

**Untersuchung der DNA-Methylierung des *SNCA*-Gens bei  
Multisystematrophie in cerebralem Cortex und Lymphocyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Eun Hae Kwon**  
aus Seoul/Korea

2017

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ullrich Wüllner
2. Gutachter: PD Dr. med. Philipp Koch

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.06.2017

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klockgether

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Multisystematrophie .....	8
1.1.1	Epidemiologie.....	8
1.1.2	Klinik und Therapie.....	9
1.1.3	Ätiopathogenese .....	11
1.2	Epigenetik und DNA-Methylierung .....	14
1.2.1	CpG-Inseln .....	15
1.2.2	Etablierung von Methylierungsmustern .....	16
1.2.3	Regulierung der Genexpression.....	17
1.2.4	Einfluss von Umweltfaktoren .....	19
1.2.5	Methylierungs-assoziierte Erkrankungen .....	20
1.3	Überblick über <i>SNCA</i> -Intron1 .....	23
1.4	Ziel der Arbeit.....	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1	Material .....	26
2.1.1	Chemikalien und Geräte.....	26
2.1.2	Untersuchungsmaterial .....	28
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Grundlagen der Bisulfitsequenzierung .....	31
2.2.2	Isolierung genomischer DNA.....	33
2.2.3	Bisulfitkonversion .....	34
2.2.4	PCR-Amplifikation .....	34

2.2.5	Klonierung .....	36
2.2.6	Kolonie-PCR .....	37
2.2.7	Sequenzierung .....	38
2.2.8	Verwendete Software und Statistik .....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
3.1	Bisulfitkonversion und PCR .....	41
3.2	Sequenzierung der Plasmid-DNA .....	42
3.3	Auswertung der Bisulfitsequenzierung .....	43
3.3.1	Methylierungsstatus in Lymphocyten und Cortex .....	44
3.3.2	Methylierungsstatus in Abhängigkeit verschiedener Parameter .....	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>51</b>
4.1	Variationen in der DNA-Methylierung .....	51
4.1.1	Vergleich zwischen MSA und Kontrollen .....	51
4.1.2	Vergleich zwischen ZNS- und Blutgewebe .....	53
4.2	DNA-Methylierung und <i>SNCA</i> -Expression .....	54
4.3	Einflussfaktoren auf die DNA-Methylierung .....	58
4.4	Limitierungen dieser Arbeit .....	60
4.5	Klinische Relevanz .....	61
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
∞	Unendlich
AD	Alzheimer-Demenz
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
AP2	Activating protein 2
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
bp	Basenpaar
BS	Bisulfit
C1	Ein-Kohlenstoff
CCD	Charge-coupled device
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
Ctrl	Kontrollen
D2	Dopamin 2
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDG-PET	Fluor-Desoxyglucose Positronen-Emissions-Tomographie
GCI	Glial cytoplasmic inclusions
GEPARD	Genbank Parkinson'sche Krankheit Deutschland
LB	Lysogeny broth (Medium)
LBD	Lewykörperchen-Demenz
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LOI	Loss of imprinting
LYMPH	Lymphocyten

M	Mol
max.	Maximal
MeCP	Methyl-CpG-bindende Proteine
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
MTHRF	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
n	Stichprobe
p	Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Morbus Parkinson
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PSEN	Präsenilin
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAH	S-Adenosylhomocystein
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SAM	S-Adenosylmethionin
SNCA	Alpha-Synuclein
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SP1	Specifity protein 1
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPSS	Statistic Package for Social Sciences
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TESS	Transcription Element Search System
TET	Ten-eleven-translocation
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	Times gravity
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Multisystematrophie

Die Multisystematrophie (MSA) ist eine in der Regel sporadisch auftretende neurodegenerative Erkrankung mit progressivem Verlauf. Unter dem Begriff „*multiple system atrophy*“ fassten Graham und Oppenheimer 1969 die drei Krankheitsentitäten Shy-Drager-Syndrom, striatonigrale Degeneration und olivopontocerebelläre Atrophie auf Grundlage ihrer klinikopathologischen Gemeinsamkeiten zusammen (Graham und Oppenheimer, 1969). Klinisch präsentiert sich die MSA durch autonomes Versagen in Kombination mit cerebellärer Ataxie oder einem Parkinsonismus, der kaum auf L-Dopa reagiert (Gilman et al., 1999, 2008). Je nach prädominierender motorischer Dysfunktion wird die MSA in MSA-P mit Parkinson-Syndrom und in MSA-C mit cerebellärem Syndrom unterteilt (Gilman et al., 1999; Quinn, 1989). Von den klinischen Variationen unabhängig stellen  $\alpha$ -Synuclein-positive oligodendrogliale cytoplasmatische Einschlusskörperchen das pathognomische neuropathologische Merkmal der MSA dar (Papp et al., 1989; Wakabayashi et al., 1998).

#### 1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der MSA wird auf ca. 0,6 und die Prävalenz zwischen 1,9 und 4,9 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Bjornsdottir et al., 2013; Bower et al., 1997; Schrag et al., 1999; Stefanova et al., 2009). Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen (Stefanova et al., 2009; Wüllner et al., 2004). Eine prospektive multizentrische Kohortenstudie der *European MSA Study Group* ermittelte einen durchschnittlichen Erkrankungsbeginn mit 56 Jahren und eine mittlere Überlebenszeit von 9,8 Jahren (Wenning et al., 2013). Gemäß den Konsensuskriterien wurden 62 % der kaukasischen Patienten der MSA-P und 38 % der MSA-C zugeordnet. Die Tatsache, dass in der japanischen Population der Anteil an MSA-C mit 83,8 % gegenüber MSA-P mit 16,2 % überwiegt (Yabe et al., 2006), impliziert eine genetische und umwelt-bedingte Komponente in der Krankheitsentstehung.

### 1.1.2 Klinik und Therapie

Angesichts klinisch überlappender Symptomatik insbesondere mit dem idiopathischen Parkinson-Syndrom gestaltet sich die Diagnosestellung der MSA als herausfordernd. Einer 1995 durchgeführten Untersuchung zufolge wurden 12 von 35 MSA-Fällen bis zur Obduktion falsch als idiopathisches Parkinson-Syndrom klassifiziert (Wenning et al., 1995). Selbst durch erfahrene Neurologen konnte die Diagnose nach ca. 3 Jahren Erkrankungsdauer lediglich in 50 % der Fälle korrekt gestellt werden (Litvan et al., 1997). Erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium werden alle Kardinalsymptome mit autonomem Versagen, Parkinsonismus, cerebellärer Ataxie und Pyramidenbahnläsion manifest. Anhand von Konsensuskriterien wird die Diagnose der MSA in die Kategorien „möglich“, „wahrscheinlich“ und „gesichert“ eingeteilt (Gilman et al., 1999, 2008; s. Tab. 1). In der überarbeiteten Fassung sind die Kriterien um die Befunde aus den bildgebenden Verfahren erweitert.

Der Parkinsonismus stellt die häufigste klinische Manifestationsform dar (Wenning et al., 2004, 2013). Akinese und Rigor sind oft symmetrisch ausgeprägt. Anstelle des klassischen Ruhetremors wie bei PD imponiert bei MSA vielmehr ein Haltetremor. Die cerebelläre Symptomatik umfasst Gang- und Extremitätenataxie, Dysarthrie und Okulomotorikstörung (Gilman et al., 2008). Durch den raschen Erkrankungsprogress werden die Patienten nach ca. 6 Jahren rollstuhlpflichtig (Klockgether et al., 1998). Der Nachweis eines autonomen Versagens wird als diagnostisches Kriterium gefordert. Die erektile Dysfunktion zeigt sich früh und betrifft später alle männlichen Patienten. Eine Blasenentleerungsstörung tritt häufiger auf als eine symptomatische orthostatische Hypotension (Wenning et al., 2013). Ein positives Pyramidenbahnzeichen findet sich in der Hälfte aller Fälle (Gilman et al., 1999). Obwohl die Demenz als Ausschlusskriterium für die Diagnose der MSA gewertet wird, häufen sich Berichte über frontal-exekutive Funktionsstörungen (Dujardin et al., 2003) und kognitive Einschränkungen (Kawai et al., 2008), die mit einer Atrophie des Frontalhirns korrelieren (Chang et al., 2009).

**Tab. 1:** Konsensus-Diagnosekriterien für die Multisystematrophie (MSA) (nach Gilman et al. 2008)

<b>Möglich</b>	<p>Parkinson-Syndrom <b>oder</b> cerebelläres Syndrom</p> <p><b>plus</b></p> <p>mindestens ein Symptom hinweisend auf eine autonome Störung</p> <p><b>und</b></p> <p>mindestens ein zusätzliches Merkmal:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Babinski-Zeichen mit Hyperreflexie</li> <li>• Stridor</li> </ul> <p><u>MSA-P</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• rasch progredientes Parkinson-Syndrom</li> <li>• geringes Ansprechen auf L-Dopa</li> <li>• posturale Instabilität innerhalb von 3 Jahren</li> <li>• Dysphagie innerhalb von 5 Jahren nach Einsetzen motorischer Symptome</li> <li>• Atrophie von Putamen, mittlerem Kleinhirnstiel, Pons oder Kleinhirn im MRT</li> <li>• Hypometabolismus im Putamen, Hirnstamm oder Kleinhirn im FDG-PET</li> </ul> <p><u>MSA-C</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrophie von Putamen, mittlerem Kleinhirnstiel oder Pons im MRT</li> <li>• Hypometabolismus im Putamen im FDG-PET</li> <li>• Präsynaptische nigrostriatale dopaminerger Denervierung im SPECT oder PET</li> </ul>
<b>Wahrscheinlich</b>	<p>Autonome Störung mit Blaseninkontinenz</p> <p><b>oder</b></p> <p>orthostatischer Blutdruckabfall bei 3-minütigem Stehen von &gt; 30 mmHg systolisch oder &gt; 15 mmHg diastolisch</p> <p><b>plus</b></p> <p>Parkinson-Syndrom mit geringem Ansprechen auf L-Dopa</p> <p><b>oder</b></p> <p>cerebelläres Syndrom</p>
<b>Gesichert</b>	<p>Histopathologisch hohe Dichte an <math>\alpha</math>-Synuclein-positiven glialen cytoplasmatischen Einschlüssen in Verbindung mit degenerativen Veränderungen im nigrostriatalen und olivopontocerebellären System</p>

Die Therapieoptionen bei MSA sind auf symptomatische Maßnahmen limitiert. Trotz des auf lange Sicht eintretenden Wirkverlusts werden vorübergehend Ansprechraten bis zu 30-40 % auf L-Dopa bei MSA-P erzielt (Colosimo et al., 2005; Hughes et al., 1992; Wenning et al., 1994). Miktionsstörungen, die in besonderem Maße die Lebensqualität einschränken, werden mit Anticholinergika und  $\alpha$ 1-Blockern kontrolliert. Für die orthostatische Hypotonie eignen sich neben einer medikamentösen Therapie z. B. mit

Mineralokortikoidanaloga auch nicht-medikamentöse Maßnahmen wie die nächtliche Oberkörperhochlagerung. Eine wirksame Behandlung der cerebellären Symptomatik ist nicht bekannt (Wenning und Stefanova, 2009).

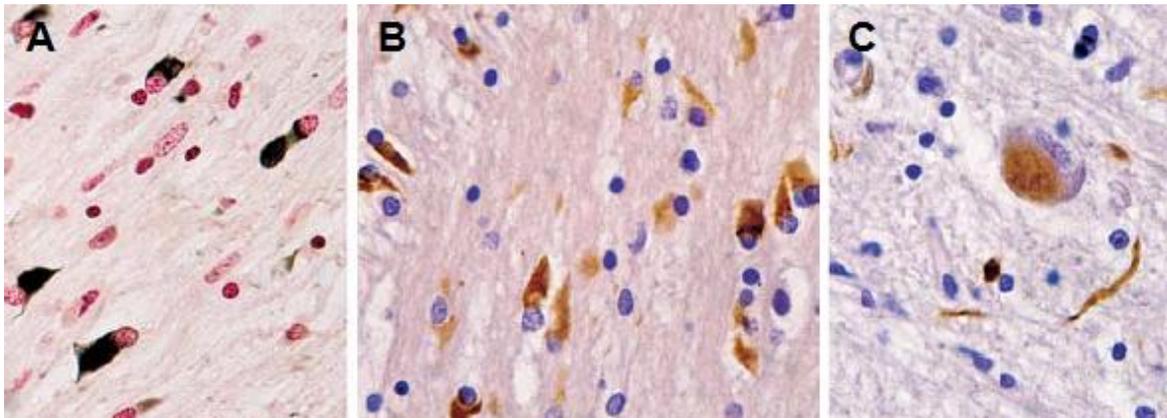
Mit wachsenden Erkenntnissen in der MSA Pathophysiologie wurden auf Krankheitsmodifikation ausgerichtete Therapieansätze erforscht. Neuroprotektive Effekte wurden für Rasagilin, Wachstumshormon, Fluoxetin und mesenchymalen Stammzellen in transgenen Tiermodellen nachgewiesen (Holmberg et al., 2007; Stefanova et al., 2008; Stemberger et al., 2011; Ubhi et al., 2012). Die Translation in klinische multizentrische Studien erbrachte für Rasagilin und Wachstumshormone negative Resultate (Holmberg et al., 2007; Poewe et al., 2014). Die Ergebnisse der abgeschlossenen Studie für Fluoxetin sind noch nicht publiziert (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01146548). Für mesenchymale Stammzellen, die MSA-C-Patienten intravenös verabreicht wurden, ließ sich in einer koreanischen Studie eine Verzögerung der klinischen Progression verzeichnen (Lee et al., 2012).

### 1.1.3 Ätiopathogenese

#### Neuropathologie

Den klinisch variablen Phänotypen der MSA liegen neuropathologische Korrelate zugrunde. Schwerpunkte der Gliosen und Nervenzelluntergänge betreffen das nigrostriatale System mit Putamen und *Substantia nigra* sowie das cerebelläre System einschließlich der mittleren Kleinhirnschenkel, dem unteren Olivenkern und der Ponsbasis (Adams et al., 1961, 1964; Burn und Jaros, 2001; Lantos, 1998; Quinn, 1989). Zur autonomen Dysfunktion tragen Neuronenverluste im *Locus coeruleus*, in den intermediolateralen Zellsäulen und im Onuf's Kern des Rückenmarks bei (Kume et al., 1993; Ozawa et al., 2004; Wenning et al., 1996, 1997). Als charakteristisches Merkmal weist die MSA  $\alpha$ -Synuclein-haltige oligodendrogliale cytoplasmatische Einschlusskörperchen (*glial cytoplasmic inclusions*, GCI) auf (Inoue et al., 1997; Papp et al., 1989; Wakabayashi et al., 1998; s. Abb. 1), deren Nachweis die Diagnose der MSA sichert. Damit zählt sie mit dem Morbus Parkinson (PD) und der Lewy-Körperchen-Demenz (LBD) zur Gruppe der Synucleinopathien (Spillantini et al., 1998). Die diffus verstreuten

GICs sind vorwiegend in den Basalganglien, im supplementären und primären Motorcortex, in der *Formatio reticularis* und im Pons lokalisiert (Papp und Lantos, 1994).  $\alpha$ -Synuclein-haltige Einschlusskörperchen befinden sich darüber hinaus in geringeren Mengen auch im Nucleus von Oligodendrocyten sowie im Cytoplasma und Nucleus von Neuronen und in Neuriten (Kato und Nakamura, 1990; Papp und Lantos, 1992). Die Dichte an GICs korreliert größtenteils mit dem neuronalen Zellverlust und der Erkrankungsdauer (Inoue et al., 1997; Ozawa et al., 2004).



**Abb. 1:** Gliale cytoplasmatische Einschlusskörperchen bei Multisystematrophie. (A) Gallyas-Silberfärbung im *Globus pallidus* und (B)  $\alpha$ -Synuclein-Immunfärbung im Pons. (C) Pontine Einschlusskörperchen im neuronalen Cytoplasma und in Neuriten (Wenning und Jellinger, 2005)

### $\alpha$ -Synuclein

Als Hauptbestandteil der oligodendroglialen Einschlusskörperchen steht  $\alpha$ -Synuclein im Fokus biochemischer und molekulargenetischer Untersuchungen (Spillantini et al., 1998). Das aus 140 Aminosäuren bestehende Protein findet sich hauptsächlich in den präsynaptischen terminalen Nervenendigungen (Jakes et al., 1994; Maroteaux et al., 1988).  $\alpha$ -Synuclein wird aber auch in anderen Geweben, u. a. in Zellen des hämatopoetischen Systems, exprimiert (Jakes et al., 1994; Michell et al., 2005; Shin et al., 2000). Die physiologische Funktion des  $\alpha$ -Synucleins wird in der Regulation der Dopaminbiosynthese, der synaptischen Plastizität und des Vesikelzyklus vermutet (Clayton und George, 1998; Lotharius und Brundin, 2002; Perez et al., 2002). Biochemisch liegt  $\alpha$ -Synuclein in hyperphosphorylierter Form vor, welche *in vitro* die

fibrilläre Formation begünstigt (Fujiwara et al., 2002; Paleologou et al., 2008), während die Nitrierung von  $\alpha$ -Synuclein die Suszeptibilität für oxidativen Stress steigert (Duda et al., 2000; Giasson et al., 2000). Eine begleitende neuroinflammatorische Komponente mit mikroglialer Aktivierung und reaktiver Astrocytose wird als pathogener Trigger der neuronalen Degeneration bei MSA diskutiert (Ishizawa et al., 2004; Stefanova et al., 2007). Neben  $\alpha$ -Synuclein akkumuliert Phosphoprotein p25 $\alpha$  in den oligodendroglialen Einschlusskörperchen, welches vom Myelin in das Zellsoma der Oligodendrocyten umverteilt wird und dadurch die GCI-Formierung beschleunigt (Song et al., 2007).

### **Genetik**

Obgleich die MSA im Allgemeinen sporadisch auftritt, gibt es vereinzelt Berichte über familiäre MSA-Fälle (Hara et al., 2007; Soma et al., 2006; Wüllner et al., 2004). In Norddeutschland wurde eine Familie mit zwei Betroffenen (MSA-P) in zwei aufeinanderfolgenden Generationen mit autosomal-dominantem Vererbungsmuster identifiziert, deren Diagnose histopathologisch gesichert wurde (Wüllner et al., 2004, 2009). Bei Verwandten 1. Grades von MSA-Patienten wurde eine Häufung von Parkinsonismus beobachtet (Vidal et al., 2010). Duplikationen und Triplikationen des  $\alpha$ -Synuclein-Gens (*SNCA*) verursachen einen familiären Morbus Parkinson, der mit klinischen und neuropathologischen Merkmalen der MSA einhergeht (Fuchs et al., 2007; Gwinn-Hardy et al., 2000; Ross et al., 2008; Singleton et al., 2003). Kürzlich wurde in einer britischen Familie mit juvenilem Parkinsonismus von autosomal-dominantem Erbgang eine G51D *SNCA* Mutation nachgewiesen (Kiely et al., 2013). Neuropathologisch zeigten sich neben PD-charakteristischen Befunden GCI-ähnliche oligodendrogliale Einschlusskörperchen, was auf einen gemeinsamen molekulargenetischen Pathomechanismus von PD und MSA hinweist. Eine Genmutation innerhalb der kodierenden Region des *SNCA*-Gens konnte bei MSA bislang nicht detektiert werden (Hara et al., 2007; Ozawa et al., 1999). Auch lassen die wenigen publizierten Daten über *SNCA*-Expressionslevel bei MSA keine heraufregulierte *SNCA*-Expression auf mRNA-Level erkennen (Asi et al., 2014; Jin et al., 2008; Langerveld et al., 2007; Miller et al., 2005; Ozawa et al., 2001; Vogt et al., 2006). In einer 2009 durchgeführten genomweiten Assoziationsstudie wurden erstmalig genetische Variationen im *SNCA*-Gen in Form von *single-nucleotide-polymorphisms* (SNPs)

identifiziert (rs3822066 und rs11931074), die mit einem erhöhten MSA-Risiko assoziiert sind (Scholz et al., 2009). Der zugehörige Haplotyp-Block erstreckt sich von Intron4 bis zur 3' untranslatierten Region des *SNCA*-Gens. Interessanterweise gelten beide SNPs auch als Risikofaktor für die PD. Dieser Befund konnte in zwei weiteren europäischen Studien (Al-Chalabi et al., 2009; Ross et al., 2010), aber nicht in einer koreanischen Kohorte (Yun et al., 2010) repliziert werden, was die Komplexität der populationspezifischen Heterogenität unterstreicht.

### **Umweltfaktoren**

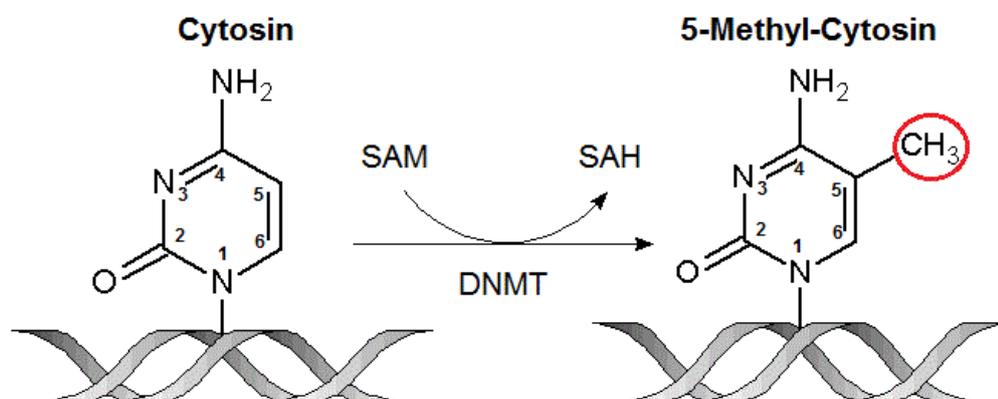
Neben der genetischen Komponente wird der Einfluss von Umweltfaktoren und Lifestyle in der MSA Pathogenese im Rahmen einer komplexen, multifaktoriellen Erkrankung diskutiert (Brown et al., 2005; Cannon und Greenamyre, 2011; Migliore und Coppedè, 2009). MSA-Patienten zeigten eine vermehrte Exposition gegenüber Umwelttoxinen wie bestimmten Metallen, Plastikmonomeren, organischen Lösungsmitteln und Pestiziden (Nee et al., 1991). Die Beschäftigung in der Landwirtschaft war mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MSA assoziiert (Vanacore et al., 2005). Die nachfolgenden Fall-Kontroll-Studien konnten den Zusammenhang zwischen beruflicher Exposition gegenüber Umwelttoxinen und erhöhtem Erkrankungsrisiko allerdings nicht bestätigen. Auch bezüglich weiterer Umweltfaktoren wie Ernährung, Rauchen und Alkohol sind die Ergebnisse uneinheitlich (Seo et al., 2010; Vidal et al., 2008).

### **1.2 Epigenetik und DNA-Methylierung**

Der Embryologe Conrad Hal Waddington führte 1942 den Begriff „*epigenotype*“ ein, um den komplexen Entwicklungsprozess ausgehend vom Genotyp zum phänotypischen Resultat zu beschreiben (Waddington, 1942). In der engeren Definition bezieht sich die Epigenetik auf Veränderungen in der Genexpression, die meiotisch und mitotisch vererbbar, aber nicht durch Veränderungen der DNA-Primärsequenz bestimmt sind (Egger et al., 2004; Russo et al., 1996). Zu den epigenetischen Mechanismen gehören DNA-Methylierung, Histonmodifikation und RNA-vermittelte Geninaktivierung, die in Interaktion Chromatinstruktur und Genexpression beeinflussen (Bird, 2007; Feil und Fraga, 2012; Jaenisch und Bird, 2003). Unter epigenetischer Kontrolle stehen

grundlegende biologische Prozesse wie Zellproliferation und -differenzierung, aber auch die dynamische Adaptationsfähigkeit des Organismus auf endogene und exogene Faktoren im Rahmen des Alterungsprozesses.

Die DNA-Methylierung stellt den am besten untersuchten Mechanismus in der Epigenetik und das zentrale Thema dieser Arbeit dar. An die 5'-Position des Pyrimidinrings der DNA-Base Cytosin wird postreplikativ eine Methylgruppe kovalent gebunden, um eine weitere DNA-Base, das 5-Methylcytosin, zu bilden. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Enzymgruppe der DNA-Methyltransferasen (DNMT) unter Verbrauch des S-Adenosylmethionins (SAM) als Methylgruppendonor (Herman und Baylin, 2003; s. Abb. 2). Bei Säugetieren liegt die Zielsequenz der DNA-Methylierung im Kontext von 5'-CpG-3'-Dinucleotiden, die von DNMTs bevorzugt erkannt werden (Gruenbaum et al., 1982). Der palindromische Aufbau ermöglicht die Weitergabe des Methylierungsmusters in einem semikonservativen Vererbungsmodus (Razin und Riggs, 1980).



**Abb. 2.:** Reaktion der Cytosin-Methylierung mithilfe der DNA-Methyltransferasen (DNMT). Nach Verbrauch der Methylgruppe des S-Adenosinmethionins (SAM) entsteht S-Adenosinhomocystein (SAH) (modifiziert nach Herman und Baylin, 2003)

### 1.2.1 CpG-Inseln

Als CpG-Insel wird ein DNA-Abschnitt bezeichnet, in dem die in eukaryotischen DNA-Sequenzen relativ selten vorkommenden CpG-Dinucleotide gehäuft auftreten

(Antequera und Bird, 1993; Bird, 2002; Gardiner-Garden und Frommer, 1987; Illingworth und Bird, 2009). Definiert werden CpG-Inseln durch die folgenden Kriterien: eine DNA-Sequenz > 200 bp mit einem G+C Gehalt > 50 % und eine beobachtete/erwartete CpG-Ratio von > 0,6 (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Anhand dieser Kriterien wurden 25.000-29.000 CpG-Inseln ermittelt, was ca. 1 % des menschlichen Genoms ausmacht (Lander et al., 2001; Illingworth et al., 2008, 2010). Die Häufigkeit der CpG-Dinucleotidsequenz liegt um etwa ein Fünftel der erwarteten statistischen Häufigkeit von 4 % zurück (Lander et al., 2011). Diese Diskrepanz wird auf die Mutation von 5-Methylcytosin zu Thymin durch spontane Deamination zurückgeführt, denn im Gegensatz zu unmethyliertem Cytosin entgeht Thymin den DNA-Reparaturmechanismen. 70-80 % aller CpG-Dinucleotide sind methyliert (Antequera, 2003; Bird, 2002; Ehrlich et al., 1982; Lister et al., 2009). Cytosine innerhalb von CpG-Inseln sind dagegen in der Regel nicht methyliert (Antequera, 2003) und bevorzugt in Promotornähe von 60-70 % aller Gene lokalisiert (Illingworth und Bird, 2009; Saxonov et al., 2006). Die Assoziation mit Promoterregionen unterstreicht die transkriptionsregulatorische Funktion der DNA-Methylierung.

### 1.2.2 Etablierung von Methylierungsmustern

Die Etablierung und Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters werden durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) gewährleistet, die den Transfer einer Methylgruppe von SAM auf die Cytosinbase katalysieren (s. Abb. 2). Das Reaktionsnebenprodukt S-Adenosylhomocystein (SAH) hemmt die Methyltransferase durch einen negativen Feedback-Mechanismus (James et al., 2002). Die DNMT1 dient der Erhaltung des Methylierungsmusters („*maintenance*“) bei der semikonservativen Replikation. Mit ihrer Präferenz für hemimethylierte DNA methyliert sie den neu synthetisierten DNA-Strang anhand der parentalen Template-DNA (Bestor, 2000; Leonhardt et al., 1992). Die Funktion der *de novo*-Methylierung wird DNMT3a und DNMT3b zugeschrieben, die für die Etablierung embryonaler und gewebsspezifischer Methylierungsmuster essenziell sind (Okano et al., 1998, 1999). Die vereinfachte Einteilung in *maintenance*- und *de novo*-Methylierung weicht jedoch neueren Erkenntnissen, die auf eine engere

Kooperativität der DNMT-Enzyme untereinander sowie deren Interaktion mit Chromatin-modifizierenden Enzymen hinweisen (Jones und Liang, 2009).

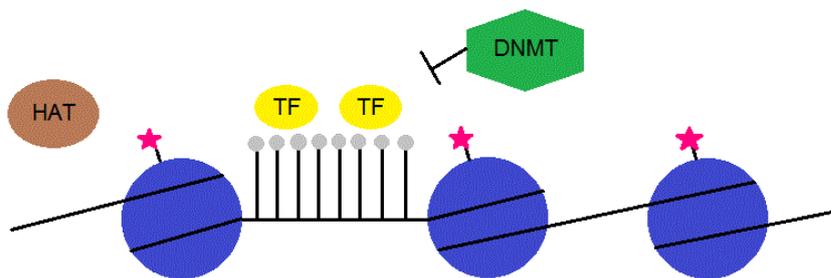
Das lange vorherrschende Konzept der DNA-Methylierung als relativ stabiles epigenetisches Merkmal wurde im Hinblick auf die Möglichkeiten einer DNA-Demethylierung und somit Reversibilität der DNA-Methylierung neu gewertet (Ramchandani et al., 1999). Die DNA-Demethylierung spielt sich sowohl in der frühen embryonalen Entwicklung (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; Reik et al., 2001; Sasaki und Matsui, 2008) als auch in terminal differenzierten Zellen wie den postmitotischen Neuronen ab (Ma et al., 2009; Weaver et al., 2004). Die passive DNA-Demethylierung erfolgt durch Inhibition bzw. Fehlen der DNMT1 (Wu und Zhang, 2010). Aktive Demethylierungsmechanismen sind noch nicht abschließend geklärt (Ooi und Bestor, 2008; Wu und Zhang, 2010). Es werden Glycosylasen und Basenexzisionsmechanismen im Rahmen von DNA-Reparaturvorgängen zur Entfernung von 5-Methylcytosin diskutiert (Cortellino et al., 2011; Gehring et al., 2009; Jiricny und Menigatti, 2008). TET (*Ten-eleven-translocation*) Proteine wandeln 5-Methylcytosin in 5-Hydroxy-Methylcytosin um, welches als Intermediat im Demethylierungsprozess fungieren könnte (Wu und Zhang, 2011).

### 1.2.3 Regulierung der Genexpression

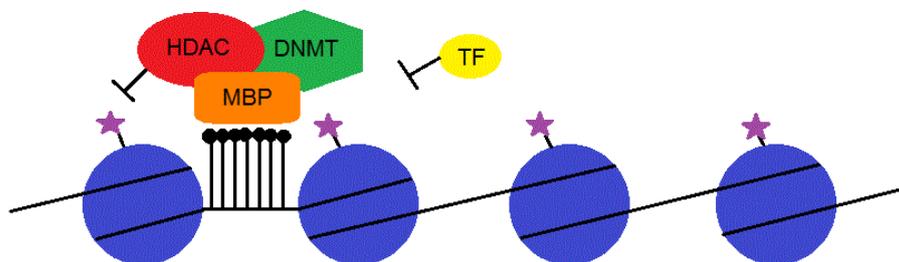
Zahlreiche Studien belegen die Rolle der DNA-Methylierung in der Regulierung der Genexpression, die insbesondere anhand der Korrelation zwischen Promotermethylierung und transkriptioneller Repression veranschaulicht wurde (Bird und Wolffe, 1999; Cedar, 1988; Siegfried et al., 1999; Weber et al., 2007). In Abbildung 3 ist der transkriptionsregulierende Mechanismus in Abhängigkeit der DNA-Methylierung und weiterer epigenetischer Faktoren schematisch dargestellt. Der unmethylierte Zustand der CpG-Inseln geht mit einer transkriptionell permissiven Chromatinkonfiguration einher (Deaton und Bird, 2011). Die aufgelockert vorliegenden Nucleosomen sind durch Histonacetylierung (H3Ac) gekennzeichnet. Hingegen ist die CpG-Methylierung mit der Inaktivierung der Genexpression (*gene silencing*) assoziiert, denen zwei Mechanismen zugrunde liegen (Bird und Wolffe, 1999; Klose und Bird,

2006; Nan et al., 1997; Tate und Bird, 1993). Zum einen blockiert die Methylgruppe in den CpG-Dinucleotiden sterisch die Bindung von Transkriptionsfaktoren mit CpG-Erkennungssequenz an die DNA. Zum anderen lagern Methyl-CpG-bindende Proteine (MeCP) an methylierte CpG-Dinucleotide an und rekrutieren weitere co-repressorische Komplexe wie Histondeacetylasen und DNMTs. In Zusammenspiel dieser Faktoren wird die Chromatinstruktur in das transkriptionell inaktive Heterochromatin überführt.

Transkriptionell aktiv



Transkriptionell inaktiv



- Unmethyliertes Cytosin
- methyliertes Cytosin
- ★ H3Ac
- ★ H3
- TF Transkriptionsfaktor
- HAT Histonacetylase
- DNMT DNA-Methyltransferase
- HDAC Histondeacetylase
- MBP Methyl-CpG-bindendes Protein

**Abb. 3:** Zusammenspiel der epigenetischen Faktoren in der Regulation der Transkriptionsaktivität über Beeinflussung der Chromatinstruktur (modifiziert nach Zardo et al., 2005)

Als wichtiger Regulator der Genexpression ist die DNA-Methylierung an verschiedenen grundlegenden biologischen Prozessen beteiligt. Bei der Inaktivierung eines X-Chromosoms bei weiblichen Säugetieren dient die DNA-Methylierung der stabilen Repression des *Xist*-Gens auf dem inaktiven X-Chromosom (Beard et al., 1995; Panning und Jaenisch, 1996). Die selektive monoallelische Genexpression beim genomischen Imprinting wird durch die DNA-Methylierung gewährleistet (Li et al., 1993; Reik und Walter, 2001). Durch die transkriptionelle Inaktivierung von Transposons und repetitiven DNA-Sequenzen trägt die DNA-Methylierung ebenso zur Stabilisierung des Genoms bei (Putiri und Robertson, 2011; Yoder et al., 1997). Darüber hinaus unterliegt die Zelltyp-spezifische Differenzierung der dynamisch regulierten DNA-Methylierung vor allem in der Embryogenese, wodurch die Identität der Zelle festgelegt wird (Gibbs et al., 2010; Reik et al., 2001; Santos et al., 2002).

#### **1.2.4 Einfluss von Umweltfaktoren**

Die potenzielle Reversibilität der DNA-Methylierung erweist sich in der Modifizierbarkeit des programmierten Methylierungsmusters durch endogene und exogene Faktoren mit Auswirkung auf Genexpression und Phänotyp (Feil und Fraga, 2012; Jaenisch und Bird, 2003). Studien monozygoter Zwillinge veranschaulichen den Einfluss von Umweltbedingungen auf die interindividuellen Unterschiede in der DNA-Methylierung, infolge dessen aus identischen Genotypen unterschiedliche Phänotypen hervorgehen (Fraga et al., 2005; Kaminsky et al., 2009; Wong et al., 2005). Neben akkumulierenden stochastischen Variationen in der DNA-Methylierung lässt sich mit zunehmendem Alter ein epigenetischer Drift mit Trend zur globalen Hypomethylierung beobachten (Bollati et al., 2009; Fraga und Esteller, 2007). Dynamische Alters-assoziierte Veränderungen der Methylierung sind auch in postmitotischen Neuronen nachweisbar (Hernandez et al., 2011; Numata et al., 2012; Siegmund et al., 2007). Diätetische Komponenten des Ein-Kohlenstoff (C1)-Metabolismus wie Folsäure, Vitamin B6 und Vitamin B12 üben über die Verfügbarkeit von Methylgruppen einen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Methylierung aus (Crider et al., 2012; Friso und Choi, 2002; Lim und Song, 2012). Das Nucleosidanalogon 5-Azacytidin stellt ein Beispiel für die chemische Modifikation der DNA-Methylierung durch Inhibition der Interaktion zwischen DNA und DNMT1 dar

(Stresemann und Lyko, 2008). Die demethylierende Aktivität von 5-Azacytidin wird über den Einsatz in experimentellen Studien hinaus als chemotherapeutisches Agens beim Myelodysplastischen Syndrom genutzt (Jones und Taylor, 1980; Kaminskas et al., 2005).

Die nachhaltige Auswirkung der DNA-Methylierung auf den Phänotyp bis in nachfolgende Generationen wurde eindrücklich anhand der *Agouti*-Genexpression im Mausmodell demonstriert (Cooney et al., 2002; Cropley et al., 2006; Wolff et al., 1998). Wurden die Muttertiere während der Schwangerschaft mit Methylgruppendonatoren gefüttert, war das *Agouti*-Gen bei den Nachkommen ebenfalls vermehrt methyliert mit phänotypischer Prägung hinsichtlich Fellpigmentierung, Stoffwechsellage, Krankheitssuszeptibilität und Lebensdauer. Vorübergehend extreme Umweltbedingungen in der frühesten Entwicklungsphase bei Menschen, die pränatal dem niederländischen Hungerwinter 1944-1945 ausgesetzt waren, führten zu langanhaltenden epigenetischen Veränderungen mit Hypomethylierung des imprintierten *IGF2*-Gens (Heijmans et al., 2008). Auch psychosoziale Faktoren wie das maternale Sozialverhalten oder frühkindliche Traumata waren mit nachhaltigen Veränderungen im Genexpressionsmuster über epigenetische Programmierung assoziiert (McGowan et al., 2009; Weaver et al., 2004).

### **1.2.5 Methylierungs-assoziierte Erkrankungen**

Die fundamentale Rolle der DNA-Methylierung für die Entwicklung und Funktion des Organismus erschließt sich aus den schwerwiegenden Erkrankungsbildern, die durch Aberrationen im Methylierungsmuster bzw. Defekte in der Methylierungsmaschinerie entstehen (Feinberg, 2007; Portela und Esteller, 2010; Robertson, 2005). Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom sind seltene neurogenetische Erkrankungen, die auf Fehlregulationen des genomischen Imprintings zurückzuführen sind. Je nach Verlust der paternal bzw. maternal imprimierten Gene auf dem Chromosom 15q11-13 resultieren variable Phänotypen mit morphologischen Anomalien, mentaler Retardierung und Verhaltensstörung (Nicholls et al., 1998; Robertson, 2005). In der Tumorgenese bezieht sich *Loss of imprinting* (LOI) auf die aberrante Expression von Onkogenen durch

Hypomethylierung spezifischer Promotorregionen. Auf der anderen Seite induziert die Hypermethylierung die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die globale Hypomethylierung in Tumorzellen geht mit chromosomaler Instabilität einher (Baylin und Herman, 2000; Esteller, 2008; Feinberg and Vogelstein, 1983). Das ICF-Syndrom (*immunodeficiency centromeric instability and facial anomalies*), eine Immunschwäche mit Anomalien des Gesichtsschädels, ist durch eine Mutation der *de novo*-Methylase DNMT3b verursacht, die durch Hypomethylierung zu einer Instabilität des pericentromerischen Heterochromatins führt (Ehrlich, 2003; Okano et al., 1999). Als häufigste Ursache mentaler Retardierung bei Frauen basiert das Rett-Syndrom auf einer Punktmutation im X-chromosomal gekoppelten *MeCP2*-Gen (Amir et al., 1999).

### **DNA-Methylierung und Neurodegeneration**

Gegenwärtig zeichnet sich die Rolle der DNA-Methylierung und weiterer epigenetischer Prozesse in neurodegenerativen Erkrankungen ab, die durch wenige bekannte Risikogene und Altersabhängigkeit charakterisiert sind (Fuso, 2013; Iraola-Guzmán et al., 2011; Marques et al., 2011; Urdinguio et al., 2009). Die bislang identifizierten genetischen Variationen bieten für die *late onset* bzw. überwiegend idiopathischen Formen keine ausreichende Erklärung, eine Erkrankung zu entwickeln (Hamza und Payami, 2010). Die phänotypische Diskordanz bei identischem Genotyp monozygoter Zwillinge verdeutlicht die Komplexität der Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Fraga et al., 2005; Mastroeni et al., 2009; Poulsen et al., 2007). Das steigende Erkrankungsrisiko im Alter wird erklärt durch die Abnahme der „phänotypischen Plastizität“, d. h. der Anpassungsfähigkeit des Organismus auf die Umwelt durch Inkorporation epigenetischer und genetischer Variationen (Bjornsson et al., 2004; Feinberg, 2007). Die Alzheimer-Demenz (AD) und der M. Parkinson (PD) stehen als die führenden neurodegenerativen Erkrankungen im Fokus der aktuellen epigenetischen Forschung. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Konzentrationen der Methylierungsmarker (SAM, SAH) und neurodegenerativen Proteinen (APP,  $\alpha$ -Synuclein), wobei ein hohes Methylierungspotenzial (SAM/SAH-Ratio) mit einer besseren kognitiven Funktion einherging (Obeid et al., 2009). Eine Homocysteinämie hingegen wird als Risikofaktor für AD gewertet (Clarke et al., 1998; Morris, 2003; Ravaglia et al., 2005; Seshadri et al.,

2002). Untersuchungen zum Methylierungsstatus bei AD ergaben die Tendenz zur globalen Hypomethylierung insbesondere in vulnerablen Hirnregionen wie *Hippocampus* sowie dem temporalen und entorhinalen Neocortex (Chouliaras et al., 2013; Mastroeni et al., 2009, 2010). Hinweise für eine Hypomethylierung des *Amyloid Precursor Protein (APP)*-Gens, die zur Ablagerung des proteolytischen Spaltprodukts Amyloid  $\beta$  beitragen könnte (Tohgi et al., 1999; West et al., 1995), ließen sich in neueren *post mortem* Hirnstudien nicht bestätigen (Barrachina und Ferrer, 2009; Brohede et al., 2010; Wang et al., 2008). Nichtsdestotrotz wurde bei AD-Patienten ein alters-abhängiger epigenetischer Drift in wichtigen Genen beobachtet, die an der A $\beta$ -Prozessierung (PSEN1, APOE) und am Methylierungsvorgang (MTHRF, DNMT1) beteiligt sind (Wang et al., 2008).

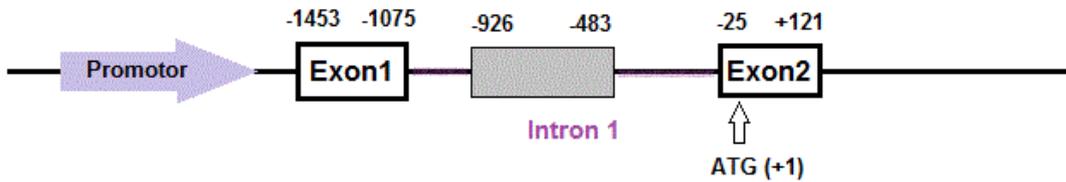
Vor dem Hintergrund der Hypothese einer aberranten Expression des *SNCA*-Gens in der PD-Pathogenese mit nachfolgender Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in Lewy-Körperchen, wurde der Methylierungsstatus im *SNCA*-Gen hinsichtlich eines transkriptionsregulatorischen Einflusses untersucht. Die ersten Hinweise einer epigenetisch regulierten *SNCA*-Genexpression entstammen Studien, die über eine Hypermethylierung des *SNCA*-Promotors bei Patienten mit chronischem Alkoholismus (Bönsch et al., 2005) und Anorexia nervosa (Frieling et al., 2007) berichteten. Ein PD-Patient mit heterozygoter p.Ala53Thr-Mutation wies bei kompensatorisch heraufregulierter Expression des Wildtyp-Allels eine Inaktivierung des mutierten Allels durch Histonmodifikation und nicht durch DNA-Methylierung auf (Voutsinas et al., 2010). Dennoch wurde durch zwei Arbeitsgruppen eine transkriptionsregulatorische Funktion im Intron1-Abschnitt des *SNCA*-Gens mit inverser Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Expressionslevel bei PD nachgewiesen (Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). In beiden Studien zeigte sich eine *SNCA*-Hypomethylierung in der *Substantia nigra* bei PD-Patienten, in der Studie von Jowaed et al. (2010) darüber hinaus auch im Putamen und Cortex. Als Mechanismus der Hypomethylierung wurde eine Sequestrierung von DNMT1 vom Nucleus ins Cytoplasma durch Assoziation mit  $\alpha$ -Synuclein postuliert (Desplats et al., 2011). Bei der LBD konnten keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Methylierung gegenüber Kontrollen nachgewiesen werden (De Boni et al., 2011). Die bislang noch wenigen *SNCA*-Methylierungsanalysen im

peripheren Blut ergaben sowohl eine Hypomethylierung bei PD (Ai et al., 2014; Schmitt et al., 2015; Tan et al., 2014) als auch fehlende Methylierungsunterschiede gegenüber Kontrollen (Richter et al., 2012; Song et al., 2014). In Zusammenschau der bisherigen Befunde erscheint die aberrante DNA-Methylierung für die Dysregulation der *SNCA*-Expression als interessanter Ansatzpunkt in der Pathogenese von Synucleinopathien.

### **1.3 Überblick über *SNCA*-Intron1**

Das humane *SNCA*-Gen wird auf dem langen Arm des Chromosoms 4 im Bereich 21-23 kartiert und umfasst ca. 112 kb. Zusammengesetzt ist das Gen aus 6 Exonen (Xia et al., 2001). Exon 2 kodiert für das Translations-Startcodon ATG. Der Promotor befindet sich in 5'-Richtung vom Exon1 (s. Abb. 4A). Das *SNCA*-Gen enthält zwei CpG-Inseln; eine CpG-Insel befindet sich im nicht-kodierenden Bereich des ersten Exons und eine weitere im Intron1-Abschnitt (Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Angesichts der Ansprechbarkeit auf die Wachstumsfaktoren NGF/bFGF (Clough und Stefanis, 2007) sowie der Bindung des Transkriptionsfaktors GATA (Scherzer et al., 2008; s. Abb. 4B) wird dem Intron1-Abschnitt eine promotorähnliche Funktion in der Regulation der *SNCA*-Transkription zugeschrieben. Ferner wurde gezeigt, dass die *SNCA*-Expression durch die DNA-Methylierung im *SNCA*-Intron1 beeinflusst wird (Jowaed et al., 2010, Matsumoto et al., 2010).

A



B

-926  
**Forward primer**  
 GGAGCCTAAGGAAAGAGACTTGACCTGGCTTT**CGT**CCTGCTTCTGATATTCCCTTCTCCACAAGG

1

2 3 4 5 6  
 GCTGAGAGATTAGGCTGCTTCT**CGGGATCCGC**TTTTCC**CCCG**GGAAAC**CGC**GAGGATGCTCCATG  
 ADR1 GATA-2 GAL4

7 8  
 GAG**CGT**GAGCATCCAACCTTTTCTCTCACATAAAATCTGTCTG**CCCGCTCTCT**TGGTTTTTCTCTGT  
 Sp1,ER- $\alpha$ ,LF-A1,Yi,GAGA

9  
 AAAGTAAGCAAGCT**CG**TTTGGCAAATAATGAAATGGAAGTGCAAGGAGGCCAAGTCAACAGGT

10 11 12 13 14 15  
 GGTAAC**CGG**GTTAACAAGTGCTGG**CGCGGGG**TCC**CG**CTAGGGTGGAGGCTGAGAAC**CGCCCCCTCG**

H4TF2

16 17 18 19 20 21 22  
 GGTGGCTGG**CGCG**GGGTTGGAGAC**CGCCCGC**GAGTGTGAG**CGGCGC**CTGCTCAGGGTAG**GATA**  
 T-Ag,GCF

23  
**Reverse primer**  
 GCTGAGGG**CGGGG**TGGATGTTGGATGGATTAGAA**CCATCACACTTGGGCCTGCTGTTTG**  
 HiNF-C,Ttk,Yi,Sp1,  
 AP2,ETF,CP1,ER- $\alpha$  -483

**Abb. 4:** Die untersuchte Region des *SNCA*-Gens im Intron1-Abschnitt (nach Jowaed et al., 2010). (A) Schematischer Aufbau des *SNCA*-Gens im Startbereich. (B) Positionen der 23 CpG-Dinucleotide eingerahmt von Primer-Bindungsstellen im *SNCA*<sub>(-926/-483)</sub>. Unterstrichen sind Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren nahe den CpG-Positionen, die sich zwischen MSA- und Kontrollproben signifikant unterschieden

Basierend auf der Arbeit von Jowaed et al. (2010) wurde das *SNCA*-Gen im Intron1-Abschnitt -926 bis -483 stromaufwärts des Translations-Startcodons ATG untersucht (s. Abb. 4). Als Nucleotid Nr. 1 wurde das Adenin des ATG-Startcodons festgelegt. Der Methylierungsstatus bei MSA-Patienten und neurologisch Gesunden wurde in einem PCR-Amplifikat im Intron1 ermittelt, welches 23 CpG-Dinucleotide der CpG-Insel umfasst.

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Nach dem derzeitigen Wissensstand deuten die neuropathologischen Erkenntnisse und die Daten einer genomweiten Analyse auf eine Schlüsselrolle der  $\alpha$ -Synuclein Prozessierung in der Pathogenese der MSA hin (Stefanova et al., 2009). Auch eine Beeinflussung durch Umweltfaktoren erscheint wahrscheinlich. Untersuchungen, ob epigenetische Modifikationen zur Regulation der *SNCA*-Expression bei MSA beitragen könnten, gibt es jedoch bislang nicht. Das Ziel dieser Arbeit war daher, in Analogie zu den Methylierungsanalysen von PD und LBD, den Methylierungsstatus des *SNCA*-Gens im Intron1 im Cortex und in Lymphocyten von MSA-Patienten und neurologisch gesunden Kontrollen zu bestimmen. Dabei wurde untersucht, (1) ob sich der Methylierungsstatus im *SNCA*-Intron1 zwischen MSA und Kontrollen unterscheidet, (2) inwieweit die DNA-Methylierung zwischen peripherem Blut und ZNS variiert, (3) auf welche Weise ein verändertes Methylierungsmuster Einfluss auf die *SNCA*-Expression haben könnte und (4) ob der Methylierungsgrad mit Alter, Geschlecht, Medikation oder Erkrankungsdauer assoziiert ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, München
Blue Dextran	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DNA-Größenmarker (100 bp Ladder)	NatuTec, Frankfurt
dNTPs	NatuTec, Frankfurt
<i>E. coli</i> Top 10 F'	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Fast Red	Roth, Karlsruhe
Ficoll Typ 400	Sigma, München
Formamid	Sigma, München
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
LB Broth	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-EDTA	Merck, Darmstadt
Oligonucleotid-Primer SYN-Forward 1, SYN-Reverse 2	Thermo Scientific, Ulm
SDS	Sigma, München
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-HCl	Merck, Darmstadt

**Enzyme und Puffer**

Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
1x TAE Puffer	Merck, Darmstadt
Taq-Polymerase	Segenetic, Borken
10x Puffer A1	Segenetic, Borken

**Kits**

EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Hiss, Freiburg
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Hiss, Freiburg
BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

**Geräte**

Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Gel-Dokumentationssystem	Intas, Göttingen
Gelelektrophorese-Apparatur	Biorad, München
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pipetten	Gilson, Middleton, Bundesstaat, USA Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Sequenzer ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Spektralphotometer: Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilisator	Webeco, Selmsdorf

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X-Tracta	Biozym Scientific, Oldendorf
Zentrifugen: Biofuge Primo R, Megafuge	Heraeus, Hanau

### Verbrauchsmaterialien

Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Greiner-Bio-One, Frickenhausen Brand, Wertheim

### 2.1.2 Untersuchungsmaterial

Lymphocytenproben aus peripherem Blut entstammen der Genbank Parkinson'scher Krankheit Deutschland (GEPARD, Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Lfd. No. 51/00). Untersucht wurde die DNA von 19 MSA Patienten, darunter 10 Männern und 9 Frauen im Alter von  $60 \pm 7$  Jahren (s. Tab. 2). 13 Patienten wurden klinisch als MSA vom cerebellären Typ (MSA-C) klassifiziert, 5 Patienten wurden dem Parkinson-Typ (MSA-P) zugeordnet. Bei einer Patientin konnte der MSA-Subtyp nicht festgelegt werden. Weitere Angaben über die Proben bezüglich Erkrankungsbeginn, -dauer und L-Dopa-Einnahme werden in der Tabelle 2 aufgeführt. Als Kontrollen dienten 17 Lymphocytenproben neurologisch gesunder Individuen, darunter 9 Frauen und 8 Männer im Alter von  $57 \pm 17$  Jahren (s. Tab. 3).

**Tab. 2:** Lymphocyten-DNA von MSA-Patienten aus der Genbank Parkinson'scher Krankheit Deutschland (GEPARD)

Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Diagnose	Alter bei Onset [Jahre]	L-Dopa [mg/Tag]	Erkrankungs- dauer [Jahre]
126x01	weiblich	72	MSA-C	63	0	9
47x01	weiblich	56	MSA-P	53	950	3
165x01	weiblich	64	MSA-C p	58	0	6
210x01	weiblich	63	MSA-P	61	k. A.	2
68x02	weiblich	65	MSA	59	500	6
76x01	weiblich	59	MSA-C	58	0	1
3x01	weiblich	64	MSA-P	59	550	5
23x01	weiblich	50	MSA-C p	46	0	4
294x01	weiblich	64	MSA-C p	60	50	4
191x01	männlich	64	MSA-P	60	400	4
246x01	männlich	60	MSA-C	52	0	8
44x01	männlich	63	MSA-C p	61	0	2
45x01	männlich	59	MSA-C p	56	0	3
548x01	männlich	65	MSA-C p	58	0	7
57x01	männlich	57	MSA-C p	k.A.	0	k.A.
162x01	männlich	67	MSA-P	67	150	1
473x01	männlich	52	MSA-C p	49	0	3
1520x01	männlich	53	MSA-C	48	0	5
222x01	männlich	42	MSA-C	38	0	4

p = *probable* (wahrscheinlich); k. A. = keine Angaben

**Tab. 3:** Lymphocyten-DNA von Kontrollpersonen aus der Genbank Parkinson'scher Krankheit Deutschland (GEPARD)

Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]
RZ112	weiblich	42	RZ94	männlich	75
RZ421	weiblich	53	RZ884	männlich	78
RZ307	weiblich	50	RZ268	männlich	44
RZ323	weiblich	73	RZ1111	männlich	55
RZ1139	weiblich	77	285x02	männlich	41
RZ898	weiblich	36	1081p01	männlich	50
RZ847	weiblich	76	120k3	männlich	32
RZ825	weiblich	72	1186x02	männlich	37
RZ293	weiblich	78			

*Post mortem* Cortexgewebe wurde freundlicherweise aus dem Obduktionsgut der *Queen Square Brain Bank for Neurological Disorders*, London, bereitgestellt. Zur DNA-Isolation wurden Gewebeproben von 10 MSA Patienten, 6 Männern und 4 Frauen im Alter von  $70 \pm 8$  Jahren und 10 Kontrollen, 5 Männern und 5 Frauen im Alter von  $82 \pm 5$  Jahren verwendet (s. Tab. 4 und 5).

**Tab. 4:** Cortex-DNA von MSA-Patienten aus *Queen Square Brain Bank for Neurological Disorders*, London

Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	max. L-Dopa [mg/Tag]	Erkrankungsdauer [Jahre]
895	weiblich	86	500	7
774	weiblich	70	0	5
686	weiblich	75	1000	9
631	weiblich	65	1000	7
881	männlich	72	0	4
769	männlich	78	1200	6
776	männlich	61	1600	5
P31/96	männlich	70	700	8
P32/95	männlich	60	0	4
P2/97	männlich	59	100	6

**Tab. 5:** Cortex-DNA von Kontrollpersonen aus *Queen Square Brain Bank for Neurological Disorders*, London

Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]
934	weiblich	83
888	weiblich	84
731	weiblich	81
C2/98	weiblich	74
C5/97	weiblich	77

Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]
812	männlich	91
677	männlich	86
936	männlich	85
893	männlich	79
758	männlich	86

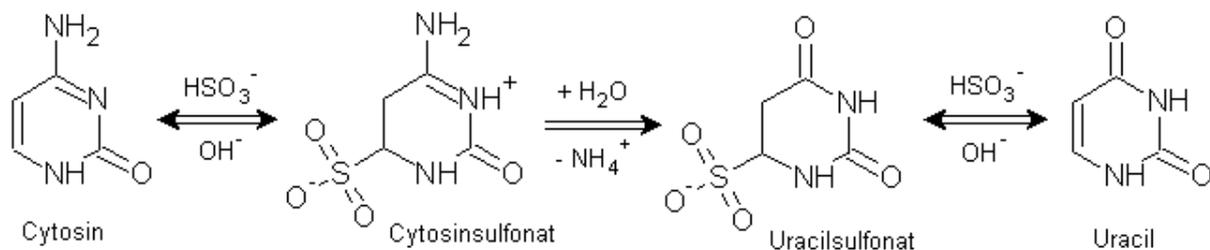
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Grundlagen der Bisulfitsequenzierung

Die Sequenzierung nach Behandlung genomischer DNA mit Natriumbisulfit bietet die Möglichkeit, jedes einzelne Cytosin-Molekül einer Zielsequenz auf das Vorhandensein einer Methylierung am C5-Atom im CpG-Kontext zu prüfen. Eingeführt wurde diese Methodik von Frommer et al. (1992) und Clark et al. (1994). Das grundlegende Prinzip

der Bisulfitbehandlung beruht auf der Umwandlung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil durch selektive Desaminierung in drei Reaktionsschritten (s. Abb. 5):

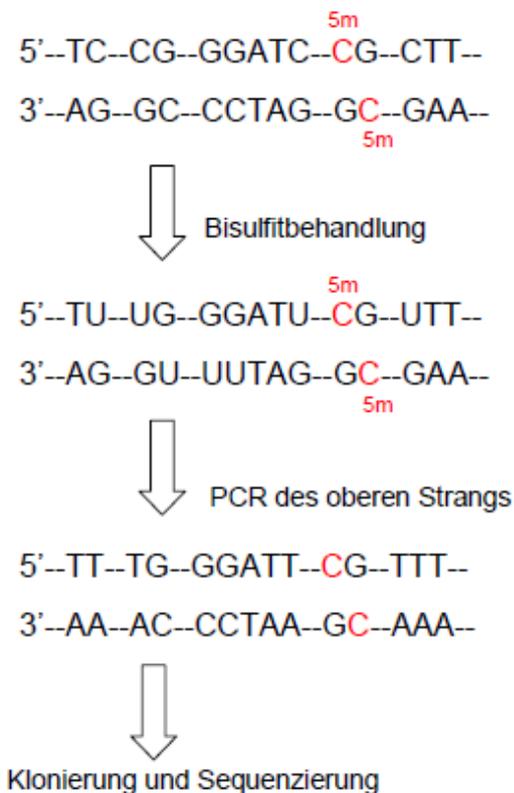
1.) Bei der Sulfonierung lagert sich das Bisulfition ( $\text{HSO}_3^-$ ) reversibel an die 5-6 Doppelbindung des Cytosins. 2.) Aufgrund der katalytischen Wirkung des Bisulfits wird Cytosinsulfonat irreversibel zu Uracilsulfonat hydrolytisch desaminiert. 3.) Anschließend wird die Sulfonatgruppe unter alkalischer Behandlung wieder entfernt, so dass Uracil entsteht. 5-Methylcytosin hingegen bleibt unverändert, da sich das Reaktionsgleichgewicht kaum in Richtung einer Desaminierung verschieben lässt (Wang et al., 1980).



**Abb. 5:** Bisulfitreaktion an unmethyliertem Cytosin mit Sulfonierung, hydrolytischer Desaminierung und Desulfonierung (nach Hayatsu, 1976)

In Abbildung 6 ist die Modifikation der DNA-Sequenz von der Bisulfitreaktion bis zum Sequenzierungsschritt dargestellt. Die Bisulfitreaktion erfolgt einzelstrangspezifisch nach Denaturierung der DNA. Die infolge der Bisulfitkonversion nicht mehr komplementären DNA-Einzelstränge werden mittels PCR amplifiziert. In diesem Arbeitsschritt wird das modifizierte Uracil durch Thymin ersetzt, während 5-Methylcytosin als Cytosin fortgeführt wird. Über Klonierung der PCR-Fragmente vor Sequenzierung, wie in dieser Arbeit angewandt, wird der Methylierungsstatus für jedes CpG eines individuellen klonierten DNA-Moleküls quantitativ und allel-spezifisch erfasst (Zhang et al., 2009). Bei einer direkten Sequenzierung nach Bisulfit-PCR kann lediglich eine Aussage über den durchschnittlichen Methylierungsgrad für CpGs mehrerer Moleküle getroffen werden (Clark et al., 1994, Paul et al., 1996). Die Bisulfit-Pyrosequenzierung stellt im Gegensatz dazu ein quantitatives Hoch-Durchsatz-Verfahren zur Gen-spezifischen Methylierungsanalyse dar, die aber auch nur eine Aussage über den durchschnittlichen

Methylierungsgrad für CpGs mehrerer Moleküle zulässt (Colella et al., 2003; Tost und Gut, 2003; Uhlmann et al., 2002).



**Abb. 6:** Die DNA-Sequenz von der Bisulfitkonversion bis zur Sequenzierung

### 2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Bisulfitbehandlung wurde zunächst das Ausgangsmaterial, die genomische DNA, aus den Geweben gewonnen. Die Lymphocyten-DNA wurde nach Standardprotokoll extrahiert zur Verfügung gestellt. Das Cortexgewebe wurde mit 500 µl Kernlysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2) versetzt und unter Zugabe von 80 µl 10 % SDS und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 56 °C lysiert. Nach Abkühlung auf RT wurden Proteine mit 320 µl NaCl (6 M) ausgesalzt, indem die Probe mehrmalig invertiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um die Präzipitation der DNA mit 0,6-0,7 Volumen Isopropanol durchzuführen. Die Zentrifugation wurde wie oben beschrieben wiederholt.

Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, ein weiteres Mal zentrifugiert und in 30-100 µl 10 mM Tris pH 8,5 gelöst. Die Reinheit und Konzentration der DNA im Eluat wurden photometrisch bestimmt.

### 2.2.3 Bisulfitkonversion

Die Bisulfitkonversion von 300-500 ng genomischer DNA der zu untersuchenden Proben und die nachfolgende Aufreinigung erfolgten mit Hilfe des *EpiTect Bisulfit Kits* gemäß Herstelleranleitung. Zur Qualitätssicherung der Bisulfit-DNA (BS-DNA) wurden Positivkontrollen mit bekanntem Methylierungsstatus (100 % Methylierung) mitgeführt.

### 2.2.4 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*; PCR) ist eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte, die von zwei Oligonucleotiden (Primern) flankiert werden (Saiki et al., 1989). Initial wird die doppelsträngige Ziel-DNA denaturiert, so dass die Primer komplementär an die einzelsträngige DNA-Matrizen hybridisieren können. Ausgehend von den Primern werden mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase die komplementären Einzelstränge synthetisiert.

Um eine bevorzugte Amplifikation einer methylierten Sequenz zu vermeiden, wurden die Bindungsstellen für die Primer außerhalb der CpG-Stellen positioniert (Warnecke et al., 2002):

Primer	Sequenz	Position
SYN-Forward 1	5'-GGAGTTTAAGGAAAGAGATTTGATT-3'	-926 bis -902
SYN-Reverse 2	5'-CAAACAACAAACCCAAATATAATAA-3'	-483 bis -507

Bisulfit-PCR

2 µl	BS-DNA
1 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
3 µl	10x PCR-Puffer
0,6 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Primer Forward (10 µM)
1 µl	Primer Reverse (10 µM)
0,15 µl	Platinum Taq-Polymerase (5 U/µl)
ad 30 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammengestellt. Der Gehalt und die Qualität der BS-DNA fallen infolge der Degradierung durch die Bisulfitbehandlung variabel in der photometrischen Messung aus (Grunau et al., 2001). Als Template für die PCR wurden 2 µl DNA verwendet. Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl wurde nach kurzer Zentrifugation im Thermocycler mit folgendem Programm bearbeitet:

Programmschritt	Temp. (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	95	600
Denaturierung	94	45
Annealing	54	45
Elongation	72	45
Abschließende Elongation	72	600
Lagerung	4	∞

} 40 Zyklen

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde durch elektrophoretische Auftrennung in 2%igem Agarosegel unter UV-Lampe visualisiert, welches zuvor frisch hergestellt worden war. Bei der Zubereitung des Gels wurde 1 g Agarose in 50 ml 1x TAE Puffer gelöst. Während der Abkühlung wurden 2,5 µl des fluoreszierenden Farbstoffs *Fast Red* hinzugefügt und schließlich ausgegossen. Auf das Gel wurden 9 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau und 15 % Ficoll Typ 400 gelöst in *Aqua bidest.*) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 100 V für 20 min angelegt. Die Länge des DNA-Produkts wurde anhand einer 100 bp DNA-Leiter bestimmt. Die PCR-

Produkte in der gesuchten Länge von 444 bp wurden mit dem *X-tracta* aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Nach den Vorgaben des Herstellers des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kits* wurden Gelreste sowie Rückstände von PCR-Reagenzien von der DNA vollständig entfernt. Die dadurch aufgereinigte und angereicherte DNA wurde in 8 µl *Aqua bidest.* gelöst. 2 µl des Eluats wurden mit 1 µl Ladepuffer erneut auf 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die Qualität der Aufreinigung und die benötigte DNA-Menge anhand der Bandenstärke für die weitere Bearbeitung abzuschätzen.

### 2.2.5 Klonierung

Die Sequenzierung subklonierter PCR-Produkte ermöglicht durch die Insertion eines einzelnen PCR-Produkts pro Klon die allel-spezifische Analyse des Methylierungsmusters eines individuellen DNA-Moleküls. Für die Klonierung wurden zuvor LB-Agar-Platten hergestellt, indem 10 g LB mit 7,5 g Agar in 500 ml H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert wurden. Nach Abkühlung auf unter 60 °C wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und in Petrischalen verteilt. Die Lagerung der angefertigten Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

#### Ligation

Die Klonierung wurde mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* durchgeführt. Nach Herstellerprotokoll wurden die durch die Taq-Polymerase generierten überhängenden Enden (*sticky ends*) der PCR-Produkte vor der Ligation geglättet (*blunt*). Die eingesetzte DNA-Menge richtete sich nach der Bandenstärke im Agarosegel und betrug zwischen 1-3 µl. Das DNA-Fragment wurde als Insert in den linearisierten pJET1.2/blunt Klonierungsvektor integriert. Durch die Ligation des DNA-Inserts wird die Sequenz eines für Bakterien lethalen Gens *eco47IR* unterbrochen, so dass nur die Zellen, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben, wachsen können.

#### Transformation

Zur Vervielfältigung des Plasmidvektors wurde die DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien eingeschleust. Dazu wurde ein Aliquot aus 50 µl kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die

Transformation erfolgte durch einen Hitzschock, indem die Bakterien 45 s bei 42 °C im Wasserbad erhitzt und im Anschluss für 2 min auf Eis abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 300 µl vorgewärmten SOC-Mediums wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C im Schüttler angezogen. 100 µl des Ansatzes wurden auf die vorgewärmten LB-Agar-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.6 Kolonie-PCR

Klone mit korrektem Einbau der DNA in den Vektor wurden mittels PCR identifiziert. Für diese PCR wurden pro Platte eines Individuums mindestens 10 Bakterienkolonien mit der Pipettenspitze gepickt. Die Kolonien wurden jeweils in 3 ml LB-Medium (12,5 g LB in 500 ml *Aqua bidest.* gelöst und mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) bei 37 °C im Schüttler ÜN inkubiert. Je 1 µl Bakteriensuspension wurde für einen PCR-Ansatz von 20 µl verwendet. Das pJET1.2 Primerpaar war im *CloneJET PCR Cloning Kit* enthalten.

Primer	Sequenz
pJET1.2 forward	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET1.2 reverse	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

#### PCR-Ansatz

1 µl	Bakteriensuspension
2 µl	10x Puffer A1
2 µl	dNTPs (2 mM)
0,4 µl	Primer Forward (10 µM)
0,4 µl	Primer Reverse (10 µM)
0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/ µl)
ad 20 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Die Einstellung des PCR-Programms für diesen Reaktionsansatz war folgende:

Programmschritt	Temp. (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	94	180
Denaturierung	94	30
Annealing	60	30
Elongation	72	45
Abschließende Elongation	72	300
Lagerung	4	∞

} 30 Zyklen

Durch elektrophoretische Auftrennung in 2%igem Agarosegel wurden die PCR-Produkte dargestellt. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde mit dem *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Gehalt und Qualität der DNA in 30 µl Eluat wurden photometrisch bestimmt.

### 2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Ermittlung der DNA-Nucleotidsequenz basierend auf der enzymatischen Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). In Analogie zum PCR-Ablauf besteht die Sequenzierung aus den Reaktionsschritten Denaturierung, Anlagerung des Primers und DNA-Elongation. Der Kettenabbruch erfolgt durch den Einbau fluoreszenzmarkierter 2'3'-Dideoxynucleotid-Triphosphate (ddNTPs). Aufgrund der fehlenden freien 3'-Hydroxygruppe der ddNTPs kann die Verlängerung des DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase nicht fortgesetzt werden, so dass DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Die markierten Basen der Abbruchfragmente werden nach elektrophoretischer Auftrennung anhand des Fluoreszenzsignals mittels CCD-Kamera im Sequenziergerät abgelesen. Für die Sequenzreaktion wurde das *BigDye-Terminator-Kit v1.1* verwendet. Als Primer wurde der pJET1.2 Reverse Primer eingesetzt.

Sequenzieransatz

150-300 ng	Plasmid-DNA (ca. 2 µl)
0,5 µl	Primer Reverse (10 µM)
2 µl	BigDye Mix
ad 10 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Der Ansatz durchlief folgendes Programm im Thermocycler:

Programmschritt	Temp. (°C)	Zeit (s)	
Initiale Denaturierung	96	240	
Denaturierung	96	10	} 25 Zyklen
Annealing	50	5	
Elongation	60	240	
Lagerung	8	∞	

Die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss durch Ethanol-fällung aufgereinigt. Dabei wurde ein Sequenzieransatz mit 10 µl *Aqua bidest.*, 5 µl 125 mM EDTA, 1 µl BlueDextran (10 mg/ml) und 60 µl Ethanol absolut aufgefüllt und gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 15.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. 150 µl von 70 % Ethanol wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch erneut 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 5 min bei 37 °C getrocknet und in einem Gemisch aus 4 µl *Aqua bidest.* und 16 µl Formamid gelöst. Schließlich wurden die Proben in Sequenzierungstubes überführt und mit dem *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* sequenziert.

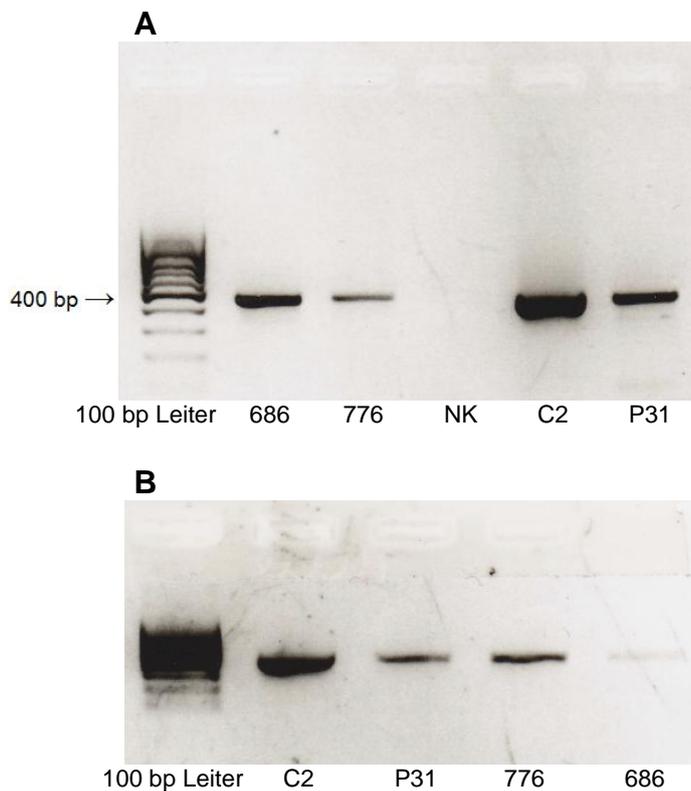
### 2.2.8 Verwendete Software und Statistik

Die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in einer DNA-Sequenz wurden mithilfe des Programms TESS bestimmt (*Transcription Element Search System*; <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Zur Darstellung der sequenzierten DNA in Form von Elektropherogrammen wurde die Software *Chromas Lite*, Version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) verwendet. Die weitere Auswertung der bisulfit-modifizierten Sequenzen wurde mit der Software *Biq Analyzer 2.0* (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) ausgeführt. Vorausgesetzt wurden eine Bisulfit-Konvertierung von mindestens 90 % und eine Übereinstimmung der bisulfitbehandelten Sequenzen mit der genomischen Sequenz von mindestens 90 %. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und der linearen Regressionsanalyse, die durch das Programm SPSS für Windows, Version 21.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, Illinois, USA) ausgeführt wurde. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bisulfitkonversion und PCR

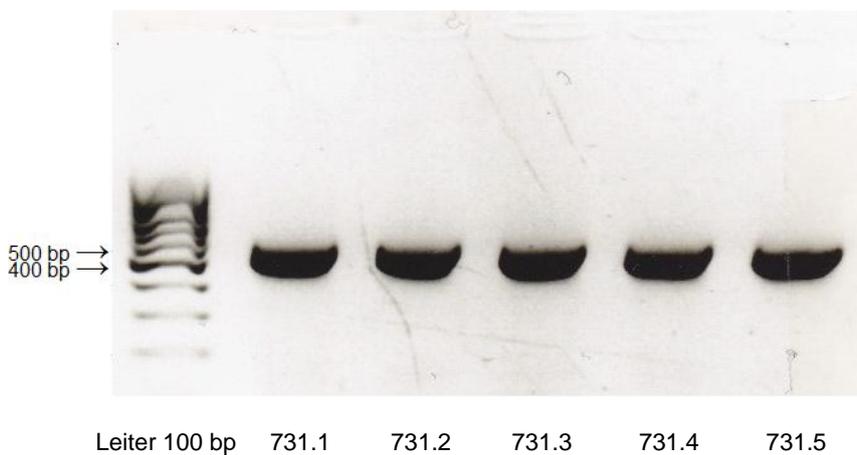
Aus allen genomischen DNA-Proben des Lymphocyten- und Cortexgewebes konnte das bisulfit-behandelte Fragment  $SNCA_{(-926/-483)}$  im Intron1 amplifiziert werden. Das gesuchte PCR-Produkt in der Länge von 444 bp wurde durch elektrophoretische Auftrennung nachgewiesen (s. Abb. 7A). Nach Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde das Eluat erneut in der Gelelektrophorese aufgetrennt, zum einen zur Qualitätssicherung als auch zur semiquantitativen Abschätzung der DNA-Menge für die Klonierung abhängig von der Bandenstärke (s. Abb. 7B).



**Abb. 7:** Nachweis der Banden mit der Länge von 444 bp durch Auftragung auf 2%iges Agarosegel und elektrophoretische Auftrennung bei 100 V, NK = Negativkontrolle. (A) Banden von Proben nach PCR-Amplifikation Bisulfit-behandelter DNA. (B) Variabilität der Bandenstärke nach Aufreinigung der PCR-Produkte

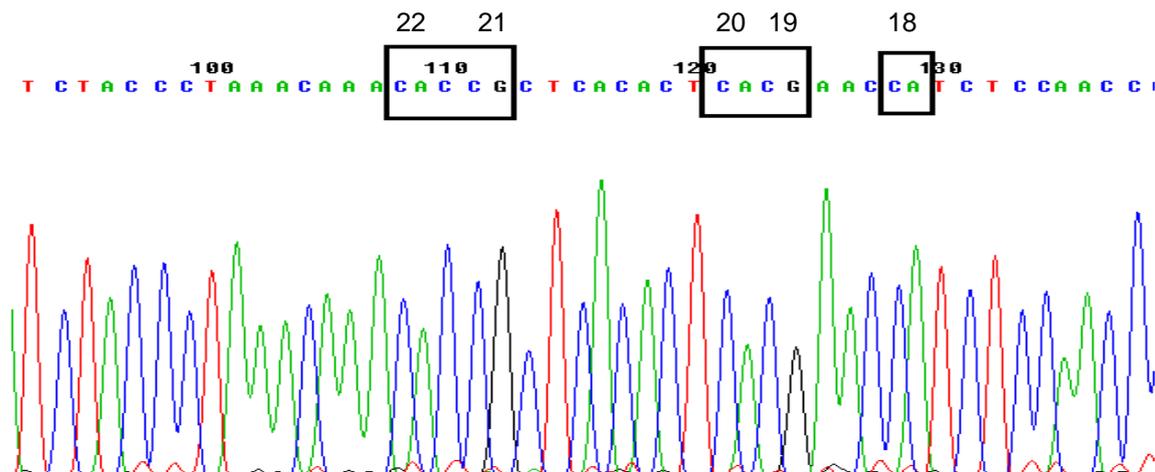
### 3.2 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Das PCR-Produkt wurde als Vektor-Insert-Konstrukt in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, die ÜN inkubiert wurden. Aus allen Proben wurden jeweils mindestens 10 Kolonien selektiert. Das Insert tragende Plasmid ließ sich mittels PCR identifizieren (s. Abb. 8).



**Abb. 8:** Gelelektrophoretische Kontrolle der Inserts mit der Länge von 444 bp nach Auftragung auf 2%iges Agarosegel, NK = Negativkontrolle

Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde extrahiert und der Sequenzierreaktion überführt. Durch die Bisulfitkonversion wurde nicht-methyliertes Cytosin zu Uracil umgewandelt und in der PCR als Thymin gelesen, während methyliertes Cytosin unverändert fortgeführt wurde. In der DNA-Sequenzierung entstand der Gegenstrang als komplementäre Sequenz aus der Basenpaarung Thymin/Adenin sowie Cytosin/Guanin. In der folgenden Abbildung ist ein Ausschnitt eines Elektropherogramms darstellt.

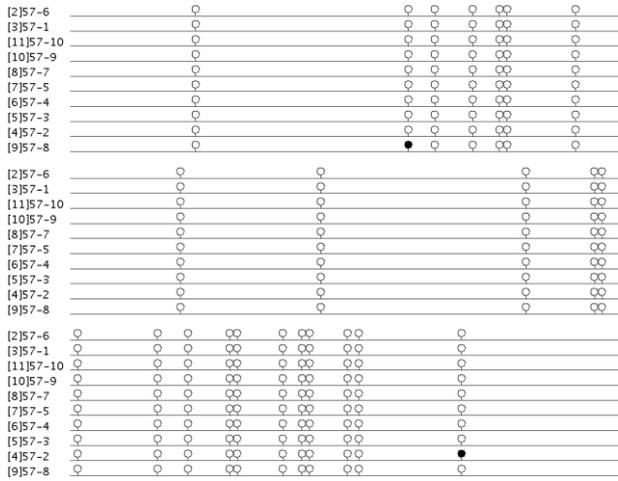


**Abb. 9:** Elektropherogramm einer Cortexkontrolle (Probe 934.8). Markiert sind die CpG-Positionen von Nr. 18 bis 22. Die konvertierten nicht-methylierten Cytosine werden in der Sequenzierung als Adenine abgelesen (Nr. 18, 20, 22), während methylierte Cytosine als Guanine erkannt werden (Nr. 19, 21)

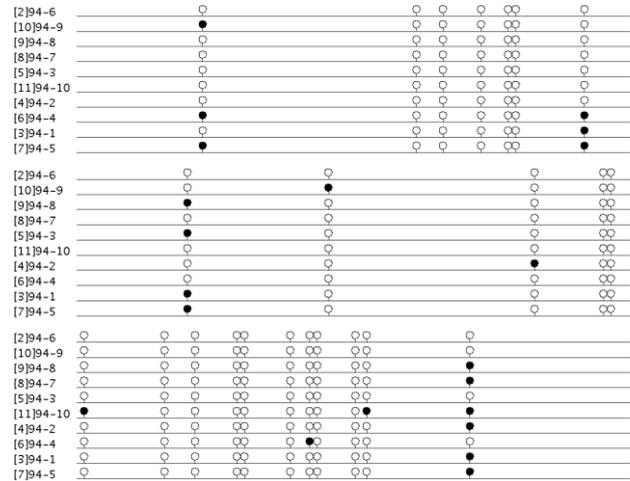
### 3.3 Auswertung der Bisulfitsequenzierung

Der Methylierungsstatus von 8-10 sequenzierten Klone pro Einzelprobe wurde mit dem Programm *Biq Analyzer* (Bock et al., 2005) analysiert. Dieses Programm dient zudem der Qualitätskontrolle insofern, als es inkomplett konvertierte Cytosine nach Bisulfitmodifikation, Klonsequenzen und Sequenzierungsfehler erkennt und von der Analyse ausschließt. In Abbildung 10 werden exemplarisch Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung in Form von Lollipop-Diagrammen, wie sie im *Biq Analyzer* generiert werden, präsentiert. Dabei entspricht jeder Kreis einer CpG-Position, die entweder methyliert (schwarz) oder nicht-methyliert (weiß) ist.

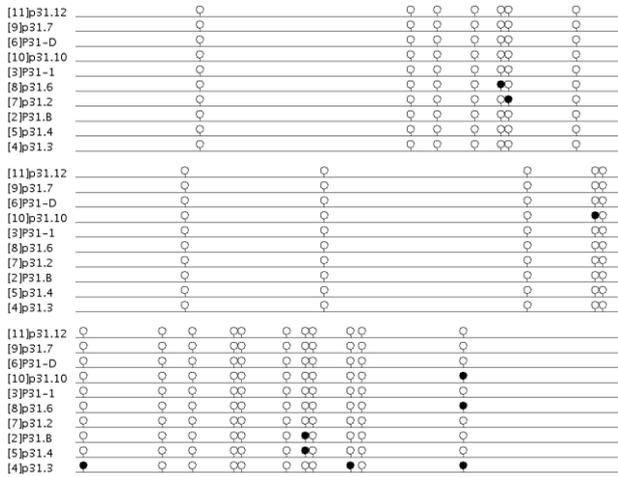
**A. Lymphocyten-MSA**



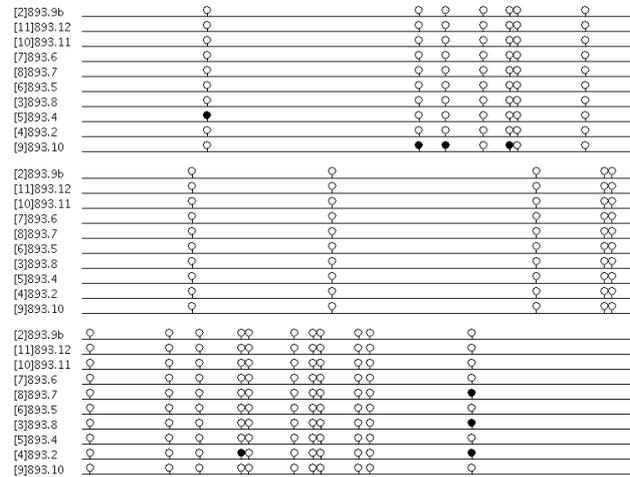
**B. Lymphocyten-Kontrollen**



**C. Cortex-MSA**



**D. Cortex-Kontrollen**

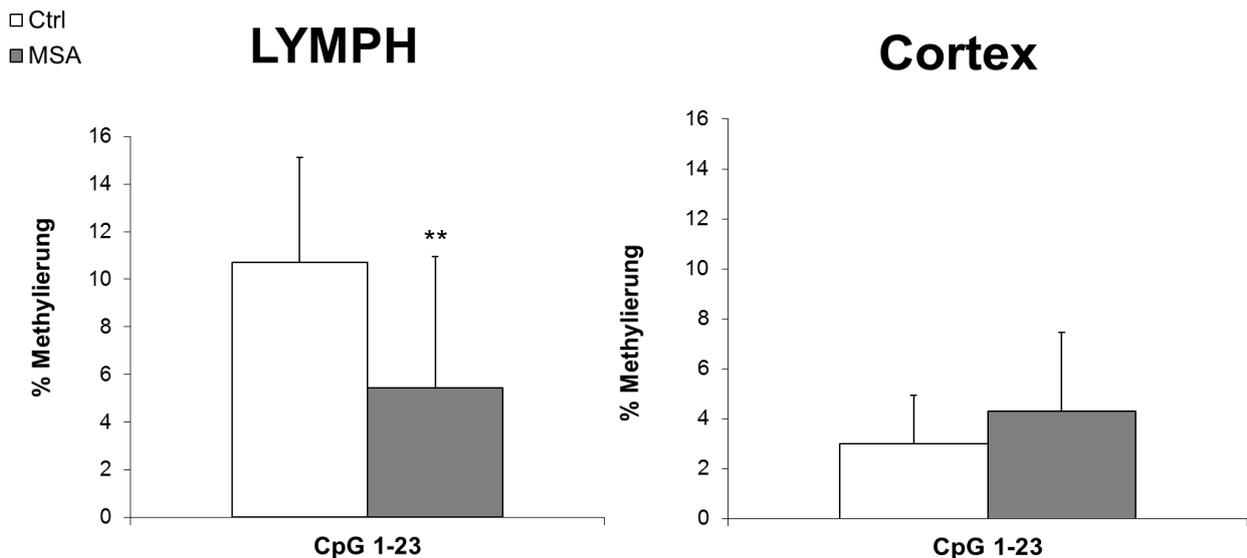


**Abb. 10:** Lollipop-Diagramme von MSA-Patienten und Kontrollen in Lymphocyten (A+B) und im Cortex (C+D) in der CpG-Reihenfolge 23 bis 1. Bereits in der Übersicht erscheint die MSA-Probe in Lymphocyten (A) geringer methyliert als die Kontrollprobe (B). Im Cortex dagegen lässt sich kein eindeutiger Unterschied in der Methylierung erkennen

**3.3.1 Methylierungsstatus in Lymphocyten und Cortex**

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus des *SNCA*-Gens im Intron1 wurden 36 Lymphocytenproben von 19 MSA-Patienten und 17 Kontrollpersonen sowie 20 Cortexproben von jeweils 10 MSA-Patienten und entsprechenden Kontrollen untersucht (s. 2.1.2). Der durchschnittliche Methylierungsgrad aller 23 CpG-Positionen ist in Abbildung 11 dargestellt. Dabei wurde der Mittelwert bei MSA-Patienten in Lymphocyten gewebe bei  $5,4 \pm 5,5$  (Mittelwert  $\pm$  SD) ermittelt und war hiermit signifikant

niedriger als in der Kontrollgruppe bei einem Mittelwert von  $10,7 \pm 4,4$  (Mittelwert  $\pm$  SD;  $p = 0,0035$ ). Im Cortex zeigte sich kein signifikanter Methylierungsunterschied zwischen Patientengruppe  $4,3 \pm 3,2$  (Mittelwert  $\pm$  SD) und Kontrollen  $3,0 \pm 1,9$  (Mittelwert  $\pm$  SD;  $p = 0,28$ ).

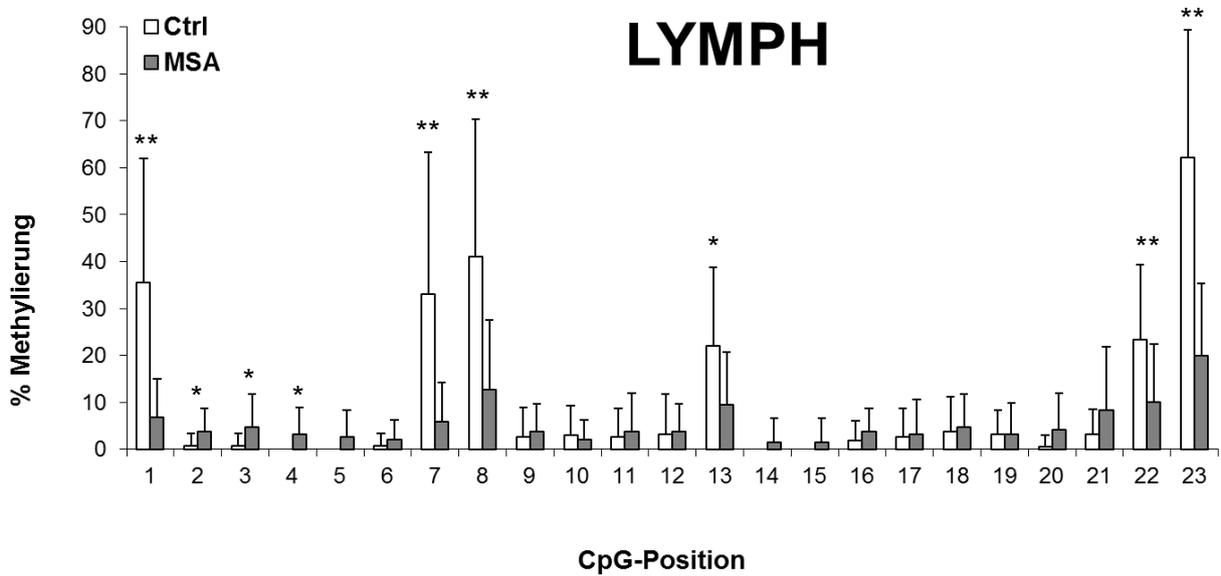


**Abb. 11:** Mittelwerte [%] der Methylierung aller CpG-Positionen (1-23). Die DNA von MSA-Patienten in Lymphocyten (LYMPH) ist gegenüber Kontrollen (Ctrl) signifikant hypomethyliert. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

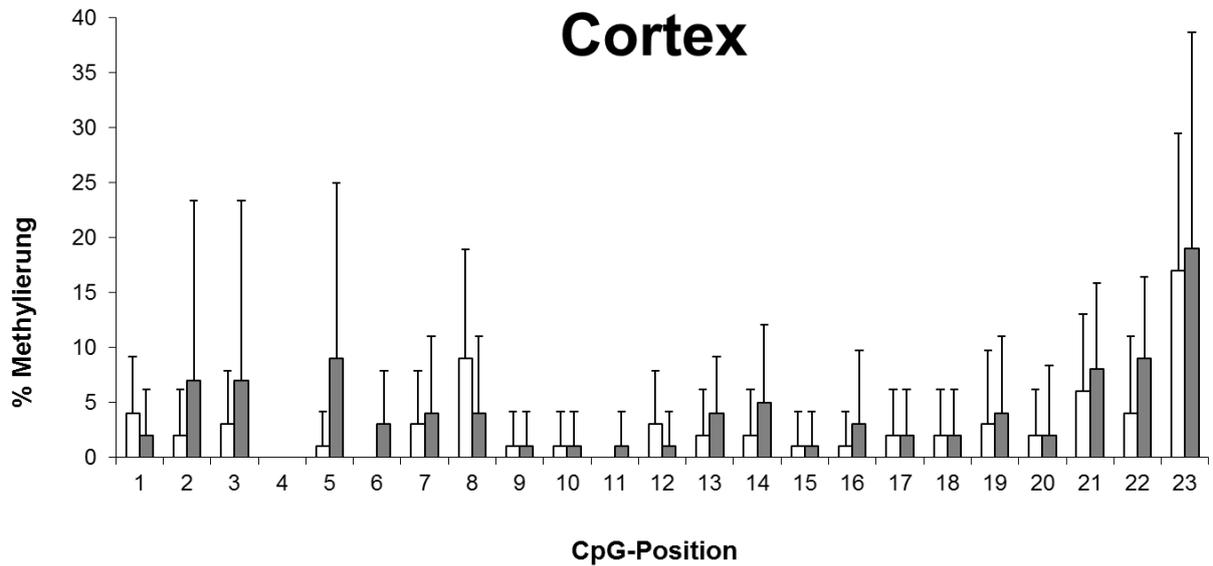
Die Methylierungsanalyse einzelner CpG-Positionen findet sich in Abbildung 12. In Lymphocyten-DNA von MSA-Patienten zeigte sich die Hypomethylierung vor allem an bestimmten CpG-Positionen (1, 7, 8, 22 und 23) ausgeprägt im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 7,0 \times 10^{-5}$ ;  $p = 0,0006$ ;  $p = 0,0007$ ;  $p = 0,008$ ;  $p = 1,5 \times 10^{-6}$ ) sowie auch in Position 13 ( $p = 0,013$ ). Umgekehrt waren die CpG-Dinucleotide in den Positionen 2-4 bei den MSA-Patienten signifikant hypermethyliert ( $p = 0,03$  jeweils). Die Analyse einzelner CpG-Positionen der Cortex-DNA ergab im Allgemeinen eine Hypermethylierung in der MSA-Gruppe mit Ausnahme weniger CpG-Positionen (1, 8, 12). Die Methylierungsdifferenzen zwischen MSA und Kontrollen im Cortex fielen jedoch nicht signifikant aus (kleinstes  $p$  in CpG-Position 6 =  $0,065$ ). Unterschiede im Methylierungsmuster zeichneten sich nicht nur zwischen peripherem und zentralem

Gewebe ab. Starke Variabilitäten in der DNA-Methylierung waren ebenso zwischen den Einzelproben und innerhalb der individuellen Einzelproben erkennbar.

**A**



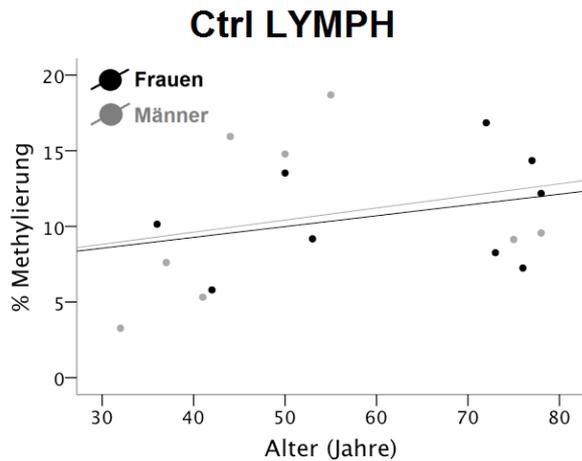
**B**



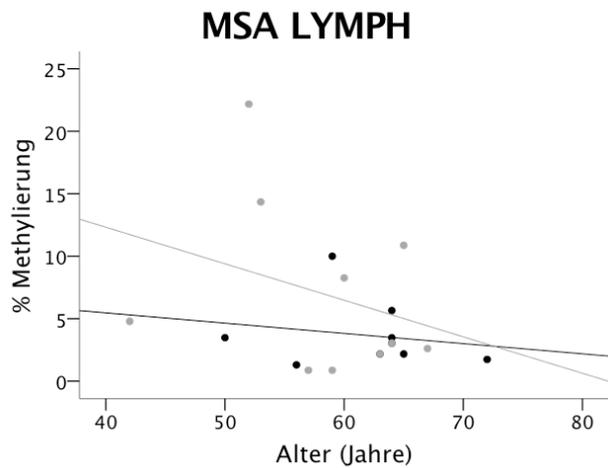
**Abb. 12:** Methylierungsgrad der einzelnen CpG-Positionen. (A) Im Vergleich zu Kontrollen (Ctrl) signifikante Hypomethylierung in Lymphocyten (LYMPH) von MSA-Patienten (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). (B) Keine signifikanten Methylierungsdifferenzen im Cortex

### 3.3.2 Methylierungsstatus in Abhängigkeit verschiedener Parameter

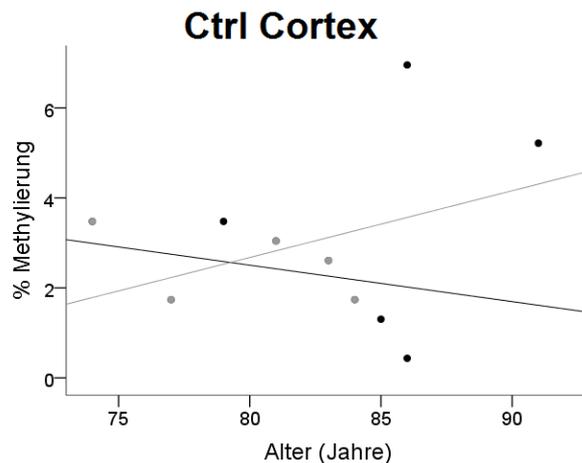
Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und den Merkmalen Alter, Geschlecht, Medikation und Erkrankungsdauer besteht. Die Ergebnisse der Analyse ergaben keine Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Alter ( $p \geq 0,4$ ; s. Abb. 13).



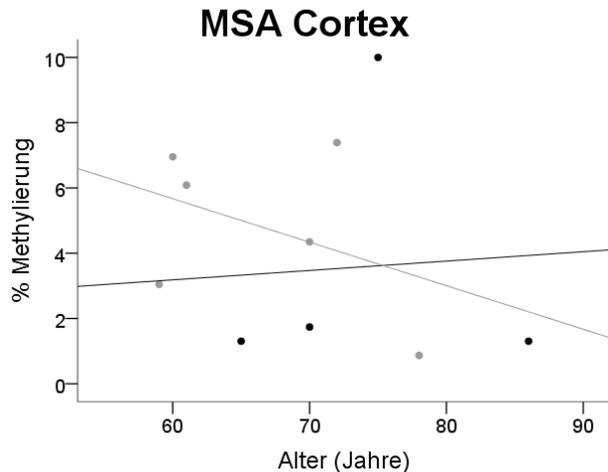
Frauen:  $R^2 = 0,11$ ;  $p = 0,4$   
Männer:  $R^2 = 0,06$ ;  $p = 0,5$



Frauen:  $R^2 = 0,04$ ;  $p = 0,6$   
Männer:  $R^2 = 0,10$ ;  $p = 0,4$



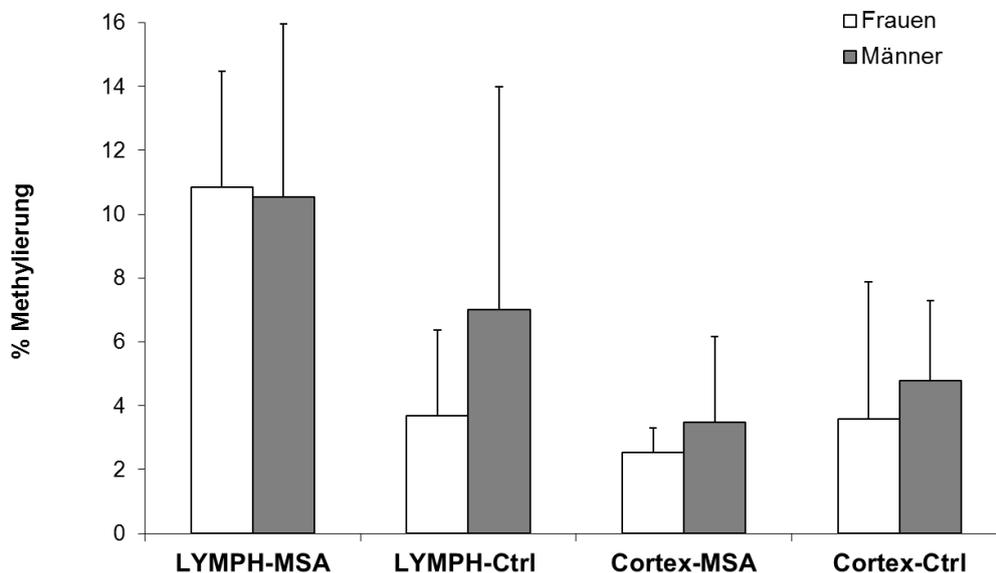
Frauen:  $R^2 = 0,19$ ;  $p = 0,5$   
Männer:  $R^2 = 0,06$ ;  $p = 0,7$



Frauen:  $R^2 = 0,004$ ;  $p = 0,9$   
Männer:  $R^2 = 0,17$ ;  $p = 0,4$

**Abb. 13:** Auftragung des Methylierungsgrads gegen Alter in den MSA-Subgruppen (LYMPH = Lymphocyten, Ctrl = Kontrollen,  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß)

Ein signifikanter Unterschied in der Methylierung zwischen Frauen und Männern konnte in dieser Arbeit in keiner der Subgruppen beobachtet werden (s. Abb. 14): Lymphocyten-Kontrollen ( $p = 0,9$ ), Lymphocyten-MSA ( $p = 0,2$ ), Cortex-Kontrollen ( $p = 0,5$ ), Cortex-MSA ( $p = 0,6$ ). Trotz fehlender signifikanter Korrelation von Alter und Geschlecht mit der DNA-Methylierung ist darauf hinzuweisen, dass der Verlauf der Methylierung im Alter im Cortex sowohl zwischen der MSA- und Kontrollgruppe sowie auch zwischen Männern und Frauen gegensätzlich ausfiel. In den Lymphocyten wurden eine Zunahme der Methylierung bei den Kontrollen im Verlauf des Lebens und eine Abnahme bei MSA konstatiert.

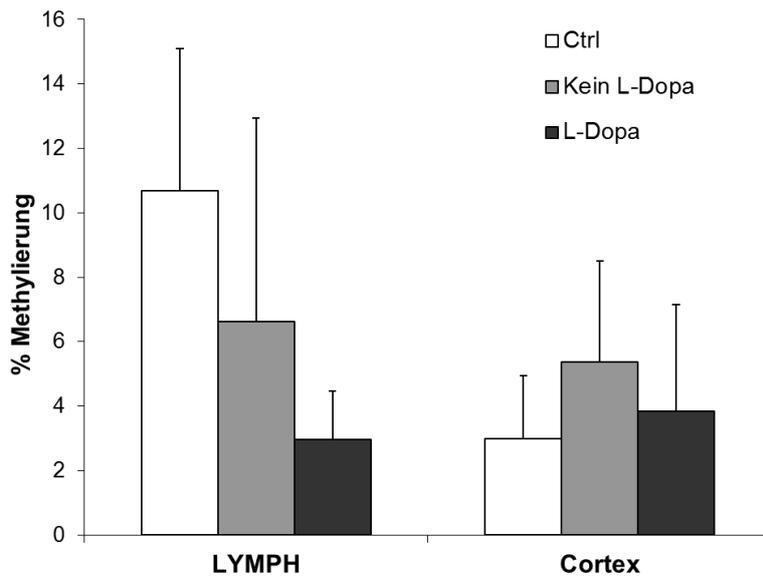


**Abb. 14:** Geschlechtsspezifische Methylierungsanalyse in den MSA-Subgruppen (LYMPH = Lymphocyten, Ctrl = Kontrollen)

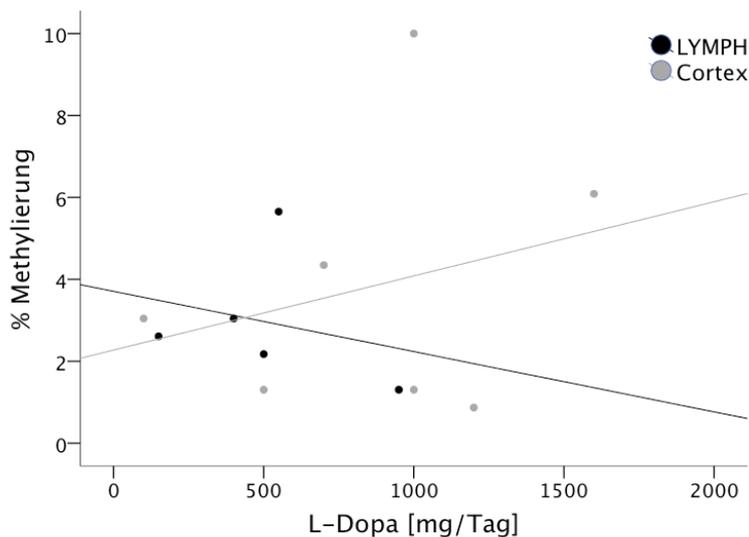
Als weiterer Parameter wurde der Einfluss der L-Dopa Einnahme (Minstdosis 100 mg/d) untersucht. Im Vergleich zur L-Dopa-naiven MSA-Subgruppe ( $6,6 \pm 6,3$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 13$ ) wurde bei den L-Dopa-behandelten MSA-Patienten ( $3,0 \pm 1,6$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 5$ ) in den Lymphocytenproben eine Reduktion des Methylierungsgrades um das 2,2-fache nachgewiesen; der Unterschied fiel jedoch nicht signifikant aus ( $p = 0,226$ ; s. Abb. 15A). In den Cortexproben war der Methylierungsgrad unter L-Dopa-Einnahme ( $3,9 \pm 3,3$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 7$ ) gegenüber der nicht mit L-Dopa behandelten Subgruppe

( $5,4 \pm 3,1$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3$ ) um den Faktor 1,4 erniedrigt ( $p = 0,5$ ). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und der Methylierungsgrad korrelierte nicht mit der L-Dopa-Dosis (s. Abb. 15B): Lymphocyten:  $R^2 = 0,07$ ;  $p = 0,7$ ; Cortex:  $R^2 = 0,07$ ;  $p = 0,6$ .

**A**

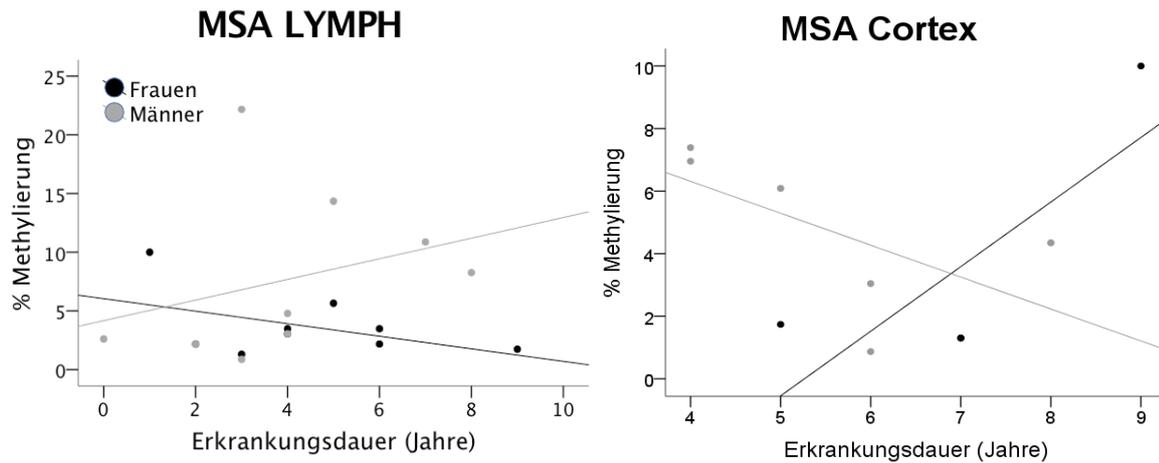


**B**



**Abb. 15:** Einfluss der L-Dopa-Medikation auf die Methylierung (A). Diese ist bei MSA sowohl in Lymphocyten (LYMPH) als auch im Cortex unabhängig von der L-Dopa-Dosis (B)

Bezüglich der Erkrankungsdauer konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Methylierungsgrad hergestellt werden ( $p \geq 0,2$ ; s. Abb. 16). Interessant ist jedoch auch hier wieder, dass gegensätzliche Tendenzen des Methylierungsgrads mit zunehmender Erkrankungsdauer sowohl zwischen Männern und Frauen als auch in den untersuchten Geweben beobachtet wurden.



Frauen:  $R^2 = 0,23$ ;  $p = 0,2$   
 Männer:  $R^2 = 0,09$ ;  $p = 0,4$

Frauen:  $R^2 = 0,62$ ;  $p = 0,2$   
 Männer:  $R^2 = 0,38$ ;  $p = 0,2$

**Abb. 16:** Fehlende Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Erkrankungsdauer bei MSA sowohl in Lymphocyten (LYMPH) als auch im Cortex

## 4. Diskussion

Die Annahme einer multifaktoriellen Genese der MSA wirft die Frage nach einer epigenetischen Beteiligung in der MSA Pathogenese auf, die die genetischen und umweltbedingten Einflüsse verknüpft. Vor dem Hintergrund der oligodendroglialen  $\alpha$ -Synuclein-Ablagerung sowie der Identifikation des *SNCA*-Gens als wichtigsten genetischen Risikofaktor könnte eine aberrante DNA-Methylierung zur Dysregulation der *SNCA*-Expression beitragen. In *post mortem* Hirngewebe stellte sich die transkriptionell aktive Region im Intron1-Abschnitt des *SNCA*-Gens bei PD-Patienten hypomethyliert dar, was *in vitro* eine Heraufregulierung der *SNCA*-Transkription zur Folge hatte (Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Im Hinblick auf eine leichtere Zugänglichkeit und Bearbeitungsmöglichkeit ist auch von Interesse, ob der Methylierungsstatus des ZNS-Gewebes in peripheren Blutzellen reflektiert wird.

### 4.1 Variationen in der DNA-Methylierung

#### 4.1.1 Vergleich zwischen MSA und Kontrollen

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich der Methylierungsstatus im *SNCA*-Intron1-Abschnitt zwischen MSA-Patienten und neurologisch gesunden Kontrollpersonen unterscheidet. Ein signifikanter Unterschied in der Gesamtmethylierung zeigte sich in Lymphocyten-DNA mit erniedrigtem durchschnittlichen Methylierungsgrad in der MSA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert MSA: 5,4 %; Kontrollen: 10,7 %). Im Cortex hingegen waren die Methylierungsunterschiede nicht signifikant (Mittelwert MSA: 4,3 %; Kontrollen: 3,0 %). Die hier ermittelten Methylierungslevel von ca. 3-10 % sind mit den Ergebnissen vorangegangener Studien bezüglich des *SNCA*-Methylierungslevels vergleichbar. Jowaed et al. demonstrierten mittels der klassischen Sequenzierung nach Klonierung signifikante Hypomethylierungen im *SNCA*-Intron1 bei PD-Patienten in den Hirnregionen *Substantia nigra*, Putamen und Cortex (2010). Dabei wurde der höchste Methylierungsgrad im Cortex mit ca. 4 % in der PD-Gruppe bzw. ca. 9 % in den Kontrollen gemessen (2010). LBD-Patienten boten ebenfalls im Cortex die höchste Methylierung mit ca. 3 % (De Boni et al., 2011). Aber wie auch in den weiteren

untersuchten Hirnregionen, *Substantia nigra*, Putamen, *Gyrus cinguli*, temporalem Cortex und Kleinhirn ließ sich hier kein signifikanter Unterschied verglichen mit Kontrollen nachweisen. Diese Methylierungsanalyse basierte auf der Methode der 454 GS-FLX Sequenzierung. Eine starke Divergenz im Methylierungsgrad von nahezu 0 % bei PD-Patienten und nahezu 100 % bei Kontrollen ermittelte eine japanische Arbeitsgruppe in der *Substantia nigra* unter Verwendung der klassischen Sequenzierung nach Klonierung (Matsumoto et al., 2010). Im anterioren cingulären Cortex und im Putamen wurden keine signifikanten Methylierungsunterschiede detektiert. Im frontalen Cortex rangierten die Methylierungslevel zwischen 40-45 % bei PD, DLB und Kontrollen mit signifikanter Hypomethylierung bei den Erkrankten (Desplats et al., 2011).

Diese stark fluktuierenden Methylierungslevel aus den verschiedenen Studien auch innerhalb derselben Hirnregionen lassen sich über die unterschiedliche Methodik hinaus im Rahmen der unterschiedlichen Zusammenstellung hinsichtlich Alter, Geschlecht, Ethnizität der Probanden sowie Auswahl der Hirnsubregionen erklären. Inmitten einer konservierten Methylierungslandschaft zwischen Individuen bestehen Gewebe- sowie Zelltyp-spezifische Variationen des Methylierungsmusters innerhalb eines Individuums (Suzuki und Bird, 2008), die sich auch in terminal differenzierten Zellen des ZNS wiederfinden (Ladd-Acosta et al., 2007; Siegmund et al., 2007; Xin et al., 2010). Hirnregion-spezifische Unterschiede ergeben sich aus der heterogenen zellulären Zusammensetzung über die Profilierung eines Methylierungsmusters, welches möglicherweise die Zelldifferenzierung, Hirnorganisation und -funktion der jeweiligen Zellpopulationen abbildet. Es wird diskutiert, dass die Neuroplastizität, basierend auf der Adaption an Erlebnisse und Eindrücke, zusammen mit Umweltfaktoren und stochastischen Fluktuationen zur Entstehung interindividueller Variabilitäten der DNA-Methylierung innerhalb der Hirnregionen beiträgt (Xin et al., 2010). Vor dem Hintergrund einer solchen Gewebe- und Zellspezifität in der Etablierung von Methylierungsmustern könnte in dieser Arbeit eine Methylierungsdifferenz zwischen MSA und Kontrollen im Cortex entgangen sein. Zu den Limitierungen dieser Arbeit gehört neben dem wichtigen Faktor des eingeschränkten Probenumfangs sicherlich auch die Fokussierung auf ein Hirnareal, nämlich den Cortex. Daher wären in Zukunft Untersuchungen auf

Einzelzelllevel aus verschiedenen Hirnsubregionen zur Validierung der bisherigen Resultate erforderlich.

#### **4.1.2 Vergleich zwischen ZNS- und Blutgewebe**

Trotz erwartbarer Methylierungsdifferenzen aufgrund unterschiedlicher ontogenetischer Herkunft im Rahmen der gewebsspezifischen Methylierungsprofilierung gibt es Hinweise, dass die DNA-Methylierung zwischen peripheren Blutzellen und ZNS-Gewebe zu einem gewissen Grad korreliert (Davies et al., 2012; Masliah et al., 2013). In dieser Arbeit wurde bei vergleichbarem Methylierungslevel in Cortex und Lymphocyten eine signifikante Hypomethylierung nur in Lymphocyten von MSA-Patienten entsprechend den Ergebnissen der *post mortem* Hirnstudien von PD-Patienten nachgewiesen (Desplats et al., 2011; Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Methylierungsanalysen, die das periphere Blut als Surrogatgewebe in Parkinson-Syndromen untersuchten, sind in der Anzahl limitiert. Die rezent publizierten Daten zum Methylierungsstatus in Leukocyten bestätigen eine Hypomethylierung im *SNCA*-Gen bei PD-Patienten (Ai et al., 2014; Tan et al., 2014). In zwei weiteren Studien ließ sich kein Nachweis einer unterschiedlichen DNA-Methylierung in Leukocyten zwischen PD und Kontrollen feststellen (Richter et al., 2012; Song et al., 2014). Die beiden Studien waren jedoch von kleinerem Probenumfang und im Rahmen der Pyrosequenzierung auf die Methylierungsanalyse von wenigen CpG-Positionen begrenzt. In einer sehr umfangreichen Studie mit mehr als 900 Proben ergaben sich neben signifikanten Unterschieden zwischen PD-Patienten und Kontrollen auch Hinweise auf den Einfluss eines SNP-Genotyps sowie von Geschlecht, Alter und L-Dopa auf den Methylierungsstatus (Schmitt et al., 2015).

Als Hauptquelle von  $\alpha$ -Synuclein im Blut stellten sich Erythrozyten und hämatopoetische Precursorzellen heraus (Barbour et al., 2008; Scherzer et al., 2008; Shi et al., 2010). Die Plasmakonzentration von  $\alpha$ -Synuclein variierte erheblich zwischen PD und MSA verglichen mit Kontrollen (Lee et al., 2006; Li et al., 2007; Shi et al., 2010; Sun et al., 2014). Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene in Leukocyten bei PD fielen widersprüchlich aus. Eine gesteigerte mRNA-Expression bei PD (Kim et al., 2004) ließ sich in einer weiteren

Studie nicht replizieren (Tan et al., 2005). Variationen des Hämolysegrades und Kontamination mit anderen Blutzellpopulationen im Rahmen des experimentellen Settings könnten bei diesen inkonsistenten Befunden eine Rolle spielen (Shi et al., 2010). Bei den hämatopoetischen und neuronalen Zellen wurde aufgrund der Rekrutierung gemeinsamer Transkriptionsfaktoren ein paralleler Mechanismus in der Aktivierung der *SNCA*-Expression diskutiert (Scherzer et al., 2008). Ferner wurde demonstriert, dass der PD-assoziierte *Rep1*-Polymorphismus im *SNCA*-Promotor die *SNCA*-Expression auch in Lymphocyten beeinflusst (Fuchs et al., 2008). Eine genomweite Methylierungsanalyse detektierte konkordante Variationen differenziell methylierter Genloci in Hirn- und Blutgewebe von PD-Patienten (Masliah et al., 2013). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass ein Teil des zentralnervösen Pathomechanismus auch bei MSA in peripheren Blutzellen reflektiert sein könnte. Zur Etablierung von Blut als Surrogatgewebe für Methylierungsanalysen und als Biomarker bedarf es weiterführender Korrelationsstudien in Blutsubpopulationen.

## 4.2 DNA-Methylierung und *SNCA*-Expression

Die Rolle des *SNCA*-Gens als hoch signifikanter Risikofaktor in der Entstehung von Synucleinopathien hat sich vor allem anhand der zahlreichen Morbus Parkinson-Studien etabliert. Die Relevanz der genetischen Komponente tritt auch bei MSA durch die Identifikation der ersten *SNCA*-Genvarianten in genomweiten SNP-Assoziationsstudien weiter in den Vordergrund (Al-Chalabi et al., 2009; Scholz et al., 2009). Bei bislang fehlender Genmutation im kodierenden Abschnitt (Hara et al., 2007; Ozawa et al., 1999) wird bei MSA eine veränderte Regulation der *SNCA*-Expression, resultierend in eine pathologische Akkumulation des  $\alpha$ -Synucleins im oligodendrogialen Cytoplasma, diskutiert. Einen Mechanismus der transkriptionellen Regulation stellt die DNA-Methylierung dar. Im Allgemeinen führt die Hypermethylierung zur Geninaktivierung, die Hypomethylierung zur Genaktivierung (Cedar, 1988; Weber et al., 2007). In dieser Arbeit wurde erstmalig der Methylierungsstatus im *SNCA*-Gen bei MSA untersucht. Während im *SNCA*-Intron1 von MSA-Lymphocyten eine Hypomethylierung beobachtet wurde, zeigten sich in der Cortex-DNA keine Methylierungsunterschiede zwischen MSA und Kontrollen.

Der Nachweis einer signifikanten Hypomethylierung im *SNCA*-Intron1 zumindest in Lymphocyten von MSA-Patienten stützt die Befunde von publizierten Studien, die eine Beeinflussung der *SNCA*-Expression durch DNA-Methylierung bei PD belegen. In verschiedenen Hirnregionen von PD-Patienten wurde ein erniedrigter Methylierungsgrad im *SNCA*-Intron1 nachgewiesen (Desplats et al., 2011; Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Auch die Methylierungsanalysen in peripheren Blutzellen ergeben Hinweise auf eine *SNCA*-Hypomethylierung bei PD (Ai et al., 2014; Schmitt et al., 2015; Tan et al., 2014). Fehlende Methylierungsunterschiede im *SNCA*-Gen in den Hirnproben von LBD-Patienten gegenüber Kontrollen deuten auf Unterschiede im zugrunde liegenden Pathomechanismus in den Synucleinopathien hin (De Boni et al., 2011). Die Auswirkung einer Hypomethylierung im *SNCA*-Intron1 auf das Expressionslevel wurde *in vitro* anhand von Luciferase-Assays demonstriert; eine reduzierte Methylierung im *SNCA*-Intron1 korrelierte mit der Induktion der *SNCA*-Expression (Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Für die weitere CpG-Insel im *SNCA*-Gen im Exon1/Promoter-Abschnitt konnte dagegen keine Beeinflussbarkeit der Transkription durch DNA-Methylierung nachgewiesen werden (Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Obwohl die Studienlage keine wesentliche *SNCA*-Überexpression bei MSA erkennen lässt, können dezente Veränderungen im *SNCA*-Expressionslevel bei kleinem Probenumfang entgangen sein (Scholz et al., 2009). Auf zellulärer Ebene wurde mittels Laser-Mikrodissektion eine diskret gesteigerte mRNA-Expression in Oligodendrocyten von MSA-Patienten gemessen (Asi et al., 2014). Folglich könnte eine Hypomethylierung im *SNCA*-Intron1 zu einer Aktivierung der *SNCA*-Expression mit oligodendroglialer  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation führen und somit zum erhöhten Risiko zur Entstehung der MSA beitragen.

### **Methylierungsabhängige Bindung von Transkriptionsfaktoren**

Neben dem eigentlichen Promotor wird dem Intron1-Abschnitt eine wichtige regulatorische Funktion in der *SNCA*-Transkription zugeschrieben, weil darin transkriptionell relevante Bindungsstellen für NGF-responsive Elemente und Transkriptionsfaktoren wie ZSCAN21 und GATA enthalten sind (Clough et al., 2009; Clough und Stefanis, 2007; Scherzer et al., 2008). Die untersuchte CpG-Region im *SNCA*-Intron1 beinhaltet eine hoch konservierte GATA-Bindungsstelle, über die die

Aktivierung der *SNCA*-Expression vermittelt wird (Scherzer et al., 2008). Die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren kann durch den Methylierungsstatus der DNA-Zielsequenz beeinflusst werden (Bird und Wolffe, 1999; Blattler und Farnham, 2013; Chen et al., 2011; Suzuki und Bird, 2008). Mit Ausnahme von CpG-Position 1 repräsentieren alle CpG-Dinucleotide der CpG-Insel im *SNCA*-Intron1 prognostizierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. In der Auswertung einzelner CpG-Dinucleotide zeigten sich die Methylierungsdifferenzen zwischen MSA und Kontrollen in Lymphocyten an bestimmten CpG-Positionen besonders ausgeprägt. Signifikante Hypomethylierungen waren in CpG-Positionen 1, 7, 8, 13, 22, 23 in MSA nachweisbar, während die CpG-Positionen 2-4 hypermethyliert waren. Hypomethylierungen in der *Substantia nigra* (Position 8, 17) und Putamen (Position 8, 12) wurden von Jowaed et al. bei PD-Patienten gegenüber Kontrollen in der Einzel-CpG-Analyse beobachtet (2010). Trotz fehlenden Unterschieds in der Gesamtmethylierung zwischen LBD-Patienten und Kontrollen ermittelten De Boni et al. Methylierungsdifferenzen im Putamen in CpG-Position 6 und 8 (2011). Die genannten CpG-Positionen liegen in der Nähe bzw. innerhalb von Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren wie SP1 (*specificity protein 1*) und AP2 (*activating protein 2*), die durch eine Methylierungssensitivität in ihrer Bindungskapazität gekennzeichnet sind (Clark et al., 1997; Comb und Goodman, 1990; Zhu et al., 2003). Im Allgemeinen binden SP1 und AP2 ubiquitär an Promotorelementen von Genen, die an basalen Prozessen wie Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose beteiligt sind (Black et al., 2001; Hilger-Eversheim et al., 2000). Darüber wird die Rolle von SP1 in der neuronalen Responsivität auf oxidativen Stress im Rahmen der Neurodegeneration diskutiert (Ryu et al., 2003; Li et al., 2002; Lee et al., 2006). AP2 wird eine wichtige regulatorische Funktion in der Expression von Genen des monoaminergen Transmittersystems im Hirnstamm zugeschrieben, welche wichtige Komponenten des dopaminergen Systems wie u. a. Dopamin-Hydroxylase, -transport und die Monoaminoxidase einschließen (Damberg, 2005). Diese Daten deuten auf eine Transkriptionsfaktor-vermittelte *SNCA*-Expression in Abhängigkeit des spezifischen Methylierungsstatus einer individuellen CpG-Position. In Zukunft muss das Methylierungsmuster in Studien mit größerer Patientenkohorte vor allem auch im Hinblick auf solitäre CpG-Positionen verifiziert werden, um für die Genexpression relevante methylierungssensitive Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu identifizieren.

### Weitere Regulationsmechanismen der DNA-Methylierung

Die zugrunde liegenden Mechanismen einer *SNCA*-Hypomethylierung in Synucleinopathien sind unklar. Dysfunktionen in der Methylierungsmaschinerie kommen hierfür in Betracht, wobei bisher keine genetischen Mutationen oder Polymorphismen bekannt sind. Es liegt jedoch eine Studie vor, die die Interaktion von DNMT1 und  $\alpha$ -Synuclein beleuchtet (Desplats et al., 2011). Aus den Ergebnissen dieser Studie geht hervor, dass DNMT1 mit  $\alpha$ -Synuclein aggregiert und vom Nucleus ins Cytoplasma sequestriert wird, so dass bei reduziertem nucleären DNMT1-Level eine globale Hypomethylierung im Cortex von PD- und LBD-Patienten resultiert. Durch Inhibition von DNMT mittels 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde die *SNCA*-Expression heraufreguliert, was zur vermehrten Apoptose dopaminerger Neurone führte (Wang et al., 2013). Angesichts eines heritablen Anteils der CpG-Methylierung scheint auch eine genetische Regulation der DNA-Methylierung vorzuliegen (Bjornsson et al., 2008; Heijmans et al., 2007; Zhang et al., 2010). In einer genomweiten Assoziationsstudie wurde gezeigt, dass genetische Varianten in Form von SNPs mit der DNA-Methylierung assoziiert sind und dadurch die Genexpression beeinflussen können (Zhang et al., 2010). Bei der PD wurde in der Tat eine Assoziation zwischen dem *Rep1*-Polymorphismus im *SNCA*-Promoter und der DNA-Methylierung hergestellt (Ai et al., 2014). Ungeachtet der Distanz zwischen dem SNP-Locus und der CpG-Insel im *SNCA*-Intron1, ging das protektive kürzere Allel mit einer Hypermethylierung im *SNCA*-Intron1 einher. Mit der Identifikation genetischer Varianten auch bei MSA könnte eine genetisch regulierte DNA-Methylierung das Verständnis der Genexpressionsregulation in der MSA Pathogenese erweitern.

Allerdings muss bei fehlendem Nachweis einer signifikanten Methylierungsdifferenz im Cortex in dieser Arbeit die Hypothese kritisch hinterfragt werden, ob eine erhöhte *SNCA*-Expression verursacht durch veränderte DNA-Methylierung im *SNCA*-Intron1 an der Pathogenese der MSA beteiligt sein könnte. Die funktionelle Rolle der DNA-Methylierung in der Transkriptionsregulation kristallisiert sich zunehmend als komplex heraus. Methylierte CpG-Inseln in Promoternähe lassen sich nicht immer in ihrer transkriptionellen Aktivität hindern bzw. können trotz unmethylierten Zustands transkriptionell inaktiv sein (Weber et al., 2007). Außerdem findet DNA-Methylierung auch außerhalb von CpG-Inseln, in so genannten CpG *island shores*, statt, die

wahrscheinlich für die Gewebs-spezifische Differenzierung verantwortlich sind (Irizarry et al., 2009). Die DNA-Methylierung im transkribierten Genbereich (*gene bodies*) kann paradoxerweise zu einer Transkriptionsaktivierung führen (Maunakea et al., 2010). Eine weitere Funktion der *gene body*-Methylierung könnte ferner in der Regulation des alternativen Splicings bestehen (Laurent et al., 2010; Shukla et al., 2011). Dieser Punkt erscheint insofern interessant, als bei MSA richtungsweisende Veränderungen auf mRNA-Expressionslevel fehlen. Stattdessen wird das alternative Splicing des *SNCA*-Gens durch unterschiedliche Expression von *SNCA*-Isoformen als weiterer molekularer Mechanismus in der Entstehung von Synucleinopathien diskutiert (Beyer et al., 2008; Mills und Janitz, 2012; Scholz et al., 2009). Auch ist die Rolle von 5-Hydroxymethylcytosinen im Methylierungsprozess und in der Regulation der Genexpression noch weitgehend unverstanden. In Anbetracht des Verteilungsmusters im ZNS und der Beteiligung an wichtigen biologischen Prozessen ist die Bedeutung von 5-Hydroxymethylcytosin in neurodegenerativen Erkrankungen aktuell Gegenstand der Forschung (Cheng et al., 2014; Song et al., 2011; Szulwach et al., 2011).

### **4.3 Einflussfaktoren auf die DNA-Methylierung**

Die Modifizierbarkeit des epigenetischen Zustands durch intrinsische und externe Einflussfaktoren ermöglicht dem Organismus, sich über Veränderungen der Genexpression den Umweltbedingungen anzupassen (Feil und Fraga, 2012; Jaenisch und Bird, 2003). Daher wurden die Parameter Geschlecht, Alter, Krankheitsdauer und L-Dopa-Medikation im Hinblick auf einen Methylierungs-modifizierenden Einfluss geprüft. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Methylierungsmuster sind beschrieben und u. a. anhand der X-Chromosom-Inaktivierung diskutiert (El-Maarri et al., 2007; Liu et al., 2010; Sarter et al., 2005; Tobi et al., 2009). In dieser Arbeit waren unterschiedliche Tendenzen der Methylierung zwischen Männern und Frauen mit zunehmendem Alter von MSA-Erkrankten und Kontrollen erkennbar, die jedoch nicht an eine statistische Signifikanz heranreichten. Bei MSA entspricht dieser Befund der weitgehend gleichmäßigen Geschlechterverteilung der Erkrankung (Wüllner et al., 2004; Stefanova et al., 2009). Die steigende Krankheitssuszeptibilität im Alter bei Abnahme der epigenetischen Adaptationsfähigkeit (Bjornsson et al., 2004; Feinberg, 2007) spiegelt

sich in der Korrelation des Methylierungsstatus mit dem Alter bei LBD-Patienten wider (De Boni et al., 2011). Die eigenen Ergebnisse deuten auf eine alters-abhängige Methylierungsdynamik hin ohne signifikante Korrelation. Während Matsumoto et al. eine Assoziation zwischen DNA-Methylierung und der Extension der Lewy-Körperchen-Pathologie belegen konnte (2010), korrelierte die Methylierung nicht mit der Erkrankungsdauer der MSA.

Wenn auch statistisch nicht signifikant, ließ sich in dieser Arbeit eine Reduktion der Methylierung durch die L-Dopa Medikation stärker in Lymphocyten, aber auch im Cortex von MSA-Patienten beobachten. Dabei korrelierte die Methylierung nicht mit der L-Dopa Dosis. Dieser Befund ist erklärbar durch die Tatsache, dass L-Dopa mit Komponenten des C1-Metabolismus interagiert (Blandini et al., 2001). Ein wichtiger Reaktionsschritt im L-Dopa-Metabolismus besteht in der Methylierung von L-Dopa mittels Catechol-O-Methyltransferase (COMT) unter Verbrauch des Methylgruppendonators S-Adenosylmethionin (SAM) (Schwarz und Storch, 2007). Das als Nebenprodukt entstandene S-Adenosylhomocystein (SAH) wird zu Homocystein hydrolysiert. Eine bei PD-Patienten dokumentierte Homocysteinämie wurde als L-Dopa-induzierte Depletion von Methylgruppen im Rahmen des neurodegenerativen Progresses diskutiert (Blandini et al., 2001; O'Suilleabhain et al., 2004; Yasui et al., 2000). Bei gesunden Frauen mit moderat erhöhtem Homocysteinspiegel zeigte sich eine Hypomethylierung in Lymphocyten-DNA (Jacob et al., 1998; Rampersaud et al., 2000; Yi et al., 2000). Die limitierte Verfügbarkeit von SAM wurde als Erklärungsansatz einer gesteigerten SNCA-Expression in Thrombozyten herangezogen (Obeid et al., 2009). Die Studie von Matsumoto et al. demonstrierte *in vitro* die Induktion der SNCA-Expression durch Zugabe von Dopamin, die zur Demethylierung der CpG-Insel führte (2010). Der demethylierende Effekt von Dopamin ließ sich durch den D2-Antagonisten Haloperidol aufheben, so dass ein D2-Rezeptor-vermittelter Mechanismus bei der Demethylierung diskutiert wurde. Der Methylierungs-modifizierende Einfluss von L-Dopa bei MSA könnte daher metabolisch in der Reduktion des Methylierungspotenzials mit konsekutiver Heraufregulierung der SNCA-Expression begründet sein. Im Gegensatz dazu deuten die Analysen von Schmitt et al. (2015) auf eine Erhöhung der Methylierung in PD-Lymphocyten nach L-Dopa Exposition.

## 4.4 Limitierungen dieser Arbeit

### Methodik

Die Bisulfitsequenzierung gilt als Goldstandard zur quantitativen Detektion von CpG-Methylierung in individuellen DNA-Molekülen (s. 2.2.1). Dennoch birgt diese Methode einige technische Schwierigkeiten und potenzielle Artefakte. Eine inkomplette Bisulfitkonversion z. B. durch ungenügende Einzelstrangtrennung führt zu falsch positiven 5mC-Residuen. In dieser Arbeit wurden aber Konversionsraten von mindestens 90 % erzielt. Bei der nachfolgenden PCR-Amplifikation ist zu berücksichtigen, dass die darin verwendete Taq-Polymerase keine Korrekturlesefunktion besitzt, so dass fehlerhafte Sequenzen entstehen können. Des Weiteren lässt sich nicht ausschließen, dass die nicht mehr komplementären DNA-Einzelstränge mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden (Warnecke et al., 1997). Die Amplifikation unmethylierter DNA wird begünstigt, da der höhere C/G-Gehalt in methylierter DNA die Schmelztemperatur anhebt. Ferner stellte die Subklonierung des Bisulfit-PCR-Produkts einen kritischen Schritt dar. Die Ratio von methylierten zu unmethylierten PCR-Produkten verschiebt sich tendenziell zugunsten der methylierten PCR-Produkte (Chhibber und Schroeder, 2008; Warnecke et al., 2002). Eine direkte PCR-Sequenzierung ohne den arbeitsaufwendigen Schritt der Subklonierung hingegen erlaubt keine Methylierungsanalyse eines individuellen DNA-Moleküls. Die Auswertung durch die direkte PCR-Sequenzierung erfolgt semiquantitativ, denn sie gibt bei gemischter CpG-Methylierung lediglich den gemittelten Methylierungsgrad wieder (Clark et al., 2006). Eine quantitative Auswertung ist bei der Pyrosequenzierung gegeben. Nachteil ist jedoch die begrenzte Leseweite des Sequenzierprimers von max. 150 bp (Jiang et al., 2010).

### Untersuchungsmaterial

Der begrenzte Probenumfang dieser Arbeit schränkt die statistische Aussagekraft deutlich ein. Diese Limitierung fällt angesichts der starken interindividuellen Unterschiede in der Methylierung noch schwerer ins Gewicht. Neben einer Ausweitung des Probenumfangs wäre sicherlich ebenso eine Ausweitung der zu untersuchenden Gewebeareale zur Auswertung der Methylierungsmuster im ZNS bei MSA erforderlich, um ein eventuelles distinktes Methylierungsprofil im erkrankten Gewebe zu detektieren.

In dieser Arbeit wurde der Cortex repräsentativ für das ZNS-Gewebe analysiert. Allerdings konnte keine unterschiedliche Methylierung von MSA-Patienten zu Kontrollen gefunden werden. Die vergleichende Analyse des Methylierungsstatus in verschiedenen Hirnarealen erscheint jedoch umso wichtiger, als durch die vorangegangenen PD- und LBD-Studien die Gewebespezifität der DNA-Methylierung hervorgehoben wurden (De Boni et al., 2011; Jowaed et al., 2010; Matsumoto et al., 2010). Die beobachtete Hypomethylierung im Putamen und in der *Substantia nigra* bei PD-Patienten könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Neurodegeneration und DNA-Methylierung hindeuten. Um den Zusammenhang zwischen GCI-Pathologie und DNA-Methylierung bei MSA zu prüfen, ist der Cortex als Ausgangsgewebe dennoch nicht ungeeignet, da GCIs auch im Cortex, v. a. im Motorcortex, verteilt sind, der Neuronenverlust hingegen weniger stark ausgeprägt ist (Ahmed et al., 2012). Das Cortexgewebe in dieser Arbeit beinhaltete ein heterogenes Gemisch aus multiplen Zellsorten. Es muss aber berücksichtigt werden, dass sich der Methylierungsgrad über die topographisch-anatomische Zuordnung einzelner Hirnareale hinaus auch zwischen einzelnen Zellpopulationen unterscheidet. Durch die zelluläre Heterogenität könnten Methylierungsdifferenzen maskiert worden sein. Daher könnte bei MSA eine Methylierungsanalyse unter Separation der Zellpopulation in Neurone und Oligodendrocyten eine differenziertere Aussage auf zellulärer Basis ermöglichen. Denn bislang ist der zelluläre Ursprung von  $\alpha$ -Synuclein nicht geklärt. Der GCI-assoziierten Oligodendropathie mit sekundärer neuronaler Degeneration bei MSA steht als weiterer pathophysiologischer Ansatz eine primär neuronale Synucleinopathie mit sekundärer oligodendrialer  $\alpha$ -Synuclein-Ablagerung gegenüber (Reyes et al., 2014; Stefanova et al., 2009; Wakabayashi und Takahashi, 2006; Yoshida, 2007).

#### **4.5 Klinische Relevanz**

Der Methylierungsstatus von MSA-Patienten unterschied sich von dem neurologisch gesunder Kontrollpersonen in Form einer Hypomethylierung bei den Erkrankten zumindest in Lymphocyten-DNA. Es stellt sich die Frage, ob anhand eines distinkten Methylierungsprofils Erkrankte von Gesunden selektiert werden können, wie sie beispielsweise für die LBD demonstriert wurde (Fernandez et al., 2012). Im Fall von PD

hat auch die Analyse von großen Kollektiven, vermutlich aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität, bisher keine hinreichend guten Werte für Sensitivität und Spezifität ergeben, um die Erkrankung anhand des Methylierungsstatus im Blut ausreichend sicher zu diagnostizieren (Schmitt et al., 2015). Die Suche nach non-invasiven Biomarkern für die MSA und weitere Parkinson-Syndrome wird umso mehr forciert, als die akkurate Diagnosestellung meist zu spät erfolgt. Im Gegensatz zum *post mortem* Hirngewebe, das Methylierungsalterationen im Endstadium der Erkrankung repräsentiert, ermöglicht die Analyse peripherer Blutzellen durch ihre leichte Zugänglichkeit ein Monitoring der DNA-Methylierung. In einer genom-weiten Methylierungsanalyse zeigte sich ungeachtet der Gewebe- und Zellheterogenität eine Korrelation der Methylierungsmuster zwischen Hirn- und Blutgewebe (Masliah et al., 2013). Die Untersuchung einzelner CpG-Positionen im *SNCA*-Intron1 ergab ein Methylierungsmuster in Lymphocyten-DNA von MSA-Patienten, in dem sich an individuellen CpG-Positionen gesondert signifikant ausgeprägte Hypomethylierungen abzeichneten. Ein solch distinktes Methylierungsprofil könnte das krankheits-assoziierte Genexpressionsmuster bei MSA reflektieren. Durch die kovalente Bindung der Methylgruppe an Cytosin besteht bei der DNA-Methylierung auf der einen Seite eine gewisse Stabilität des epigenetischen Merkmals zum Screening einer Erkrankung bzw. zur Bewertung des Erkrankungsrisikos. Im Gegensatz zum irreversiblen genetischen Gerüst bietet die DNA-Methylierung andererseits aufgrund ihrer potenziellen Reversibilität die Möglichkeit des Therapie-Monitorings oder sogar zur Therapie selbst (Esteller et al., 2000; Paz et al., 2004; Tost, 2010). Die DNA-Methylierung hat sich in der Tumorforschung als Biomarker zur Diagnostik, Prognose, Therapiemonitoring und -prädiktion etabliert (Levenson, 2010). Angesichts der Methylierungskorrelationen zwischen Hirngewebe und Blutbestandteilen in AD (Wang et al., 2008), PD (Maeda et al., 2009, 2012), Multipler Sklerose (Liggett et al., 2010) und psychiatrischen Erkrankungen (Dempster et al., 2011) eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Biomarkern auch für Synucleinopathien.

## 5. Zusammenfassung

Die Multisystematrophie (MSA) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung mit charakteristischer Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein in oligodendroglialen Einschlusskörperchen. Bis auf die Identifikation des *SNCA*-Gens als Risikofaktor ist die Ätiopathogenese der MSA unklar. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass das *SNCA*-Gen durch Methylierung einer CpG-Insel im Intron1-Abschnitt in der transkriptionellen Aktivität moduliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus erstmalig bei MSA erhoben unter der Fragestellung, ob ein verändertes Methylierungsmuster im *SNCA*-Intron1 an der dysregulierten *SNCA*-Expression in der MSA Pathogenese beteiligt sein könnte. Hierfür wurde DNA aus Lymphocyten von 19 MSA Patienten und 17 neurologisch gesunden Kontrollen sowie aus *post mortem* Cortexgewebe von 10 MSA Patienten und 10 Kontrollpersonen verwendet. Die Methylierungsanalyse erfolgte mittels der Goldstandardtechnik der Bisulfitsequenzierung. Aus der Bisulfitreaktion generierte DNA-Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Nach Klonierung der PCR-Produkte wurden individuelle Klone der Sequenzierung zur quantitativen, allel-spezifischen Methylierungsanalyse zugeführt.

Die Lymphocyten-DNA im *SNCA*-Intron1 zeigte sich bei MSA gegenüber Kontrollen signifikant hypomethyliert ( $5,4 \pm 5,5$  Mittelwert  $\pm$  SD vs.  $10,7 \pm 4,4$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $p = 0,0035$ ). Eine Hypomethylierung im *SNCA*-Intron1 könnte durch Induktion der Genexpression eine pathologisch heraufregulierte *SNCA*-Expression mit konsekutiver  $\alpha$ -Synuclein-Aggregation bei MSA zur Folge haben. An individuellen CpG-Positionen (CpG-Positionen 1, 7, 8, 13, 22 und 23) traten die Methylierungsdifferenzen noch stärker hervor. Die Nähe von Bindungsstellen wichtiger Transkriptionsfaktoren impliziert einen Transkriptionsfaktor-vermittelten Mechanismus. Im Cortex hingegen fand sich kein Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen Erkrankten und Kontrollen ( $4,3 \pm 3,2$  Mittelwert  $\pm$  SD vs.  $3,0 \pm 1,9$  Mittelwert  $\pm$  SD;  $p = 0,28$ ). Allerdings ist angesichts der variablen gewebspezifischen Methylierungsprofile die Analyse weiterer Hirnregionen zur Validierung der Rolle der DNA-Methylierung bei MSA dringend erforderlich. Es mehren sich Hinweise, dass Methylierungsmuster von ZNS-Gewebe im Blutgewebe reflektiert wird, so dass ein distinktes Methylierungsmuster im Blut als Biomarker dienen

könnte. Darüber hinaus lässt die Evaluation potenzieller Einflussfaktoren Tendenzen im Hinblick auf eine Assoziation der DNA-Methylierung mit Alter, Geschlecht und Erkrankungsdauer sowie eine Hypomethylierung unter L-Dopa Medikation erkennen.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams R, van Bogaert L, van der Eecken H. Dégénérescences nigro-striées et cerebello-nigro-striées. *Psychiat Neurol* 1961; 142: 233-246

Adams RD, van Bogaert L, van der Eecken H. Striato-nigral degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1964; 23: 584-608

Ahmed Z, Asi YT, Sailer A, Lees AJ, Houlden H, Revesz T, Holton JL. The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38: 4-24

Ai SX, Xu Q, Hu YC, Song CY, Guo JF, Shen L, Wang CR, Yu RL, Yan XX, Tang BS. Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2014; 337: 123-128

Al-Chalabi A, Dürr A, Wood NW, Parkinson MH, Camuzat A, Hulot JS, Morrison KE, Renton A, Sussmuth SD, Landwehrmeyer BG, Ludolph A, Agid Y, Brice A, Leigh PN, Bensimon G; NNIPPS Genetic Study Group. Genetic variants of the alpha-synuclein gene SNCA are associated with multiple system atrophy. *PLoS One* 2009; 4: e7114

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23: 185-188

Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1647-1658

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11995-11999

Asi YT, Simpson JE, Heath PR, Wharton SB, Lees AJ, Revesz T, Houlden H, Holton JL. Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA. *Glia* 2014; 62: 964-970

Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 55-59

Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 880-891

Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174

- Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 1995; 9: 2325-2334
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-2402
- Beyer K, Domingo-Sàbat M, Humbert J, Carrato C, Ferrer I, Ariza A. Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease. *Neurogenetics* 2008; 9: 163-172
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-398
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454
- Bjornsdottir A, Gudmundsson G, Blondal H, Olafsson E. Incidence and prevalence of multiple system atrophy: a nationwide study in Iceland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84:136-140
- Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet* 2004; 20: 350-358
- Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekström TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, Feinberg AP. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008; 299: 2877-2883
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell Physiol* 2001; 188: 143-160
- Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 2001; 47: 1102-1104
- Blattler A, Farnham PJ. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *J Biol Chem* 2013; 288: 34287-34294
- Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21: 4067-4068

- Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 234-239
- Bönsch D, Lenz B, Kornhuber J, Bleich S. DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *Neuroreport* 2005; 16: 167-170
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 1997; 49: 1284-1288
- Brohede J, Rinde M, Winblad B, Graff C. A DNA methylation study of the amyloid precursor protein gene in several brain regions from patients with familial Alzheimer disease. *J Neurogenet* 2010; 24: 179-181
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1250-1256
- Burn DJ, Jaros E. Multiple system atrophy: cellular and molecular pathology. *Mol Pathol* 2001; 54: 419-426
- Cannon JR, Greenamyre JT. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* 2011; 124: 225-250
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; 53: 3-4
- Chang CC, Chang YY, Chang WN, Lee YC, Wang YL, Lui CC, Huang CW, Liu WL. Cognitive deficits in multiple system atrophy correlate with frontal atrophy and disease duration. *Eur J Neurol* 2009; 16: 1144-1150
- Chen PY, Feng S, Joo JW, Jacobsen SE, Pellegrini M. A comparative analysis of DNA methylation across human embryonic stem cell lines. *Genome Biol* 2011; 12: R62
- Cheng Y, Bernstein A, Chen D, Jin P. 5-Hydroxymethylcytosine: A new player in brain disorders? *Exp Neurol* 2014. pii: S0014-4886(14)00150-2
- Chhibber A, Schroeder BG. Single-molecule polymerase chain reaction reduces bias: application to DNA methylation analysis by bisulfite sequencing. *Anal Biochem* 2008; 377: 46-54.
- Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, Coleman PD, Rutten BP, van den Hove DL. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 2091-2099

- Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 1997; 195: 67-71
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2990-2997
- Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* 2006; 1: 2353-2364
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55: 1449-1455
- Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998; 21: 249-254
- Clough RL, Dermentzaki G, Stefanis L. Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219. *J Neurochem* 2009; 110: 1479-1490
- Clough RL, Stefanis L. A novel pathway for transcriptional regulation of a-synuclein. *FASEB J* 2007; 21: 596-607
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35: 146-150
- Colosimo C, Tiple D, Wenning GK. Management of multiple system atrophy: state of the art. *J Neural Transm* 2005;112: 1695-1704
- Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3975-3982
- Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002; 132: 2393-2400
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 2011; 146: 67-79
- Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 2012; 3: 21-38

Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine A<sub>vy</sub> allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17308-17312

Damberg M. Transcription factor AP-2 and monoaminergic functions in the central nervous system. *J Neural Transm* 2005; 112: 1281-1296

Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC, Mill J. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol* 2012; 13: R43

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011; 25: 1010-1022

De Boni L, Tierling S, Roeber S, Walter J, Giese A, Kretzschmar HA. Next-generation sequencing reveals regional differences of the  $\alpha$ -synuclein methylation state independent of Lewy body disease. *Neuromolecular Med* 2011; 13: 310-320

Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, Kalidindi S, Picchioni M, Kravariti E, Touloupoulou T, Murray RM, Mill J. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4786-4796

Desplats P, Spencer B, Coffee E, Patel P, Michael S, Patrick C, Adame A, Rockenstein E, Masliah E. Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases. *J Biol Chem* 2011; 286: 9031-9037

Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, Gollomp SM, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *American Journal of Pathology* 2000; 157: 1439-1445

Dujardin K, Defebvre L, Krystkowiak P, Degreef JF, Destee A. Executive function differences in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; 9: 205-211

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463

Ehrlich M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 2003; 109: 17-28

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 2709-2721

El-Maarri O, Becker T, Junen J, Manzoor SS, Diaz-Lacava A, Schwaab R, Wienker T, Oldenburg J. Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males. *Hum Genet* 2007; 122: 505-514

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350-1354

Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 97-109

Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007; 447: 433-440

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92

Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Cespedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res* 2012; 22: 407-419

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10604-10609

Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 2007; 23: 413-418

Frieling H, Gozner A, Römer KD, Lenz B, Bönsch D, Wilhelm J, Hillemacher T, de Zwaan M, Kornhuber J, Bleich S. Global DNA hypomethylation and DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in females with anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 229-230

Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002; 132: 2382S-2387S

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 182-831

Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, Langston JW, Middleton FA, Ross OA, Hulihan M, Gasser T, Farrer MJ. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 2007; 68: 916-922

Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC, Gasser T. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J* 2008; 22: 1327-1334

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology* 2002; 4:160-164

Fuso A. The 'golden age' of DNA methylation in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 523-534

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;196: 261-282

Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* 2009; 25: 82-90

Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000; 290: 985-989

Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai SL, Arepalli S, Dillman A, Rafferty IP, Troncoso J, Johnson R, Zielke HR, Ferrucci L, Longo DL, Cookson MR, Singleton AB. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000952

Gilman S, Low PA, Quinn N, Albanese A, Ben-Shlomo Y, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lang AE, Lantos PL, Litvan I, Mathias CJ, Oliver E, Robertson D, Schatz I, Wenning GK. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1999; 163: 94-98

Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008; 71: 670-676

- Graham JG, Oppenheimer DR. Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1969;32: 28-34
- Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 1982; 295: 620-622
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E65-E65
- Gwinn-Hardy K, Mehta ND, Farrer M, Maraganore D, Muenter M, Yen SH, Hardy J, Dickson DW. Distinctive neuropathology revealed by alpha-synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 663-672
- Hamza TH, Payami H. The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *J Hum Genet* 2010; 55: 241-243
- Hara K, Momose Y, Tokiguchi S, Shimohata M, Terajima K, Onodera O, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Hirasawa M, Mizuno Y, Ogata K, Goto J, Kanazawa I, Nishizawa M, Tsuji S. Multiplex families with multiple system atrophy. *Arch Neurol* 2007; 64: 545-551
- Hayatsu H. Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. *Progr. Nucleic Acids res. Mol. Biol* 1976; 16: 75-124
- Heijmans BT, Kremer D, Tobi EW, Boomsma DI, Slagboom PE. Heritable rather than age-related environmental and stochastic factors dominate variation in DNA methylation of the human IGF2/H19 locus. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 547-554
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 17046-17049
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054
- Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, Arepalli S, van der Brug M, Chong S, Moore M, Longo DL, Cookson MR, Traynor BJ, Singleton AB. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 1164-1172
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 2000; 260: 1-12

- Holmberg B, Johansson JO, Poewe W, Wenning G, Quinn NP, Mathias C, Tolosa E, Cardozo A, Dizdar N, Rascol O, Slaoui T; Growth-Hormone MSA Study Group; European MSA Study Group. Safety and tolerability of growth hormone therapy in multiple system atrophy: a double-blind, placebo-controlled study. *Mov Disord* 2007; 22: 1138-1144
- Hughes AJ, Colosimo C, Kleedorfen B, et al. The dopaminergic response in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 1009-1013
- Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 2008; 6: e22
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 2009; 583: 1713-1720
- Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001134
- Inoue M, Yagishita S, Ryo M, Hasegawa K, Amano N, Matsushita M. The distribution and dynamic density of oligodendroglial cytoplasmic inclusions (GCIs) in multiple system atrophy: a correlation between the density of GCIs and the degree of involvement of striatonigral and olivopontocerebellar systems. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 585-591
- Iraola-Guzmán S, Estivill X, Rabionet R. DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment? *Clin Genet* 2011; 80: 1-14
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyani S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 2009; 41: 178-186
- Ishizawa K, Komori T, Sasaki S, Arai N, Mizutani T, Hirose T. Microglial activation parallels system degeneration in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 43-52
- Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM, Swendseid ME. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J. Nutr* 1998; 128:1204-1212
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33: 245-254
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 1994; 345: 27-32

James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 2002;132: 2361-2366

Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, Fan W, Qian X, Zhang T, Lu D. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab Invest* 2010; 90: 282-290

Jin H, Ishikawa K, Tsunemi T, Ishiguro T, Amino T, Mizusawa H. Analyses of copy number and mRNA expression level of the alpha-synuclein gene in multiple system atrophy. *J Med Dent Sci* 2008; 55: 145-153

Jiricny J, Menigatti M. DNA Cytosine demethylation: are we getting close? *Cell* 2008; 135: 1167-1169

Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 805-811

Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20: 85-93

Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, Wüllner U. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J Neurosci* 2010; 30: 6355-6359

Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R; FDA. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3604-3608

Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat. Genet* 2009;41: 240-245

Kato S, Nakamura H. Cytoplasmic argyrophilic inclusions in neurons of pontine nuclei in patients with olivopontocerebellar atrophy: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Acta Neuropathol* 1990; 79: 584-594

Kawai Y, Suenaga M, Takeda A, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Kato K, Fukatsu H, Naganawa S, Kato T, Ito K, Sobue G. Cognitive impairments in multiple system atrophy: MSA-C vs MSA-P. *Neurology* 2008; 70: 1390-1396

Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, Proukakis C, Quinn N, Lees AJ, Hardy J, Revesz T, Houlden H, Holton JL.  $\alpha$ -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol* 2013; 125: 753-769

Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn TB, Seo JH, Kim HS, Park CH, Choi SH, Cho SH, Lee WJ, Suh YH. Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J* 2004; 18: 1615-1617

Klockgether T, Lüdtke R, Kramer B, Abele M, Bürk K, Schöls L, Riess O, Laccone F, Boesch S, Lopes-Cendes I, Brice A, Inzelberg R, Zilber N, Dichgans J. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 1998; 121: 589-600

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 89-97

Kume A, Takahashi A, Hashizume Y. Neuronal cell loss of the striatonigral system in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1993; 117: 33-40

Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, Callinan PA, Fan JB, Potash JB, Feinberg AP. DNA Methylation Signatures within the Human Brain. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 1304-1315

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N,

Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921

Langerveld AJ, Mihalko D, DeLong C, Walburn J, Ide CF. Gene expression changes in postmortem tissue from the rostral pons of multiple system atrophy patients. *Mov Disord* 2007; 22: 766-777

Lantos PL. The definition of multiple system atrophy: a review of recent developments. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 1099-1111

Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 2010; 20: 320-331

Lee J, Kosaras B, Aleyasin H, Han JA, Park DS, Ratan RR, Kowall NW, Ferrante RJ, Lee SW, Ryu H. Role of cyclooxygenase-2 induction by transcription factor Sp1 and Sp3 in neuronal oxidative and DNA damage response. *FASEB J* 2006; 20: 2375-2377

Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 2006; 113: 1435-1439

Lee PH, Lee JE, Kim HS, Song SK, Lee HS, Nam HS, Cheong JW, Jeong Y, Park HJ, Kim DJ, Nam CM, Lee JD, Kim HO, Sohn YH. A randomized trial of mesenchymal stem cells in multiple system atrophy. *Ann Neurol* 2012; 72: 32-40

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 1992; 71, 865-874

Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 481-488

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-365

- Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, Culvenor JG, Horne MK. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007; 204: 583-588
- Li SH, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H, Li XJ. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1277-1287
- Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, Feng X, Reder A, Stefoski D, Balabanov R, Levenson V. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2010; 290: 16-21
- Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol* 2012; 863: 359-376
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; 462: 315-322
- Litvan I, Goetz CG, Jankovic J, Wenning GK, Booth V, Bartko JJ, McKee A, Jellinger K, Lai EC, Brandel JP, Verny M, Chaudhuri KR, Pearce RK, Agid Y. What is the accuracy of the clinical diagnosis of multiple system atrophy? A clinicopathologic study. *Arch Neurology* 1997; 937-944
- Liu J, Morgan M, Hutchison K, Calhoun VD. A study of the influence of sex on genome wide methylation. *PLoS One* 2010; 5: e10028
- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 932-942
- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009; 323: 1074-1077
- Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Higuchi Y, Makino N. Aging-associated alteration of telomere length and subtelomeric status in female patients with Parkinson's disease. *J Neurogenet* 2012; 26: 245-251
- Maeda T, Guan JZ, Oyama J, Higuchi Y, Makino N. Aging-associated alteration of subtelomeric methylation in Parkinson's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64: 949-955
- Marques SC, Oliveira CR, Pereira CM, Outeiro TF. Epigenetics in neurodegeneration: a new layer of complexity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35: 348-355

- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988; 8: 2804-2815
- Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* 2013; 8: 1030-1038
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 2025–2037
- Mastroeni D, McKee A, Grover A, Rogers J, Coleman PD. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2009; 4: e6617
- Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, Iwata A. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS One* 2010; 5: e15522
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010; 466: 253-257
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403: 501-502
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 2009; 12: 342-348
- Michell AW, Luheshi LM, Barker RA. Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005; 381: 294-298
- Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2009; 667: 82-97
- Miller DW, Johnson JM, Solano SM, Hollingsworth ZR, Standaert DG, Young AB. Absence of alpha-synuclein mRNA expression in normal and multiple system atrophy oligodendroglia. *J Neural Transm* 2005; 112: 1613-1624
- Mills JD, Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 1012.e11-1012.e24
- Morris MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 425-428

Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997; 88: 471-481

Nee LE, Gomez MR, Dambrosia J, Bale S, Eldridge R, Polinsky RJ. Environmental-occupational risk factors and familial associations in multiple system atrophy: a preliminary investigation. *Clin Auton Res* 1991; 1: 9-13

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 1998; 14: 194-200

Numata S, Ye T, Hyde TM, Guitart-Navarro X, Tao R, Winger M, Colantuoni C, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK. DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 260-272

Obeid R, Schadt A, Dillmann U, Kostopoulos P, Fassbender K, Herrmann W. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem* 2009; 55: 1852-1860

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219-220

Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 2008; 133: 1145-1148

Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000; 10: 475-478

O'Suilleabhain PE, Bottiglieri T, Dewey RB Jr, Sharma S, Diaz-Arrastia R. Modest increase in plasma homocysteine follows levodopa initiation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2004; 19: 1403-1408

Ozawa T, Okuizumi K, Ikeuchi T, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. Analysis of the expression level of alpha-synuclein mRNA using postmortem brain samples from pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 188-190

Ozawa T, Paviour D, Quinn NP, Josephs KA, Sangha H, Kilford L, Healy DG, Wood NW, Lees AJ, Holton JL, Revesz T. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivopontocerebellar systems in multiple system atrophy: clinicopathological correlations. *Brain* 2004; 127: 2657-2671

Ozawa T, Takano H, Onodera O, Kobayashi H, Ikeuchi T, Koide R, Okuizumi K, Shimohata T, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. No mutation in the entire coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1999; 270: 110-112

Paleologou KE, Schmid AW, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fredenburg RA, Lansbury PT Jr, Fernandez CO, Eliezer D, Zweckstetter M, Lashuel HA. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimetics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2008; 283: 16895-16905

Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 1996; 10: 1991-2002

Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci* 1989; 94: 79-100

Papp MI, Lantos PL. Accumulation of tubular structures in oligodendroglial and neuronal cells as the basic alteration in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1992; 107: 172-182

Papp MI, Lantos PL. The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. *Brain* 1994; 117: 235-243

Paul CL, Clark SJ. Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis. *Biotechniques* 1996; 21: 126-133

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4933-4938

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 2002; 22: 3090-3099

Poewe W, Seppi K, Fitzer-Attas CJ, Wenning GK, Gilman S, Low PA, Giladi N, Barone P, Sampaio C, Eyal E, Rascol O; Rasagiline-for-MSA investigators. Efficacy of rasagiline in patients with the parkinsonian variant of multiple system atrophy: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2015; 14: 145-152

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1057-1068

Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res* 2007; 61: 38R-42R

- Putiri EL, Robertson KD. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin Epigenetics* 2011; 2: 299-314
- Quinn N. Multiple system atrophy - the nature of the beast. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52: 78-89
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6107-6112
- Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 998-1003
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, Porcellini E, Licastro F. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 636-643
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 1980; 210: 604-610
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-1093
- Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32
- Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia* 2014; 62: 387-398
- Richter J, Appenzeller S, Ammerpohl O, Deuschl G, Paschen S, Brüggemann N, Klein C, Kühlenbäumer G. No evidence for differential methylation of  $\alpha$ -synuclein in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 2012; 27: 590-591
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C, Langston JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol* 2008; 63: 743-750
- Ross OA, Vilariño-Güell C, Wszolek ZK, Farrer MJ, Dickson DW. Reply to: SNCA variants are associated with increased risk of multiple system atrophy. *Ann Neurol* 2010; 67: 414-415
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996

Ryu H, Lee J, Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD, Neve R, Ratan RR. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 3597-3606

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6230-6234

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467

Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo. *Dev. Biol* 2002; 241: 172-182

Sarter B, Long TI, Tsong WH, Koh WP, Yu MC, Laird PW. Sex differential in methylation patterns of selected genes in Singapore Chinese. *Hum Genet* 2005; 117: 402-403

Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 129-140

Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1412-1417

Scherzer CR, Grass JA, Liao Z, Pepivani I, Zheng B, Eklund AC, Ney PA, Ng J, McGoldrick M, Mollenhauer B, Bresnick EH, Schlossmacher MG. GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene  $\alpha$ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 10907-10912

Scholz SW, Houlden H, Schulte C, Sharma M, Li A, Berg D, Melchers A, Paudel R, Gibbs JR, Simon-Sanchez J et al. SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Ann Neurol* 2009; 65: 610-614

Schmitt I, Kaut O, Khazneh H, deBoni L, Ahmad A, Berg D, Klein C, Fröhlich H, Wüllner U. L-dopa increases  $\alpha$ -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Mov Disord* 2015; 30: 1794-1801

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 354: 1771-1775

Schwarz J, Storch A. Parkinson-Syndrom: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Stuttgart: Kohlhammer, 2007; S. 202-209

Seo JH, Yong SW, Song SK, Lee JE, Sohn YH, Lee PH. A case-control study of multiple system atrophy in Korean patients. *Mov Disord* 2010; 25: 1953-1959

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-483

Shi M, Zabetian CP, Hancock AM, Ginchina C, Hong Z, Yearout D, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Leverenz JB, Zhang J. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010; 480: 78-82

Shin EC, Cho SE, Lee DK, Hur MW, Paik SR, Park JH, Kim J. Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells*. 2000; 10: 65-70. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 2011; 479: 74-79

Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 1999; 22: 203-236

Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2007; 2: e895

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841

Soma H, Yabe I, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H. Heredity in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2006; 240: 107-110

Song YJ, Lundvig DM, Huang Y, Gai WP, Blumbergs PC, Højrup P, Otzen D, Halliday GM, Jensen PH. p25alpha relocalizes in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Am J Pathol* 2007; 171: 1291-1303

Song Y, Ding H, Yang J, Lin Q, Xue J, Zhang Y, Chan P, Cai Y. Pyrosequencing analysis of SNCA methylation levels in leukocytes from Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2014; 569: 85-88

Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang B, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 68-72

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998; 251: 205-208

Stefanova N, Bücke P, Duerr S, Wenning GK. Multiple system atrophy: an update. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1172-1178

Stefanova N, Poewe W, Wenning GK. Rasagiline is neuroprotective in a transgenic model of multiple system atrophy. *Exp Neurol* 2008; 210: 421-427

Stefanova N, Reindl M, Neumann M, Kahle PJ, Poewe W, Wenning GK. Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Mov Disord* 2007; 22: 2196-2203

Stemberger S, Jamnig A, Stefanova N, et al. Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. *PLoS One* 2011; 6: e19808

Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 2008; 123: 8-13

Sun ZF, Xiang XS, Chen Z, Zhang L, Tang BS, Xia K, Jiang H. Increase of the plasma  $\alpha$ -synuclein levels in patients with multiple system atrophy. *Mov Disord* 2014; 29: 375-379

Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 465-476

Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng X, He C, Jin P. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1607-1616

Tan EK, Chandran VR, Fook-Chong S, Shen H, Yew K, Teoh ML, Yuen Y, Zhao Y. Alpha-synuclein mRNA expression in sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20: 620-623

Tan YY, Wu L, Zhao ZB, Wang Y, Xiao Q, Liu J, Wang G, Ma JF, Chen SD. Methylation of  $\alpha$ -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20: 308-313

Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-231

Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4046-4053

Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Genda Y, Ukitsu M. Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 70: 288-292

Tost J. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. *Mol Biotechnol* 2010; 44: 71-81

Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2007; 2: 2265-2275

Ubhi K, Inglis C, Mante M, Patrick C, Adame A, Spencer B, Rockenstein E, May V, Winkler J, Masliah E. Fluoxetine ameliorates behavioral and neuropathological deficits in a transgenic model mouse of  $\alpha$ -synucleinopathy. *Exp Neurol* 2012; 234: 405-416

Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 2002; 23: 4072-4079

Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1056-1072

Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Colosimo C, De Michele G, Marconi R, Stocchi F, Nicholl D, Bonuccelli U, De Mari M, Vieregge P, Meco G; ESGAP Consortium. Case-control study of multiple system atrophy. *Mov Disord* 2005; 20: 158-163

Vidal JS, Vidailhet M, Derkinderen P, Tzourio C, Alperovitch A. Familial aggregation in atypical Parkinson's disease: a case control study in multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *J Neurol* 2010; 257: 1388-1393

Vidal JS, Vidailhet M, Elbaz A, Derkinderen P, Tzourio C, Alperovitch A. Risk factors of multiple system atrophy: a case-control study in French patients. *Mov Disord* 2008; 23: 797-803

Vogt IR, Lees AJ, Evert BO, Klockgether T, Bonin M, Wüllner U. Transcriptional changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease putamen. *Exp Neurol* 2006; 199: 465-478

Voutsinas GE, Stavrou EF, Karousos G, Dasoula A, Papachatzopoulou A, Syrrou M, Verkerk AJ, van der Spek P, Patrinos GP, Stöger R, Athanassiadou A. Allelic imbalance of expression and epigenetic regulation within the alpha-synuclein wild-type and p.Ala53Thr alleles in Parkinson disease. *Hum Mutat* 2010; 31: 685-691

Waddington CH. Epigenotype. *Endeavour* 1942; 1: 18-20

Wakabayashi K, Takahashi H. Cellular pathology in multiple system atrophy. *Neuropathology* 2006; 26: 338-345

Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1998; 249: 180-182

Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 4777-4790

Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One* 2008; 3: e2698

Wang Y, Wang X, Li R, Yang ZF, Wang YZ, Gong XL, Wang XM. A DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine, exacerbates neurotoxicity and upregulates Parkinson's disease-related genes in dopaminergic neurons. *CNS Neurosci Ther* 2013; 19: 183-190

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4422-4426

Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 2002; 27:101-107

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004; 7: 847-854

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: 457-466

Wenning GK, Ben Shlomo Y, Magalhães M, Daniel SE, Quinn NP. Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain* 1994; 117: 835-845

Wenning GK, Ben-Shlomo Y, Magalhaes M, Daniel SE, Quinn NP. Clinicopathological study of 35 cases of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58: 160-166

Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W. Multiple system atrophy. *Lancet Neurol* 2004; 3: 93-103

- Wenning GK, Geser F, Krismer F, Seppi K, Duerr S, Boesch S, Köllensperger M, Goebel G et al. The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 264-274
- Wenning GK, Jellinger KA. The role of alpha-synuclein in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 129-140
- Wenning GK, Stefanova N. Recent developments in multiple system atrophy. *J Neurol* 2009; 256: 1791-808
- Wenning GK, Tison F, Ben Shlomo Y, Daniel SE, Quinn NP. Multiple system atrophy: a review of 203 pathologically proven cases. *Mov Disord* 1997; 12: 133-147
- Wenning GK, Tison F, Elliott L, Quinn NP, Daniel SE. Olivopontocerebellar pathology in multiple system atrophy. *Mov Disord* 1996; 11: 157-162
- West RL, Lee JM, Maroun LE. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci* 1995; 6:141-146
- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 1998; 12: 949-957
- Wong AH, Gottesman II, Petronis A. Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R11-R18
- Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 607-620
- Wüllner U, Abele M, Schmitz-Huebsch T, Wilhelm K, Benecke R, Deuschl G, Klockgether T. Probable multiple system atrophy in a German family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 924-925
- Wüllner U, Schmitt I, Kammal M, Kretschmar HA, Neumann M. Definite multiple system atrophy in a German family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 449-450
- Xia Y, Saitoh T, Ueda K, Tanaka S, Chen X, Hashimoto M, Hsu L, Conrad C, Sundsmo M, Yoshimoto M, Thal L, Katzman R, Masliah E. Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms. *J Alzheimers Dis* 2001; 3: 485-494
- Xin Y, Chanrion B, Liu MM, Galfalvy H, Costa R, Ilievski B, Rosoklija G, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Tycko B, Haghghi F. Genome-wide divergence of DNA methylation marks in cerebral and cerebellar cortices. *PLoS One* 2010; 5: e11357

Yabe I, Soma H, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H. MSA-C is the predominant clinical phenotype of MSA in Japan: analysis of 142 patients with probable MSA. *J Neurol Sci* 2006; 249: 115-121

Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology* 2000; 55: 437-440

Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 29318-29323

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-340

Yoshida M. Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration. *Neuropathology* 2007; 27: 484-493

Yun JY, Lee WW, Lee JY, Kim HJ, Park SS, Jeon BS. SNCA variants and multiple system atrophy. *Ann Neurol* 2010; 67: 554-555

Zardo G, Fazi F, Travaglini L, Nervi C. Dynamic and reversibility of heterochromatic gene silencing in human disease. *Cell Res* 2005; 15: 679-690

Zhang D, Cheng L, Badner JA, Chen C, Chen Q, Luo W, Craig DW, Redman M, Gershon ES, Liu C. Genetic control of individual differences in gene-specific methylation in human brain. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 411-419

Zhang Y, Rohde C, Tierling S, Stamerjohanns H, Reinhardt R, Walter J, Jeltsch A. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones. *Methods in molecular biology* 2009; 507: 177-187

Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan LJ, Ding H, Yee L, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4056-4065

## **7. Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Ullrich Wüllner herzlich für die Überlassung der Themenstellung danken mit der Möglichkeit, dies unter seiner Leitung und guten fachlichen Betreuung zu bearbeiten.

Herrn Dr. Oliver Kaut danke ich für seine treue Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit in stetiger Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Ebenso gilt mein Dank Frau PD Dr. Ina Schmitt für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und ihre konstruktive Hilfe.

Einen besonderen Dank möchte ich an Frau Sabine Proske-Schmitz und die gesamte Arbeitsgruppe richten, von der ich praktische Hilfe bei der Durchführung der Experimente in einer herzlichen Arbeitsatmosphäre erfahren habe.

Schließlich danke ich meiner Familie von Herzen.