

**Einfluss einer methylreichen Ernährung während der Schwangerschaft
auf die globale DNA- Methylierung verschiedener Organgewebe
sowie die hypothalamische Genexpression
im Mausmodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Bettina Brune
im August 2016

*“Alle Ding` sind Gift und nichts ist ohn` Gift;
allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist“*

Paracelsus (1493-1541)

1. Gutachter: Professor Dr. Helmut Heseker
2. Gutachter: Professor Dr. Dr. Claus Reinsberger

Datum der mündlichen Prüfung: 19.12.2016

Kurzfassung

Ziele: Es wird im Mausmodell untersucht, ob sich eine methylreiche Ernährung während der Schwangerschaft organspezifisch auf die globale DNA- Methylierung und das Genexpressionsmuster der Nachkommen auswirkt.

Methoden: Trächtige Mäuse werden methylreich ernährt; ab Geburt erhalten Muttertiere und Nachkommen entweder eine methylreiche oder eine Standarddiät. Die Kontrollgruppe erhält intra- und extrauterin eine Standarddiät. 3 Monate postnatal wird bei den Nachkommen die globale DNA- Methylierung in Herz-, Milz-, Leber-, Gehirn- sowie Hypothalamusgewebe untersucht; für die Genexpressionsanalyse wird Hypothalamusgewebe ausgewählt.

Ergebnisse: Eine pränatal methylreiche Diät führt zu einer signifikant höheren globalen DNA- Methylierung im Gehirn- und Hypothalamusgewebe der Nachkommen. In Herz-, Leber- und Milzgewebe ist dieser Trend nicht signifikant. Bei postnatal aufrechterhaltener methylreicher Diät der Nachkommen bleibt die globale Methylierung im Hypothalamus auf einem hohen Niveau; in den anderen Organen sinkt sie unter das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe. Es werden insgesamt 31 hypothalamische Gene identifiziert, die nach einer intrauterin methylreichen Diät signifikant und mindestens 3fach stärker bzw. schwächer exprimiert werden.

Fazit: Im Mausmodell führt eine pränatal methylreiche Diät bei den Nachkommen langfristig zu epigenetischen Veränderungen im Hypothalamus, die sowohl die globale DNA- Methylierung als auch die Genexpression betreffen. Kandidatengene für weitere Studien könnten die verstärkt exprimierten Gene *Folr1*, *Ttr* und *Tsix* sein.

Abstract

Objectives: In a mouse model it is investigated whether a high-methyl diet during pregnancy affects organ-specific global DNA methylation and gene expression patterns of the progeny.

Methods: Pregnant mice are fed a high-methyl diet; after delivery dams and their offspring receive either a high-methyl or a standard diet. The mice of the control group receive intra- and extrauterine a standard diet. 3 months postnatally global DNA methylation in heart, spleen, liver, brain and hypothalamic tissue is determined in the offspring; for gene expression analysis hypothalamic tissue is selected.

Results: A prenatal high-methyl diet is associated with a significantly higher global DNA methylation in the brain and hypothalamus tissues. In heart, liver and spleen, a nonsignificant trend towards a higher methylation is observed. When the high-methyl diet is continued postnatally, the global methylation remains at a high level in the hypothalamus; in the other organ tissues it falls below the starting level in the control group. A total of 31 hypothalamic genes are identified that were expressed significantly and at least 3-fold differently after intrauterine high-methyl diet.

Conclusion: In a mouse model a prenatal high-methyl diet leads to long-term epigenetic changes in the hypothalamus of the offspring. This concerns both global DNA methylation and gene expression. Candidate genes for further study could be the upregulated genes *Folrl*, *Ttr* and *Tsix*.

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zitierfähige Abstracts:

Brune B, Linke R, Jakubiczka S, Brunner-Weinzierl M, Brune T (2014)

Methylreiche Kost in der Schwangerschaft führt im Mausmodell beim Nachwuchs zu dauerhaft erhöhter DNA-Gesamtmethylierung und verändertem Genexpressionsmuster im Hypothalamus. Monatsschr Kinderheilkd 2014;162(1):91

Beiträge in Kongress-/ Tagungsbänden:

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Brunner-Weinzierl M, Geffers R, Brune T (2014)

Eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft führt im Mausmodell bei den Nachkommen zu einer höheren DNA-Gesamtmethylierung und verändert im Hypothalamus signifikant das Genexpressionsmuster. In: Abstractband 51. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE), Paderborn, 12.-14.03.2014

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Geffers R, Brunner-Weinzierl M, Brune T (2014)

In a mouse model dietary methyl supplementation during pregnancy permanently alters total DNA methylation and gene expression in the hypothalamus of the offspring. In: Abstractband International Conference on Developmental Origins of Adiposity and Long-Term Health, München, 13.-15.03.2014

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Geffers R, Weinzierl M, Brune T (2016)

Einfluss einer methylreichen Ernährung während der Schwangerschaft auf die globale DNA- Methylierung verschiedener Organgewebe sowie die hypothalamische Genexpression der Nachkommen im Mausmodell. In: Proceedingband 2016, DGFE-net, Med. Verlag Siegfried Zabransky, 2015 ISBN 978-3-943113-07-5

Poster:

Brune B, Linke R, Jakubiczka S, Brunner-Weinzierl M, Brune T (2014)

Methylreiche Kost in der Schwangerschaft führt im Mausmodell beim Nachwuchs zu dauerhaft erhöhter DNA-Gesamtmethylierung und verändertem Genexpressionsmuster im Hypothalamus. 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), Bonn, 26.-28.06.2014

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Geffers R, Brunner-Weinzierl M, Brune T (2014)

In a mouse model dietary methyl supplementation during pregnancy permanently alters total DNA methylation and gene expression in the hypothalamus of the offspring. In: Abstractband International Conference on Developmental Origins of Adiposity and Long-Term Health, München, 13.-15.03.2014

Vorträge:

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Geffers R, Weinzierl M, Brune T (2013)

Eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft führt im Mausmodell zu einer Übermethylierung der CpG-Islands und einer Überepression des Xist- sowie des Folatrezeptor-Gens im Hypothalamus des Nachwuchses. 49. Arbeitstagung für Pädiatrische Forschung, Düsseldorf, 12.-13.09.2013

Brune B, Jakubiczka S, Linke R, Geffers R, Weinzierl M, Brune T (2016)

Einfluss einer methylreichen Ernährung während der Schwangerschaft auf die globale DNA-Methylierung verschiedener Organgewebe sowie die hypothalamische Genexpression der Nachkommen im Mausmodell. 14. Workshop der Deutschen Gesellschaft für Fetale Entwicklung e.V. (DGFE), Neuwied, 1.-2.7.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Helmut Heseker, der mir die Gelegenheit gegeben hat, zu dieser interessanten Fragestellung eine Dissertation an der Hochschule Paderborn anzufertigen, und mich dabei sehr unterstützt hat.

Ich danke Herrn Professor Dr. Gerhard Jorch sowie Herrn Professor Dr. Hermann-Josef Rothkötter, die mir ermöglicht haben, die experimentellen Arbeiten im Tierstall und Labor der Universitätsklinik Magdeburg durchzuführen. Sehr herzlich danke ich Herrn Professor Dr. Rüdiger Linke, Dr. Sybilla Jakubiczka und ganz besonders Anke Schmidt, die mir hilfsbereit und geduldig Unterstützung bei der praktischen Umsetzung im Labor gegeben haben.

Bei Dr. Robert Geffers bedanke ich mich sehr für die bereitwillige Kooperation und Beratung bei der Durchführung und Auswertung der Genexpressionsanalyse.

Meinem Mann danke ich sehr für die Motivation zu dieser Arbeit, seine Anregungen und den geduldigen Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.2 Zusammenfassung und Fragestellung.....	16
2 Untersuchung der globalen DNA- Methylierung.....	18
2.1 Material und Methoden.....	18
2.1.1 Tiermaterial und -haltung.....	18
2.1.2 Studiendesign und Experimentaldiät.....	18
2.1.3 Probengewinnung.....	20
2.1.4 Isolierung der DNA aus den Organgeweben.....	20
2.1.5 DNA- Methylierungsanalyse.....	21
2.2 Statistik.....	21
2.3 Ergebnisse.....	22
3 Genexpressionsanalyse.....	25
3.1 Material und Methoden.....	25
3.1.1 Isolierung der RNA aus dem Hypothalamusgewebe.....	25
3.1.2 Durchführung des Microarray- Assay.....	26
3.2 Statistik.....	27
3.3 Ergebnisse.....	27
3.3.1 Bestimmung der Qualität der Genexpressionsanalyse.....	27
3.3.2 Gene, deren Expression nach intrauteriner Diät verändert ist.....	31

4	Diskussion	35
4.1	Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien.....	35
4.2	Beeinflussung der globalen DNA- Methylierung durch eine intrauterin methylreiche Diät.....	45
4.2.1	Langfristig globale DNA-Hypermethylierung nach intrauterin methylreicher Diät...	45
4.2.2	Bei postnataler Aufrechterhaltung der methylreichen Diät kein Unterschied der globalen DNA-Methylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ausnahme: Hypothalamus)	45
4.2.3	Globale DNA-Hypermethylierung im Hypothalamus weiblicher Mäuse nach prä- und postnatal methylreicher Diät: Hinweis auf Fetale (Fehl-) Programmierung?	53
4.3	Langfristig verändertes hypothalamisches Genexpressionsmuster nach intrauterin methylreicher Diät.....	55
5	Schlussfolgerung	66
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	72
8	Anhang	86
8.1	Studienüberblick.....	86
8.2	Isolierung der DNA aus den Organgeweben.....	101
8.2.1	Substanzen.....	101
8.2.2	Durchführung.....	101
8.3	DNA-Methylierungsanalyse.....	102
8.3.1	Substanzen.....	103
8.3.2	Durchführung.....	104
8.4	Präparation des Hypothalamus.....	105
8.5	Isolierung der RNA aus dem Hypothalamusgewebe.....	106
8.6	Zusammensetzung des Standardfutters.....	107
8.7	Eidesstattliche Erklärung.....	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten, die im Diätfutter supplementiert wurden.....	19
Tabelle 2: Anzahl der untersuchten Proben, aus denen die globale DNA-Methylierung bestimmt wurde.....	21
Tabelle 3: Gegenüberstellung der unterschiedlichen hypothalamischen Genexpression ($\geq 1,1$ fach) zwischen weiblichen und männlichen Mäusen: von Mozhui et al publizierte Ergebnisse (97) und Ergebnisse der vorliegenden Studie	28
Tabelle 4: Gene, die bei den weiblichen Nachkommen, deren Mütter während der Schwangerschaft methylreich ernährt wurden, im Vergleich zu den männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe signifikant und mindestens 3fach stärker exprimiert wurden.....	31
Tabelle 5: Gene, die bei den weiblichen Nachkommen, deren Mütter während der Schwangerschaft methylreich ernährt wurden, im Vergleich zu den männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe signifikant und mindestens 3fach schwächer exprimiert wurden.....	32
Tabelle 6: Gene, die Einfluss nehmen auf Transkription, Translation und Signaltransduktion.....	33
Tabelle 7: Gene, die dem Imprinting unterliegen.....	33
Tabelle 8: Gene, die an der Steuerung und dem Transport von Hormonen beteiligt sind..	34
Tabelle 9: Gene, deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist.....	34
Tabelle 10: Studien, in denen der Einfluss einer ausschließlich pränatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA- Methylierung der Nachkommen untersucht wurde.....	47
Tabelle 11: Studien, in denen der Einfluss einer pränatal und in der Stillzeit verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA- Methylierung untersucht wurde.....	48
Tabelle 12: Studien, in denen der Einfluss einer dauerhaft prä- und postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA- Methylierung untersucht wurde.....	49
Tabelle 13: Studien, in denen der Einfluss einer postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA- Methylierung untersucht wurde.....	50
Tabelle 14: Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen/ -armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Mausmodell untersucht wurde.....	87

Tabelle 15:	Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen/ -armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Rattenmodell untersucht wurde.....	91
Tabelle 16:	Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen/ -armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Schweinmodell untersucht wurde.....	96
Tabelle 17:	Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methylreichen/ -armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Humanmodell untersucht wurde.....	97
Tabelle 18:	Studien, in denen der Einfluss des Folsäurelevels auf DNA-Methylierung und Genexpression in vitro untersucht wurde.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel der Folate.....	2
Abbildung 2: Synthese von S-Adenosylmethionin aus Methionin und ATP, katalysiert durch Isoformen des Enzyms Methioninadenosyl-transferase (MAT).....	3
Abbildung 3: Der DNA-Zyklus und der Methylierungszyklus in der Zelle.....	5
Abbildung 4: Übertragung der reaktiven Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) auf Cytosin.....	6
Abbildung 5: Übertragung von Methylgruppen auf die DNA.....	7
Abbildung 6: Steuerung der Genaktivität durch Methylierung.....	8
Abbildung 7: Dynamik der globalen DNA- Methylierung während des Lebenszyklus....	10
Abbildung 8: Genetisch identische A ^{yy} /a Nachkommen von Mäusen, die fünf verschiedene Phänotypen repräsentieren.....	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Nährstoffexposition während der Schwangerschaft und den Mechanismen, die zu dem Auftreten von Krankheiten im späteren Leben führen.....	14
Abbildung 10: Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit angewandten Experimentalansatzes.....	20
Abbildung 11: Veränderlicher Grad der globalen DNA- Methylierung in verschiedenen Organgeweben weiblicher Nachkommen von Mäusen im Alter von 3 Monaten in Abhängigkeit vom Zeitfenster der Fütterung einer methylreichen Diät.....	22
Abbildung 12: Prozentualer Gehalt von 5-Methylcytosin, in verschiedenen Proben gemessen durch den MethylFlash™ - Kit im Vergleich zur klassischen HPLC-MS-Methode.....	24
Abbildung 13: Heatmap der in der Diätgruppe (♀) gegenüber der Kontrollgruppe (♂) signifikant unterschiedlich exprimierten Gene mit einer mindestens 2fach stärkeren bzw. schwächeren Expression.....	30
Abbildung 14: Potentielle tägliche Aufnahmemenge von synthetisch hergestellter Folsäure durch den Konsum von angereicherten Lebensmittel sowie Pharmaprodukten.....	37
Abbildung 15: Schematischer Überblick über die Lokalisation von Transportern und Rezeptoren für Folate/ Folsäure im Organismus (intra- und extrauterin).....	40
Abbildung 16: Blutfluss im fetalen Kreislauf.....	41
Abbildung 17: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Untersuchung festgelegten Zeitfenster der Diätfütterung von Muttertieren und ihren Nachkommen in den Interventionsgruppen.....	44

Abbildung 18: Hypothetisches Modell der intra- und extrauterinen Dynamik der globalen DNA- Methylierung in Abhängigkeit vom Zeitfenster der Fütterung einer methylreichen Diät.....	51
Abbildung 19: Modell des Folattransports über die Blut- Liquor- Schranke im Gehirn.....	56
Abbildung 20: Genloki von <i>Eif2s3x</i> , <i>Xist</i> und <i>Tsix</i> auf dem X- Chromosom der Maus.....	58
Abbildung 21: Unterdrückung der <i>Xist</i> - Expression durch Anlagerung der Antisense- RNA des <i>Tsix</i>	59
Abbildung 22: Entstehung der intrazellulären Domäne (AICD) des Amyloid-Vorläufer- proteins (APP) im amyloidogenen Stoffwechselweg.....	61
Abbildung 23: Umwandlung von Noradrenalin in Adrenalin durch Transmethylierung.....	63
Abbildung 24: Hypothetisches Modell der Hochregulierung von <i>Ttr</i>	64
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Methylierungsanalyse.....	103
Abbildung 26: Schnittführung zur Hypothalamuspräparation	105

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
APP	Amyloid-Precursor-Protein
BPA	Bisphenol A
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CRH	Corticotropin-Releasinghormon
DGE	Deutschen Gesellschaft für Ernährung
DHF	Dihydrofolat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA- Methyltransferase
DMBA	Dimethylbenzo[α]anthrazen
DOHaD	Developmental Origin of Health and Disease
EPICOR	Long-term follow-up of antithrombotic management patterns in acute coronary syndrome patients
FBP	Folate binding protein
Folr	Folatrezeptor
IAP	Intracisternal A Particle
HPLC	High Perfomance Liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
HPLC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
MAT	Methionin-Adenosyl-Transferase
MS	Massenspektrometer
NRD	Neuralrohrdefekt
PFCT	Protonengekoppelter Folattransporter
RBP	Retinol-binding- protein
RFC	Reduced Folate Carrier
RNA	Ribonucleic Acid
SAH	S- Adenosylhomozystein
SAM	S-Adenosylmethionin
THF	Tetrahydrofolsäure
V. cava inferior	Vena cava inferior
V. umbilicalis	Vena umbilicalis
ZNS	Zentralnervensystem

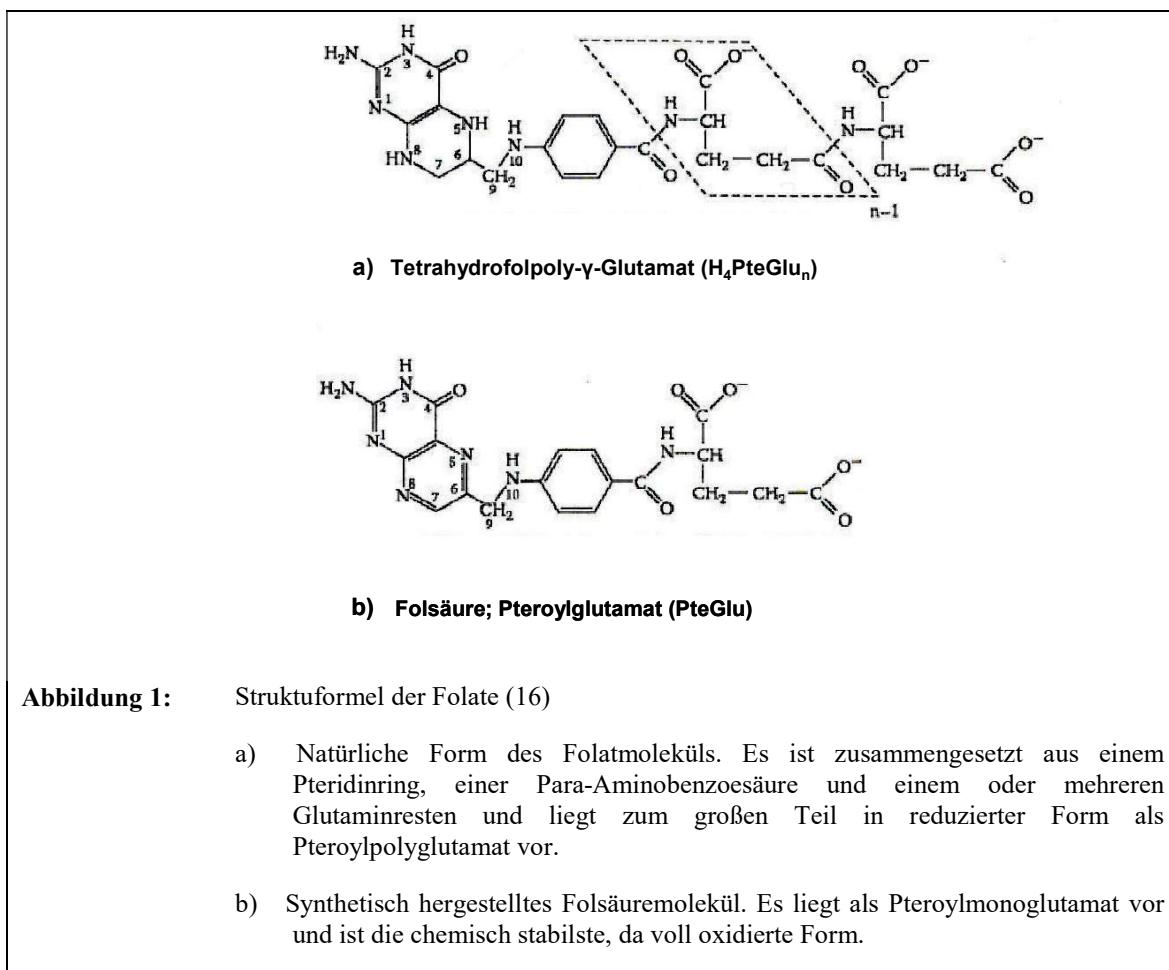
1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Eine adäquate mütterliche Nährstoffzufuhr während der Schwangerschaft ist von Beginn an eine wichtige Voraussetzung für die normale Entwicklung des Fetus. Wenn der Bedarf an bestimmten Nährstoffen überschritten oder nicht ausreichend gedeckt wird, besteht ein erhöhtes Risiko für Entwicklungsstörungen des ungeborenen Kindes, die sich in Form von Wachstumsrestriktionen oder kongenitalen Anomalien zeigen können. Ein Beispiel für die teratogene Wirkung eines Nährstoffes ist die Hypervitaminose A, die während der Frühschwangerschaft zu fetalen Missbildungen von Herz, Gaumen und Urogenitaltrakt führen kann (1, 2). Auch pathologisch erhöhte Glukosewerte im mütterlichen Blut, die bei einem bereits bestehendem oder während der Schwangerschaft diagnostizierten Diabetes auftreten können, gehen zum Zeitpunkt der fetalen Organogenese mit einem erhöhten Risiko für kongenitale Fehlbildungen an Herz, Wirbelsäule und Rückenmark sowie im Gastrointestinaltrakt des Kindes einher (3). Dabei korreliert das Risiko schwerer angeborener Fehlbildungen und Aborte mit dem Ausmaß der Hyperglykämien (4).

Eine bekannte, durch einen Nährstoffmangel bedingte gravierende Fehlbildung beim Neugeborenen stellt der Neuralrohrdefekt (NRD) dar. Seit Beginn der 1960er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen einer in der Frühschwangerschaft nicht ausreichenden Versorgung mit dem natürlich in der Nahrung enthaltenen Vitamin Folat und dem Auftreten von NRD vermutet (5, 6, 7, 8, 9). Ursächlich zugrunde liegt ein unvollständiger Verschluss des fetalen Neuralrohrs während der embryonalen Entwicklungsphase, welche in der 2. Schwangerschaftswoche beginnt und mit der 10. Woche nach der Befruchtung endet. Die entscheidende Zeitspanne für diese gravierende Entwicklungsstörung liegt demzufolge innerhalb eines sehr kleinen Zeitfensters während der Frühschwangerschaft. Die Mechanismen, die zu der Entstehung der NRD unterschiedlichen Ausmaßes führen, sind vielfältig und bislang noch nicht vollständig geklärt (10). Anfang der 1990er Jahre konnte die Reduzierung des Auftretens von NRD durch eine perikonzeptionelle Einnahme von Folsäure, der synthetisch hergestellten Form des Vitamins, wissenschaftlich nachgewiesen werden (11, 12). Das Folsäuremolekül ist voll oxidiert und chemisch sehr stabil. Es kann direkt ohne Umwandlungsprozesse über die Darmschleimhaut resorbiert werden; die individuelle Bioverfügbarkeit liegt zwischen 50 und 97 % und ist im Mittel höher als die der natürlich vorkommenden Nahrungsfolate (13, 14, 15). Diese sind sehr labil gegenüber äußeren Einflüssen, sie liegen größtenteils in reduzierter Form vor und müssen vor der enteralen Resorption umgewandelt werden. Synthetische Folsäure wird daher für eine

Supplementierung in Präparatform sowie für die Anreicherung von Lebensmitteln verwendet. In Abbildung 1 sind die jeweiligen Strukturformeln des Folat- und Folsäuremoleküls dargestellt.



Um das Risiko für die Entstehung von NRD zu minimieren, wird Schwangeren sowie Frauen in gebärfähigem Alter bzw. mit Planung einer Schwangerschaft daher von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfohlen, zusätzlich zu einer folatreichen Ernährung perikonzeptionell 400 μ g Folsäure täglich als Prophylaxe zu supplementieren (17, 18). Um das Niveau der Folsäureversorgung in der Bevölkerung gezielt anzuheben, wurde darüber hinaus in einigen Ländern seit Ende der 1990er Jahre die obligatorische Anreicherung von Grundnahrungsmitteln mit Folsäure eingeführt (19, 20, 21, 22). Neben Folaten bzw. Folsäure übernimmt auch das Vitamin B₁₂ eine wichtige Funktion hinsichtlich der Entwicklung des Ungeborenen. Bei Säuglingen wurden infolge einer maternalen Unterversorgung während der Schwangerschaft hämatologische und neurologische Störungen beobachtet, die postnatal als megaloblastäre Anämie, Homocysteinämie und neurologische Entwicklungsverzögerung auffielen; letztere waren teilweise nicht vollständig durch eine B₁₂- Gabe reversibel (23, 24, 25, 26, 27, 28). Auch das Risiko für die

Entstehung eines Neuralrohrdefektes wird durch einen Mangel während der Schwangerschaft erhöht; es wird daher diskutiert, Grundnahrungsmittel neben Folsäure mit Vitamin B₁₂ anzureichern (29).

Darüber hinaus scheint eine ausreichende Zufuhr der essentiellen Aminosäure Methionin eine kritische Rolle hinsichtlich der fetalen Entwicklung zu übernehmen; das Risiko für die Entstehung von NRD wird bei einem perikonzeptionellen Mangel ebenfalls erhöht (30). Beim Abbau zu Homocystein wird Methionin in einem Zwischenschritt in S-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt (siehe Abbildung 2) (31). Die hochreaktive Methylgruppe (-CH₃) des SAM kann durch Methyltransferasen auf zahlreiche Substrate übertragen werden; es spielt im Stoffwechsel eine wichtige Rolle bei Transmethylierungen. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS), wie z.B. Depressionen und Morbus Alzheimer, und der Versorgung mit SAM beobachtet (32, 33).

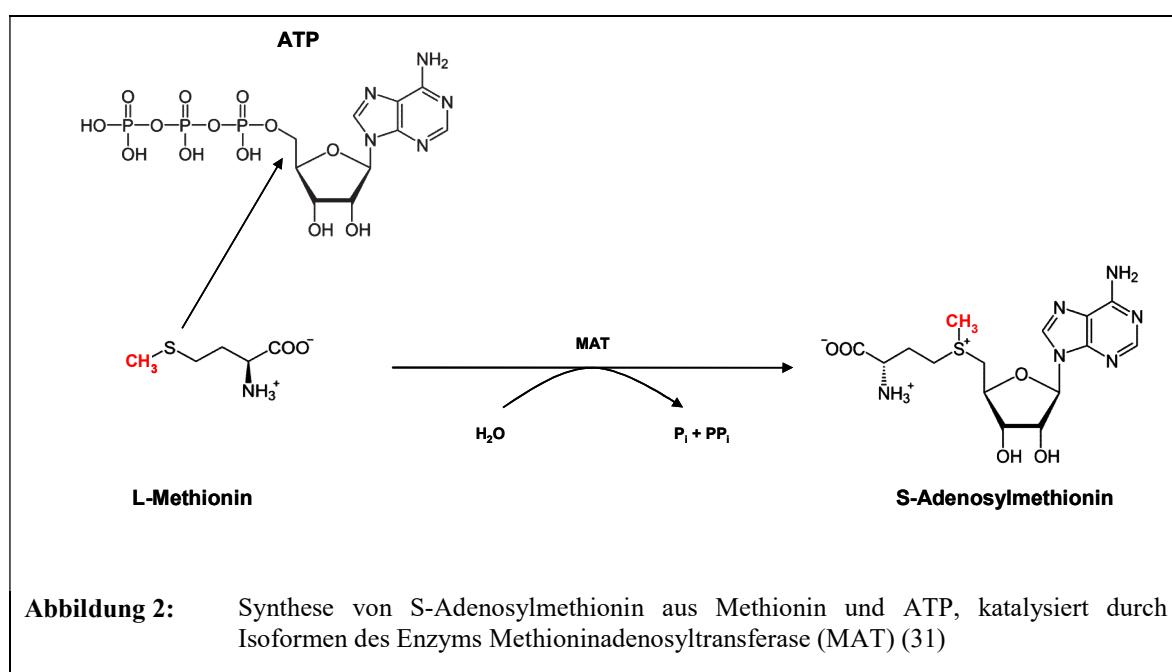


Abbildung 2: Synthese von S-Adenosylmethionin aus Methionin und ATP, katalysiert durch Isoformen des Enzyms Methioninadenosyltransferase (MAT) (31)

Substanzen, die Methylgruppen abgeben oder übertragen, werden als Methyldonatoren bezeichnet. Dazu zählen neben dem oben erwähnten Stoffwechselprodukt SAM die mit der Nahrung zugeführten Nährstoffe Folate, Methionin, Cholin und Betain. Darüber hinaus sind die Vitamine B₁₂, B₆ und B₂ an der enzymatischen Übertragung der Methylgruppen im Stoffwechsel beteiligt (34, 35).

Im Prinzip können in der Zelle zwei verschiedene Systeme des Methylgruppentransfers unterschieden werden, die in der Zelle parallel nebeneinander ablaufen und die über eine gemeinsame Schnittstelle, das Vitamin B₁₂, miteinander verbunden sind: der DNA- Zyklus und der Methylierungs- Zyklus (siehe Abbildung 3, S.5) (36). Die mit der Nahrung aufgenommenen, überwiegend nichtmethylierten Folate werden zunächst in der Leber in 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (5-Methyl-THF) umgewandelt. Nach Aufnahme des 5-Methyl-THF in die Zelle wird in einem ersten Schritt die Methylgruppe an das als Coenzym dienende Vitamin B₁₂ abgegeben. Es entsteht Tetrahydrofolsäure (THF), welche als Ausgangsprodukt für den DNA-Zyklus zur Verfügung steht. Dieses wird zunächst in 5,10- Methylen- Tetrahydrofolsäure (5,10-Methylen-THF) umgewandelt; die hierfür benötigten Methylgruppen werden an dieser Stelle durch die Umwandlung von Serin in Glycin in Anwesenheit des Enzyms Serin-Hydroxymethyltransferase aus dem Amiosäurestoffwechsel geliefert. Im nächsten Schritt kann dann zum einen die Pyrimidinsynthese erfolgen, bei der Dihydrofolat (DHF) entsteht, welches durch die DHF- Reduktase wieder zu THF umgewandelt wird. Zum anderen kann 5,10-Methylen-THF auch für die Purinsynthese verwendet werden, dafür wird es zuvor in einer Zwischenreaktion zu 10-Formyl-THF umgewandelt. Schließlich wird auch bei diesem Stoffwechselschritt erneut THF gebildet. Pyrimidine und Purine werden für die DNA-Synthese verwendet. Als dritte Möglichkeit kann 5,10-Methylen-THF darüber hinaus in einer irreversiblen Reaktion zu 5-Methyl-THF umgewandelt werden. Synthetisch hergestellte Folsäure gelangt als Vorstufe des THF ohne den Umweg über 5-Methyl-THF in den zellulären DNA-Zyklus; sie wird durch die Dihydrofolat-Reduktase in einem ersten Zwischenschritt zu Dihydrofolat und dann zu THF umgewandelt.

Die von dem Vitamin B₁₂ übernommene Methylgruppe des 5-Methyl-THF wird in den Methylierungszyklus eingeschleust und mithilfe des Enzyms Methionin- Synthase auf die Aminosäure Homocystein übertragen. Es entsteht die Aminosäure Methionin, welche beim Abbau durch die Übertragung des aktivierte Adenosylrest eines ATP-Moleküls in S- Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt wird. SAM steht als Methyldonor für zahlreiche Reaktionen, wie z.B. die Methylierung von Proteinen, Phospholipiden, DNA und RNA zur Verfügung (33, 37, 38). Bei der DNA- Methylierung wird die Methylgruppe des SAM durch Methyltransferasen auf die DNA übertragen, dabei entsteht S- Adenosylhomozystein (SAH). Dieses wird in Homozystein umgewandelt, und der Zyklus kann erneut beginnen. Für den reibungslosen Ablauf des Methylierungs- Zyklus sind Folate bzw. Folsäure in Form von 5-Methyl-THF und B₁₂ notwendig. Ein Mangel führt zu einem Defizit an SAM und einem Anstieg des Homozysteins. Eine inadäquate Versorgung kann kompensatorisch durch die Bildung von Methionin mithilfe von Cholin bzw. Betain ausgeglichen werden (35).

Abbildung 3 zeigt einen einfachen schematischen Überblick über die Abläufe der beiden Zyklen in der Zelle, die jeweiligen wichtigsten Zielfunktionen im Stoffwechsel und den Transfer der Methylgruppen.

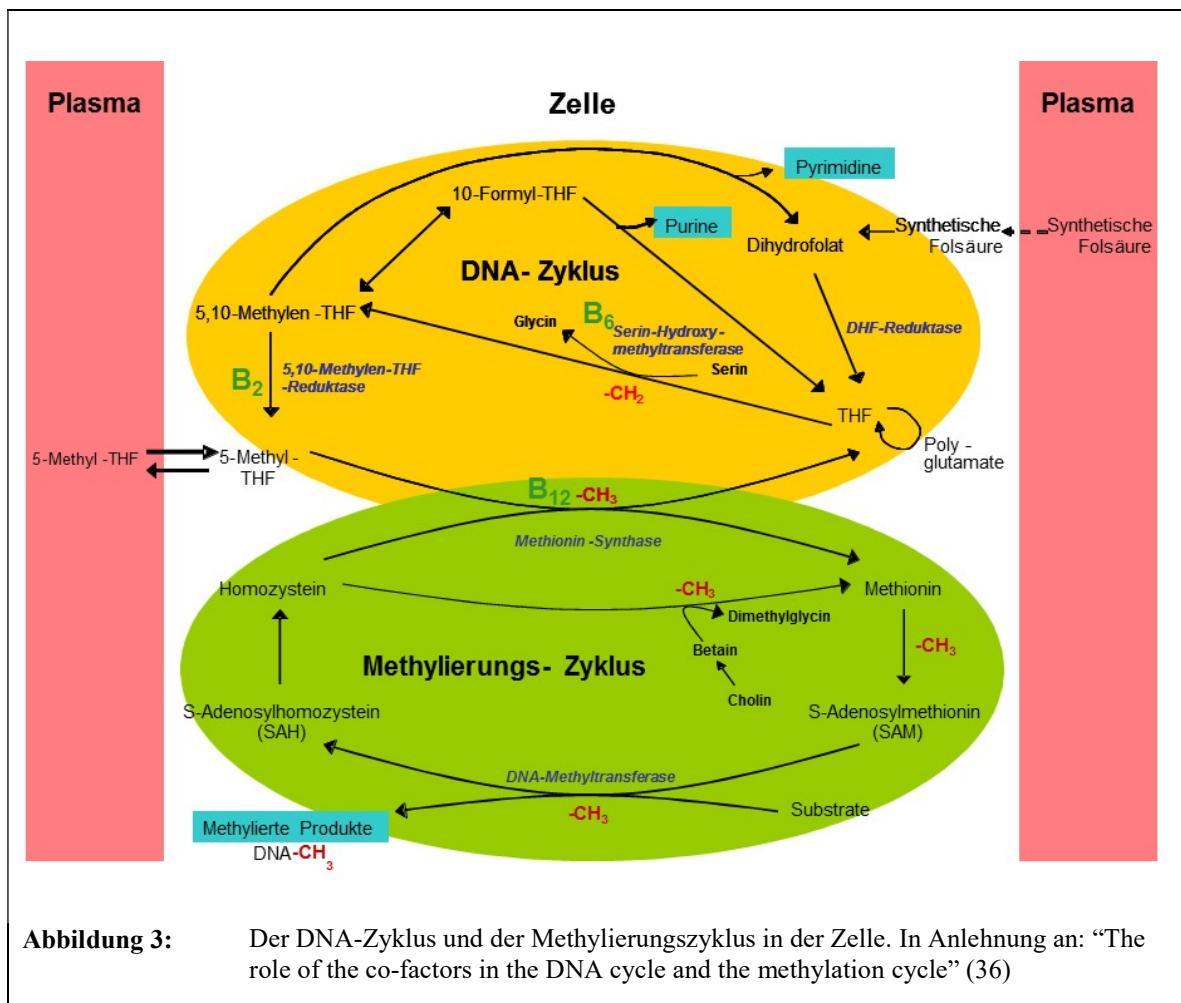
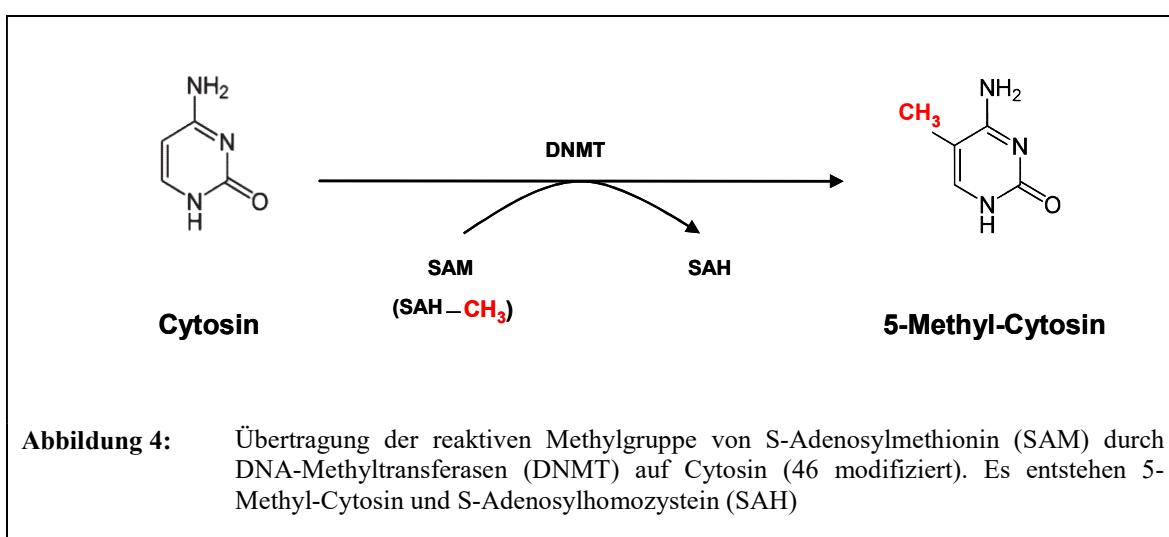


Abbildung 3: Der DNA-Zyklus und der Methylierungszyklus in der Zelle. In Anlehnung an: "The role of the co-factors in the DNA cycle and the methylation cycle" (36)

Die DNA-Methylierung zählt zu den epigenetischen Mechanismen, die die Aktivität von Genen regulieren. Der Begriff Epigenetik wird für die Beschreibung von Vorgängen verwendet, die vererbbarer Veränderungen der Aktivität von Genen bei gleichzeitig unveränderter DNA-Sequenz hervorrufen (39). Geprägt wurde er bereits Mitte des 20. Jahrhunderts durch den Evolutionsforscher Waddington, dieser beschrieb damit eine stetige Wechselbeziehung zwischen Genen und Umwelt, durch die der Phänotyp eines Individuums beeinflusst werden kann (40). Derzeit wird das menschliche Epigenom intensiv erforscht, ähnlich wie beim Humangenomprojekt (41). Die Kombination aller epigenetischen Veränderungen in einer Zelle bezeichnet man als ihren epigenetischen Code; durch ihn sind die Zellen in der Lage, trotz gleicher genetischer Ausstattung jeweils unterschiedliche Funktionen zu übernehmen, z.B. als Herz-, Leber- oder

Nervenzelle (42). Neben der DNA- Methylierung zählen auch die Modifikationen von Chromatin z.B. durch Histonmethylierung, -acetylierung oder phosphorylierung sowie die Wechselwirkungen von micro-RNAs mit der DNA zu den epigenetischen Mechanismen mit Einfluss auf die Genaktivität (42, 43, 44).

Beim Vorgang der DNA-Methylierung wird die Methylgruppe des SAM durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) enzymatisch auf die DNA-Base Cytosin übertragen. Dies geschieht mittels kovalenter Bindung an der 5. Position des Pyrimidinringes, dabei entstehen 5-Methyl-Cytosin und SAH (45, 46) (siehe Abbildung 4).



Die Methylierung des Cytosins findet bei Wirbeltieren hauptsächlich innerhalb von Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotiden (CpG-Dinukleotiden) auf beiden komplementären DNA-Strängen statt und führt zu einer veränderten dreidimensionalen Struktur der DNA (47, 48, 49, 50, 51) (siehe Abbildung 5).

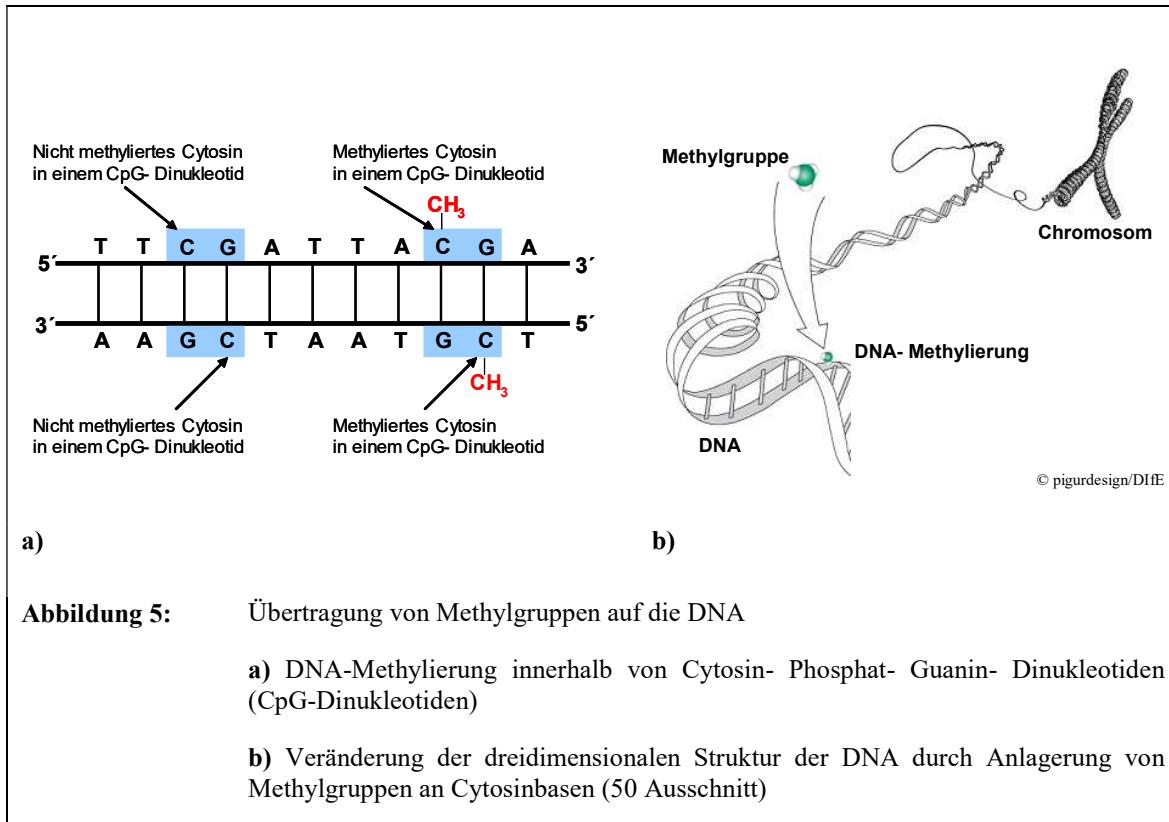
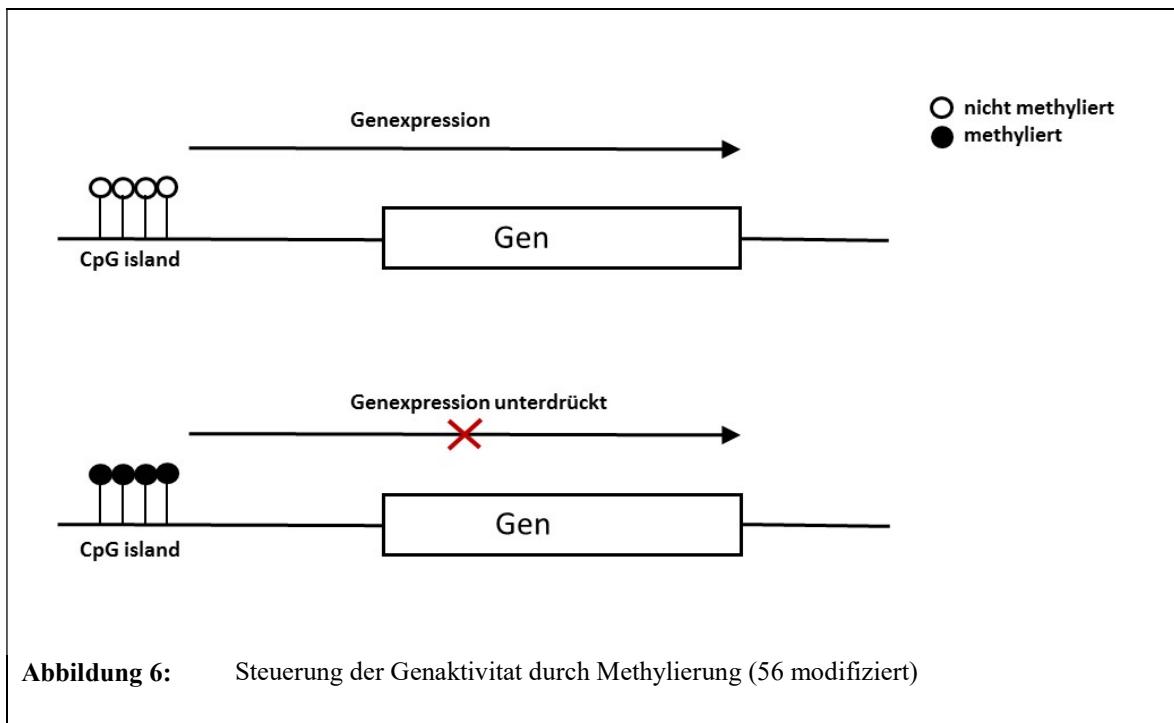


Abbildung 5: Übertragung von Methylgruppen auf die DNA

- a) DNA-Methylierung innerhalb von Cytosin- Phosphat- Guanin- Dinukleotiden (CpG-Dinukleotiden)
- b) Veränderung der dreidimensionalen Struktur der DNA durch Anlagerung von Methylgruppen an Cytosinbasen (50 Ausschnitt)

CpG- Dinukleotide (CpG-Ort, englisch: CpG- site) kommen im gesamten Genom nur in sehr geringer Menge vor (<1%); in bestimmten Abschnitten der DNA konzentrieren sie sich jedoch in statistisch erhöhter Dichte. Solche Regionen werden als CpG- Inseln bezeichnet; sie kommen gehäuft in der Promotorregion eines Gens vor, welche in der Regel vor dem Gen lokalisiert ist (52, 53). Der Promotor tritt in Wechselwirkung mit bestimmten DNA- bindenden Proteinen, die den Start der Transkription des Gens durch das Enzym RNA- Polymerase vermitteln und als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Während die CpG- Inseln im Gesamtgenom überwiegend methyliert vorliegen, trifft dies für diejenigen im Promotorbereich von Genen meist nicht zu (54, 55). In unmethyliertem Zustand ermöglichen sie als potentielle Bindungsstellen für Methylgruppen die Regulation der Genexpression durch die Beeinflussung der Transkriptionsvorgänge. Ihre Methylierung durch Anlagerung einer Methylgruppe und die dadurch bedingte Strukturveränderung der DNA in diesem Genabschnitt hat zur Folge, dass die Transkriptionsfaktoren nicht binden können und das Gen infolgedessen nicht abgelesen werden kann: es wird stillgelegt. In der Regel wird daher die Genexpression durch Methylierung unterdrückt (Abbildung 6). Im umgekehrten Fall bewirkt eine Demethylierung in der Promotorregion, dass ein stillgelegtes Gen reaktiviert wird und die kodierte Information abgelesen und übertragen werden kann. Die Markierung der DNA durch Methylgruppen dient demnach als

Schalter, der Gene aktivieren oder stilllegen kann; sie besitzt damit eine weit reichende Bedeutung für die Genregulation bei Säugetieren und Menschen.



Gleich zu Beginn ihres Lebens gibt es bei Säugetieren zwei entscheidende Entwicklungsabschnitte, in denen das Epigenom durch Löschung und Neuetablierung der bis dahin bestehenden Methylierungsmuster einer tiefgreifenden Reprogrammierung unterzogen wird (siehe Abbildung 7, S.10) (57, 58, 59). Betroffen sind zum einen die befruchtete Eizelle noch vor ihrer Implantation in die Gebärmutter, zum anderen kurze Zeit später die embryonalen Urkeimzellen (synonym: primordiale Keimzellen), welche Vorläufer der Ei- bzw. Samenzellen sind. Die erste Demethylierung erfolgt, sobald Ei- und Samenzelle bei der Befruchtung verschmolzen sind und die Zygote entstanden ist. Die erste nahezu vollständige Löschung der Programmierung ermöglicht die neue Ausbildung genspezifischer Methylierungsmuster, welche schließlich zu gewebespezifischen Transkriptionsvorgängen führen. Sie ist notwendig für die Entwicklung des totipotenten Potentials der embryonalen Stammzellen, da die beiden fusionierten Keimzellen jeweils sehr unterschiedliche Epigenome aufweisen. Die embryonalen Stammzellen sind Vorläufer für alle Körperzellen einschließlich der Keimzellen; im Verlauf ihrer Spezialisierung verlieren sie schrittweise ihre Totipotenz. Nur bei einigen wenigen Genen, die dem Imprinting unterliegen, bleibt die Methylierung erhalten. Beim Imprinting, auch als genomische Prägung bezeichnet, handelt es sich um einen Spezialfall der Genstilllegung, bei dem gezielt entweder das maternale oder das paternale

Allel durch Methylierung abgeschaltet wird. Die Genexpression hängt demnach davon ab, von welchem Elternteil das Allel stammt. Dieser epigenetische Vorgang der alternativen Stillegung entweder des paternalen oder des maternalen Allels beeinflusst damit den Phänotyp der Nachkommen, ohne den genetischen Code der Nukleotidbasensequenz zu verändern. Die Genstilllegung durch Imprinting zählt zu den wichtigsten Prozessen, die durch Methylierung gesteuert werden. Ein bekanntes Beispiel ist die Inaktivierung eines der beiden X- Chromosome bei weiblichen Säugetieren zu einem sehr frühen Zeitpunkt ihrer embryonalen Entwicklung mit dem Ziel der Dosiskompensation von Genprodukten (60).

Aus der Zygote entwickelt sich schließlich die Blastozyste, und noch vor ihrer Einnistung in den Uterus erfolgt die de-novo-Methylierung des Genoms. Ein zweites Mal wird das Methylierungsmuster in der frühen Embryonalphase in den Urkeimzellen während ihrer Wanderung in die Gonadenanlagen innerhalb kurzer Zeit gelöscht; diesmal sind auch Gene betroffen, die dem Imprinting unterliegen. Ein komplett neuer Methylierungsstatus der embryonalen Keimzellen ermöglicht beim weiblichen Embryo eine Aktivierung des stillgelegten X- Chromosom, so dass in den heranreifenden Eizellen beide X- Chromosomen potentiell genutzt werden können. Auch fehlerhafte Epimutationen, die andernfalls immer an die Folgegenerationen weitergegeben würden, können auf diese Weise gelöscht werden. Während der weiteren Gonadenentwicklung werden dann geschlechtsspezifische Methylierungsmuster neu etabliert.

Studien legen nahe, dass eine fehlerhafte Ausbildung der Methylierungsmuster in einem sehr frühen Stadium der intrauterinen Entwicklung auch zur Entstehung von Fehlbildungen des Neuralrohrs führen kann (61, 62). Die während der Embryogenese etablierten Methylierungsmuster bleiben im Wesentlichen in den Zellen erhalten und werden über mitotische und meiotische Zellteilung an alle neu entstehenden Tochterzellen weitergegeben. Die zwei Phasen der Reprogrammierung sind in Abbildung 7 dargestellt.

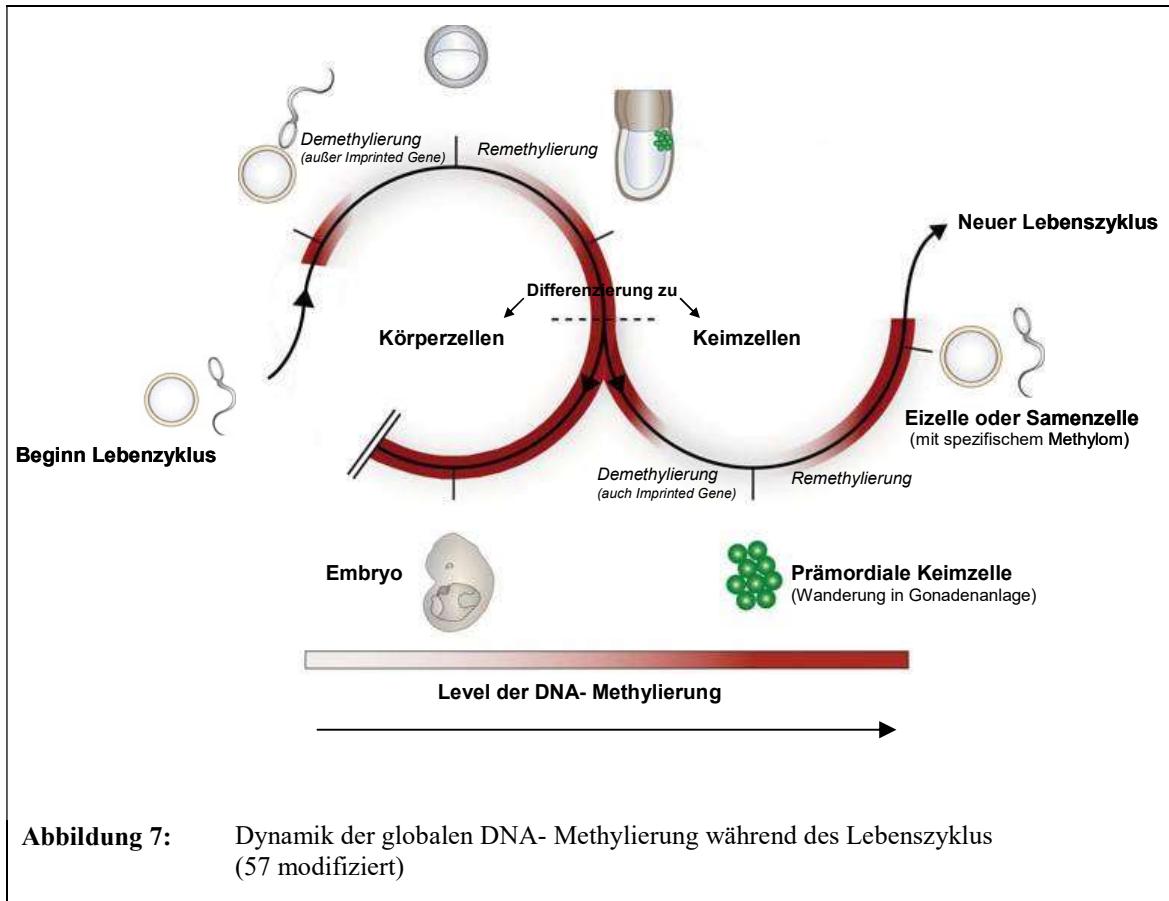


Abbildung 7: Dynamik der globalen DNA- Methylierung während des Lebenszyklus (57 modifiziert)

Lange wurde angenommen, dass die der Methylierung zugrundeliegenden Mechanismen nicht oder nur in geringem Umfang auch durch externe Faktoren veränderbar sind. Mittlerweile zeigen Studien, dass es sich bei der DNA- Methylierung um eine temporäre Modifikation im Erbgut handelt, die im Sinne eines Anpassungsprozesses durch Umweltfaktoren wie z.B. Lebensstil, soziale Erfahrungen, physikalische Faktoren und chemische Substanzen sowie durch bestimmte Nährstoffe beeinflusst werden kann (63, 64, 65). Forschungsergebnisse an eineiigen Zwillingen liefern Hinweise, dass bei gleicher Genausstattung das Erkrankungsrisiko für z.B. Brustkrebs, Insulinresistenz oder Diabetes im Laufe des Lebens durch unterschiedliche epigenetische Vorgänge beeinflusst wird (66, 67, 68). Man geht inzwischen davon aus, dass neu entstehende Hypo- oder auch Hypermethylierungen eine Rolle bei der Karzinogenese und der Entwicklung chronischer Erkrankungen spielen (69, 70, 71).

Ein Beispiel für die Steuerung epigenetischer Mechanismen durch Ernährungsfaktoren konnten Forscher durch Untersuchungen an Honigbienen nachweisen (65, 72). Sie beobachteten, dass alle jungen Bienen nach dem Schlüpfen zunächst mit dem Futtersaft Gelée Royal versorgt wurden.

Danach wurden die späteren Arbeiterinnen ausschließlich mit einem Honig- Pollen- Brei gefüttert, durch dessen Inhaltstoffe bestimmte Gene stark methyliert und dadurch deaktiviert wurden. Nur die zukünftigen Königinnen erhielten weiterhin zusätzlich das Gelée Royal. Dies enthält eine Fettsäure, welche die Inaktivierung der Gene verhindert. Auf diese Weise können nur die auserwählten jungen Bienen die gewünschten Eigenschaften einer Königin entfalten, obwohl alle Bienen identische Genomsequenzen besitzen. Studienergebnisse zeigten, dass im Gehirn der Königinnen mehr als 500 Gene durch Methylierung anders markiert sind als bei den Arbeiterinnen.

Es ist mittlerweile bekannt, dass die DNA- Methylierung und die Genexpression auch durch eine methylarme bzw. -reiche Ernährung beeinflusst werden können. In einer Untersuchung an gesunden Frauen führte eine Diät mit einem hohen Folsäuregehalt zu einer Abnahme der globalen Methylierung der leukozytären DNA (73). Ergebnisse der EPICOR- Studie, in deren Rahmen die Risikofaktoren für Herz-Kreislauferkrankungen untersucht wurden, zeigten einen inversen Zusammenhang zwischen der Vitamin B- Versorgung und dem Methylierungslevel verschiedener Kandidatengene (74). In weiteren Studien wurde demgegenüber auch nach einer Phase folsäureärmer Ernährung eine genomweite Hypomethylierung sowohl der Leuko- als auch der Lymphozyten bei postmenopausalen Frauen festgestellt (75, 76).

Auch in Zellversuchen an humanen Kolonzellen konnte nachgewiesen werden, dass niedrige Folatlevel im Medium zu einer zunehmenden Hypomethylierung der globalen DNA führen, dieser Vorgang war durch eine gesteigerte Folatzufuhr reversibel (77). In Untersuchungen an Ratten ging eine cholin- bzw. methylarme Diät mit einer globalen Demethylierung der DNA in der Leber einher (78, 79). Eine weitere Studie an Knockout- Mäusen zeigte einen Zusammenhang zwischen dem Versorgungsstatus mit Vitamin B₁₂ und globaler DNA- Methylierung im Gehirn (80). Darüber hinaus konnte im Mausmodell ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Zufuhr von Methionin und einer veränderten genspezifischen Methylierung im Gehirn nachgewiesen werden (81).

Es gibt Hinweise, dass Methyldonatoren in der Nahrung, die dem mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft zugeführt wird, die globale bzw. genspezifische Methylierung sowie die Genexpression bei den Nachkommen langfristig verändern können. In Untersuchungen an Schafen führte eine maternale methylarme Diät während der Schwangerschaft bei den Nachkommen in der Leber zu einer veränderten Methylierung von CpG- Islands und ging langfristig mit einer veränderten Immunantwort sowie erhöhtem Körperfett, Insulinresistenz und Hypertonie einher (82).

Am Modell der Agouti-Maus konnte gezeigt werden, dass eine methylreiche Ernährung der Muttertiere bei den sich entwickelnden Embryos gezielt die Genexpression durch eine Veränderung der Methylierung und dadurch den Phänotyp der Nachkommen langfristig beeinflussen kann (83, 84). Das Agouti- Gen kodiert für ein parakrines Signalmolekül und wird reguliert durch die Promotor- Aktivität eines bestimmten Gen-Abschnittes, der Intracisternal A Particle (IAP)- Sequenz. Mäuse mit einer bestimmten Genvariante (viable yellow agouti; A^{vy}) sind häufig krankhaft übergewichtig, leiden an Diabetes mellitus und Krebs und besitzen eine gelbe Fellfarbe. Zugrunde liegt die Insertion eines IAP- Retrotransposons vor dem Agouti-Gen, seine Transkription ruft an dieser Stelle eine ektopische Expression des Agouti- Proteins hervor, dessen parakrine Signalfunktion dann in den verschiedenen Geweben zu den phänotypischen Veränderungen führt (85). Eine auf den Zeitraum der Schwangerschaft beschränkte methylreiche Diät führte in der F1- Generation während der frühen Embryogenese zu einer verstärkten Methylierung von CpG-Islands der IAP- Sequenz und dadurch zu deren Stilllegung; diese blieb langfristig bestehen mit der Folge, dass die Nachkommen eine im Vergleich dunklere Fellfarbe hatten und gesund waren (siehe Abbildung 8). Die Aktivität des Retrotransposons wurde von den Muttertieren epigenetisch unterschiedlich vererbt, so dass es ein ganzes Spektrum von verschiedenen Ausprägungsgraden des Phänotypes gab. Dabei korrelierte die Methylierung der IAP-Sequenz invers mit der ektopischen Expression des Agouti-Gens. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine unvollständige Löschung der epigenetischen Markierungen während der Reprogrammierung in den Keimzellen handelt, die auf diese Weise von der Mutter an die Nachkommen weitergegeben wird. Die veränderte Methylierung blieb auch bestehen, nachdem der Nachwuchs postnatal eine normale Nahrung erhielt und wurde mit sukzessiv abnehmendem Ausprägungsgrad an die Folgegenerationen weitergegeben.

Eine methylreiche Ernährung der Mutter während der Schwangerschaft kann demnach offenbar die embryonalen Reprogrammierungsvorgänge und damit die Etablierung neuer Methylierungsmuster auch in der Keimbahn des Ungeborenen verändern.

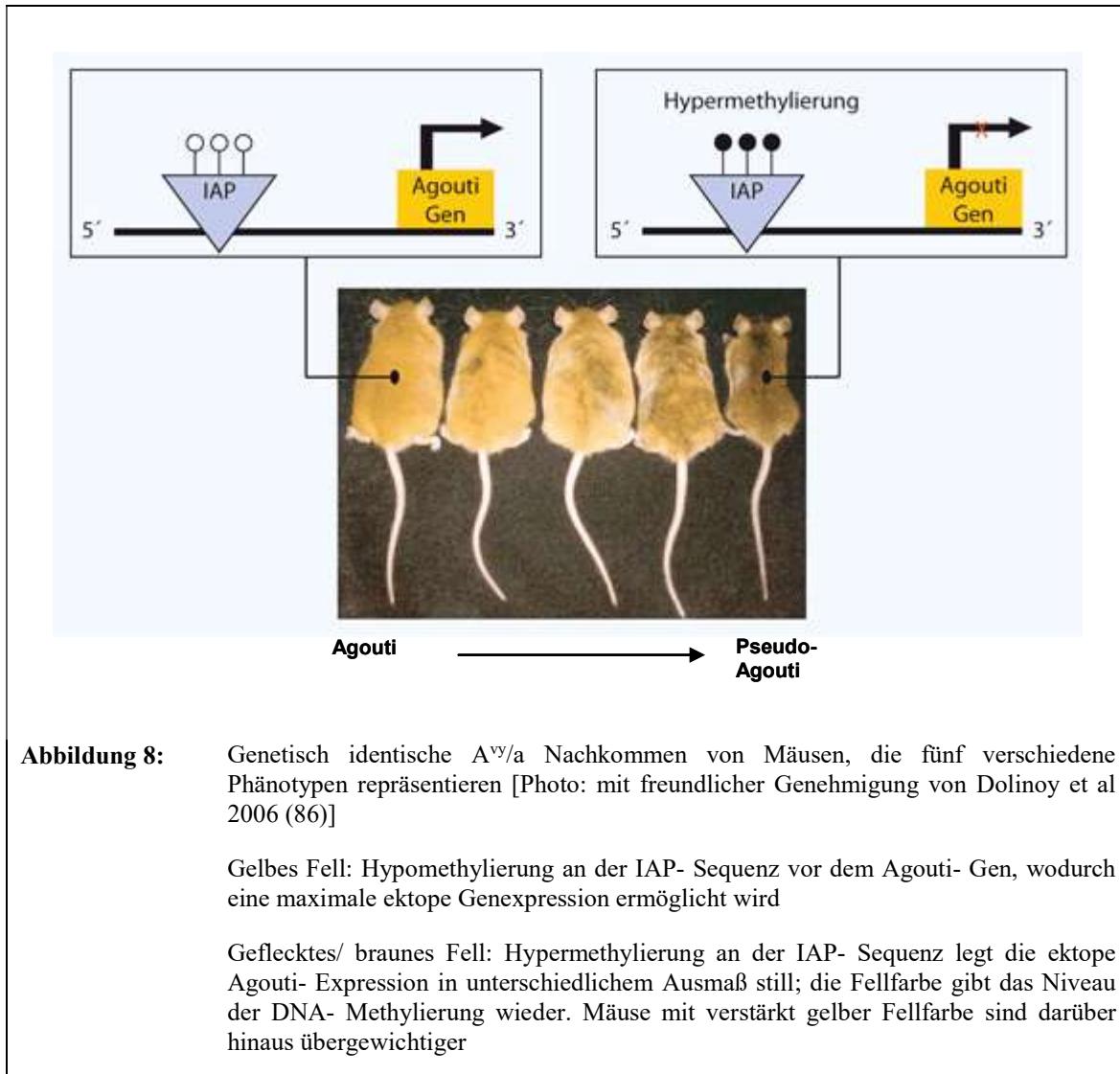


Abbildung 8: Genetisch identische A^{yy}/a Nachkommen von Mäusen, die fünf verschiedene Phänotypen repräsentieren [Photo: mit freundlicher Genehmigung von Dolinoy et al 2006 (86)]

Gelbes Fell: Hypomethylierung an der IAP- Sequenz vor dem Agouti- Gen, wodurch eine maximale ektopische Genexpression ermöglicht wird

Geflecktes/ braunes Fell: Hypermethylierung an der IAP- Sequenz legt die ektopische Agouti- Expression in unterschiedlichem Ausmaß still; die Fellfarbe gibt das Niveau der DNA- Methylierung wieder. Mäuse mit verstärkt gelber Fellfarbe sind darüber hinaus übergewichtiger

Eine Veränderung der fetalen Genregulation durch nutritive Faktoren zu einem sehr frühen Zeitpunkt, die auch an spätere Folgegenerationen weitergegeben werden kann, verleiht der Bedeutung der Ernährung in der Schwangerschaft eine neue Dimension, die möglicherweise weit in die gesundheitliche Zukunft der Nachkommen reicht. Verschiedene Studien an Populationen, die aufgrund von Kriegen Hungersnöten ausgesetzt waren, bestätigen einen Zusammenhang zwischen einer extremen Mangelernährung während verschiedener Zeitfenster in der Schwangerschaft und langfristig veränderter DNA- Methylierung sowie dem vermehrten Auftreten von Erkrankungen bei den Nachkommen, die bis in die Enkelgenerationen reichen (87, 88, 89, 90, 91). Man spricht in diesem Zusammenhang von der „thrifty phenotype Hypothese“, die besagt, dass ein reduziertes fetales Wachstum aufgrund einer Mangelversorgung im späteren Leben mit dem Auftreten chronischer Erkrankungen wie z.B. Koronare Herzkrankheit, Hypertonie und Diabetes assoziiert ist (92).

Die langfristigen Auswirkungen intrauteriner Einflüsse auf die Gesundheit der Nachkommen, zu denen auch die Ernährung zählt, werden unter dem Begriff „DOHaD“ (Developmental Origin of Health and Disease) zusammengefasst (93). Sie sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und haben im Jahr 2004 zu der Neugründung der gleichnamigen internationalen Fachgesellschaft geführt (94). Man geht mittlerweile davon aus, dass bestimmte Erkrankungen, die im Laufe des Lebens auftreten, ihren Ursprung in der Phase des intrauterinen Wachstums haben. Epigenetische Modifikationen wie die DNA- Methylierung, ausgelöst z.B. durch eine inadäquate Versorgung des Fetus durch einen Nährstoffmangel oder -überschuss, stellen einen der Mechanismen dar, die zu einer fehlerhaften fetalen Programmierung führen und später mit einem erhöhten Risiko für z.B. das Metabolische Syndrom einhergehen (95). In Abbildung 9 ist der Zusammenhang zwischen intrauteriner Fehlprogrammierung, epigenetischen Modifikationen und Erkrankungsrisiko schematisch dargestellt.

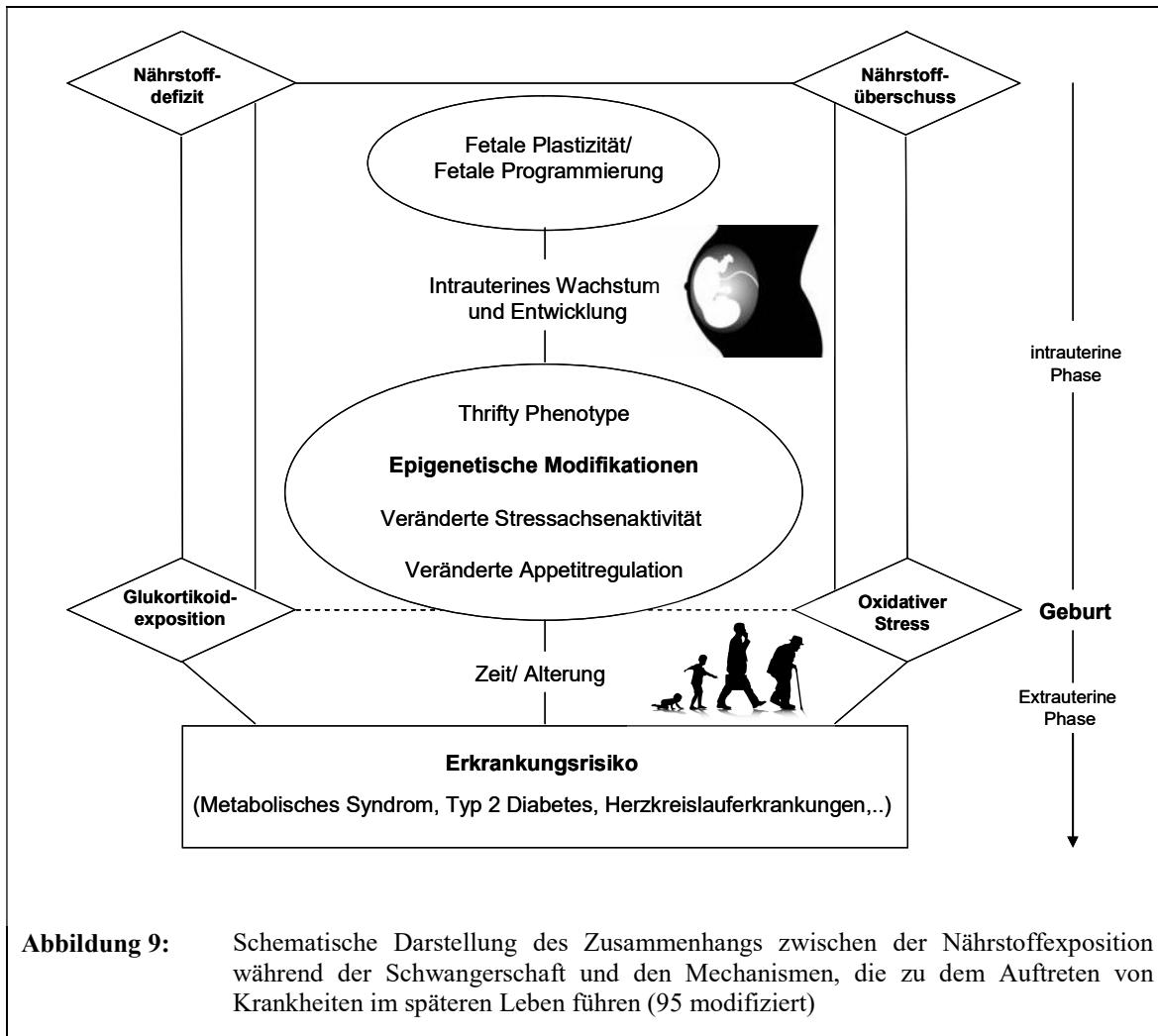


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Nährstoffexposition während der Schwangerschaft und den Mechanismen, die zu dem Auftreten von Krankheiten im späteren Leben führen (95 modifiziert)

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen der Einfluss einer folsäure- bzw. methylreichen oder -armen Ernährung der Mutter während der Schwangerschaft auf die DNA-Methylierung und die Genexpression bei den Nachkommen untersucht. Ein Überblick über Studien, die im Zeitraum von 1989 bis 2015 veröffentlicht wurden, ist tabellarisch im Anhang aufgeführt. Die Studien unterscheiden sich im Design teilweise erheblich voneinander, so dass ein Vergleich der Ergebnisse nur sehr bedingt möglich ist. Die Zeitfenster der Diätfütterung variieren, und oft wurden neben einem veränderten Folsäure- bzw. Methylgehalt der Nahrung weitere Nährstoffvariablen eingeführt (z.B. Mangel an Protein und/ oder B₁₂, Überschuss an Fett, Zugabe von Omega-3- Fettsäuren) oder zusätzlich tumorauslösende Noxen verabreicht. Die Bestimmung der DNA- Methylierung bzw. die Expressionsanalysen wurden teilweise auf globaler, sehr oft aber auch gezielt auf genspezifischer Ebene durchgeführt. Nicht immer wurde untersucht, ob eine methylreiche Ernährung während der Schwangerschaft langfristige Auswirkungen auf die DNA-Methylierung der Nachkommen hat, sondern es wurde der Methylierungsstatus beim Feten am Ende der Schwangerschaft analysiert. Darüber hinaus fokussieren sich die Untersuchungen überwiegend auf einzelne Organe oder Zelllinien bzw. es wurde Tumorgewebe untersucht.

Das Nervengewebe des Gehirns und insbesondere der Hypothalamus als übergeordnetes Regelzentrum sind in dieser Hinsicht besonders interessant; Veränderungen der DNA-Methylierung und Genexpression durch Ernährungsfaktoren während der Schwangerschaft sind in diesen Geweben bisher jedoch nur wenig untersucht worden. Ob von einer methylreichen Ernährung während der Schwangerschaft die globale DNA- Methylierung verschiedener Organe im direkten Vergleich und unter Anwendung derselben Methode bei den Nachkommen unterschiedlich beeinflusst wird, wurde bisher noch nicht untersucht. In den Untersuchungen, in denen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt wurde, wurde das gleiche Gewebe wie für die Methylierungsanalyse ausgewählt; in diesem Zusammenhang wurden überwiegend Expressionsanalysen auf der Basis vorab festgelegter Kandidatengene durchgeführt.

1.2 Zusammenfassung und Fragestellung

Es ist bekannt, dass die ausreichende intrauterine Versorgung mit Nährstoffen Voraussetzung für eine physiologische Entwicklung des Ungeborenen ist. Seit der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen einem gestörten Folat-/ Folsäurestoffwechsel bzw. -mangel und dem Auftreten von Neuralrohrdefekten wird Schwangeren derzeit neben einer folatreichen Ernährung die perikonzeptionelle Supplementierung von synthetischer Folsäure empfohlen. In den letzten Jahren rückte die Bedeutung der Folate bzw. der Folsäure in ihrer Eigenschaft als Methylgruppenüberträger sowie der ebenfalls an Methylierungsreaktionen beteiligten Nährstoffe B₁₂, B₆, sowie Methionin und Cholin hinsichtlich der Steuerung epigenetischer Vorgänge in den Vordergrund. Man geht inzwischen davon aus, dass eine methylreiche bzw. -arme Diät die DNA-Methylierung und in der Folge die Expression von Genen beeinflussen kann. Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe durch DNA- Methyltransferasen von S-Adenosylmethionin auf die DNA- Base Cytosin übertragen. Dieser Vorgang findet innerhalb von CpG- Dinukleotiden statt, die in bestimmten Abschnitten der DNA, den CpG-Inseln, in sehr hoher Konzentration vorkommen. Diese CpG-Inseln befinden sich überwiegend in der Promotorregion eines Gens und sind in der Regel unmethyliert; dadurch bieten sie sich als potentielle Bindungsstellen für Methylgruppen an. Ihre Methylierung durch Anlagerung einer Methylgruppe und die dadurch bedingte Strukturveränderung der DNA in diesem Genabschnitt haben zur Folge, dass Transkriptionsfaktoren hier nicht binden können; das Gen kann infolgedessen nicht abgelesen werden und wird stillgelegt. In der Regel wird daher durch Methylierung die Genexpression unterdrückt. Im umgekehrten Fall bewirkt eine Demethylierung in der Promotorregion, dass ein stillgelegtes Gen reaktiviert wird und die Information abgelesen und übertragen werden kann. Die Markierung der DNA mittels Methylierung dient demnach als Schalter, der Gene aktiviert oder stilllegt und besitzt damit eine weit reichende Bedeutung für die Entwicklung von Säugetieren und Menschen. Die Zusammensetzung der Ernährung ist ein Umweltfaktor, der auf das Epigenom einwirkt, welches offenbar lebenslang innerhalb bestimmter Grenzen einer plastischen Verformbarkeit durch äußere Einflüsse unterliegt. Es gibt Hinweise, dass sich eine methylreiche Ernährung während der Schwangerschaft auf die DNA- Methylierung und Genexpression des ungeborenen Kindes auswirken kann und dass auch Methylierungsprozesse in den fetalen Keimzellen beeinflusst werden können. Intrauterin passt sich der Organismus an seine Umgebungsbedingungen an, was zu diesem frühen Zeitpunkt möglicherweise zu einer dauerhaften Programmierung von Regelkreisen führen kann im Sinne einer metabolischen Prägung. Dieser Vorgang wird als Fetale (Fehl-) Programmierung beschrieben und kann sich auf die zukünftige Gesundheit der Nachkommen auswirken. In bisherigen Untersuchungen wurde der Einfluss von pränatal bzw. postnatal methylreichen oder -armen Diäten lediglich in ihrer Auswirkung auf

einzelne Organe bzw. spezielle Promotor-, Methylierungs- bzw. Genexpressionsmuster untersucht. Der Einfluss solcher Diäten auf die globale Methylierung bzw. das Genexpressionsmuster ist bisher nicht vergleichbar mit einem Assay untersucht worden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die Untersuchungen möglicher Veränderungen der globalen DNA- Methylierung sowie des Genexpressionsmusters nach intrauterin methylreicher Diät. Es soll vergleichend mit einem Assay im Tiermodell (Maus) untersucht werden, in welchen Geweben die globale DNA-Methylierung besonders stark sowohl durch eine prä- als auch postnatal methylreiche Diät beeinflusst wird. Des Weiteren soll in besonders stark betroffenen Geweben untersucht werden, ob der Einfluss auf die Methylierung auch mit einem veränderten Genexpressionsmuster einhergeht.

Daher sollen in der vorliegenden Arbeit in zwei aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten folgende Fragestellungen am Mausmodell untersucht werden:

1. Arbeitsschritt: Untersuchung der globalen DNA- Methylierung in verschiedenen Organgeweben mit/ ohne Exposition einer methylreichen Diät

1. Ist der Level der globalen DNA- Methylierung ausgewählter Organe der adulten Maus im Normalfall unterschiedlich hoch?
2. Verändert eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft den Level der globalen DNA- Methylierung ausgewählter Organe bei den adulten Nachkommen dauerhaft und gewebespezifisch?
3. Verändert eine methylreiche Diät, die sowohl die Muttertiere während der Schwangerschaft und Stillzeit als auch darüber hinaus ihre Nachkommen nach der Entwöhnungsphase erhalten, den Level der globalen DNA- Methylierung in ausgewählten Organen der adulten Nachkommen?

2. Arbeitsschritt: Untersuchung der globalen Genexpression in dem Gewebe mit der stärksten Veränderung nach pränatal methylreicher Diät

4. Hat sich infolge der pränatal methylreichen Diät bei den adulten Nachkommen in dem am stärksten betroffenen Organgewebe auch das Genexpressionsmuster verändert und wenn ja, welche Gene sind am stärksten in ihrer Expression verändert?

2 Untersuchung der globalen DNA- Methylierung

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Tiermaterial und -haltung

Für die Studie wurde der Mausstamm C56BL/6 Wildtyp (Ursprung: The Jackson Laboratory, Main, USA) ausgewählt. Es wurden Mäuse verwendet, die aus einer institutseigenen Nachzucht der Universitätsklinik Magdeburg/ Kinderklinik von Versuchstieren stammten. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen in einem inversen Lichtrhythmus und bei einer Raumtemperatur von 22-24°C gehalten; die selbstständige Aufnahme von Trinkwasser und Nahrung war jederzeit gewährleistet. Alle Experimentaldiäten wurden in Pelletform von der Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH geliefert. Die verwendeten Tiere wurden im Einklang mit der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt (96). Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Magdeburg und von der für Tierversuche zuständigen Landesbehörde in Halle (Saale) genehmigt.

2.1.2 Studiendesign und Experimentaldiät

Weibliche Mäuse wurden im Alter von 6 Monaten mit gleichaltrigen Männchen angepaart (Generation P). Ab dem Zeitpunkt der Verpaarung erhielten die Pärchen in der Kontrollgruppe weiterhin die üblicherweise verwendete Nahrung („Standarddiät“). In zwei weiteren Gruppen erhielten die Pärchen eine methylreiche Diät, in welcher die Nährstoffe Folsäure, B₁₂, B₆, Methionin und Cholin in 4fach höherer Konzentration enthalten waren (Tabelle 1). Die vollständige Auflistung aller Inhaltstoffe der Standardnahrung ist im Anhang aufgeführt. Vaginalplaque-positive Weibchen wurden dann von den Männchen getrennt gehalten. Ab dem Zeitpunkt der Geburt erhielten die Muttertiere in der Kontrollgruppe und in einer der beiden Interventionsgruppen über den Zeitraum der Stillphase hinweg die Standarddiät; die Muttertiere der anderen Interventionsgruppe erhielten weiterhin die methylreiche Diät. 3 Wochen postnatal wurden die Nachkommen (Generation F1) von den Muttertieren abgesetzt und nach Geschlecht getrennt gehalten. Sie erhielten dann über einen Zeitraum von 9 Wochen das gleiche Diätfutter wie ihre Mütter.

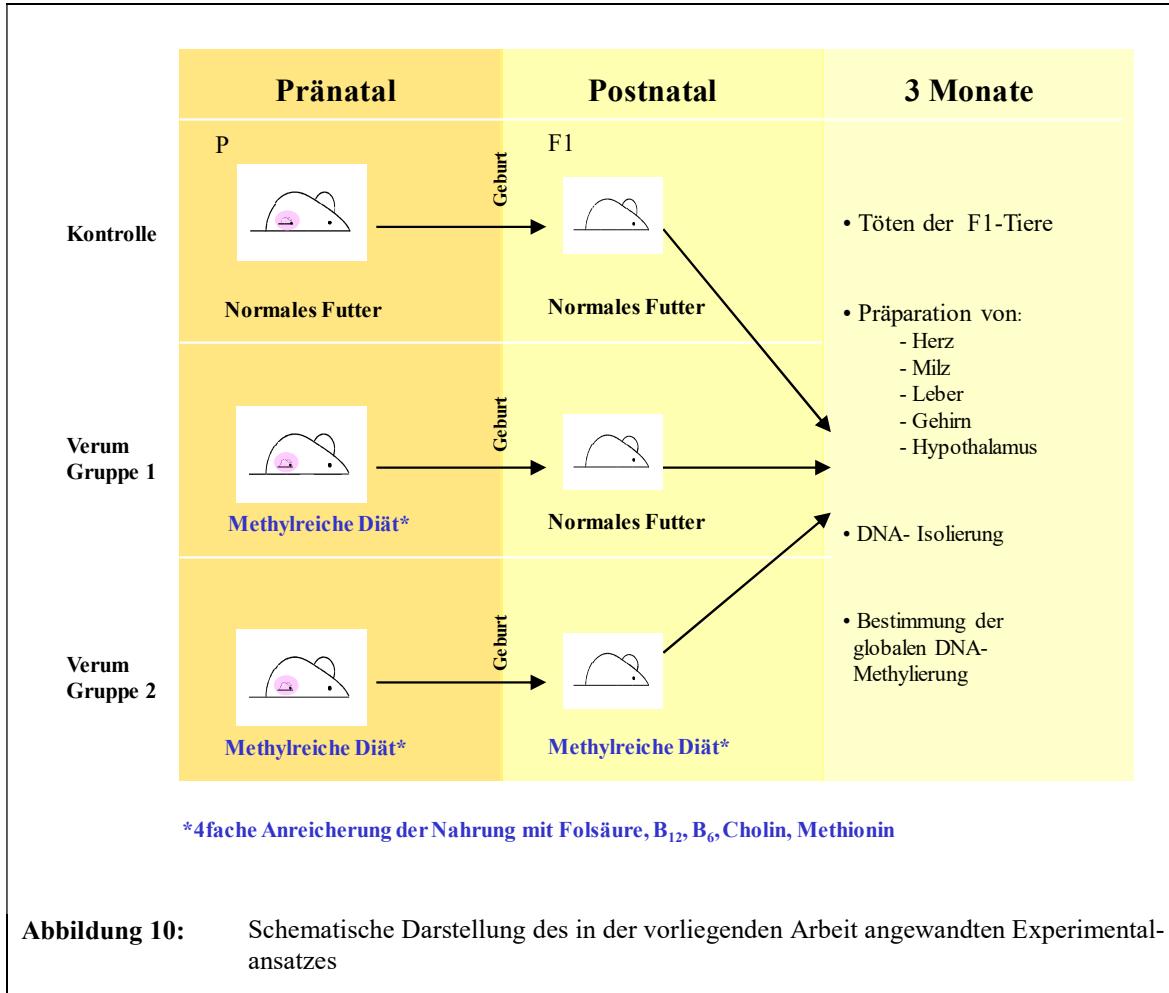
Tabelle 1: Komponenten, die im Diätfutter supplementiert wurden (4fache Dosis)

Komponenten	Standarddiät	Methylreiche Diät
Folsäure	7 mg (pro kg)	28 mg (pro kg)
Cobalamin (B ₁₂)	100 µg (pro kg)	400 µg (pro kg)
Pyridoxin (B ₆)	21 mg (pro kg)	84 mg (pro kg)
Methionin	0,3%	1 %
Cholin	2.990 mg (pro kg)	12.000 mg (pro kg)

Die Nachkommen wurden für die weiterführenden Untersuchungen in 3 Gruppen eingeteilt, die in- und extrauterin jeweils einem unterschiedlichen Nährstoffangebot exponiert worden waren:

- Gruppe 1: Nachkommen, deren Mütter in der Schwangerschaft und Stillzeit eine Standarddiät erhielten; die Nachkommen selbst erhielten darüber hinaus bis zum Alter von 3 Monaten die gleiche Standarddiät
(= Kontrollgruppe)
- Gruppe 2: Nachkommen, deren Mütter ausschließlich in der Schwangerschaft methylreiches Diätfutter erhielten, ab dem Zeitpunkt der Geburt erhielten Muttertiere und Nachkommen bis zum Alter von 3 Monaten die Standarddiät
(= pränatal methylreiche Diät)
- Gruppe 3: Nachkommen, deren Mütter in der Schwangerschaft und Stillzeit methylreiches Diätfutter erhielten; die Nachkommen erhielten darüber hinaus bis zum Alter von 3 Monaten ebenfalls methylreiches Diätfutter
(= prä- und postnatal methylreiche Diät)

Abbildung 10 zeigt einen Überblick über den in der vorliegenden Studie angewandten Experimentalansatz.



2.1.3 Probengewinnung

Die Tötung der F1- Nachkommen erfolgte im Alter von 3 Monaten durch Inhalation von CO₂. Die Organe Herz, Milz, Leber und Gehirn wurden zügig entnommen und unmittelbar auf Eis gelagert. Aus dem Gehirn wurde die Hypothalamusregion herauspräpariert; die einzelnen Schritte der Schnittführung sind im Anhang aufgeführt. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

2.1.4 Isolierung der DNA aus den Organgeweben

Aus den Organgeweben wurde die genomische DNA mittels Standardtechnik (Kit NucleoBond® Buffer Set IV, Macherey-Nagel) isoliert. Hierzu wurden die gefrorenen Gewebeproben einzeln aufgetaut, in einer Pufferlösung homogenisiert und unter Zugabe einer Proteinase im Thermocycler inkubiert. Die jeweils enthaltene DNA wurde nach mehreren Waschvorgängen auf eine

Anionenaustauschersäule überführt, eluiert und anschließend in einer Pufferlösung aufgefangen. Es erfolgte die Herstellung von Pellets durch Trocknung, welche dann in Wasser gelöst wurden. Die ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte der DNA- Isolierung wird im Anhang aufgeführt.

2.1.5 DNA- Methylierungsanalyse

Es wurde der globale DNA- Methylierungsgrad der Organe Herz, Milz, Leber, Gehirn sowie des Hypothalamus weiblicher Nachkommen in der Kontrollgruppe sowie in den beiden Interventionsgruppen bestimmt. Die jeweilige Anzahl der untersuchten Proben ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die Methylierungsanalyse wurde mit dem Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit® (Epigentek) durchgeführt. Dieser Test hat eine Detektionssensitivität von < 0,2 ng pro 100 µg DNA und ist speziesunabhängig. Bei dem Verfahren wird die in den Proben enthaltene DNA auf einer Platte immobilisiert, der methylierte Anteil der DNA wird mittels 5-Methylcytosin- Antikörper erkannt und durch eine ELISA- ähnliche Reaktion quantifiziert. Die einzelnen Schritte der Methylierungsanalyse sind ausführlich im Anhang aufgeführt.

Tabelle 2: Anzahl der untersuchten Proben, aus denen die globale DNA- Methylierung bestimmt wurde

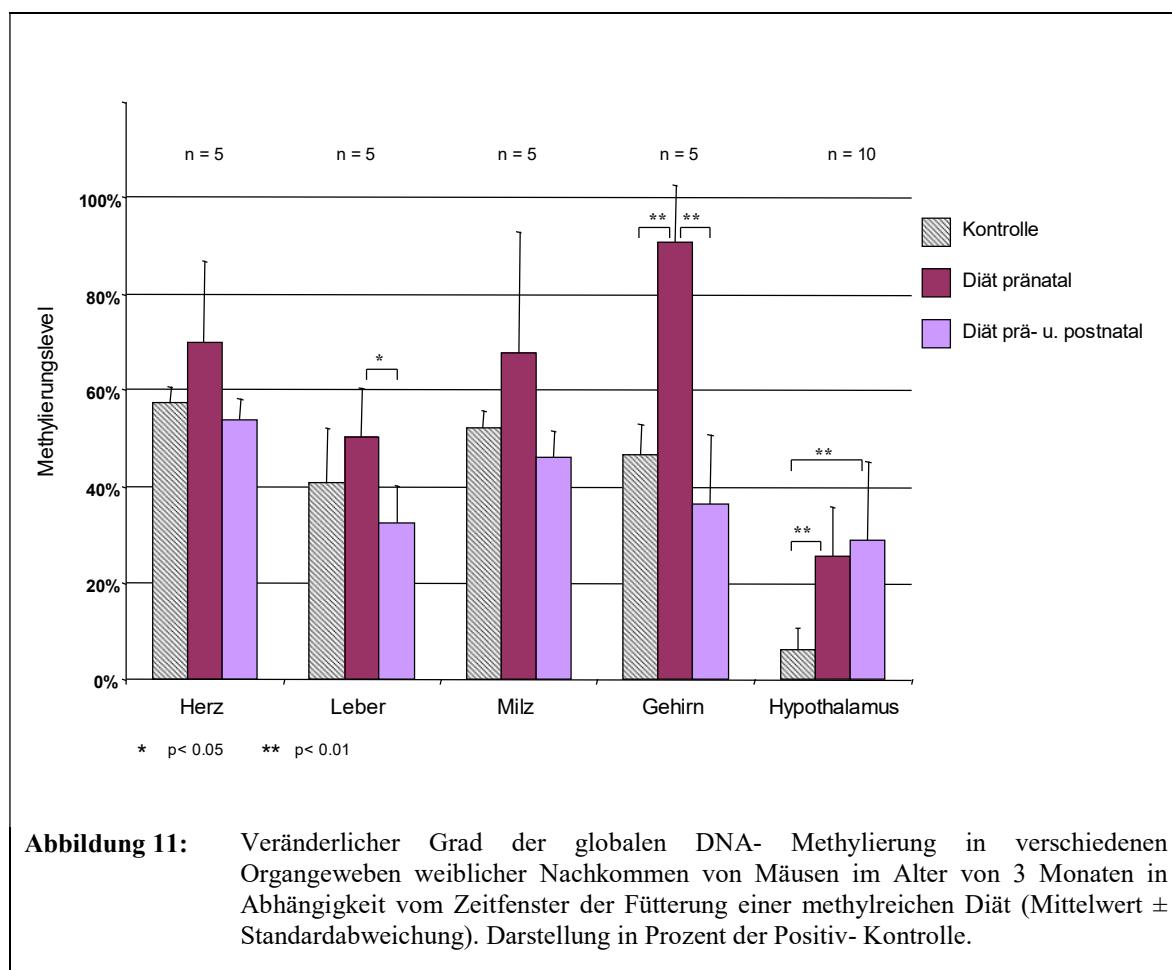
Gruppenzuordnung	Herz	Milz	Leber	Gehirn	Hypothalamus
Gruppe 1 (Kontrolle)	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 10
Gruppe 2 (pränatal methylreiche Diät)	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 10
Gruppe 3 (prä- u. postnatal methylreiche Diät)	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 10

2.2 Statistik

Die statistische Auswertung der globalen DNA- Methylierung erfolgte mit Excel XP (Microsoft®) sowie dem Statistikpaket GraphPad Prism® (GraphPad Software). Alle Daten wurden auf Normalverteilung getestet. Normal verteilte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; Unterschiede wurden mittels Student's T-Test (2seitig) auf Signifikanz getestet.

2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der globalen DNA- Methylierung sind in Prozent der Positiv- Kontrollen des ELISA- Kit in Abbildung 11 dargestellt; dabei sind theoretisch auch Werte über 100% möglich. Dargestellt wird der jeweilige Level der globalen DNA- Methylierung für die 3 Gruppen „Kontrolle“ (Standarddiät der Muttertiere während der Schwangerschaft sowie der Nachkommen postnatal), „Diät pränatal“ (methylreiche Diät der Muttertiere während der Schwangerschaft, Standarddiät der Muttertiere sowie der Nachkommen postnatal ab Geburt) und „Diät prä- und postnatal“ (methylreiche Diät sowohl der Muttertiere während der Schwangerschaft und Stillzeit als auch der Nachkommen postnatal).



Die Ergebnisse zeigen, dass im Normalfall die globale DNA- Methylierung der Organgewebe Herz, Leber, Milz und Gehirn bei den weiblichen Nachkommen der Kontrollgruppe, die sowohl intrauterin während der Schwangerschaft als auch nach der Geburt bis zum Alter von 3 Monaten einem normalen Methylangebot in der Nahrung exponiert waren, im Mittel zwischen 40- 60 % im

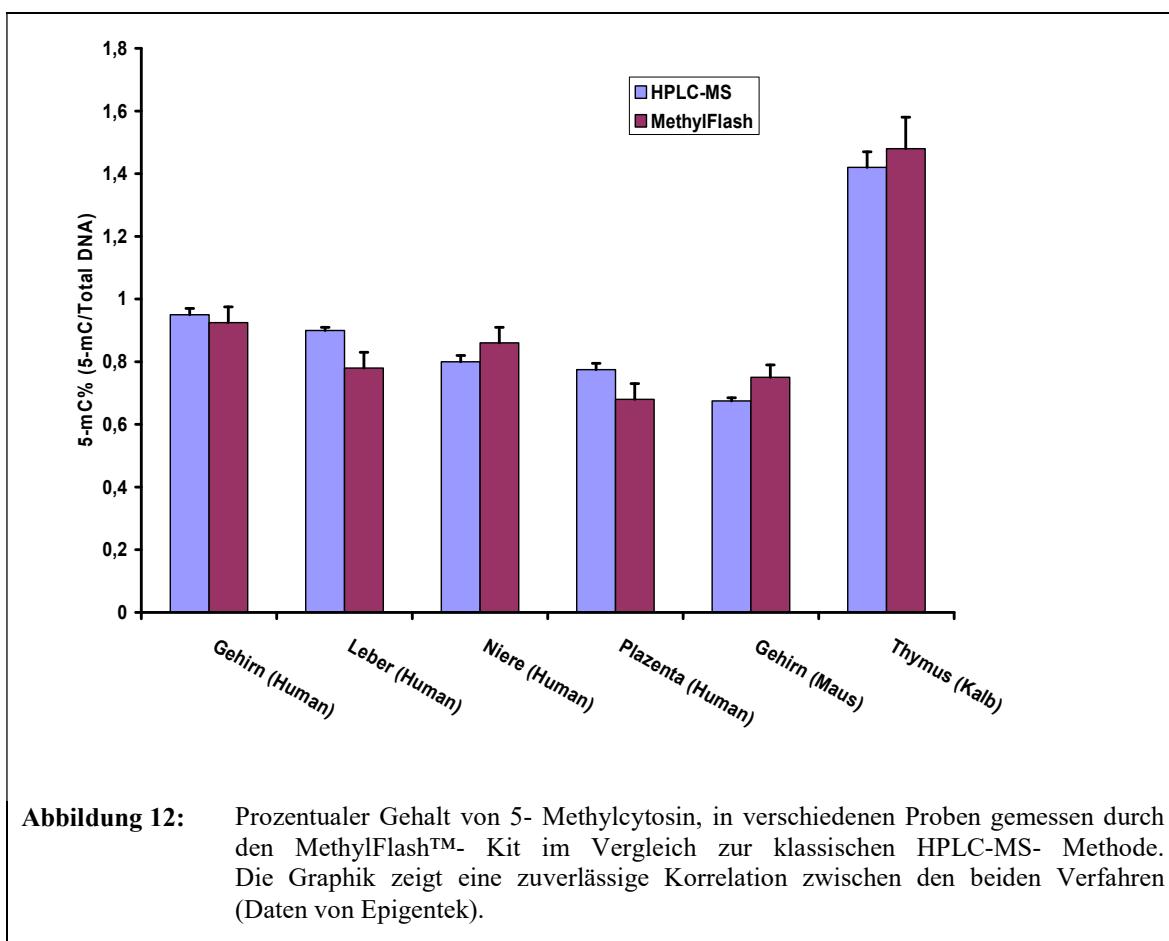
Vergleich zur der Positiv-Kontrolle liegt. Im Hypothalamus ist der Methylierungsgrad dagegen sehr viel niedriger und liegt im Mittel bei 6 %.

Die Organgewebe der weiblichen Nachkommen, die ausschließlich intrauterin einer methylreichen Diät exponiert waren, weisen einen tendentiell höheren globalen DNA- Methylierungsgrad im Vergleich zu den Organgeweben der Kontrollgruppe auf; dieses Ergebnis trifft für alle untersuchten Organe in unterschiedlichem Ausmaß zu. Während der Methylierungsgrad in Herz-, Leber- und Milzgewebe um jeweils circa 10 % ansteigt, ist die Zunahme am stärksten ausgeprägt im neuronalen System: im Gehirn ist der globale Methylierungsgrad der DNA in der Gruppe der Nachkommen, die intrauterin einer methylreichen Diät ausgesetzt waren, ca. doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe (47 % versus 91 %), in der Hypothalamusregion vervierfacht er sich (6 % versus 26 %). Diese Unterschiede sind signifikant ($p < 0.01$).

Bei den weiblichen Nachkommen, die sowohl intra- als auch dauerhaft extrauterin einem methylreichen Nährstoffangebot exponiert wurden, ist die globale DNA- Methylierung in den Geweben von Herz, Leber, Milz und Gehirn im Alter von 3 Monaten tendentiell niedriger sowohl im Vergleich zu den Nachkommen, die lediglich als Feten eine methylreiche Diät über die Mutter erhielten, als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Leber- und Gehirngewebe ist die globale DNA- Methylierung in dieser Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zu den Nachkommen, die ausschließlich pränatal einem erhöhten Methylgruppenangebot über die Mutter exponiert waren. Allein im Hypothalamusgewebe zeigt sich der globale DNA- Methylierungslevel stabil und bleibt in der dauerhaft methylreich ernährten Gruppe weiterhin erhöht (Diät pränatal versus Diät prä- und postnatal: 26 % versus 29 %).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse, dass eine pränatal methylreiche Diät zu einem Anstieg der globalen DNA- Methylierung bei den Nachkommen führt. Bei Fortführung der Diät auch postnatal sinkt die Methylierung dagegen wieder ab. Eine Ausnahme stellt der Hypothalamus dar; hier bleibt die Methylierung dauerhaft auf hohem Niveau.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Proben im Mäusegehirn liegen in derselben Dimension wie die in Abbildung 12 dargestellten Validierungsmessungen des Herstellers, bei denen die Analyseergebnisse der Messungen mittels HPLC-MS und MethylFlash™- Kit verglichen wurden. Dies zeigt, dass die Messungen valide sind.



3 Genexpressionsanalyse

3.1 Material und Methoden

Der Grad der Veränderung der globalen DNA- Methylierung infolge einer methylreichen Ernährung der Muttertiere während der Schwangerschaft ist im Hypothalamusgewebe der weiblichen Nachkommen mit Abstand am stärksten und ist auch bei postnatal fortgeföhrter Diät der Nachkommen auf hohem Niveau. Es wurde daher im nächsten Arbeitsschritt für die Genexpressionsanalyse diese Gewebe ausgewählt, um Gene zu identifizieren, die möglicherweise infolge einer intrauterin methylreichen Diät in ihrer Expression langfristig verändert wurden.

Das hypothalamische Genexpressionsmuster wurde bereits von Mozhui et al an ca. 3 Monate alten Mäusen geschlechtsspezifisch untersucht (97). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bestimmte Gene im Hypothalamus bei männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich stark exprimiert werden: von den insgesamt 48 identifizierten Genen unterschieden sich nur sehr wenige (*Xist*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Uty* und *Kdm5d*) deutlich hinsichtlich ihrer Expression (Fold Difference >6); diese waren alle wie zu erwarten entweder auf dem Geschlechtschromosom X oder Y lokalisiert. Bei den übrigen 43 identifizierten Genen war der Unterschied aufgrund der hohen Fallzahl (78 Tiere) zwar signifikant, der Fold Difference lag bei ihnen aber sehr niedrig (maximal 1,3). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Genexpressionsmuster im Hypothalamus von zwei weiblichen Nachkommen von Mäusen, die ausschließlich intrauterin einer methylreichen Diät exponiert worden waren, mit denen von zwei männlichen Nachkommen von Mäusen der Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse wurden schließlich zur Qualitätskontrolle mit den Ergebnissen von Mozhui et al (97) verglichen.

3.1.1 Isolierung der RNA aus dem Hypothalamusgewebe

Aus dem in Stickstoff gelagerten Hypothalamusgewebe wurde die mRNA mittels Standardtechnik isoliert (mRNA-Extraktions-Kit®, Qiagen). Das Protokoll ist im Anhang aufgeführt. Die Quantität und Qualität jeder RNA- Probe wurde im Nanodrop ND-1000 UV Spektrophotometer vermessen und die Integrität der RNA Probe im Agilent BioAnalyzer 2100 Eletrophoresesystem bestimmt. Als Ausgangsmaterial wurden 200 ng RNA unter Verwendung des Low-RNA Input Linear Amplification Kits ® (Agilent Technologies) amplifiziert.

3.1.2 Durchführung des Microarray- Assay

Die Expressionsanalyse zeigt, welche Gene in der Zelle zum Untersuchungszeitpunkt aktiv sind. Gene enthalten die Information zur Erzeugung von messenger RNA (mRNA), aber zu jedem beliebigen Zeitpunkt schreibt eine Zelle nur einem Bruchteil ihrer Gene in mRNA um. Wenn ein Gen gerade abgelesen (exprimiert) wird, um mRNA zu produzieren, wird es als "eingeschaltet" betrachtet, andernfalls als "ausgeschaltet". In DNA-Microarrays oder -Macroarrays kann die Menge an mRNA einer Vielzahl von Genen aus Zellen einer Kultur bzw. eines Gewebes simultan bestimmt werden. Dazu wird die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Detektion erfolgt bei dieser Methode über komplementäre Hybridisierung der markierten cDNA (Radioisotope, Fluoreszenzfarbstoffe) mit den Sonden des DNA- Array. Die Genexpressionsmuster wurden durch die Arbeitsgruppe Genom-Analytik des Helmholtz-Zentrums Braunschweig (Leitung Dr. R. Geffers) mittels Gene Array (Mouse Gene Expression v2 4x44K Microarray Kit; G4846A, Agilent; USA) bestimmt. Dieser Array- Assay ist in der Lage, die simultane Expression von ca. 27.122 Genen in den zu untersuchenden Geweben zu detektieren.

Die so hergestellte und markierte cDNA wurde dann nach den Herstellerangaben auf einen murinen Gene Array hybridisiert (Mouse Gene Expression v2 4x44K Microarray Kit; G4846A, Agilent, USA). Die Microarrays wurden anschließend mit Hilfe eines DNA-Microarray-Scanners, Modell G2565A (Agilent Technologies) gescannt. Die Fluoreszenzdaten wurden anschließend mit Feature Extraction Software Version 10.5 ausgewertet. (Agilent Technologies). Die Zuweisung der Expressionswerte einzelner Gene wurde nach dem Agilent.SingleColor.14868 Protocol durchgeführt. Für die nachfolgende Statistik wurden die Rohdaten normalisiert. Dies erfolgte durch Skalierung der Einzelwerte auf den Mittelwert aller untersuchten Proben. Anschließend wurden die normalisierten Expressionsdaten genabhängig auf den Median zentralisiert.

3.2 Statistik

Die statistische Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte mit Excel XP (Microsoft®). Für die statistische Analyse wurden im T-Test Verfahren die Diät- und Kontrollgruppen gegenübergestellt. Je Gruppe wurden biologische Duplikate berücksichtigt. Aufgrund der kleinen Stichprobenzahl beschreibt das Ergebnis dieser Analyse eher einen statistischen Trend als eine biologisch relevante Signifikanz. Es wurden diejenigen Gene herausgefiltert, bei denen sich die Mittelwerte der Expressionswerte zwischen Diät- und Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p<0.05$) unterschieden und mindestens 3fach (Expressionsunterschied >3) unterschiedlich waren.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Bestimmung der Qualität der Genexpressionsanalyse

In den Tabellen 3a und b sind jeweils die von Mozhui et al (97) identifizierten Gene aufgeführt, die geschlechtsspezifisch unterschiedlich im murinen Hypothalamus (Expressionsunterschied $> 1,1$ fach/ $p < 0.05$) exprimiert wurden. Im Vergleich dazu sind in den letzten beiden Spalten die entsprechenden Daten der eigenen Untersuchung dargestellt. Mozhui et al verwenden für die Bestimmung des Expressionsunterschiedes den Begriff „Fold difference“, in der vorliegenden Untersuchung wurde der in der Genexpressionsanalyse häufiger verwendete Begriff „Fold change“ gewählt. Beide beschreiben das Verhältnis zwischen dem Ausgangswert und dem Vergleichswert (z.B. bedeutet ein Fold change +2 eine zweifach stärkere Expression in der Vergleichsgruppe).

Tabelle 3: Gegenüberstellung der unterschiedlichen hypothalamischen Genexpression ($\geq 1,1$ fach) zwischen weiblichen und männlichen Mäusen: von Mozhui et al publizierte Ergebnisse (97) und Ergebnisse der vorliegenden Studie

a) In weiblichen Tieren (vorliegende Studie: Diätgruppe) gegenüber männlichen Tieren (vorliegende Studie: Kontrollgruppe) hochregulierte Gene

Gensymbol	Beschreibung	Chr	Mozhui et al (97) (n= 78)		Vorliegende Studie (n= 2)	
			p- Wert	Expressions- unterschied ¹⁾	p- Wert	Expressions- unterschied ¹⁾
<i>Xist</i>	Inactive X specific transcript	X	< 0.01	+41,82	< 0.01	+309,90
<i>Kdm6a</i>	Histone demethylase (UTX)	X	< 0.01	+1,36	<0.05	+ 1,83
<i>Eif2s3x</i>	Eukaryotiv translation initiation factor 2	X	< 0.01	+1,31	<0.05	-4,19
<i>Ddx3x</i>	RNA helicase	X	< 0.01	+1,27	<0.01	+1,70
<i>Kdm5c</i>	Histone demethylase	X	< 0.01	+1,27	<0.05	+1,22
<i>2610029G23Rik</i>	Novel Xinactivation escapee2	X	< 0.01	+1,16	n.s.	
<i>Tac2</i>	Tachykinin peptide hormone	10	< 0.01	+1,32	n.s.	
<i>Esr1</i>	Estrogen receptor	10	< 0.01	+1,29	n.s.	
<i>Gm9884</i>	Predicted gene	1	< 0.01	+1,21	n.s.	
<i>Gpr88</i>	G protein coupled receptor 88	3	< 0.01	+1,19	n.s.	
<i>Socs2</i>	Suppressor of cytokine signaling 2	12	< 0.01	+1,18	n.s.	
<i>Vmn1r90</i>	Vomeronasal receptor	7	< 0.01	+1,18	n.s.	
<i>Npbwr1</i>	Neuropeptide receptor	1	< 0.01	+1,16	n.s.	
<i>Oxtr</i>	Oxytocin receptor	6	< 0.01	+1,14	n.s.	
<i>Nmur2</i>	Neuromedin peptide receptor	11	< 0.01	+1,12	n.s.	
<i>Nmbr</i>	Neuromedin receptor	10	< 0.01	+1,12	n.s.	
<i>Gpr83</i>	G protein coupled receptor	9	< 0.01	+1,12	n.s.	
<i>Cish</i>	Cytokine inducible SH2-containing protein	9	< 0.01	+1,11	n.s.	
<i>Stra6</i>	Stimulated by retinoic acid gene 6	9	< 0.01	+1,10	n.s.	

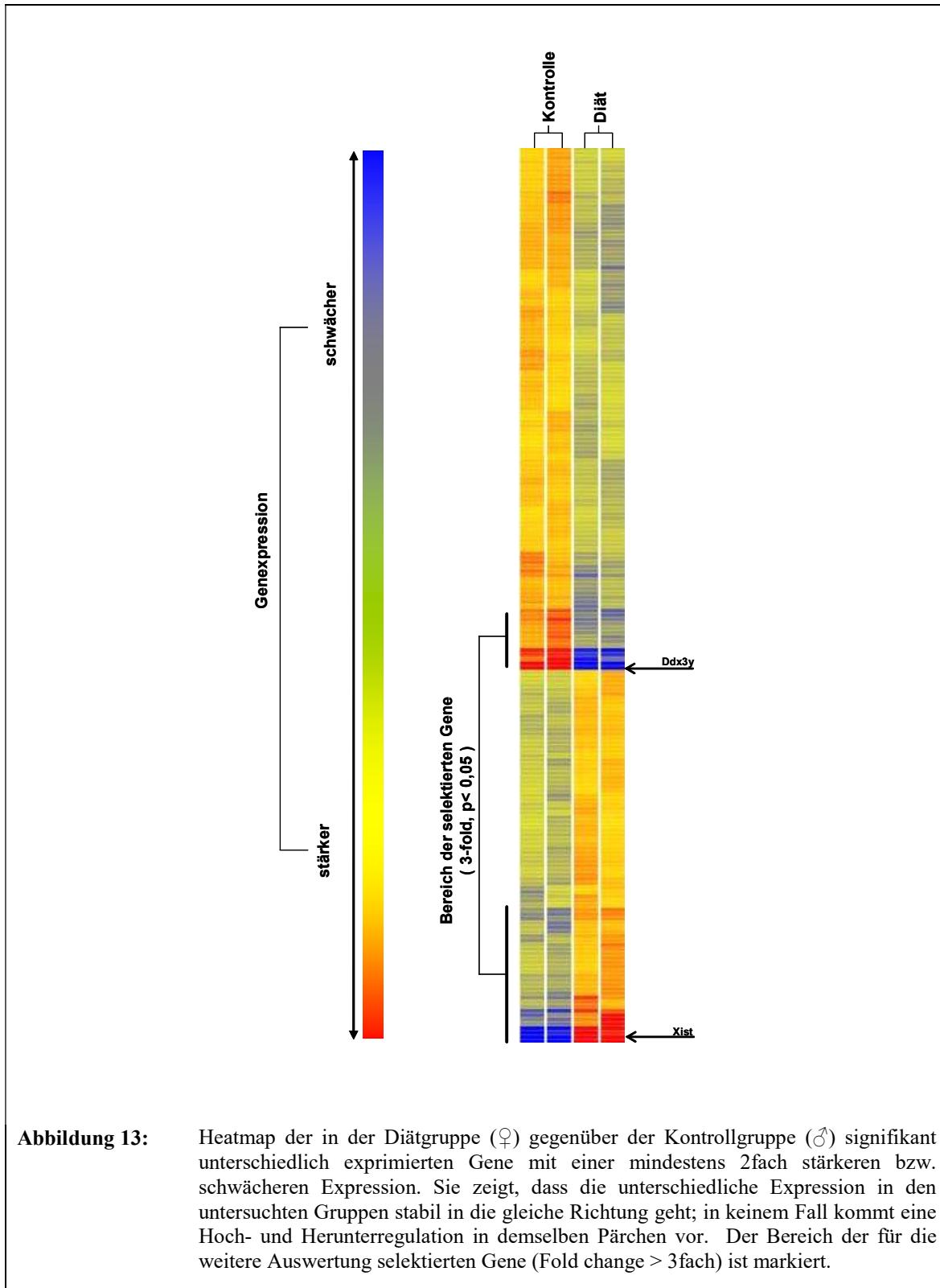
¹⁾ Dieser Wert gibt den Grad der veränderten Expression gegenüber der Vergleichsgruppe als Vielfaches an (englische Bezeichnung: Fold difference bzw. in der vorliegenden Arbeit Fold change)

- b) In weiblichen Tieren (vorliegende Studie: Diätgruppe) gegenüber männlichen Tieren (vorliegende Studie: Kontrollgruppe) herunterregulierte Gene

			Mozhui et al (97) (n= 78)		Vorliegende Studie (n= 2)	
Gensymbol	Beschreibung	Chr	p- Wert	Expressions- unterschied ¹⁾	p- Wert	Expressions- unterschied ¹⁾
<i>Eif2s3y</i>	Translation initiation factor	Y	< 0.01	-17,25	< 0,01	-125,43
<i>Ddx3y</i>	RNA helicase	Y	< 0.01	-17,22	< 0.01	-201,49
<i>Uty</i>	Histone demethylase	Y	< 0.01	-13,34	< 0.01	-2,80
<i>Kdm5d</i>	Histone demethylase	Y	< 0.01	-6,23	< 0.01	-11,09
<i>Rbm3</i>	RNA binding motif gene	X	< 0.01	-1,17	< 0.01	-2,14
<i>Arhgap36</i>	Rho GTPaseactivating	X	< 0.01	-1,16	n.s.	
<i>Syt4</i>	Synaptotagminlike gene	X	< 0.01	-1,13	n.s.	
<i>Lamp5</i>	Lysosomal glycoprotein	2	< 0.01	-1,23	n.s.	
<i>Serpina3n</i>	Serine protease inhibitor	12	< 0.01	-1,11	n.s.	
<i>Adamts2</i>	Procollagen metallopeptidase	11	< 0.01	-1,10	n.s.	

¹⁾ Dieser Wert gibt den Grad der veränderten Expression gegenüber der Vergleichsgruppe als Vielfaches an (englische Bezeichnung: Fold difference bzw. in der vorliegenden Arbeit Fold change)

Die Tabellen zeigen, dass in der vorliegenden Studie trotz der geringen Fallzahl bis auf 4 Gene (*Tac2*, *Esr1*, *Gm9884*, *Lamp5*) alle von Mozhui et al identifizierten, im Hypothalamus geschlechtsspezifisch $\geq 1,2$ fach stärker bzw. schwächer exprimierten Gene signifikant detektiert wurden. Dass bei einer $< 1,2$ fach veränderten Expression in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zu erwarten waren, ist der geringen Fallzahl geschuldet, es wurden in diesen Bereichen aber auch keine positiven Ergebnisse erzielt. Darüber hinaus waren alle anderen detektierten Gene in dieselbe Richtung verändert; einzige Ausnahme war das Gen *Eif2s3x*, welches nicht wie zu erwarten stärker, sondern schwächer exprimiert wurde. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die in der vorliegenden Arbeit gewählten Auswahlkriterien für unterschiedlich exprimierte Gene ($p < 0.05$, Expressionsunterschied ≥ 3 fach) robust tatsächliche Expressionsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen darstellen. Eine Übersicht der Ergebnisse der in dieser Arbeit verwendeten Array-Analyse ist als Heatmap in Abbildung 13 dargestellt.



3.3.2 Gene, deren Expression nach intrauteriner Diät verändert ist

Es wurden insgesamt 35 Gene (einschließlich der geschlechtsspezifisch unterschiedlich exprimierten Gene) identifiziert, deren hypothalamische Expression bei den weiblichen Nachkommen nach intrauteriner Diät gegenüber den männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe signifikant und mindestens 3fach stärker bzw. schwächer war (Fold change > 3). Von diesen Genen wurden 16 überexprimiert; sie sind in Tabelle 4 aufgelistet. 19 Gene wurden schwächer exprimiert; sie sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Gene, die bei den weiblichen Nachkommen, deren Mütter während der Schwangerschaft methylreich ernährt wurden, im Vergleich zu den männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe signifikant und mindestens 3fach stärker exprimiert wurden

Gensymbol	Beschreibung	Lokus	Fold Change
<i>Xist</i> ¹⁾	Inactive X specific transcripts	Chr X	+ 309,9
<i>Ttr</i>	Transthyretin	Chr 18	+ 76,4
<i>Braf</i>	Braf transforming gene	Chr 6	+ 9,0
<i>Serpina 11</i>	Serine (or cystein) peptidase inhibitor	Chr 12	+ 7,3
<i>Ecrg4</i>	Augurin 1500015O10Rik	Chr 1	+ 6,2
<i>2010110K18Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 18	+ 5,6
<i>Med12l</i>	Mediator of RNA polymerase II transcription	Chr 3	+ 5,0
<i>Nat3</i>	N-acetyltransferase 3	Chr 8	+ 4,3
<i>Tsix</i>	X(inactive)-specific transcript	Chr X	+ 4,2
<i>Folr1</i>	Folate receptor 1	Chr 7	+ 3,8
<i>4930509J09Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 3	+ 3,4
<i>Kif20b</i>	Kinesin family member 20B	Chr 19	+ 3,3
<i>Ptprv</i>	Protein tyrosine phosphatase	Chr 1	+ 3,1
<i>Cmya5</i>	Cardiomyopathy associated 5	Chr 13	+ 3,0
<i>Srd5a2</i>	Steroid 5 alpha-reductase 2	Chr 17	+ 3,0
<i>Pkhd1II</i>	Polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1	Chr 15	+ 3,0

¹⁾ Interne Qualitätskontrolle: Im murinen weiblichen Hypothalamus gegenüber dem männlichen Hypothalamus im Normalfall hochreguliert (97)

Tabelle 5: Gene, die bei den weiblichen Nachkommen, deren Mütter während der Schwangerschaft methyreich ernährt wurden, im Vergleich zu den männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe signifikant und mindestens 3fach schwächer exprimiert wurden

Gensymbol	Beschreibung	Lokus	Fold Change
<i>Ddx3y</i> ¹⁾	DEAD box polypeptide 3	Chr Y	-201,5
<i>Eif2s3y</i> ¹⁾	Eucaryotic translation initiation factor	Chr Y	-125,4
<i>Kdm5d</i> ¹⁾	Lysine(K)-specific demethylase 5D	Chr Y	- 11,1
<i>Dmrtal</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1	Chr 4	- 9,4
<i>Fignl1</i>	Fidgetin-like 1	Chr 11	- 6,1
<i>Ubelyl</i>	Ubiquitin-activating enzyme E1	Chr Y	- 5,9
<i>Eif2s3x</i>	Eukaryotic translation initiation factor	Chr X	- 4,2
<i>Tmprss11e</i>	Transmembrane protease, serine 11e	Chr 5	- 4,4
<i>Olf1256</i>	Olfactory receptor	Chr 2	- 3,7
<i>Ripk4</i>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4	Chr 16	- 3,6
<i>Zfp689</i>	Zinc finger protein 689	Chr 7	- 3,4
<i>A130019P10Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 10	- 3,4
<i>Ptbp1</i>	Polypyrimidine tract binding protein 1	Chr 10	- 3,2
<i>Plekhg3</i>	Pleckstrin homology domain containing	Chr 12	- 3,2
<i>Itch</i>	Itchy, E3 ubiquitin protein ligase	Chr 2	- 3,1
<i>Rrn3</i>	RRN3 RNA polymerase I transcription factor	Chr 16	- 3,1
<i>Gm428</i>	Predicted gene 428	Chr 4	- 3,1
<i>Slc22a1</i>	Solute carrier family 22	Chr 17	- 3,1
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	Chr 3	- 3,0

¹⁾ Interne Qualitätskontrolle: Im murinen weiblichen Hypothalamus gegenüber dem männlichen Hypothalamus im Normalfall herunterreguliert (97)

Die Ergebnisse stimmen mit denen von Mozhui et al überein, in deren Studie die geschlechtsspezifisch unterschiedliche Expression von *Xist*, *Ddx3y*, *Eif2s3y* und *Kdm5d* im Hypothalamus von Mäusen gezeigt wurde (97). Eine Ausnahme stellt das Gen *Eif2s3x* dar, welches nicht wie erwartet stärker, sondern signifikant schwächer exprimiert wird. Alle übrigen Gene werden bei den Geschlechtern demnach im Normalfall nahezu gleich stark exprimiert (< 1,10fach stärkere bzw. schwächere Expression). Die Ergebnisse der Array- Analyse werden daher vor dem Hintergrund der Annahme diskutiert, dass die unterschiedliche Genexpression auf

die verabreichte intrauterine Diät zurückzuführen ist. Die in der vorliegenden Untersuchung detektierten 31 Gene, die neben den bekannten geschlechtsspezifisch unterschiedlich exprimierten Genen signifikant und mit einem Fold Change von mindestens 3 nach intrauteriner Diät hoch- bzw. herunterreguliert werden, werden in Abhängigkeit von ihrer bekannten Funktion in den Tabellen 6 bis 9 aufgeführt.

Tabelle 6: Gene, die Einfluss nehmen auf Transkription, Translation und Signaltransduktion

Gensymbol	Beschreibung	Lokus	Fold Change
<i>Braf</i>	Braf transforming gene	Chr 6	+ 9,0
<i>Med12l</i>	Mediator of RNA polymerase II transcription	Chr 3	+ 5,0
<i>Folr1</i>	Folate receptor 1	Chr 7	+ 3,8
<i>Ptprv</i>	Protein tyrosine phosphatase	Chr 1	+ 3,1
<i>Cmya5</i>	Cardiomyopathy associated 5	Chr 13	+ 3,0
<i>Dmrtal</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1	Chr 4	- 9,4
<i>Fignl1</i>	Fidgetin-like 1	Chr 11	- 6,1
<i>Ube1y1</i>	Ubiquitin-activating enzyme E1	Chr Y	- 5,9
<i>Eif2s3x</i>	Eukaryotic translation initiation factor	Chr X	- 4,2
<i>Olf1256</i>	Olfactory receptor	Chr 2	- 3,7
<i>Ripk4</i>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4	Chr 16	- 3,6
<i>Zfp689</i>	Zinc finger protein 689	Chr 7	- 3,4
<i>Ptbp1</i>	Polypyrimidine tract binding protein 1	Chr 10	- 3,2
<i>Itch</i>	Itchy E3 ubiquitin protein ligase	Chr 2	- 3,1
<i>Rrn3</i>	RRN3 RNA polymerase I transcription factor	Chr 16	- 3,1
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	Chr 3	- 3,0

Tabelle 7: Gene, die dem Imprinting unterliegen

Gensymbol	Name	Lokus	Fold Change
<i>Tsix</i>	X(inactive)-specific transcript, opposite strand	Chr X	+ 4,2

Tabelle 8: Gene, die an der Steuerung und dem Transport von Hormonen beteiligt sind

Gensymbol	Name	Lokus	Fold Change
<i>Ttr</i>	Transthyretin	Chr 18	+ 76,4
<i>Ecrg4</i>	Augurin (1500015O10Rik)	Chr 1	+ 6,2
<i>Srd5a2</i>	Steroid 5 alpha-reductase 2	Chr 17	+ 3,0

Tabelle 9: Gene, deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist

Gensymbol	Name	Lokus	Fold Change
<i>Serpina 11</i>	Serine (or cystein) peptidase inhibitor	Chr 12	+ 7,3
<i>2010110K18Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 18	+ 5,6
<i>Nat3</i>	N-acetyltransferase 3	Chr 8	+ 4,3
<i>Kif20b</i>	Kinesin family member 20B	Chr 19	+ 3,3
<i>Pkhd111</i>	Polycystic kidney and hepatic disease 1-like 1	Chr 15	+ 3,0
<i>4930509J09Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 3	+ 3,4
<i>Tmprss11e</i>	Transmembrane protease, serine 11e	Chr 5	- 4,4
<i>A130019P10Rik</i>	RIKEN cDNA	Chr 10	- 3,4
<i>Plekhg3</i>	Pleckstrin homology domain containing	Chr 12	- 3,2
<i>Slc22a1</i>	Solute carrier family 22	Chr 17	- 3,1
<i>Gm428</i>	Predicted gene 428	Chr 4	- 3,1

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei weiblichen Mäusen, deren Mütter während der Schwangerschaft eine methylreiche Diät erhielten, im Vergleich zu den weiblichen Mäusen der Kontrollgruppe die globale DNA- Methylierung in allen untersuchten Organen im adulten Alter erhöht ist. Von dieser Hypermethylierung sind das Gehirn und insbesondere der Hypothalamus am stärksten betroffen. Wird die methylreiche Diät auch postnatal fortgeführt, liegt die globale DNA-Methylierung bei den Nachkommen nach 3 Monaten tendentiell unterhalb des Levels in der Kontrollgruppe; allein im Hypothalamus zeigt sich in dieser Gruppe ebenfalls eine Hypermethylierung. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass eine intrauterin methylreiche Diät bei den weiblichen Nachkommen dauerhaft die hypothalamische Genexpression verändert.

4.1 Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien

Bei der Interpretation der Ergebnisse sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen und der Vergleich mit den bisher aus der Literatur bekannten Daten bedarf einer kritischen Betrachtung. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die jeweiligen Designs der im Anhang tabellarisch aufgeführten Studien aufgrund ihrer spezifischen Fragestellungen sehr heterogen; sie unterscheiden sich z.B. hinsichtlich des verwendeten Modells (Maus, Ratte, Schwein, Human, *in vitro*), der Art des untersuchten Gewebes, dem Alter und Geschlecht der untersuchten Nachkommen, der Zusammensetzung der Diät (Anteile der Methyldonatoren, Veränderung weiterer Komponenten wie Fett, Protein, Kohlenhydrate, Multivitamine, Zink u.a.), dem Zeitfenster der Diätexposition (prä- und/ oder postnatal) sowie der zusätzlichen Gabe tumorauslösender oder anderer die Methylierung beeinflussende Substanzen (Dimethylbenzo[α]anthrazen (DMBA), Bisphenol A (BPA), Ethanol). In nahezu allen Studien wurden Auswirkungen der Experimentaldiät auf DNA-Methylierung und Genexpression beobachtet, die jedoch in Abhängigkeit vom Studienprotokoll variierten. Dies überrascht nicht, da alle genannten Variablen sich auf die hoch komplex ablaufenden Prozesse der DNA- Methylierung auswirken können.

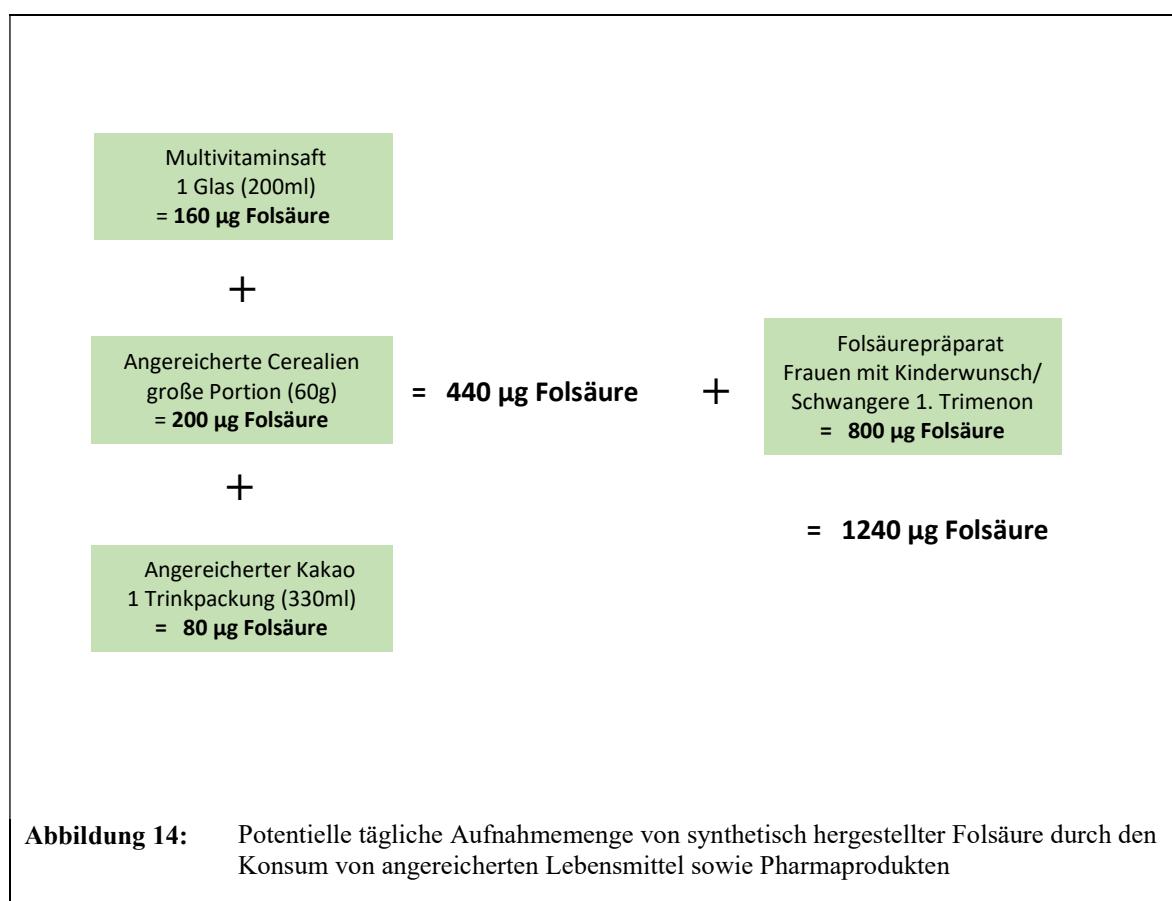
Es gibt Hinweise, dass die Veränderbarkeit der DNA- Methylierung durch eine methylreiche Ernährung organspezifisch unterschiedlich ist (98, 99, 100). Darüber hinaus wurden in Studien, die den Einfluss von Nährstoffen auf DNA- Methylierung und Genexpression untersucht haben, geschlechtsabhängig unterschiedliche Reaktionen auf eine Veränderung der Nährstoffanteile beobachtet (82, 101, 102, 103, 104).

Die Zusammensetzung der Diäten ist in den verschiedenen Studien sehr heterogen. Es wurde überwiegend isoliert der Folsäureanteil verändert; die methylreichen Diäten waren unterschiedlich zusammengesetzt und häufig wurde der Einfluss einer folsäure- bzw. methylarmen Diät untersucht. In vielen Studien wurde untersucht, ob eine proteinarme Ernährung der Muttertiere während der Schwangerschaft oder eine intrauterin induzierte fetale Wachstumsrestriktion Veränderungen der DNA- Methylierung oder Genexpression bei den Nachkommen hervorruft, die durch eine Folsäuresupplementierung neutralisiert werden können (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114). Auch die langfristigen Auswirkungen einer erhöhten Fett- oder Zuckerzufuhr in Abhängigkeit von der Methyl- bzw. Folsäureversorgung wurden untersucht (101, 105, 109, 110, 115, 116, 117, 118, 119). Darüber hinaus wurden auch die Auswirkungen unterschiedliche Folsäurelevel in Kombination mit einem Vitamin B₁₂- Defizit und einer Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung auf die globale DNA-Methylierung im Gehirn zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (120).

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Hinblick auf die in bisher durchgeführten Studien verwendeten Diäten sind die deutlich unterschiedlichen Folsäuregehalte in den jeweiligen Kontroll- und Interventionsgruppen. Bei Nagern wird als Referenznahrung häufig eine aminosäuredefinierte Diät mit einem sehr niedrigen Folsäuregehalt von maximal 2 mg pro kg verwendet, um die Folsäurezufuhr während der Experimentaldiät den gängigen humanen Aufnahmemengen anzupassen. In den Interventionsgruppen variiert der Folsäuregehalt des Diätfutters sehr stark und liegt zwischen 5 und 40 mg pro kg, während in den Kontrollgruppen teilweise weniger als 2 mg pro kg Folsäure im Futter enthalten sind (siehe Anhang, Tabellen 14 -18). In der vorliegenden Arbeit war der Folsäuregehalt in dem Standardfutter, welches die Kontrollgruppe erhielt, mit 7 mg pro kg im Vergleich zu anderen Studien deutlich höher. Eine Reduzierung würde jedoch einer Folsäureunterversorgung in dieser Zuchtpopulation entsprechen, da sich der Organismus der Tiere über Generationen hinweg an diese Nährstoffzusammensetzung bereits während seiner eigenen intra- und extrauterinen Entwicklung angepasst hat und somit von einer „zuchteigenen Homöostase“ im Folsäurestoffwechsel auszugehen ist. In der Folge könnte eine Referenznahrung in der Kontrollgruppe mit einem niedrigerem Folsäuregehalt zu Studienzwecken bei den Muttertieren ein relatives Folsäuredefizit erzeugen, welches über die Schwangerschaft und teilweise auch die Stillzeit hinweg aufrechterhalten wird, obwohl in diesen Phasen der Bedarf eigentlich sogar erhöht ist. Studien zeigen, dass bereits ein moderates Folatdefizit im betroffenen Organismus zu einer Hypomethylierung der DNA führen kann (76). Darüber hinaus ist mittlerweile bekannt, dass auch ein paternales Folsäuredefizit zum Zeitpunkt der Konzeption einen langfristigen Einfluss auf die fetale DNA-Methylierung ausüben kann (121). Es ist daher davon auszugehen, dass von einer Diät mit einem niedrigerem Folsäuregehalt während der Schwangerschaft die intra-

und auch extrauterine Bereitstellung von Methylgruppen durch den mütterlichen Organismus für die Nachkommen verändert wird, wovon je nach Studienmodell sowohl die Tiere in der Kontroll- als auch den Interventionsgruppen mit Diätfütterung betroffen wären. Dies würde dann entsprechende Konsequenzen für den Stoffwechsel der Muttertiere selbst und den ihrer Nachkommen nach sich ziehen. Bei Verwendung des üblichen Normalfutters als Referenznahrung hingegen können Unterschiede der Methylierung bzw. der Genexpression zwischen Kontroll- und Diätgruppen verglichen werden, ohne dass bei den Elterntieren von weiteren, neu hinzukommenden Einflüssen aufgrund von Stoffwechselveränderungen präkonzeptionell sowie während Trag- und Stillzeit ausgehen ist. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher das im Tierstall üblicherweise verwendete Normalfutter als Referenznahrung beibehalten.

Beim Menschen kann die Aufnahmemenge von synthetischer Folsäure in Einzelfällen stark erhöht sein. In Abbildung 14 ist beispielhaft aufgeführt, wie die tägliche Zufuhr von Folsäure durch den Verzehr angereicherter Lebensmittel sowie die zusätzliche Einnahme von pharmazeutisch hergestellten Nahrungsergänzungsmitteln insbesondere bei Schwangeren potentiell einen sehr hohen Wert erreichen kann.



In der vorliegenden Untersuchung wurde daher in den beiden Interventionsgruppen der Anteil von Folsäure in der Diätnahrung auf das 4fache Niveau im Vergleich zum Normalfutter angehoben. Um einen reibungslosen Ablauf der Methylierungsprozesse in der Zelle zu ermöglichen und eine Anreicherung von bestimmten Stoffwechselprodukten (Methyl- THF, Homozystein) infolge eines Ungleichgewichts der Nährstoffversorgung zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Gehalt der am DNA- und Methylierungszyklus beteiligten Nährstoffen B₆, B₁₂, Methionin und Cholin ebenfalls um den Faktor 4 erhöht.

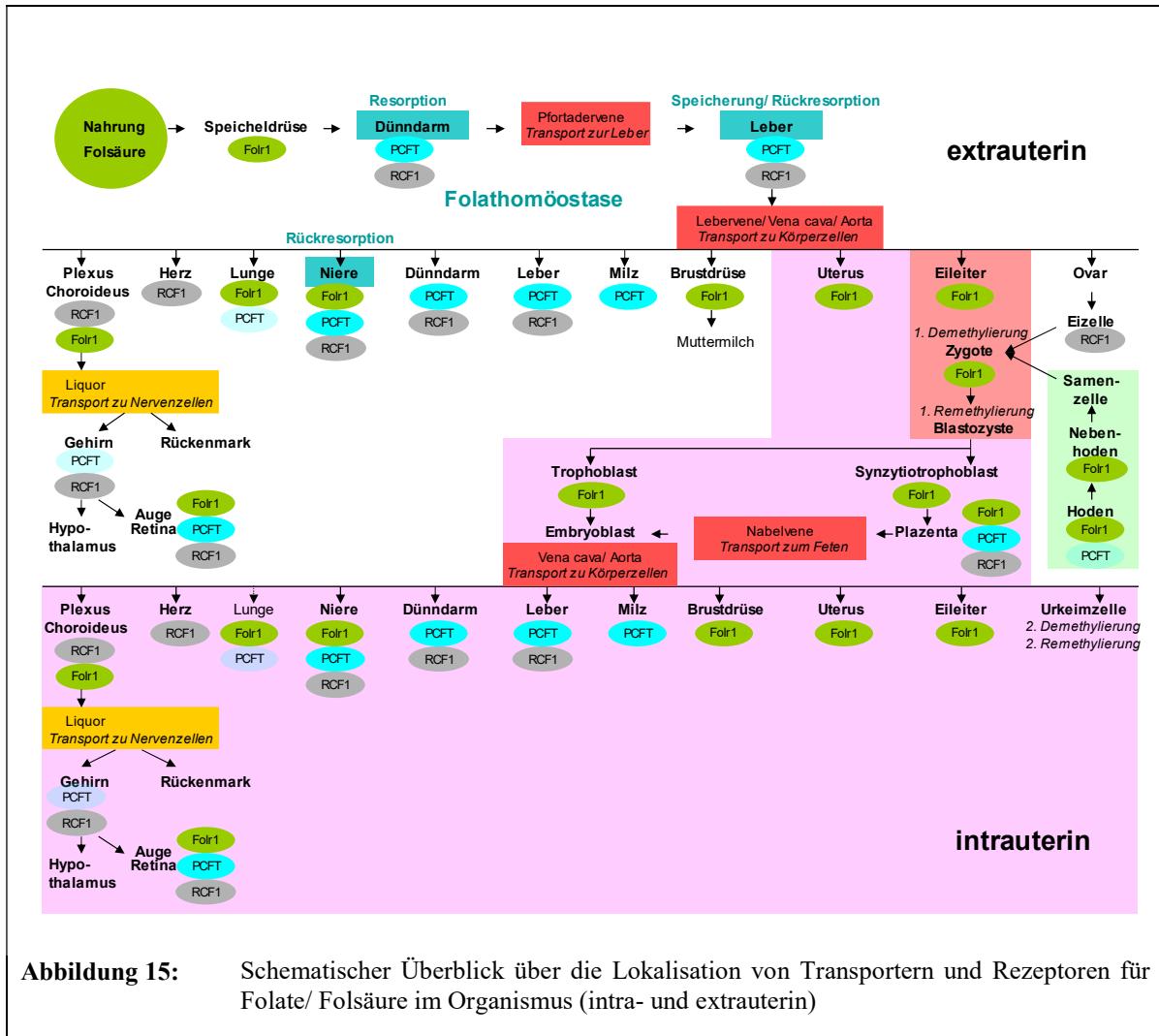
Das Ausmaß der Supplementierung scheint eine wichtige Rolle zu spielen. In einigen Studien unterschied sich der Folsäuregehalt in der Nahrung der Kontrollgruppe nicht sehr stark von dem in der Interventionsgruppe, so dass möglicherweise epigenetische Veränderungen (noch) nicht detektiert werden konnten. Einen Beleg dafür liefert eine Studie an Mäusen, bei der eine Steigerung der maternalen Folsäurezufuhr während der Tragzeit von 2 auf 40 mg pro kg, nicht aber von 2 auf 5mg pro kg mit einer signifikant höheren globalen DNA- Methylierung bei den Nachkommen einherging (118).

Aus eigener Sicht erscheint auch das Zeitfenster, innerhalb dessen die Diätexposition stattfindet, von großer Bedeutung für die Ergebnisinterpretation, da die beiden Phasen der intra- bzw. extrauterinen Entwicklung sich hinsichtlich der Nährstofftransportwege klar unterscheiden. Dies hat zur Folge, dass die Nährstoffe auf ihrem Weg im Organismus der Nachkommen intrauterin (parenterale Zufuhr) auf andere erste Zielgewebe treffen als nach ihrer Geburt (enterale Zufuhr). Die Aufnahme von Folaten und Folsäure in die Körperzellen ist abhängig von den in den jeweiligen Geweben lokalisierten Transportern und Rezeptoren, deren Affinität zu den verschiedenen Stoffwechselformen der Folate bzw. Folsäure und dem lokal vorherrschenden pH-Wert. Bekannt sind der Folattransporter 1 (synonym: Reduced Folate-Carrier; RFC), der protonen gekoppelte Folattransporter (PFCT) sowie verschiedene Isoformen der Folatrezeptoren. Der RFC besitzt eine hohe Affinität für reduzierte Folate und eine sehr niedrige Affinität für Folsäure. Er ist der Haupttransporter für Folate in die Gewebe und kommt ubiquitär vor; sein Optimum liegt bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (122). Der PFCT wurde erst 2006 beschrieben; er ist vorwiegend im Duodenum lokalisiert und arbeitet am effektivsten bei einem niedrigen pH-Wert von 5,5 (123, 124). Er transportiert sowohl reduzierte Folate als auch Folsäure mit hoher Affinität und übernimmt eine Schlüsselrolle bei der intestinalen Resorption; er ist zuständig für die pH-Wert abhängige Aufnahme der Folsäure aus der Nahrung in die Darmschleimhaut. Zur Familie der Folatrezeptoren zählen der Folatrezeptor alpha (Folr α), beta (Folr β), gamma (Folr γ) und delta (Folr δ). Der Folr α (synonym: Folate binding protein 1; FBP1), welcher eine hohe Affinität sowohl für Folsäure als auch reduzierte Folate besitzt, wird auf der

Zellmembran von Epithelgeweben exprimiert, insbesondere an der Plazenta, der Niere, der Retina und dem Choroid Plexus; in pathologischer Form wird er darüber hinaus häufig überexprimiert in Karzinomen, d.h. in malignen Tumoren epithelialer Zellen (125).

Die mit der Nahrung zugeführten und im Organismus bereitgestellten Folatmengen werden zur Aufrechterhaltung der Folathomöostase innerhalb physiologischer Grenzen gehalten: zum einen durch die limitierte enterale Resorptionskapazität des PCFT, welche einer Sättigungskinetik unterliegt, zum anderen durch Anpassung der tubulären Rückresorption in der Niere durch den Folatrezeptor alpha. Studien zeigen darüber hinaus, dass sowohl die Expression der Folattransporter PCFT und RCF im Dünndarm als auch die renale Expression des Folatrezeptor alpha den zugeführten Folsäuremengen angepasst wird mit der Folge, dass eine übermäßige Folsäurezufuhr über einen längeren Zeitraum zu einer verminderten Resorptionsrate in Darm und einer erhöhten Ausscheidung über die Niere führt, ein längerfristiges Folsäuredefizit dagegen die Resorption steigert (126, 127, 128).

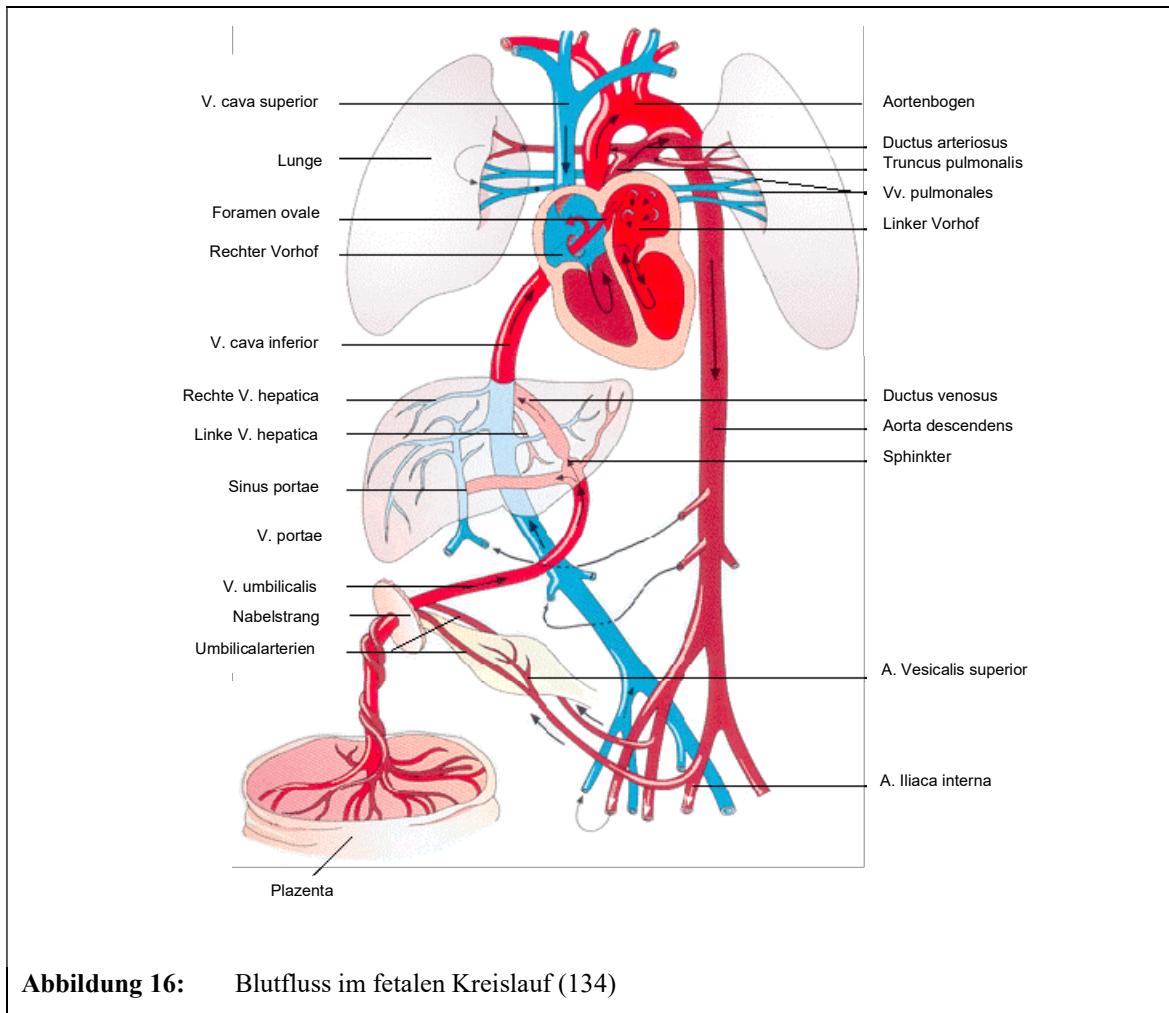
Abbildung 15 gibt einen Überblick über die Verteilung der Transporter PCFT und RCF sowie den Folatrezeptor alpha in den verschiedenen Körperteilen, die die mit der Nahrung aufgenommene Folsäure im Organismus der Elterntiere sowie des Fetus erreicht.



Es wurde beobachtet, dass bei einer längerfristigen gesteigerten Zufuhr von synthetischer Folsäure ein homöostatisches Gleichgewicht nicht aufrechterhalten werden kann: eine hohe Aufnahme synthetischer Folsäure geht mit erhöhten Mengen unmetabolisierter Folsäure im Serum einher (129, 130). Bei einer Supplementierung während der Schwangerschaft wurden erhöhte Folsäurelevel sowohl im maternalen als auch fetalen Blut sowie im plazentaren Gewebe festgestellt (131). Es ist daher davon auszugehen, dass bei einer hohen Folsäureaufnahme der Mutter auch mehr unmetabolisierte Folsäure über die Plazenta in den fetalen Blutkreislauf eintritt. Tatsächlich konnte im Nabelschnurblut Neugeborener unmetabolisierte Folsäure nachgewiesen werden (132). Welche gesundheitlichen Folgen im Einzelnen mit dem Auftreten unmetabolisierter Folsäure im Serum langfristig verbunden sind, insbesondere im Hinblick auf bestimmte Risikogruppen wie z.B. Ungeborene, ist noch offen; es gibt jedoch bereits Hinweise auf einen langfristigen Einfluss auf das Immunsystem. So wurde in einer Untersuchung an älteren Frauen beobachtet, dass ein hoher

Gehalt unmetabolisierter Folsäure im Plasma mit einer verminderten Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen assoziiert war (133).

Während der Schwangerschaft erreicht die Folsäure nach Aufnahme in die Nabelvene gemeinsam mit den anderen Nährstoffen im Blut das heranreifende Ungeborene und gelangt in den fetalen Blutkreislauf, der vor der Geburt gegenüber dem späteren Blutkreislauf wesentliche Unterschiede aufweist: um die Nährstoffe so schnell wie möglich und ungefiltert in den großen Körperkreislauf des Feten zu transportieren, mündet die Nabelvene (V. umbilicalis) in den Ductus venosus, der das nährstoffreiche Blut unter weitestgehender Umgehung der Leber in die untere Hohlvene (V. cava inferior) führt. Von dort aus erreicht sie den rechten Vorhof des Herzens, fließt durch das Foramen ovale in den linken Vorhof und gelangt unter Umgehung der noch nicht entfalteten Lunge über den Ductus arteriosus direkt in die Aorta (siehe Abbildung 16).



Die Nährstoffe werden somit intrauterin unter Umgehung von Leber und Lunge direkt zu den Körperzellen transportiert und können nach dem Zufluss durch das Herz über die Blut- Hirn-Schranke als erste Zielgewebe die fetalen Nervenzellen von Gehirn und Rückenmark erreichen. Dementsprechend findet keine vorgeschaltete Regulation der Folsäurezufuhr durch Dünndarm (als limierender Resorptionsfaktor), Leber (als Zwischenspeicher) und Niere (als Ausscheidungsorgan) statt, so dass zu diesem Zeitpunkt eine kontrollierte Herstellung einer Homöostase nicht gegeben ist. Dies hat möglicherweise zur Folge, dass während der Schwangerschaft im Falle einer erhöhten Zufuhr die neuronalen Gewebe des Fetus von Beginn ihrer Entwicklung an als erstes und besonders stark mit einem überproportionalen Folsäureangebot konfrontiert werden.

Mit der Durchtrennung der Nabelschnur nach der Geburt wird der kindliche Organismus von der mütterlichen Versorgung über den diaplazentaren Blutweg abgeschnitten: ab diesem Zeitpunkt werden die Nährstoffe dem wachsenden Organismus für den Rest seines Lebens über dem enteralen Weg zur Verfügung gestellt, während der Sauerstoff über die Lunge aufgenommen wird. Die postnatal nicht mehr benötigten Ducti (Ductus venosus und arteriosus) und das Foramen ovale bilden sich im Rahmen physiologischer Anpassungsprozesse zurück und werden verschlossen. Die von nun an oral erst mit der Muttermilch, dann mit fester Nahrung zugeführten Nährstoffe erreichen zunächst die Transporter und Rezeptoren im Dünndarm und werden nach ihrer Resorption über die Bürstensaummembran in die Schleimhaut und das venöse Blut der Bauchorgane abgegeben. Es erfolgt der Transport über die Pfortadervene zur Leber als Zwischenspeicher und schließlich die Abgabe an das arterielle Blut. Über den großen Körperkreislauf gelangen die Nährstoffe schließlich zu den verschiedenen Geweben und werden dann erst den Zielzellen zur Verfügung gestellt. Die Aufnahmekapazität für Folate bzw. Folsäure ist demnach postnatal von dem Vorhandensein von Rezeptoren im Darm und der Füllung der Leberspeicher abhängig, während intrauterin sofort und in vollem Umfang die Rezeptoren der Zielorgane Gehirn und Leber erreicht werden.

Die Zeitfenster der Diätfütterung variieren in den einzelnen Studien häufig und nicht immer kann eindeutig unterschieden werden zwischen prä- und postnataler Diätexposition. Möglicherweise liegt hier ein weiterer Erklärungsansatz für die in vielen Studien unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der DNA- Methylierung der jeweils untersuchten Organe. Teilweise wurde eine während der Schwangerschaft verabreichte Diät während der Stillzeit ausgesetzt und dann den Nachkommen 3 Wochen postnatal erneut gefüttert. Auf der anderen Seite wurden die Muttertiere in einigen Studien über die Tragzeit hinaus auch während der Stillphase methylreich ernährt; erst ab dem Zeitpunkt der Entwöhnung erhielten die Nachkommen dann eine Standardnahrung (98, 100, 101, 105, 117, 135, 136). Da jedoch bereits nach Geburt die Nährstoffaufnahme im Körper nicht

mehr über den Blutweg, sondern über die im Magen- Darm- Trakt lokalisierten Rezeptor- und Transportsysteme erfolgt, könnten auf diese Weise im Vergleich zur intrauterinen Phase andere, vermutlich geringere Mengen an Folsäure bzw. Methylgruppen tatsächlich ins Blut gelangen und dadurch zu einer Veränderung der organspezifisch unterschiedlichen Methylierungslevel führen.

Auch nach der Geburt scheint die Methylierung innerhalb bestimmter Zeitfenster unterschiedlich veränderbar zu sein: in Untersuchungen an Ratten wurde beobachtet, dass ein Folatdefizit nur innerhalb eines bestimmten Zeitfensters- ab der Entwöhnung bis zur Pubertät- zu einer Hypermethylierung in der Leber führte, die auch im Erwachsenenalter bestehen blieb, während ein Defizit zu einem anderen postnatalen Zeitpunkt keinen Effekt hatte (137, 138). Studien, bei denen die Diät nicht nur während der Schwangerschaft, sondern darüber hinaus auch postnatal bis zum Ende der Laktationszeit fortgeführt wurde, sind demzufolge nur bedingt geeignet für einen Vergleich mit den Ergebnissen dieser Untersuchung, bzw. es sind nur Teilergebnisse vergleichbar, bei denen intra- und extrauterine Einflüsse auf die Organmethylierung und Genexpression getrennt betrachtet werden können.

Die in der vorliegenden Untersuchung in den Gruppen jeweils festgelegten Zeitfenster der Diätfütterung sind zur Verdeutlichung in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

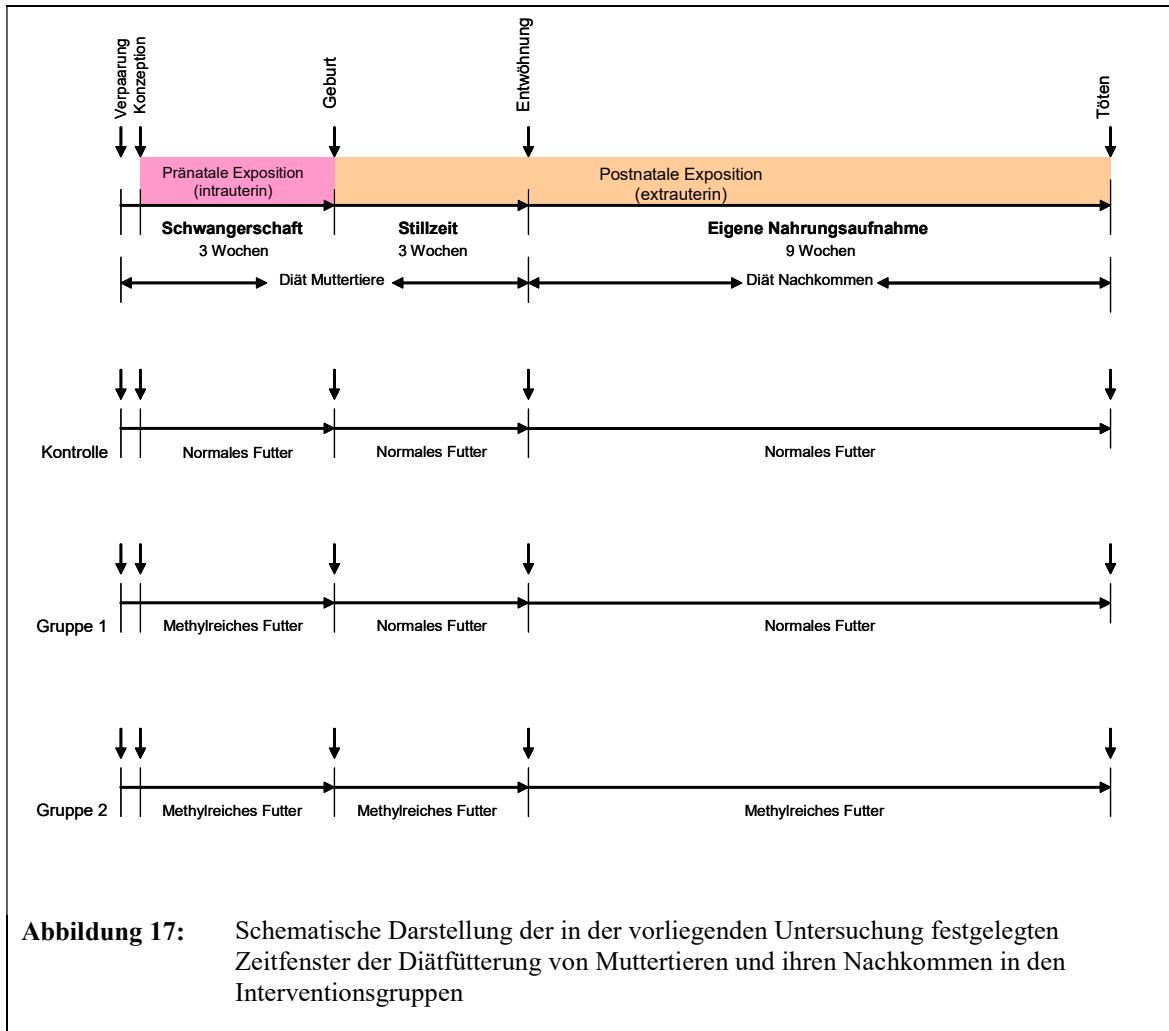


Abbildung 17: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Untersuchung festgelegten Zeitfenster der Diätfütterung von Muttertieren und ihren Nachkommen in den Interventionsgruppen

4.2 Beeinflussung der globalen DNA- Methylierung durch eine intrauterin methylreiche Diät

4.2.1 Langfristig globale DNA- Hypermethylierung nach intrauterin methylreicher Diät

Die Beobachtung, dass nach intrauterin methylreicher Diät die globale DNA- Methylierung der untersuchten Organe der weiblichen Nachkommen in adultem Alter erhöht ist, zeigt, dass sich in der vorliegenden Untersuchung der nutritive Einflussfaktor während der Fetalzeit langfristig auf das Epigenom der Nachkommen ausgewirkt hat. Ein Ungleichgewicht zwischen in- und extrauterinen Bedingungen beeinflusst offenbar nachhaltig die Methylierungsprozesse: weichen die extrauterinen Bedingungen stark von den intrauterinen ab, so führt dies langfristig zu einer Veränderung der DNA- Methylierung. Die in der vorliegenden Arbeit sehr starke Zunahme der globalen DNA- Methylierung im neuronalen Gewebe von Gehirn und Hypothalamus deutet darauf hin, dass die fetalen Nervenzellen besonders vulnerabel gegenüber nutritiven Einflüssen zu sein scheinen. Auch in einer Studie an 3 Monate alten Ratten ging eine gesteigerte Folsäureaufnahme der Muttertiere (2 mg versus 8 mg/ kg) ausschließlich während der Schwangerschaft mit einer globalen DNA- Hypermethylierung im Cortex des Gehirns einher (120). Darüber hinaus wurde im weißen Fettgewebe bei 7 Wochen alten männlichen Mäusen nach maternaler folsäurerreicher Diät ausschließlich während der Schwangerschaft ebenfalls eine globale Hypermethylierung der DNA nachgewiesen (118).

4.2.2 Bei postnataler Aufrechterhaltung der methylreichen Diät kein Unterschied der globalen DNA- Methylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ausnahme: Hypothalamus)

Erhalten die Nachkommen in der vorliegenden Untersuchung dagegen nach intrauteriner Exposition auch postnatal weiterhin eine methylreiche Diät, ist die globale DNA- Methylierung im adulten Alter in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des Hypothalamus nicht erhöht, sondern auf einem ähnlichen Level wie in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis deckt sich teilweise mit den Beobachtungen anderer Autoren. In einer Untersuchung an Mäusen zeigte sich nach methylreicher Diätfütterung über 6 Generationen ebenfalls keine signifikant unterschiedliche globale Methylierung in der Leber, jedoch wurde eine zunehmende epigenetische Variabilität beobachtet (136). Im Fettgewebe von Ratten, die pränatal sowie 4 Wochen postnatal einer folsäuresupplementierten Diät exponiert wurden, wurde 6 Wochen später im Vergleich zur Kontrollgruppe kein unterschiedlicher Status der globalen DNA- Methylierung nachgewiesen (105).

Interessanterweise ging eine Folsäuresupplementierung schwangerer *Folbp1*-Knockout- Mäuse bei allen untersuchten Genotypen mit einer globalen DNA- Hypomethylierung von Leber und Gehirn der Feten am Ende der Schwangerschaft einher (139). Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, dass hohe Mengen von Folsäure bzw. ihr Abbauprodukt Dihydrofolsäure verschiedene Enzyme des Folatstoffwechsels inhibieren und sie darüber hinaus im Stoffwechsel bei der Bindung an Transporter und Rezeptoren möglicherweise in Konkurrenz zu den reduzierten Folatformen tritt (140). Im Lebergewebe von Ratten, deren Mütter während der Trag- und Stillzeit einer folsäurereichen Diät ausgesetzt waren, wurde zum Zeitpunkt ihrer Entwöhnung eine globale DNA- Hypomethylierung festgestellt (99). Eine ausschließlich postnatale Supplementierung führte in derselben Studie ebenfalls zu einer globalen DNA- Hypomethylierung im Alter von 14 Wochen. Eine erst nach der Geburt verabreichte folsäure- bzw. methylreiche Diät ging auch in anderen Studien mit einer globalen Hypomethylierung in Leber und Kolon einher (98, 119). In Humanstudien zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen einer erhöhten Folsäureaufnahme und leukozytärer globaler DNA- Methylierung im adulten Alter (73, 141). Umgekehrt führte wie bereits beschrieben eine postnatal methylarme Diät, die in der Pubertät beendet wurde, langfristig in der Leber zu einer globalen Hypermethylierung (137).

Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass eine übermäßige Zufuhr von Methyldonatoren in der Regel zu einer Abnahme der globalen Methylierung führt, ein im Vergleich dazu niedrigerer Versorgungslevel dagegen zu einer Zunahme. Die Auflistung einer Auswahl von Studien in den Tabellen 10 bis 13 gibt einen Überblick über die Veränderungen der globalen DNA- Methylierung in Abhängigkeit vom Zeitfenster der Diätexposition. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass diese Veränderungen auch abhängig sind von der untersuchten Gewebeart (98, 99, 120), dem Alter (142) und dem Geschlecht der jeweils untersuchten Spezies (101) sowie dem Ausmaß der Supplementierung (118).

Tabelle 10: Studien, in denen der Einfluss einer ausschließlich **pränatal** verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA- Methylierung der Nachkommen untersucht wurde

■ Globale DNA- Methylierung nimmt ab ■ Globale DNA- Methylierung bleibt gleich ■ Globale DNA- Methylierung nimmt zu

a) Bestimmung der globalen Methylierung fetal/ bei Geburt

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA-Methylierung
Finnell (139)	Maus (Folbp1)	n.b.	Gehirn	GA 16 (Sectio)	25 mg Folinsäure (i.v.)	↓
s.o.	s.o.	s.o.	Leber	s.o.	s.o.	↓
Sable (120)	Ratte	n.b.	Gehirn	1 Tag	8 mg Folsäure	--

b) Bestimmung der globalen Methylierung in adultem Alter

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA-Methylierung
Vorliegende Arbeit	Maus	♀	Hypo-thalamus	3 Monate	28 mg Folsäure (+ B12, B6, Cholin, Methionin)	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Gehirn	s.o.	s.o.	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Leber	s.o.	s.o.	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Milz	s.o.	s.o.	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Herz	s.o.	s.o.	↑
Sable (120)	Ratte	n.b.	Gehirn (Cortex)	3 Monate	8 mg Folsäure	↑
Huang (118)	Maus	♂	Fett	7 Wochen	40 mg Folsäure	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Fett	s.o.	5 mg Folsäure	-

Tabelle 11: Studien, in denen der Einfluss einer **pränatal und in der Stillzeit** verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA Methylierung untersucht wurde

■ Globale DNA- Methylierung nimmt ab ■ Globale DNA- Methylierung bleibt gleich ■ Globale DNA- Methylierung nimmt zu

a) Methylierung unmittelbar nach Ende der Stillzeit

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA-Methylierung
Sie (99)	Ratte	n.b.	Leber	3 Wochen	5 mg Folsäure	↓
Sie (98)	Ratte	♂	Kolon	3 Wochen	5 mg Folsäure	↑
Sable (120)	Ratte	n.b.	Gehirn	3 Wochen	8 mg Folsäure	--

b) Methylierung langfristig im adulten Alter

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA-Methylierung
Carlin (101)	Maus	♂	Gehirn (NAc)	50 Wochen	15 mg Folsäure (+ B12, Cholin, Methionin, Betain, Zink)	↑
s.o.	s.o.	♂	Gehirn (PFC, VTA)	s.o.	s.o.	--
s.o.	s.o.	♀	Gehirn (NAc, PFC, VTA)	s.o.	s.o.	--
Hollingworth (135)	Maus	n.b.	Lunge	F1-Generation	17 mg Folsäure (+ B12, Cholin, Methionin, Betain, Zink)	--
Chmurzynska (105)	Ratte	n.b.	Fett	10 Wochen	5 mg Folsäure	--
Sie (99)	Ratte	n.b.	Leber	14 Wochen	5 mg Folsäure	--

Tabelle 12: Studien, in denen der Einfluss einer dauerhaft **prä- und postnatal** verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA Methylierung untersucht wurde

■ Globale DNA- Methylierung nimmt ab ■ Globale DNA- Methylierung bleibt gleich ■ Globale DNA- Methylierung nimmt zu

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA- Methylierung
Sable (120)	Ratte	n.b.	Gehirn (Cortex)	3 Monate	8 mg Folsäure	↑
Vorliegende Arbeit	Maus	♀	Hypothalamus	3 Monate	28 mg Folsäure (+ B12, B6, Cholin, Methionin)	↑
s.o.	s.o.	s.o.	Gehirn	s.o.	s.o.	--
s.o.	s.o.	s.o.	Leber	s.o.	s.o.	--
s.o.	s.o.	s.o.	Milz	s.o.	s.o.	--
s.o.	s.o.	s.o.	Herz	s.o.	s.o.	--
Li (136)	Maus	n.b.	Leber	5 Wochen (F6)	15 mg Folsäure (+ B12, Cholin, Methionin, Betain, Zink)	--

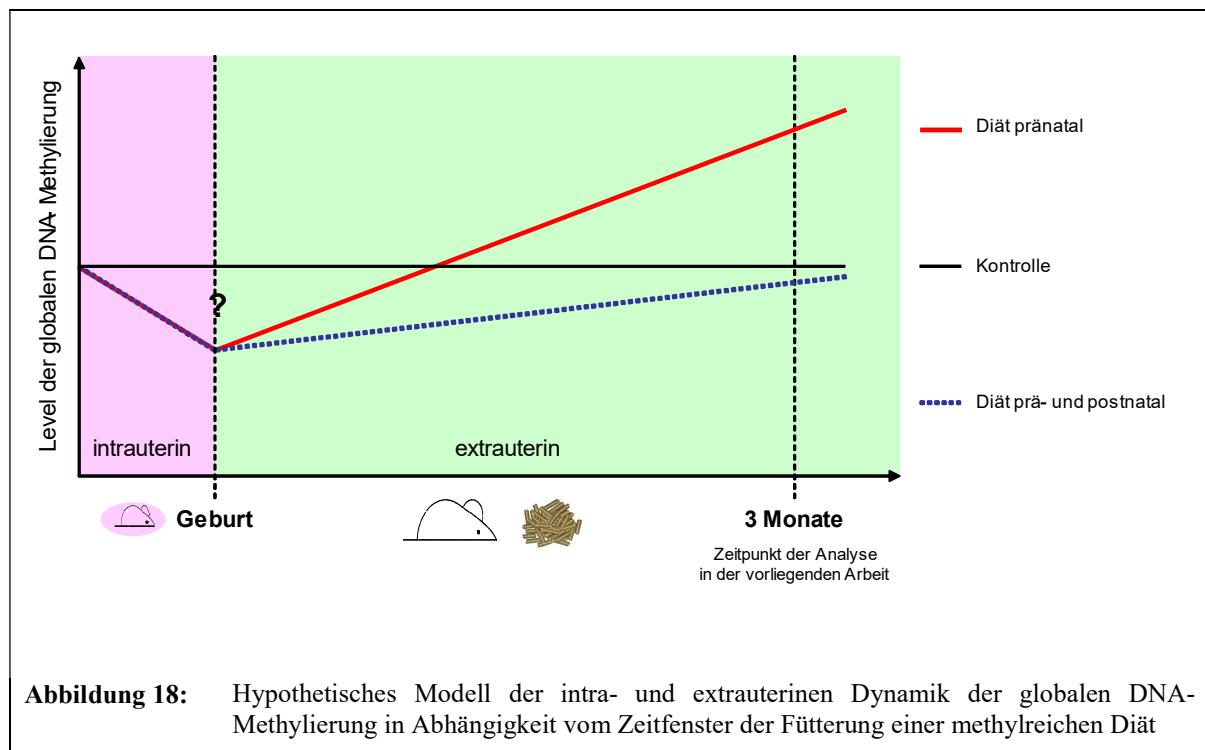
Tabelle 13: Studien, in denen der Einfluss einer **postnatal** verabreichten folsäure- bzw. methylreichen Diät auf die globale DNA Methylierung untersucht wurde

■ Globale DNA- Methylierung nimmt ab ■ Globale DNA- Methylierung bleibt gleich ■ Globale DNA- Methylierung nimmt zu

Autor	Modell	♂/♀	Gewebe	Alter	Supplementierung (pro kg)	Globale DNA- Methylierung
Cordero (119)	Ratte	♂	Leber	n.b.	Folsäure (+ B12, Cholin, Betain)	↓
Sie (99)	Ratte	n.b.	Leber	14 Wochen	5 mg Folsäure (11 Wochen)	↓
Sie (98)	Ratte	♂	Kolon	14 Wochen	5 mg Folsäure (11 Wochen)	↓
Bae (141)	Human	♀	Leukozyt	adult	Zeitraum nach Lebensmittelanreicherung	↓
Ono (73)	Human	♀	Leukozyt	adult	Hoher Folatkonsum	↓
Keyes (142)	Maus	♂	Kolon	23 Monate	18 µmol/ kg Folsäure (20 Wochen)	↑
s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	9 Monate	s.o.	--

Geht man nun auf der Grundlage bereits bekannter Daten davon aus, dass eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft mit einer globalen DNA- Hypomethylierung in den Organen der Nachkommen zum Zeitpunkt der Geburt einhergeht, würde sich in der vorliegenden Untersuchung in beiden Interventionsgruppen nach einer intrauterinen Phase der Demethylierung dieser Trend postnatal umkehren und die Methylierung wieder zunehmen. Dabei scheint das Ausmaß der Zunahme abhängig davon zu sein, wie stark der Methylgehalt der Nahrung postnatal von dem intrauterin hohen Methylangebot abweicht: folgt auf eine intrauterine Supplementierung ein normaler Methylgehalt in der Nahrung, die zudem nicht mehr über den Blutkreislauf, sondern über den Verdauungstrakt zugeführt wird, nimmt die Verfügbarkeit an Methylgruppen für die Nachkommen postnatal stark ab; dieses relativ große Defizit führt dann langfristig zu einer ausgeprägten globalen DNA- Hypermethylierung. Enthält die Nahrung hingegen postnatal einen ebenfalls erhöhten Methylgehalt, ist das Defizit zwar aufgrund der Umstellung von parenteraler auf enterale Zufuhr noch vorhanden. Da es aber deutlich geringer ausgeprägt ist, führt es in der Folge zu einem gemäßigten Anstieg der Methylierung bis leicht unterhalb des Niveaus in der

Kontrollgruppe. Abbildung 18 zeigt ein hypothetisches Modell, wie sich die DNA- Methylierung im prä- und postnatalen Verlauf in Abhängigkeit von den verfügbaren Methylgruppen in der Nahrung möglicherweise verändern könnte.



Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf einen zunächst paradox erscheinenden Prozess hin: eine intrauterin methylreiche Ernährung führt in den untersuchten fetalen Organen zu einer globalen Hypomethylierung der DNA. Erfolgt extrauterin die Exposition zu einer Diät mit normalem Methylanteil, also einer in Relation zur intrauterinen Versorgung methylarmen Diät, führt dies dann im weiteren Verlauf bei den Nachkommen zu dem gegenläufigen Effekt der globalen Hypermethylierung der DNA. Eine auch postnatal fortgeführte Supplementierung kann diesen Effekt offenbar abmildern und führt zu einem nur leichten Anstieg der Methylierung auf ein normales Niveau bzw. darunter.

Betrachtet man lediglich die Endpunkte zu einem bestimmten Zeitpunkt, z.B. im Lebensalter der Nachkommen von 3 Monaten, so könnte man auf den ersten Blick schlussfolgern, dass eine pränatale Supplementierung keine Auswirkung auf die globale Methylierung hat, wenn sie auch postnatal fortgeführt wird. Dies würde auf der anderen Seite jedoch bedeuten, dass die Aufrechterhaltung eines hohen Methylgruppenangebots auch nach der Geburt die Methylierung erneut beeinflussen kann und damit möglicherweise Veränderungen im Stoffwechsel einhergehen.

Eine Beobachtung, die in diese Richtung weist, wurde in einer Studie an Ratten gemacht: eine maternale Folsäuresupplementierung ausschließlich während der Tragzeit führte im weiteren Verlauf bei den untersuchten männlichen Nachkommen zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und sie entwickelten im weiteren Verlauf eine Neigung zu Fettleibigkeit (143). Bei den Nachkommen, die auch postnatal folsäurereich ernährt wurden, entwickelte sich das Körpergewicht demgegenüber normal. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine ausschließlich pränatal verabreichte als auch eine dauerhaft fortgeführte Folsäuresupplementierung bei den Nachkommen langfristig mit einer veränderten Expression von Genen einherging, die eine Rolle hinsichtlich der Regulation der Nahrungsaufnahme spielen. So führte beispielsweise eine dauerhafte Folsäuresupplementierung zu der Hypomethylierung des POMC- Gens, welches eine Rolle bei der Energiehomöostase und der Körpergewichtsregulation spielt. Ein Zusammenhang zwischen der Folsäureversorgung während der Schwangerschaft und Gewichtsentwicklung der Nachkommen wurde auch in einer weiteren Studie beobachtet: eine maternale Supplementierung ging hier einher mit einem signifikant höheren Geburtsgewicht der Nachkommen (98).

Es ist daher davon auszugehen, dass intrauterine Auswirkungen nicht einfach aufgehoben, sondern lediglich vorübergehend und zu einem bestimmten Zeitpunkt der Untersuchung kaschiert werden. Auch weitere, in ihrem Ausmaß noch unbekannte epigenetische Veränderungen werden dabei nicht berücksichtigt. Einen Hinweis auf derartige Veränderungen liefert auch die in einer bereits erwähnten Studie beobachtete zunehmende epigenetische Variabilität in hepatischem Gewebe von Mäusen nach methylreicher Diät (136). Die tatsächlichen und langfristigen Folgen derartiger Eingriffe von außen sind daher in ihrer Tragweite derzeit nicht abzuschätzen. Es ist auch nicht bekannt, wann genau eine fortgeführte Supplementierung beendet werden könnte, ohne dass erneut eine Gegenregulation im Sinne einer Anpassung aufgrund möglicherweise dauerhaft geprägter Regelkreise erfolgt. Es wäre daher aus eigener Sicht eine problematische Schlussfolgerung, im Anschluss an ein intrauterin künstlich induziertes erhöhtes Methylangebot, insbesondere von Folsäure, auch nach der Geburt die Supplementierung fortzuführen in der Annahme, ein Gleichgewicht zwischen in- und extrauterinen Umgebungsbedingungen herzustellen und damit Folgeerscheinungen wie z.B. die Entwicklung von Fettleibigkeit zu verhindern. Hier würde stattdessen noch länger von außen in ein auf eine Homöostase ausgerichtetes System eingegriffen und die langfristigen Nebenwirkungen sind unklar. Vielmehr sollten die maternalen und intrauterin stattfindenden epigenetischen Veränderungen infolge einer folsäure- bzw. methylreichen Diät genauer untersucht werden.

Hinzu kommt, dass die Methylierungslevel sich anscheinend bereits früh im Leben auch unter gleichen Ernährungsbedingungen verändern: in Studien an Ratten wurde festgestellt, dass die

Methylierung in bestimmten Gehirnregionen während der ersten 21 Tage postnatal ansteigt, ohne dass zusätzlich von außen nutritive Einflussfaktoren verändert wurden (120, 144). Dies weist darauf hin, dass die DNA- Methylierung dynamisch verläuft, und dass diese Dynamik möglicherweise in den neuronalen Geweben spezifischen Regulationsprozessen unterliegt. Die Methylierungsvorgänge können dann zusätzlich von außen in Abhängigkeit von dem Methylangebot der Nahrung modifiziert werden.

Es bleibt offen und in weiteren Untersuchungen zu klären, ob bei den Nachkommen eine intrauterine Folsäuresupplementierung im Rahmen einer methylreichen Diät tatsächlich in den verschiedenen Geweben, insbesondere in Gehirn und Hypothalamus, zum Zeitpunkt ihrer Geburt mit einer globalen Hypomethylierung der DNA einhergeht wie in Abbildung 18 hypothetisch dargestellt.

4.2.3 Globale DNA- Hypermethylierung im Hypothalamus weiblicher Mäuse nach prä- und postnatal methylreicher Diät: Hinweis auf Fetale (Fehl-) Programmierung?

Interessanterweise nimmt in der vorliegenden Arbeit der Hypothalamus eine Sonderstellung unter den untersuchten Gewebearten ein. Während in der vorliegenden Untersuchung die globale DNA-Methylierung in den Herz-, Leber-, Milz- und Gehirngeweben adulter weiblicher Mäuse der Kontrollgruppe auf einem ähnlich hohen Niveau zwischen 40- 60 % liegt, ist sie im Hypothalamusgewebe fast 10fach niedriger. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie, die ebenfalls an Ratten durchgeführt wurde. Hier war im Hypothalamusgewebe eine deutlich höhere Gesamtmethylierung festgestellt worden; allerdings wurde hier speziell die linke Hälfte des Hypothalamus ausgewählt und eine andere Methode zur Bestimmung der Methylierung angewandt, darüber hinaus waren die Ratten männlichen Geschlechts und zum Untersuchungszeitpunkt wesentlich älter (143).

Die globale Hypermethylierung der DNA im Hypothalamus im adulten Alter ist in der vorliegenden Arbeit in beiden Interventionsgruppen, d.h. sowohl nach ausschließlich intrauteriner als auch nach dauerhafter methylreicher Diät, gleich stark ausgeprägt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Hypothalamus auf ein erhöhtes Angebot von Methyldonatoren im Vergleich zu den anderen untersuchten Geweben von Herz, Leber, Milz und Gehirnsubstanz epigenetisch abweichend reagiert. Unterschiede treten in allen untersuchten Bereichen auf: der Level der globalen DNA- Methylierung ist in den Hypothalamen der Kontrollgruppe mit Abstand am niedrigsten; das Ausmaß der Hypermethylierung nach intrauterin methylreicher Diät ist hier am stärksten und ausschließlich in diesem Gewebe geht ein postnatales Fortführen der methylreichen

Diät ebenfalls mit einer Hypermethylierung einher. Diese Beobachtungen sind insofern interessant, weil der Hypothalamus trotz seiner geringen Größe eine besondere Rolle im Organismus einnimmt. Zum einen dient er als Bindeglied zwischen Nerven- und Hormonsystem; durch ein dichtes, mit vielen Blutgefäßen durchzogenes Geflecht mit eingebetteten Nervenzellen sind hier das Nervensystem und endokrines System eng miteinander verbunden. Zum anderen besitzt er eine übergeordnete Steuerungsfunktion und hat die überlebenswichtige Aufgabe, im Körper die verschiedenen homöostatischen Regelkreise aufrechtzuerhalten. Hier befinden sich übergeordnete Zentren des vegetativen Nervensystems, die die wichtigsten Steuerungsprozesse im Körper koordinieren und dadurch Anpassungsvorgänge an die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen ermöglichen. Dazu zählen neben der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, auch der Wasserhaushalt, die Wärmeregulation, die Sexualfunktion sowie der Wach- und Schlafrhythmus. Diese zentral übergeordneten hypothalamischen Regelzentren werden in einem sehr frühen Zeitfenster der intrauterinen Entwicklung etabliert und bedürfen einer Sollwerteinstellung, an der sie sich dann langfristig orientieren. Als Ausgangsrichtwert dient das zu diesem Zeitpunkt intrauterin vorherrschende Milieu. In einem sensiblen Zeitfenster der frühen embryonalen Entwicklung, in welchem der Hypothalamus als übergeordnetes, lebensnotwendiges Regelzentrum seiner eigenen Sollwertfindung unterliegt, ist er besonders vulnerabel für eine Fehlprogrammierung aufgrund unphysiologischer Umgebungsbedingungen, welche sich langfristig negativ auf den Organismus auswirken kann. Dies kann insbesondere dann auftreten, wenn nach der Geburt die extrauterinen Umgebungsbedingungen stark von den intrauterinen abweichen.

Es wurde im Rattenmodell beobachtet, dass Ernährungsfaktoren wie z.B. ein veränderter Fettanteil während der Schwangerschaft zu Veränderungen im fetal Hypothalamus im Sinne einer pränatalen Programmierung führen können (145). Eine fettreiche Diät der Muttertiere veränderte bei den Nachkommen die Produktion bestimmter Proteine und Hormone und stimulierte die Proliferation neuroepithelialer Zellen im embryonalen hypothalamischen dritten Ventrikel. Im weiteren Verlauf zeigten sie ein verändertes Verhalten bei der Nahrungsaufnahme, wurden übergewichtig und hatten höher Blutfettwerte. Auch in einem frühen Zeitfenster nach der Geburt sind bei Ratten, die in dieser Lebensphase noch als sehr unreif gelten, ernährungsbedingte epigenetische Veränderungen im Hypothalamus beobachtet worden: infolge einer neonatalen Überernährung wurden bei ihnen Veränderungen der Methylierung bestimmter hypothalamischer Gene nachgewiesen, die langfristig zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme führten sowie eine diabetische Stoffwechsellage begünstigten (146, 147).

Eine im Hypothalamusgewebe weiblicher Nachkommen langfristig nachweisbare globale DNA-Hypermethylierung infolge einer methylreichen Diät der Muttertiere während der Schwangerschaft

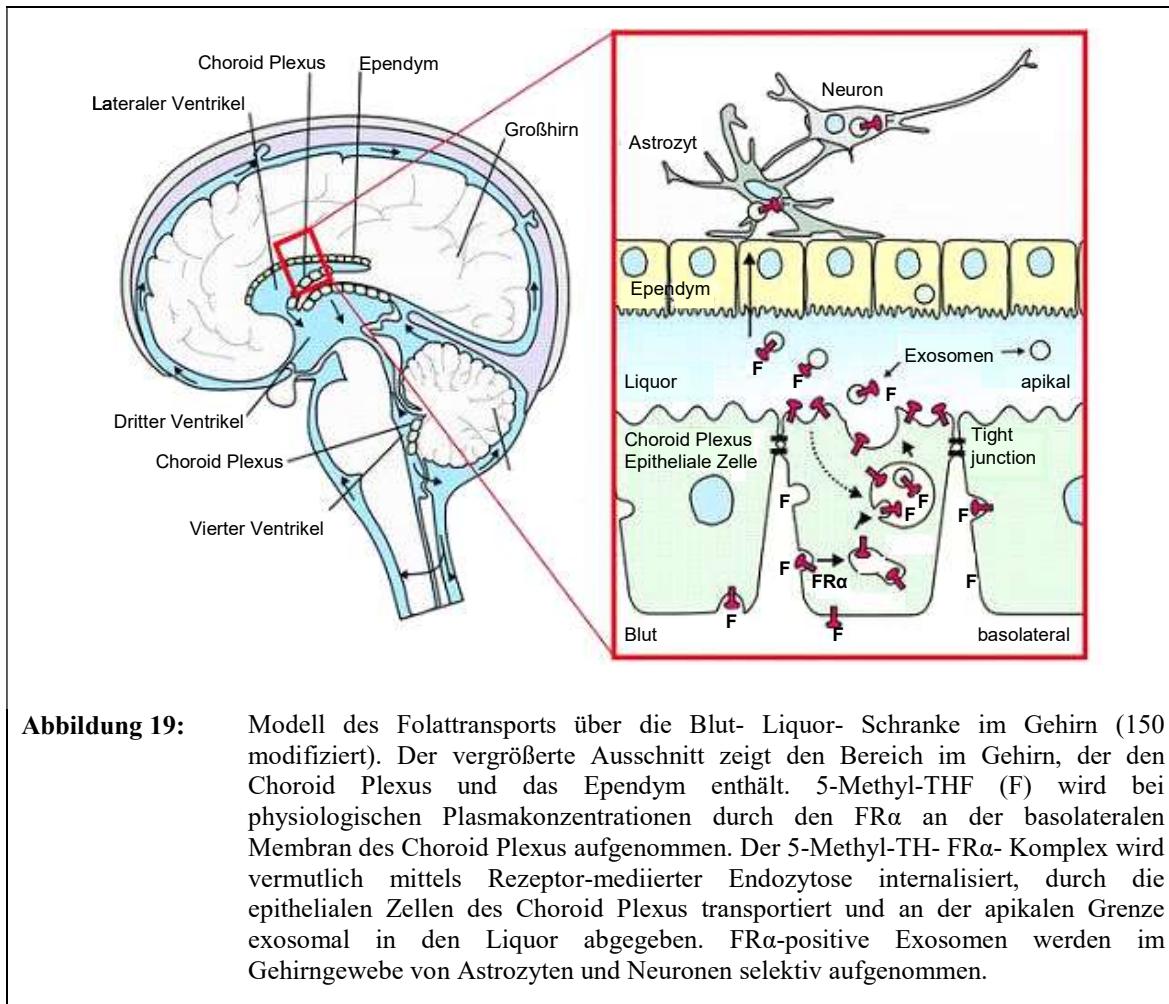
weist darauf hin, dass hier zu einem kritischen Zeitpunkt der intrauterinen Entwicklung in dem übergeordneten Regelzentrum Veränderungen auf nutriepigenetischer Ebene stattgefunden haben, die sich auf Abläufe im gesamten Organismus auswirken. Es besteht das Risiko, dass von außen in die Etablierung von Regelkreisen eingegriffen wurde und eine fetale (Fehl-) Programmierung stattgefunden hat, die sich dauerhaft auswirkt. Die Beobachtung, dass Nachkommen von Ratten nach maternaler Folsäuresupplementierung in der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für Übergewicht aufweisen, deutet ebenfalls in diese Richtung (143). Die auch nach Fortführen der Diät beobachtete globale Hypermethylierung der DNA im Hypothalamus ist ein Hinweis darauf, dass die während des intrauterinen fetalen Wachstums etablierte Gesamtmethylierung im sich entwickelnden Hypothalamus der Maus konstant bleibt. Inwieweit jedoch die spezifischen Methylierungsmuster einzelner Gene durch eine dauerhaft fortgeführte methylreiche Diät verändert werden, wie dies in einer bereits erwähnten Studie beobachtet wurde (136), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bleibt offen.

4.3 Langfristig verändertes hypothalamisches Genexpressionsmuster nach intrauterin methylreicher Diät

16 der insgesamt 31 hypothalamischen Gene, die in der vorliegenden Untersuchung nach intrauteriner Diätexposition bei den weiblichen Nachkommen langfristig in ihrer Expression verändert sind, nehmen Einfluss auf Prozesse der Transkription, Translation und Signaltransduktion und sind stark in genetische Steuerungsmechanismen in der Zelle eingebunden. Diese Gruppe stellt damit den größten Anteil der in ihrer Expression veränderten Gene dar. Zu den stärker exprimierten Genen zählen *Braf*, *Med12l*, *Folr1*, *Ptprv* sowie *Cmya5*, schwächer exprimiert werden *Dmrtal1*, *Fignl1*, *Ubelyl1*, *Eif2s3x*, *Olf1256*, *Ripk4*, *Zfp689*, *Ptbp1*, *Rrn3*, *Itch* und *Nfkb1* (siehe Tabelle 11). Sie beeinflussen sich wechselseitig, so dass es zu verstärkenden Effekten kommen kann. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass durch die während der Schwangerschaft verabreichte methylreiche Diät beim Feten offenbar tief in die Vorgänge auf Zellebene eingegriffen wurde und dass diese Veränderungen sich langfristig auf die Genfunktionen ausgewirkt haben. Auch in anderen Studien wurde nach einer maternalen hohen Folsäurezufuhr im fetalen Gehirn bzw. in der Plazenta am Ende der Schwangerschaft ebenfalls eine veränderte Expression von Genen beobachtet, die involviert sind in Signaltransduktion und Zellstoffwechsel (148, 149).

Besonders interessant ist die nach intrauterin methylreicher Diät im Hypothalamus verstärkte Expression des Gens *Folr1* (Fold change +3,8), welches für den Folatrezeptor alpha (FR α) kodiert. Wie bereits beschrieben, bindet dieses Protein aus der Familie der Folatrezeptoren mit hoher

Affinität sowohl Folsäure als auch die reduzierten Folatderivate, es vermittelt den Transport von 5-Methyl-THF in die Zelle und übernimmt gemeinsam mit weiteren Folatrezeptoren und Transportern Funktionen bei der Herstellung einer Homöostase im Folatstoffwechsel (siehe Abbildung 19). Im Plexus choroideus ist der Folatrezeptor alpha im Normalfall in sehr hohen Konzentrationen nachweisbar und Haupttransporter von Folaten über die Blut- Liquor- Schranke in das Gehirn; diese werden auf diese Weise aus dem Blut durch die Zellen des Plexus choroideus in den Liquor und dann in die Gehirnzellen transportiert. Beim Transportvorgang wird 5-Methyl-THF an den Folatrezeptor gekoppelt; gemeinsam werden beide via Transzytose in Exosomen in den Liquor abgegeben und dann von den Nervenzellen des Gehirns aufgenommen; der Mechanismus ist in Abbildung 18 dargestellt (150). Ein angeborener Defekt des Folatrezeptor alpha bedingt einen gestörten Folattransport im Gehirn, der bereits in frühen Lebensjahren zu einer neurodegenerativen Erkrankung führt (151).



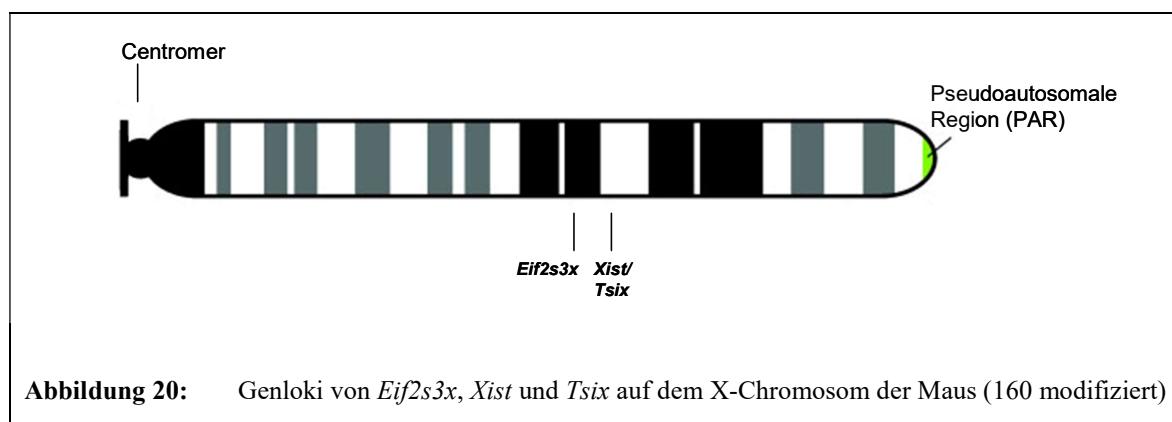
Man geht davon aus, dass transkriptionelle Mechanismen an der Regulation der Folatrezeptorexpression beteiligt sind (152). Vor wenigen Jahren wurde erkannt, dass der Folatrezeptor alpha selbst eine Rolle als Transkriptionsfaktor spielt (153). Inwieweit dies eine Rolle in der vorliegenden Untersuchung spielt, bleibt zu klären.

Die nach intrauterin methylreicher Diät beobachtete Überexpression des *Folr1* könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Folatstoffwechsel der Nachkommen nachhaltig verändert wurde. Der im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchte Nachweis einer verstärkten Expression auch auf Proteinebene würde hierzu einen wichtigen Beitrag liefern. Es ist bekannt, dass die Expression des Folatrezeptors gewebespezifisch in Abhängigkeit von der Folsäurezufuhr reguliert wird: bei höheren Zufuhrmengen nimmt die Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene ab (126), umgekehrt wird seine Expression bei niedrigen Folatkonzentrationen reversibel gesteigert (152, 154). Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass ein Folsäuremangel während der Schwangerschaft in den verschiedenen fetalen Geweben zu einer verstärkten Expression des Folatrezeptors führt, allerdings mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks: hier wurde bei einem Mangel im Gegenteil eine verminderte Expression nachgewiesen (155). Eine Ausnahme stellt auch die Plazenta dar: während der Schwangerschaft führt eine hohe maternale Folsäureversorgung in plazentarem Gewebe zu einer verstärkten Expression des Folatrezeptor alpha; es scheint so zu sein, dass der Fetus stets bestrebt ist, seine Versorgung über die Plazenta zu optimieren und diese auf ein hohes Folsäureangebot reagiert, indem sie die Aufnahme- und Transportkapazität weiter steigert (156).

Möglicherweise wird die Anpassung des Folatrezeptors an die verfügbaren Folsäuremengen auch im Hypothalamus anders reguliert als in anderen Organen. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Ausbildung der hypothalamischen Rezeptoren intrauterin an Zeitfenster gebunden ist: aufgrund der Plastizität des heranreifenden fetalen Organismus ist es denkbar, dass die im Hypothalamus lokalisierten Rezeptoren dem Angebot entsprechend ausgebildet werden und eine erste „Sollwerteinstellung“ im Sinne einer pränatalen Programmierung erfolgt. Wird ihr Expressionslevel während einer intrauterin vulnerablen Phase der fetalen Entwicklung aufgrund des vorherrschenden Milieus „programmiert“, bleibt er danach unverändert. Nach dieser Theorie würde ein erhöhtes Folsäureangebot im Rahmen der methylreichen Diät intrauterin beim Feten zu einer verstärkten hypothalamischen Rezeptorausbildung führen und letztlich eine höhere Sollwerteinstellung zur Folge haben. Der fetale Organismus würde in diesem Fall auf das intrauterin hohe Angebot an Folsäure im Rahmen der methylreichen Diät ähnlich wie bei der Plazenta mit einer Steigerung der Aufnahme- und Transportkapazität in die neuronalen Zellen des Gehirns durch eine vermehrte Expression von Folatrezeptoren in den Epithelzellen des

Choroidplexus reagieren. Einmal ausgebildet, werden diese dann dauerhaft auf einem hohen Level exprimiert. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist folglich davon abhängig, ob die Expression des Folatrezeptors auch postnatal an die jeweiligen Umgebungsbedingungen angepasst wird oder ob die Rezeptorausbildung im Hypothalamusgewebe intrauterin an limitierte Zeitfenster gebunden ist und dann dauerhaft festgelegt bleibt. Es bleibt daher zu klären, ob nach methylreicher Ernährung während der Schwangerschaft die Expression des *Folr1* bereits bei den neugeborenen Nachkommen im Hypothalamus erhöht ist und damit dauerhaft verändert bleibt oder ob die gesteigerte Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Geburt auftritt, da der Organismus auf einen höheren Folsäurelevel eingestellt ist und postnatal auf eine vermeintliche Unterversorgung reagiert. Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob die gesteigerte hypothalamische Expression des *Folr1* tatsächlich auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Noch ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Überexpression des *Folr1* nach methylreicher Diät ist interessant: in Epithelkarzinomen ermöglicht eine pathologisch erhöhte Überexpression des Folatrezeptor alpha ein rasches und invasives Tumorwachstum, in dem die Versorgung der sich rasch teilenden Zellen mit Folaten bzw. Folsäure sicherstellt wird; in der medikamentösen Tumortherapie werden daher bei einigen Tumoren Folsäureantagonisten eingesetzt (157). Es wird diskutiert, dass eine übermäßige Folsäuresupplementierung das Risiko für die Progression bestimmter Tumore erhöht (158, 159). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verstärkte Expression des *Folr1* nach intrauterin methylreicher Diät könnte ein Hinweis sein, dass ein hohes Angebot an Folsäure zu der verstärkten Ausbildung von Rezeptoren führt, welche wiederum ein Tumorwachstum begünstigen können.

Das nach intrauteriner Diät bei den weiblichen Nachkommen unerwarteterweise vermindert exprimierte Gen *Eif2s3x* (Fold Change -4,2), welches im Normalfall im Vergleich zu den männlichen Tieren stärker exprimiert wird, liegt auf dem murinen X- Chromosom in unmittelbarer Nähe der Gene *Xist* und *Tsix* (Abbildung 20).



In diesem Zusammenhang ist auch die nach intrauterin methylreicher Diät beobachtete verstärkte Expression des *Tsix* (Fold Change +4,2) interessant. Dieses Gen unterliegt dem Imprinting und ist Gegenspieler des *Xist*, welches nach der Embryonalphase wie bereits beschrieben nur in weiblichen Tieren exprimiert wird (97). Beim Imprinting handelt es sich um einen besonderen Fall der Genstilllegung durch Methylierung; bei dem gezielt entweder das mütterliche oder väterliche Allel abgeschaltet wird (60). Auf diese Weise wird zu einem sehr frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung bei weiblichen Säugetieren eines der beiden X- Chromosome inaktiviert, dabei spielen *Xist* und *Tsix* eine entscheidende Rolle. Beide kodieren jeweils nicht für ein Protein, sondern wirken ausschließlich über die transkribierte RNA. Durch die Antisense- RNA des *Tsix* wird im Normalfall die Expression von *Xist* unterdrückt (60, 161, 162). Der Ablauf dieser Gegenregulation, schematisch dargestellt in Abbildung 21, ist noch nicht vollständig geklärt; es wird vermutet, dass durch *Tsix* DNA- Methyltransferasen aktiviert werden, die den *Xist*- Promotor methylieren und damit die weitere Transkription inhibieren (163).

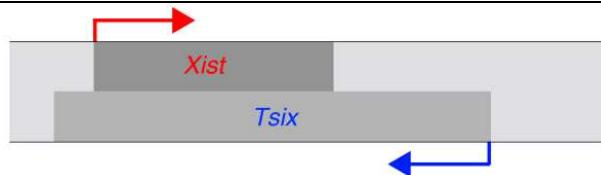


Abbildung 21: Unterdrückung der *Xist*- Expression durch Anlagerung der Antisense RNA des *Tsix*. Die kodierenden Sequenzen überlappen sich auf den gegenüberliegenden Strängen der X-chromosomal DNA (60)

Eine verstärkte Expression des *Tsix* könnte ein Hinweis sein, dass eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft die epigenetischen Reprogrammierungzyklen, welche in der frühen Entwicklung des Mausembryos stattfinden (57, 58, 59), beeinflussen könnte. Die Einordnung der veränderten Expression von *Tsix* sowie *Eif2s3x* nach intrauteriner Diät bleibt noch zu klären. Es gibt bereits Hinweise aus Studien, dass die Expression von Imprinting-Genen, darunter auch *Tsix*, durch hohe Folsäuresupplementierung oder auch andere Substanzen, die die DNA- Methylierung verändern, beeinflusst werden kann (164, 165).

Zu den nach intrauterin methylreicher Diät in ihrer Expression veränderten Genen, die an der Steuerung und dem Transport von Hormonen beteiligt sind, zählen *Ttr*, *Ecrg4* sowie *Srd5a2*. Das Ausmaß der Überexpression ist bei *Ttr* außerordentlich stark (Fold change +76,4). Dieses Gen kodiert für das Protein Transthyretin, welches dem Transport der Schilddrüsenhormone sowie von Retinol dient und im Plasma gebunden an Retinol-binding- protein (RBP) zirkuliert. Sein

Bildungsort ist vor allem der Plexus choroideus; *TtrmRNA* wurde in den Epithelzellen des lateralen, des 3. sowie des 4. Ventrikels nachgewiesen (166, 167, 168). Es wird in den Liquor bzw. das Blut sezerniert, wobei die Transportmechanismen im Gehirn und aus dem Gehirn heraus noch ungeklärt sind. Neuere Studien zeigen, dass Transthyretin im peripheren und zentralen Nervensystem einen Einfluss nimmt auf Verhalten, kognitive Fähigkeiten und Nervenregeneration sowie vermutlich auch eine Rolle bei neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Schizophrenie, Parkinson und Depressionen spielt (169, 170, 171). Bei Morbus Alzheimer scheint Transthyretin neuroprotektiv zu wirken, indem es die Aggregation von β -Amyloiden unterdrückt (172). Sein Plasmaspiegel dient als diagnostischer Biomarker und zur Prognose des Krankheitsverlaufes (173). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die Expression des Transthyretin epigenetisch reguliert wird durch die intrazelluläre Domäne (AICD) einer bestimmten neuronalen Isoform des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), welches eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Morbus Alzheimer übernimmt (174). AICD entsteht beim Abbau des APP im Verlauf des amyloidogenen Stoffwechselweg und verstärkt die Transkription des Transthyretins; dieses ist in der Lage, zuvor abgebauten β -Amyloidpeptide abzutransportieren (175).

Beim APP handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das aus über 700 Aminosäureeinheiten besteht und durch Sekretasen gespalten werden kann. Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung erfolgt die erste Spaltung durch α -Sekretasen und es entstehen ein großer, wasserlöslicher Proteinbaustein (APP α) sowie ein kleineres, in der Membran verankertes Fragment (α -stub). In einem nächsten Schritt wird von letzterem durch die γ -Sekretase ein weiteres Peptid (P3) abgespalten. APP α besitzt neuroprotektive Eigenschaften und fördert die Neuroplastizität. Im Gegensatz dazu schneiden bei der amyloidogenen APP-Prozessierung zunächst β -Sekretasen das APP- Molekül in den Proteinbaustein APP β sowie das kleinere Fragment β -stub, welches dann durch γ - und ϵ -Sekretasen weiter zerlegt wird. Dabei entstehen zum einen das Bruchstück β -Amyloid (A β), das neurotoxische Eigenschaften besitzt und Hauptbestandteil der bei Morbus Alzheimer auftretenden Plaques im Gehirn ist, zum anderen die intrazelluläre Domäne (AICD). In Abbildung 22 sind die beiden unterschiedlichen Stoffwechselwege der nicht- amyloidogenen sowie der amyloidogenen APP- Prozessierung dargestellt.

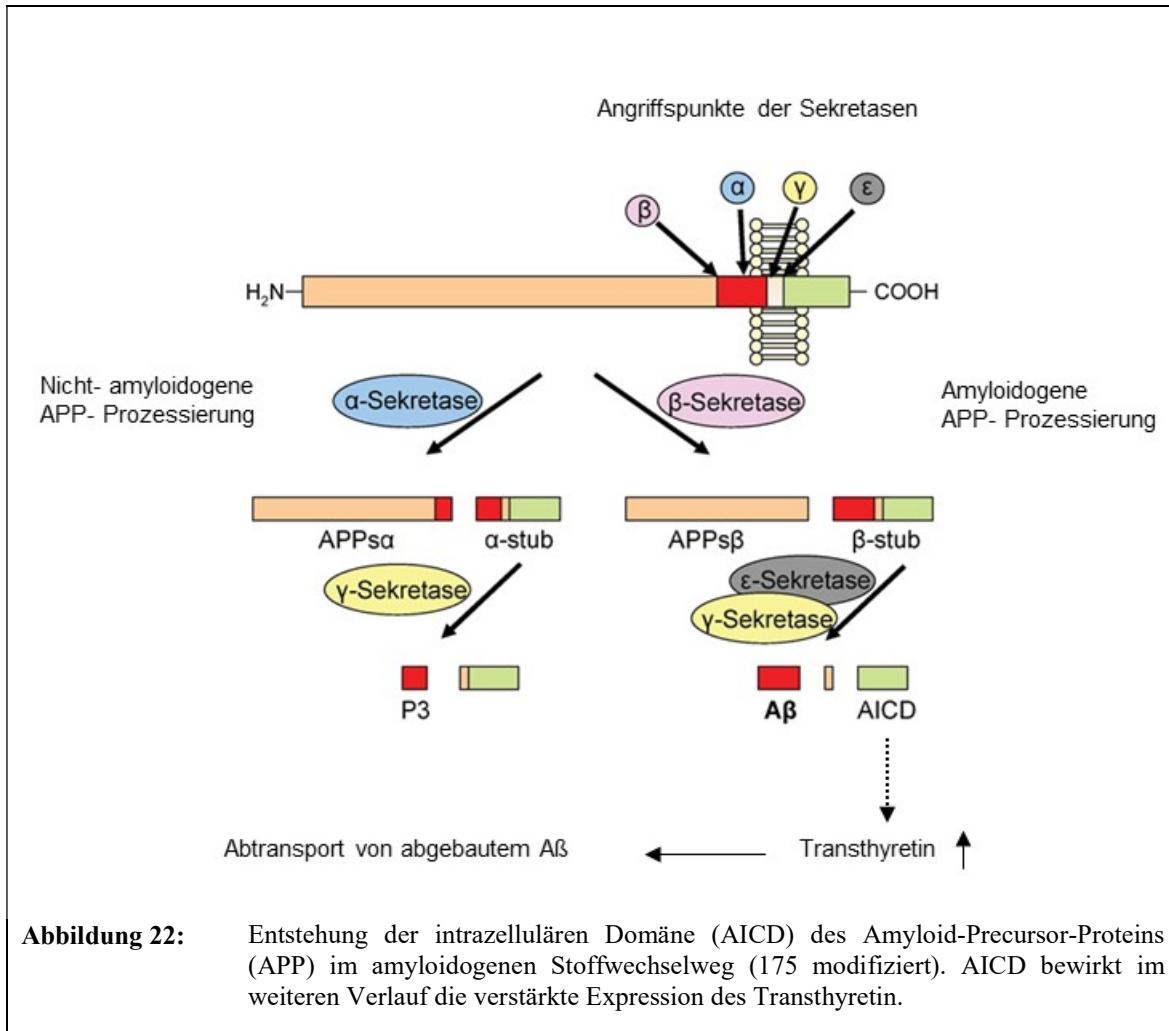


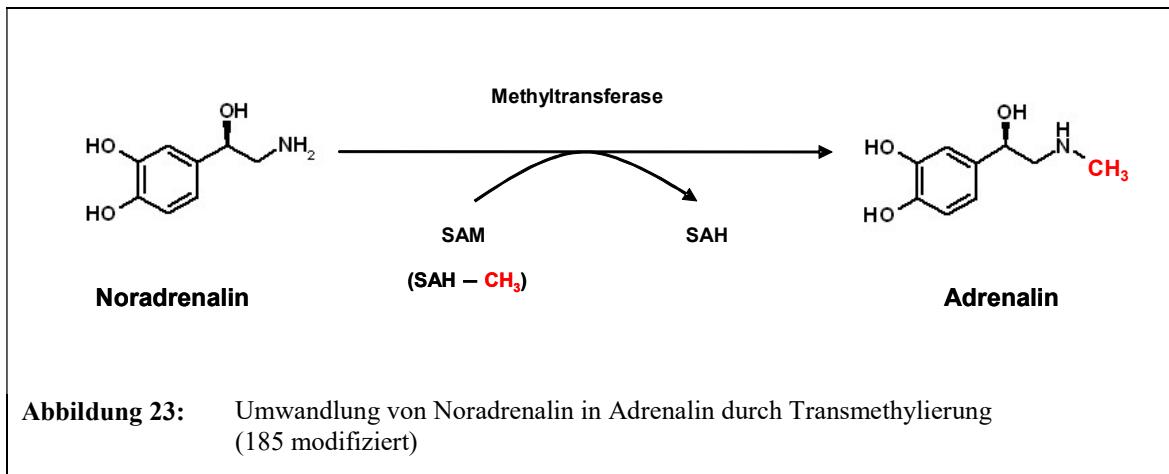
Abbildung 22: Entstehung der intrazellulären Domäne (AICD) des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) im amyloidogenen Stoffwechselweg (175 modifiziert). AICD bewirkt im weiteren Verlauf die verstärkte Expression des Transthyretin.

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass auch eine ausreichende Versorgung mit Folsäure das Risiko für die Entwicklung einer Demenzerkrankung senken kann; man vermutet, dass Folsäure die Neuronen vor der toxischen Wirkung der β -Amyloid- Ablagerung schützen kann, unter anderem durch epigenetische Veränderungen wie z.B. die DNA-Methylierung (176, 177). Interessanterweise wurde in einer Untersuchung ein Zusammenhang zwischen einer Folsäuresupplementierung und dem Transthyretinlevel im Plasma beobachtet (178). Auf der Grundlage der bisher bekannten Daten könnte die nach intrauteriner Diät deutlich verstärkte Expression des *Ttr* auf einen neuroprotektiven Effekt infolge einer hohen Folsäurezufuhr im Rahmen der methylreichen Diät hinweisen, vorausgesetzt, dass damit auch die verstärkte Expression auf Proteinebene einhergeht. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch Stress zu einer verstärkten Expression von Transthyretin im Gehirn führt: eine Überexpression von *Ttr* wurde nach chronischer Stressbelastung im präfrontalen Kortex von Mäusen beobachtet (179), auch in einer weiteren Untersuchung führte sowohl akuter als auch chronischer psychosozialer Stress zu einer Überexpression von *Ttr* (180). Da dieses Gen ein Glukokortikoid responsive element besitzt,

vermuteten die Forscher, dass es durch Glukokortikoidhormone reguliert wird. Sie konnten an Ratten zeigen, dass *Ttr* in Epithelzellen des Choroid Plexus durch Zusatz von Hydrokortison überexprimiert wurde; dieser Effekt konnte durch Antikörper gegen den Glukokortikoid- und Mineralkortikoidrezeptor unterdrückt werden.

Das hochregulierte *Ecrg4* (Fold change +6,2) wird ebenfalls vor allem im Choroid Plexus exprimiert (181). Sein Genprodukt Augurin, ein Transmembranprotein, übernimmt Funktionen hinsichtlich der Regeneration und Proliferation von Nervenzellen. Man vermutet, dass die Entwicklung von Vorläuferervenzellen epigenetisch durch die Expression von *Ecrg4* gesteuert wird (181). Eine Injektion von Augurin in den 3. Ventrikel oder direkt in den Hypothalamus aktivierte in einer Untersuchung an Ratten das Stresshormonsystem: sie führte zur hypothalamischen Ausschüttung des Corticotropin-Releasinghormon CRH und Adiuretin sowie erhöhten Plasmawerten des hypophysären Adrenocorticotropen Hormons ACTH und des in der Nebennierenrinde gebildeten Kortikosteron (182). Umgekehrt bewirkte eine chronische Belastung durch sozialen Stress die Überexpression von *Ecrg4* im Gehirn von Mäusen (183).

Da die Mäuse in der vorliegenden Untersuchung keinen äußeren Reizen ausgesetzt wurden, die eine Stressreaktion hervorrufen, könnten möglicherweise Bestandteile der intrauterinen Diät die Stressachse aktiviert haben und zu einer gesteigerten Expression sowohl von *Ecrg4* als auch *Ttr* führen. Bereits in den 1960er Jahren wurde vermutet, dass die intravenöse Gabe der Methyl-Donatoren Methionin und Cholin dosisabhängig die Wirkung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin verstärkt (184). Diese übernehmen auch Funktionen als Neurotransmitter im Gehirn, die bei der Erregungsübertragung an den Synapsen von Nervenzellen eine Rolle spielen. Bei dem Neurotransmitter Noradrenalin, der sowohl im Nebennierenmark als auch in Nervenzellen des Hypothalamus synthetisiert wird, handelt es sich um einen Methyl-Akzeptor, der in der Nebenniere durch Methylierung unter Beteiligung von S-Adenosylmethionin als Methyldonator in das wirksamere Adrenalin umgewandelt wird (184, 185) (Abbildung 23).



Man geht davon aus, dass bei diesem Vorgang der Transmethylierung die labile Methylgruppe von Methionin bzw. Cholin zur Verfügung gestellt wird (184). Diese beiden Nährstoffe gelangen über die Blut- Hirn- Schranke in das Gehirn (186, 187). Da in der vorliegenden Untersuchung ihr Anteil in der Diätnahrung während der Fetalzeit ebenfalls erhöht war, ist von dieser Seite aus möglicherweise ein langfristiger Einfluss auf die neuroendokrine Stressachse hervorgerufen worden, der auch zu den veränderten Genexpression im Hypothalamus beitragen könnte. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird vermutet, dass eine intrauterin stattfindende fehlerhafte Programmierung durch einen Nährstoffüberschuss oder -mangel zu einer veränderten Stressantwort und später zu dem Auftreten von Erkrankungen führen kann (95).

Srd5a2 (Fold change +3,0) kodiert für das Protein Steroid-5 α -Reduktase 2, welches eine wichtige Rolle im Testosteronstoffwechsel spielt: es katalysiert die Umwandlung von Testosteron in das potentere Androgen Dihydrotestosteron. Die Aktivität des Gens *Srd5a2* wird epigenetisch reguliert über Methylierung und Acetylierung (188). Es ist bekannt, dass Androgene sich im Gehirn positiv auswirken auf die neuronale Differenzierung, Plastizität und synaptische Dichte (189, 190). Sie schützen vermutlich auch vor der Akkumulation von Amyloidpeptiden, die zu dem Krankheitsbild Morbus Alzheimer führt (191). Bei männlichen Ratten führte eine Gonadektomie zu einem Anstieg des Amyloid-beta Protein- Level im Gehirn, der durch die Gabe von Dihydrotestosteron rückgängig gemacht werden konnte (192). Da wie bereits beschrieben auch *Ttr* in der Lage ist, β -Amyloid- Proteine zu binden, vermuteten Forschern einen Zusammenhang zwischen der neuroprotektiven Wirkung von Dihydrotestosteron und Transthyretin. Sie konnten tatsächlich an Epithelzellen des Choroid Plexus von Nagern nachweisen, dass die Behandlung mit Dihydrotestosteron zu einem Anstieg des Transthyretins auf Proteinebene führte und die Transkription in diesen Zellen induzierte, und zwar über einen Androgenrezeptor- unabhängigen Weg (193).

Möglicherweise ist die starke Überexpression von *Ttr* auf ein synergistisches Zusammenspiel mehrerer Faktoren zurückzuführen, welches in der Gesamtbetrachtung ein schlüssiges Bild vermittelt und letztlich einen neuroprotektiven Effekt entfalten könnte. Ein hypothetisches Modell der Wechselwirkungen ist in Abbildung 24 dargestellt.

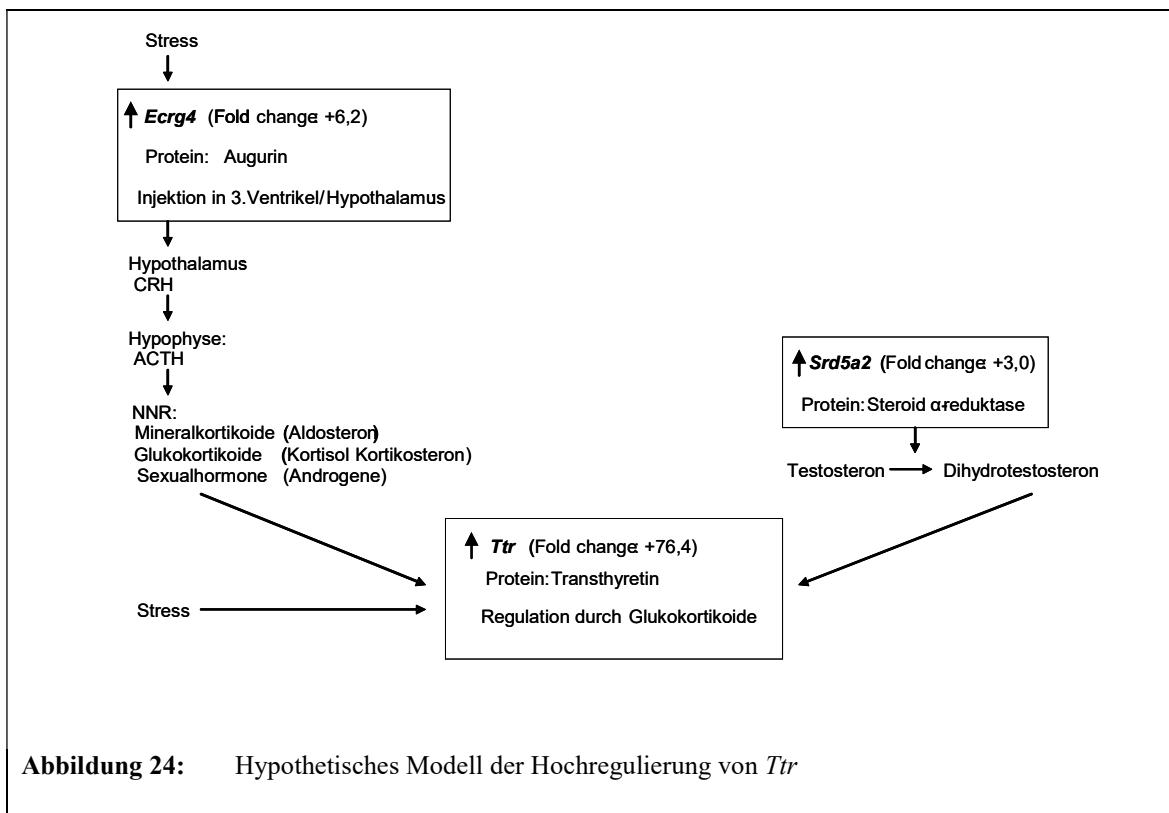


Abbildung 24: Hypothetisches Modell der Hochregulierung von *Ttr*

Es wäre interessant, in weiterführenden Studien auf Proteinebene zu untersuchen, ob im Rahmen einer erhöhten Genexpression von *Ecrg4* und *Srd5a2* tatsächlich eine gesteigerte Synthese sowohl von Kortikosteron als auch von Dihydrotestosteron stattfindet und ob diese mit erhöhten Transthyretinleveln im Gehirn einhergeht.

Neben den bereits beschriebenen Genen sind insgesamt 11 Gene signifikant und mit einem Fold Change > 3 in ihrer Expression verändert, deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist. Ungefähr die Hälfte von ihnen wird im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker exprimiert (*Serpina11*, *2010110K18Rik*, *Nat3*, *Kif20b*, *Pkhd111*, *4930509J09Rik*), die andere Hälfte schwächer (*Tmprss11e*, *A130019P10Rik*, *Slc22a1*, *Plekhg3*, *Gm428*). Die Bedeutung dieser langfristig veränderten Expression vor dem Hintergrund einer intrauterin methylreichen Diät bleibt offen.

Am Beispiel der gelben Agouti- Maus, die an Übergewicht, Diabetes mellitus und Krebs leidet, wurde gezeigt, dass neben der Fellfarbe auch das Erkrankungsrisiko der Nachkommen durch eine methylreiche Diät der Muttertiere während der Tragzeit infolge einer veränderten Expression des Agouti- Gens vermindert werden kann (83). Es gibt darüber hinaus Vermutungen, dass veränderte Genexpressionsmuster in verschiedenen Körperteilen, die zum Beispiel im Rahmen von intrauterin induzierter Ethanol- oder Bisphenol-A- Exposition, Wachstumsrestriktion, Proteinmangel oder Diabetes beobachtet wurden, durch eine gleichzeitige Supplementierung von Folsäure normalisiert bzw. ausgeglichen werden können (107, 111, 112, 113, 114, 194, 195, 196). Die Möglichkeiten, durch zusätzliche Folsäuregaben negativen Einflüssen während der Fetalzeit entgegenzusteuern, sind jedoch offensichtlich begrenzt und durchaus kritisch zu betrachten. Studien zeigen, dass Veränderungen nicht vollständig durch eine Supplementierung aufgehoben werden (108), teilweise wurde auch das Eintreten zusätzlicher Veränderungen der Genexpression durch erhöhte Folsäuregaben beobachtet (197). Es wurden auch geschlechtsspezifische Veränderungen des Glukosestoffwechsels nachgewiesen, die mit einer veränderten Genmethylierung und -expression einhergingen (198).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Zufuhr von Methyldonatoren während kritischer Entwicklungsphasen in utero die Expression von Genen, die die Immunantwort regulierten, negativ beeinflussen und damit das Erkrankungsrisiko für allergische Atemwegserkrankungen erhöhen kann: im Mausmodell wurde beobachtet, dass eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft in der ersten Generation der Nachkommen die Expression eines Gens verändert, welches eine Rolle bei der Entstehung von allergischen Atemwegserkrankungen spielt; die Behandlung mit einer demethylierenden Substanz (5-Azacytidin) konnte die Veränderung rückgängig machen (135). In einer Untersuchung an Lymphoblasten konnte gezeigt werden, dass in der Zellkultur eine Vielzahl von Genen in Abhängigkeit von der Folsäurekonzentration im Medium dysreguliert wird, darunter auch Imprinting Gene wie z.B. *Xist* (164). Die Autoren warnen davor, dass eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft zu einer abnormalen Genexpression während der frühen Hirnentwicklung führen könnte, mit langfristigen Folgen für Prozesse der Kognition und Wahrnehmung.

5 Schlussfolgerung

Der Benefit einer Folsäuresupplementierung in der Schwangerschaft während der Phase der sehr frühen Embryonalentwicklung ist aufgrund der Reduzierung des Risikos für die Entwicklung von Neuralrohrdefekten beim Ungeborenen durch umfangreiche Studien belegt. Allerdings unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die These, dass eine unkritische, längerfristig hohe Aufnahme von Folsäure und weiteren Methyldonatoren in der Schwangerschaft negative Auswirkungen auf die spätere Gesundheit der Nachkommen haben könnte, die nicht auf den ersten Blick offensichtlich sind. Sowohl die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen der globalen DNA- Methylierung in den verschiedenen Organen als auch die mehr als 3fach veränderte Expression von über 30 hypothalamischen Genen geben Anlass zu weiterführenden Untersuchungen. Der Hypothalamus scheint aufgrund seiner übergeordneten Steuerungsfunktionen und der hier im Vergleich zu den anderen Geweben anders ausgeprägten Veränderungen der globalen DNA- Methylierung und aufgrund der veränderten Genexpression nach intrauteriner Diät besonders als Zielorgan geeignet zu sein. Studien legen nahe, dass während des kritischen Zeitfensters der Schwangerschaft und auch früh postnatal bei den Nachkommen Veränderungen auf hypothalamischer Ebene zum einen durch eine erhöhte Folsäurezufuhr (143), aber auch durch andere Nährstoffe hervorgerufen werden können, die langfristig mit negativen Folgen für die Gesundheit einhergehen (145, 146, 147).

Die in der vorliegenden Arbeit in einem ersten Schritt durchgeführte Analyse der globalen DNA- Methylierung erscheint als Screening sinnvoll, um grundlegende Trends hinsichtlich der Auswirkungen einer methylreichen Ernährung zu erkennen. Durch eine vergleichende Untersuchung verschiedener Organe unter denselben Bedingungen konnten zunächst die Gewebe identifiziert werden, die besonders stark von Veränderungen betroffen sind. Dies trifft offenbar für das Gehirn und hier insbesondere den Hypothalamus zu. Diese Gewebe können dann im Hinblick auf Veränderungen auf Gen- bzw. Proteinebene sowie Stoffwechselveränderungen gezielter untersucht werden. Die daraufhin in der vorliegenden Arbeit in einem zweiten Schritt durchgeführte globale Genexpressionsanalyse im Hypothalamusgewebe hat schließlich zu der Identifizierung von Kandidatengenen geführt.

Für weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine methylreiche Diät während der Schwangerschaft erscheinen aus eigener Sicht die Gene *Folr1*, *Ttr*, *Ercg4*, *Srd5a2* sowie *Tsix* als besonders geeignet. Die Durchführung genspezifischer Methylierungsanalysen sowie eine Bestätigung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf Proteinebene stehen noch aus. Allerdings hat die Analyse der Methylierung einzelner Kandidatengene in Studien gezeigt, dass eine Veränderung des

genspezifischen Methylierungslevels nicht unbedingt zu einer veränderten Expression des betroffenen Gens führt, sondern dass hier noch weitere Wirkungsmechanismen beteiligt sind (109). Sollte der Folatrezeptor alpha im Hypothalamus nach methylreicher Diät tatsächlich auch auf Proteinebene langfristig stärker exprimiert werden, sind mögliche Auswirkungen auf den Folatstoffwechsel noch unklar. In diesem Fall wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression dieses Rezeptors auch in weiteren Geweben verändert ist, wie es bereits von anderen Autoren beobachtet wurde (121,152, 155, 199). Neben der Bedeutung des Folatrezeptors für die Aufnahme und den Transport der Folate bzw. Folsäure sollte dabei auch das Risiko einer beschleunigten Tumorentwicklung berücksichtigt werden. Daneben könnte ein möglicher Einfluss einer methylreichen Diät auf die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen genauer untersucht werden, auch vor dem Hintergrund, dass bereits ein Zusammenhang zwischen Folsäurezufuhr und Transthyretinlevel im Plasma beobachtet wurde (178). Es wäre darüber hinaus interessant zu untersuchen, ob und wenn ja, über welche Stoffwechselwege bei den Nachkommen tatsächlich langfristig Veränderungen der neuroendokrinen Stressachse nach einer intrauterinen methylreichen Diät eintreten, und ob mit der methylreichen Diät möglicherweise Verhaltensveränderungen einhergehen.

Die Aussagen der vorliegenden Arbeit werden limitiert durch die niedrigen Fallzahlen, die den Auswertungen zugrunde liegen; die Ergebnisse sollten daher durch Studien mit größeren Fallzahlen bestätigt werden. Die Untersuchung beschränkt sich zudem auf Veränderungen bei weiblichen Nachkommen, so dass kein geschlechtsspezifischer Vergleich stattfinden kann. Dies wäre insofern interessant, da in der Literatur viele geschlechtsabhängige Unterschiede gefunden wurden. Um langfristige Veränderungen zu erfassen, wurden die Gewebeanalysen bei den Nachkommen ausschließlich im Alter von 3 Monaten durchgeführt. Daher kann keine Aussage über den prä- und postnatalen Verlauf der DNA- Methylierung getroffen werden, sondern lediglich eine Vermutung über die Dynamik geäußert werden. Es wäre daher zwar aufwendig, aber sehr interessant, die Veränderungen von Methylierung und Genexpression im Rahmen einer prä- und/ oder postnatal methylreichen Diät zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung zu bestimmen, z.B. beim Fetus, zum Zeitpunkt der Geburt, in der Pubertät und bei adulten Tieren. Darüber hinaus gibt es Erkenntnisse, dass sowohl die DNA- Methylierung in Spermien als auch die plazentare Genexpression durch die präkonzeptionelle paternale Folsäureversorgung beeinflusst werden kann (121, 199). Es ist daher nicht völlig auszuschließen, dass die methylreiche Diät trotz des äußerst kurzen Zeitraums der Verpaarung die Spermatogenese bei den männlichen Tieren epigenetisch verändert hat, mit der Folge, dass möglicherweise die veränderte Methylierung bzw. Genexpression bei den Nachkommen unter anderem auch darauf zurückzuführen sein könnte, wie dies bei der plazentaren Folatrezeptorexpression beobachtet wurde.

Bei der Genexpressionsanalyse wurden weibliche Tiere, die intrauterin eine methylreiche Diät erhalten hatten, mit männlichen Tieren der Kontrollgruppe verglichen, da im murinen Hypothalamus bekanntermaßen nur sehr wenige Gene (*Xist*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Uty* und *Kdm5d*) geschlechtsspezifisch deutlich unterschiedlich exprimiert werden (97). Es ist daher unklar, inwieweit möglicherweise auch diese Gene durch die methylreiche Diät in ihrer Expression beeinflusst wurden. Da unerwarteterweise in der vorliegenden Arbeit *Tsix*, welches dem Imprinting unterliegt und als Gegenspieler des *Xist* bekannt ist, hochreguliert wird, könnte auch die Expression des *Xist* verändert sein, wie bereits in anderen Studien beobachtet wurde (164, 165).

Darüber hinaus bleibt offen, ob die beobachteten Veränderungen auf das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten der methylreichen Diät oder aber bestimmte Nährstoffe zurückzuführen sind; eine Gewichtung der einzelnen Nahrungs faktoren wie z.B. Folsäure oder Methionin bzw. Cholin ist in der vorliegenden Untersuchung nicht möglich. Grundsätzlich bleibt letztlich auch fraglich, inwieweit die am Mausmodell erzielten Ergebnisse tatsächlich auf den menschlichen Organismus übertragen werden können.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse sollte eine Supplementierung mit Folsäure, aber auch mit weiteren Nährstoffen, die in den Methylierungszyklus eingreifen, insbesondere während der Phase der Schwangerschaft sorgfältig abgewogen werden und gezielt eingesetzt werden. Es ist bedenkenswert, dass die embryonalen Organe, und hier insbesondere das Herz und die neuronalen Gewebe, während des intrauterinen Wachstums direkt über den diaplazentaren Blutweg mit den Nährstoffen konfrontiert werden, ohne dass die Aufnahmekapazität durch Darm oder Niere limitiert werden kann bzw. eine hepatische Zwischenspeicherung stattfindet. Untersuchungen zeigen, dass nach Anreicherung von Grundnahrungsmitteln die Folsäureaufnahme in der Bevölkerung stärker zugenommen hat als vorhergesagt wurde (200), gleichzeitig werden zunehmend erhöhte Folsäurespiegel im Serum gemessen (201). Die gesundheitlichen Auswirkungen einer längerfristig erhöhten Zufuhr, die beim Menschen insbesondere während seiner frühen intrauterinen Entwicklungsphase hervorgerufen werden können, sollten in weiterführenden Studien genauer untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten mehren sich die Hinweise, dass die Voraussetzungen für das Auftreten von Gesundheit oder Krankheit im Leben eines Menschen bereits während seiner frühesten intrauterinen Entwicklung geschaffen werden. Das Zeitfenster der Schwangerschaft ist daher aufgrund der frühen Weichenstellung für die Gesundheit der Nachkommen zunehmend in den Fokus geraten und die Auswirkungen einer fetal Nährstoffunter- bzw. überversorgung wurden in zahlreichen Studien untersucht. Es wurde entdeckt, dass mit der Nahrung zugeführte Nährstoffe an epigenetischen Steuerungsprozessen im Organismus beteiligt sind und dadurch Einfluss auf die Genregulation nehmen können. Als bedeutendster epigenetischer Marker gilt die veränderbare DNA- Methylierung, da durch das Anhängen bzw. Entfernen einer Methylgruppe an eine bestimmte Position der DNA Gene an- bzw. ausgeschaltet werden können. Die Methylierungskapazität wird bestimmt durch die Bioverfügbarkeit bestimmter Ernährungsfaktoren, zu denen die Vitamine Folsäure, B₁₂ und B₆ sowie Methionin und Cholin zählen. In der Schwangerschaft ist die physiologische embryonale Entwicklung unter anderem abhängig von der ausreichenden Versorgung mit Methylgruppen, und eine perikonzeptionelle Folsäure-supplementierung kann das Risiko der Entwicklung eines Neuralrohrdefektes beim Ungeborenen vermindern (11, 12). Auf der anderen Seite mehren sich die Hinweise, dass es sich insbesondere bei dem Vitamin Folsäure um einen Mikronährstoff handelt, welcher neben seiner schützenden Funktion im Fall einer Überdosierung auch negative Folgen für den Organismus haben kann. Die Auswirkungen einer übermäßig hohen, längerfristigen Zufuhr während der Schwangerschaft auf die spätere Gesundheit des sich entwickelnden Feten sind noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob sich eine methylreiche Ernährung, welche Folsäure, B₁₂, B₆, Methionin und Cholin in vierfach höherer Dosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe enthält, in der Schwangerschaft langfristig auf die globale DNA- Methylierung und das Genexpressionsmuster der Nachkommen auswirkt. Um herauszufinden, in welchem Gewebe die stärksten Veränderungen nach intrauterin methylreicher Diät zu beobachten sind, wurden die Organe Leber, Milz, Herz, Gehirn und spezifisch der Hypothalamus untersucht, da dieser während der Embryonalzeit als besonders vulnerabel für äußere Einflüsse gilt und später als übergeordnetes Regelzentrum eine essentielle Funktion für die Aufrechterhaltung homöostatischer Regelkreise im Körper ausübt. Trächtige Mäuse wurden während der Schwangerschaft methylreich ernährt; ab dem Zeitpunkt der Geburt erhielten Muttertiere und Nachkommen dann entweder weiterhin die methylreiche oder eine normale Diät. Die Ergebnisse in den beiden Gruppen wurden verglichen mit gleichaltrigen Mäusen, die als Kontrollgruppe sowohl intra- als auch extrauterin die normale Diät

erhalten hatten, so dass letztlich die Methylierungsergebnisse von 3 Monate alten weiblichen Nachkommen vorlagen, die folgenden drei Gruppen zugeordnet werden können: Gruppe 1: methylreiche Diät ausschließlich pränatal, Gruppe 2: methylreiche Diät prä- und postnatal, Gruppe 3: normale Diät prä- und postnatal.

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse zeigen, dass eine ausschließlich pränatal methylreiche Diät mit einer signifikant höheren globalen DNA- Methylierung im Gehirn- und insbesondere im Hypothalamusgewebe einhergeht. Bei den Organen Herz, Leber und Milz ist ein Trend hin zu einer höheren Methylierung zu beobachten, der jedoch kein Signifikanzniveau erreicht. Wird die methylreiche Diät dagegen auch postnatal aufrechterhalten, kehrt sich dieser Trend um und die globale Methylierung sinkt in den Organen unter das Ausgangsniveau in der Kontrollgruppe; allein im Hypothalamus bleibt die globale Methylierung konstant auf einem hohen Niveau. Daher wurde die Genexpressionsanalyse von mehr als 20.000 Genen im hypothalamischen Gewebe durchgeführt.

Es ist bekannt, dass im murinen Hypothalamus nur sehr wenige Gene geschlechtsabhängig deutlich unterschiedlich exprimiert werden (*Xist*, *Eif2s3y*, *Ddx3y*, *Uty* und *Kdm5d*) (97). Zur internen Qualitätskontrolle wurden daher die Genexpressionsmuster von zwei 3 Monate alten weiblichen Nachkommen, die intrauterin einer methylreichen Diät exponiert worden waren, mit denen von zwei männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe verglichen. Es wurden bei den weiblichen Tieren nach intrauteriner Diät zusätzlich zu den oben genannten bereits bekannten Genen insgesamt 31 Gene identifiziert, die signifikant und mindestens 3fach unterschiedlich exprimiert wurden. Knapp die Hälfte dieser Gene ist involviert in Transkriptions- und Translationsprozesse. Daneben hinaus sind Gene betroffen, die an der Steuerung und dem Transport von Hormonen beteiligt sind sowie ein Gen, welches dem Imprinting unterliegt.

Als Kandidatengen für weiterführende Untersuchungen besonders interessant ist das verstärkt exprimierte Gen *Folr1*, welches für den Folatrezeptor alpha kodiert und im Organismus Funktionen bei der Herstellung einer Folathomöostase sowie in pathologischer Form beim Tumorwachstum übernimmt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen intrauterin methylreicher Diät und verstärkter Expression des Gens *Ttr*, welches für das Transportprotein Transthyretin kodiert, könnte ebenfalls in weiteren Studien untersucht werden. Hier stellt sich die Frage nach einer Wechselwirkung mit den ebenfalls verstärkt exprimierten Genen *Ecrg4* und *Srd5a2* und einer möglichen Beeinflussung der endokrinen Stressachse, die möglicherweise auch mit einer Verhaltensänderung einhergeht. Darüber hinaus ist das dem Imprinting unterliegende *Tsix* aufgrund seiner Bedeutung bei der X-

chromosomalen Inaktivierung während der frühen embryonalen Phase der epigenetischen Reprogrammierung in seiner Funktion als Gegenspieler des *Xist* besonders interessant.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass eine hohe Aufnahme von Methyldonatoren während der Schwangerschaft im Mausmodell im Hypothalamus mit langfristig auftretenden epigenetischen Veränderungen bei den Nachkommen einhergeht, die sowohl die globale DNA- Methylierung als auch die Expression von Genen betreffen. Sie bestätigen damit Aussagen andere Autoren, die ebenfalls Auswirkungen gesehen haben, die jedoch insgesamt sehr heterogen waren, möglicherweise, weil die Studien auf jeweils sehr unterschiedlichen Protokollen beruhen. Das Wechselspiel epigenetischer Mechanismen ist sehr komplex und unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren, die sich auf Methylierung und Genexpression auswirken können. Die Bedeutung weiterführender Studien, die gezielt den Zusammenhang zwischen einer pränatal methylreichen Diät und epigenetischen Veränderungen bei den Nachkommen sowie ihrer langfristigen Gesundheit untersuchen, wird dadurch unterstrichen. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf den Hypothalamus als übergeordnetes Regelzentrum gelegt werden, da Veränderungen in diesem vulnerablen Gewebe sich nicht nur auf den Stoffwechsel, sondern auch auf die kognitiven Funktionen des betroffenen Organismus auswirken können.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Kizer K, Fan A, Bankowska J et al. Vitamin A- a pregnancy hazard alert. West J Med 1990; 152:78-81
- 2 Pinnock C, Alderman C. The potential for teratogenicity of vitamin A and its congeners. Med J Aust. 1992;157(11-12):804-9
- 3 Aberg A, Westbom L, Källén B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. Early Hum Dev 2001;61(2):85-95
- 4 Schaefer U, Songster G, Xiang A et al. Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1997;177(5):1165-71
- 5 Hibbard E, Smithells R. Folic acid metabolism and human embryopathy. Lancet 1965;i:1254
- 6 Laurence K, Carter C, David P. Major central nervous system malformations in South Wales II. Pregnancy Factors, seasonal variation, and social class effects. Brit J prev soc Med 1968; 22:212-222
- 7 Smithells R, Sheppard S, Schorah C. Vitamin deficiencies and neural tube defects. Arch Dis Childh 1976;51:944-50
- 8 Smithells R, Sheppard S, Schorah C et al. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. Lancet 1980;1(8164):339-40
- 9 Smithells R, Sheppard S, Schorah C et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. Arch Dis Child 1981;56:911-918
- 10 Copp A, Greene N. Neural tube defects- disorders of neurulation and related embryonic processes. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2013;2(2):213-27
- 11 Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. Lancet 1991;338(8760):131-7
- 12 Czeizel A, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N Engl J Med 1992; 327(26):1832-5
- 13 Menke A, Weimann H, Achtert G et al. Absolute bioavailability of folic acid after oral administration of a folic acid tablet formulation in healthy volunteers. Arzneimittelforschung 1994;44(9):1063-7
- 14 Winkels R, Brouwer I, Siebelink E et al. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. Am J Clin Nutr 2007;85(2):465-73
- 15 Hannon- Fletcher M, Armstrong N, Scott J et al. Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. Am J Clin Nutr 2004;80(4):911-8
- 16 Shane B. Folate chemistry and metabolism. In: Bailey L (Hrsg). Folate in health and disease. 2010, 2. Auflage, Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, S.3

- 17 Krawinkel M, Strohm D, Weissenborn A et al. Revised D-A-CH intake recommendations for folate: how much is needed? *Eur J Clin Nutr* 2014;68:719-23
- 18 Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hrsg). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr: Folat. 2013, 1. Auflage, 5. korrigierter Nachdruck, Neustadt a. d. Weinstraße: Neuer Umschau Buchverlag
- 19 Food and Drug Administration, Department of health and human services. Food Standards: Amendment of Standards of Identity for Enriched Grain Products to Require Addition of Folic acid. *Federal Register* 1996;61(44):8781
- 20 Ray J. Folic acid fortification in Canada. *Nutr Rev* 2004;62(6):35-39
- 21 Chen L, Rivera M. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev* 2004;62(6):40-43
- 22 Hertrampf E, Cortés F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev* 2004;62(6):44-48
- 23 Chalouhi C, Faesch S, Anthoine-Milhomme M et al. Neurological consequences of vitamin B12 deficiency and its treatment. *Pediatr Emerg Care* 2008;24(8):538-41
- 24 Smolka V, Bekárek V, Hlídková E et al. Metabolic complications and neurologic manifestations of vitamin B12 deficiency in children of vegetarian mothers. *Cas Lek Česk* 2001;140(23):732-5
- 25 Stollhoff K, Schulte F. Vitamin B12 and brain development. *Eur J Pediatr.* 1987;146(2):201-5
- 26 Wighton M, Manson J, Speed I et al. Brain damage in infancy and dietary vitamin B12 deficiency. *Med J Aust* 1979;2(1):1-3
- 27 Graham S, Arvela O, Wise G. Long-term neurologic consequences of nutritional vitamin B12 deficiency in infants. *J Pediatr* 1992;121(5 Pt 1):710-4
- 28 Dror D, Allen L. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev* 2008;66(5):250-5
- 29 Thompson M, Cole D, Ray J. Vitamin B12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):697-701
- 30 Shoob H, Sargent R, Thompson S et al. Dietary methionine is involved in the etiology of neural tube defect-affected pregnancies in humans. *J Nutr* 2001;131(10):2653-8
- 31 Sufrin J, Finckbeiner S, Oliver C. Marine-derived metabolites of S-Adenosyl-methionine as templates for new anti-infectives. *Mar Drugs* 2009;7(3):401-434
- 32 Bottiglieri T, Hyland K. S-adenosylmethionine levels in psychiatric and neurological disorders: a review. *Acta Neurol Scand Suppl* 1994;154:19-26
- 33 Mischoulon D, Fava M. Role of S-adenosyl-l-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(5):1158-61
- 34 Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* 2002;6(1):39-42

- 35 Niculescu M, Zeisel S. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002;132(8):2333-35
- 36 FAO/ WHO. FAO/WHO Expert Consultation on human vitamin and mineral requirements: Folate and folic acid. 2001, Rom: FAO, S. 53-62
- 37 Chiang P, Gordon R, Tal J et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996 ;10(4) :471-80
- 38 Bottiglieri T. S-Adenosyl-L-methionine (SAMe): from the bench to the bedside- molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr* 2002;76(suppl):1151-7
- 39 Goldberg A, Allis C, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007;128(4):635-8
- 40 Waddington C. The Epigenotype. *Int J of Epidemiol* 2012;41(1):10-3
- 41 Dyke S, Cheung W, Joly Y et al. Epigenome data release: a participant-centered approach to privacy protection. *Genome Biol* 2015;16(1):142
- 42 Wu H, Sun Y. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res* 2006;59(4 Pt2):21R-25R
- 43 Barter M, Bui C, Young D. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(5):339-49
- 44 Khraiwesh B, Arif M, Seumel G et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 2010;140(1):111-22
- 45 Erlanson D, Chen L, Verdine G. DNA methylation through a locally unpaired intermediate. *J Am Chem Soc.* 1993;115 (26):12583-12584
- 46 Meda F, Folci M, Baccarelli A et al. The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2011;8(3):226-36
- 47 Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation- mediated epigenetic control. *J Cell Biochem* 2009;108(1):43-51
- 48 Lister R, Pelizzola M, Dowen R et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009;462(7271):315-322
- 49 Cedar H, Solage A, Glaser G et al. Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res* 1979;6(6):2125-2132
- 50 Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (Dife). Start up-Lab Epigenetik der Adipositas (EPA) Online im Internet. URL: <http://www.dife.de/presse/pressemitteilungen/?id=1340> [Stand: 17.01.2017]
- 51 Molecular Biology Web Book. DNA methylation and CpG island. Inheritance of DNA methylation pattern. Kapitel 7, Abbildung 7. Online im Internet. URL: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F2.htm> [Stand: 07.10.2015]
- 52 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;196(2):261-82

- 53 Wagener C, Müller O. DNA- Methylierung. In: Molekulare Onkologie- Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 2009, 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S.143-144
- 54 Klose R, Bird A. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006;31(2):89-97
- 55 Bird A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321(6067):209-13
- 56 Mau T, Yung R. Potential of epigenetic therapies in non-cancerous conditions. *Front Genet* 2014;5:438
- 57 Hackett J, Surani M. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368(1609):20110328
- 58 Haaf T. Epigenetische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Implikationen für die Reproduktionsmedizin. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006;3(3):136-140
- 59 Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 1995;4:1751-5
- 60 Panning B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. *J Biol* 2008;7(8):30
- 61 Matsuda M, Yasutomi M. Inhibition of cephalic neural tube closure by 5-azacytidine in neurulating rat embryos in vitro. *Anat Embryol* 1992;185(3):217-23
- 62 Zagris N, Podimatas T. 5-Azacytidine changes gene expression and causes developmental arrest of early chick embryo. *Int J Dev Biol* 1994;38(4):741-4
- 63 Fraga M, Ballestar E, Paz M et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(30):10604-9
- 64 Weaver I, Cervoni N, Champagne F et al. Epigenetic programming by maternal behaviour. *Nat Neurosci* 2004; 7(8):847-54
- 65 Lyko F, Foret S, Kucharski R et al. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 2010;8(11):e1000506
- 66 Heyn H, Carmona F, Gomez A et al. DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker. *Carcinogenesis* 2013;34(1):102-8
- 67 Zhao J, Goldberg J, Bremner J et al. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes* 2012;61(2):542-6
- 68 Rakyan V, Beyan H, Down T et al. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet* 2011;7(9):e1002300
- 69 Yuasa Y. DNA methylation in cancer and ageing. *Mech Ageing Dev* 2002;123(12):1649-54
- 70 Waterland R, Jirtle R. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-8

- 71 Issa J, Ottaviano Y, Celano P et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7(4):536-40
- 72 Kucharski R, Maleszka J, Foret S et al. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 2008;319(5871):1827-30
- 73 Ono H, Iwasaki M, Kuchiba A et al. Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leuкоzyte DNA. *Cancer Sci* 2012;103(12):2159-64
- 74 Fiorito G, Guarnera S, Valle C et al. B-vitamins intake, DNA-methylation of one carbon metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24(5):483-8
- 75 Jacob R, Gretz D, Taylor P et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998;128(7):1204-12
- 76 Rampersaud G, Kauwell G, Hutson A et al. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000;72(4):998-1003
- 77 Wasson G, McGlynn A, McNulty H et al. Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *J Nutr* 2006;136(11):2748-53
- 78 Locker J, Reddy T, Lombardi B. DNA methylation and hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-devoid diet. *Carcinogenesis* 1986;7(8):1309-12
- 79 Wainfan E, Dizik M, Stender M et al. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 1989;49(15):4094-7
- 80 Fernández-Roig S, Lai S, Murphy M et al. Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCB1R/CD320 knockout mouse. *Nutr Metab* 2012;18:9:41
- 81 Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB et al. An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(26):17095-100
- 82 Sinclair K, Allegrucci C, Singh R et al. DNA methylation, insulin resistance and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(49):19351-6
- 83 Wolff G, Kodell R, Moore S et al. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 1998;12(11):949-57
- 84 Waterland R, Jirtle R. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23(15):5293-5300
- 85 Morgan H, Sutherland H, Martin D et al. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 1999;23(3):314-8
- 86 Dolinoy D, Weidman J, Waterlan R et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 2006;114(4):567-72

- 87 Tobi E, Lumey L, Talens R et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009;18(21):4046-53
- 88 Painter R, Osmond C, Gluckman P et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 2008;115(10):1243-9
- 89 Lumey L, Stein A, Susser E. Prenatal famine and adult health. *Annu Rev Public Health* 2011;32:237-62
- 90 Lumey L, Khalangot M, Vaiserman A. Association between type 2 diabetes and prenatal exposure to the Ukraine famine of 1932-33: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3(10):787-94
- 91 Li Y, He Y, Qi L et al. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* 2010;59(10):2400-6
- 92 Hales C, Barker D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologica* 1992;35(7):595-601
- 93 Silveira P, Portella A, Goldani M et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)* 2007;83(6):494-504
- 94 DOHad International Society for Developmental Origins of Health and Disease. Online im Internet. URL: <http://dohadsoc.org/> [Stand: 11.08.2015]
- 95 Breneke B, Prater M, Bahamonde J et al. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J Pregnancy* 2013;368461
- 96 Amtsblatt der Europäischen Union. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.09.2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Online im Internet. URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:de:PDF> [Stand: 13.08.2015]
- 97 Mozhui K, Lu L, Armstrong W et al. Sex-specific modulation of gene expression networks in murine hypothalamus. *Front Neurosci* 2012;6:63
- 98 Sie K, Medline A, van Weel J et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on colorectal cancer risk in the offspring. *Gut* 2011;60(12):1687-94
- 99 Sie K, Li J, Ly A et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on global and gene-specific DNA methylation in the liver of the rat offspring. *Mol Nutr Res* 2013;57(4):677-85
- 100 Ly A, Lee H, Chen J et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Res* 2011;71(3): 988-97
- 101 Carlin J, George R, Reyes T. Methyl donor supplementation blocks the adverse effects of maternal high fat diet on offspring physiology. *PLoS One* 2013;8(5): e63549
- 102 Nohara K, Baba T, Murai H et al. Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Arch Toxicol* 2011;85(6):653-61

- 103 Barua S, Kuizon S, Chadman K et al. Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics Chromatin* 2014;7(1):3
- 104 McKay J, Wong Y, Relton C et al. Maternal folate supply and sex influence gene-specific DNA methylation in the fetal gut. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(11):1717-23
- 105 Chmurzynska A, Stachowiak M, Pruszynska-Oszmalek. Maternal protein and folic acid intake during gestation does not program leptin transcription or serum concentration in rat progeny. *Genes Nutr* 2012;7(2):217-22
- 106 Altobelli G, Bogdarina I, Stupka E et al. Genome-wide methylation and gene expression changes in newborn rats following maternal protein restriction and reversal by folic acid. *PLoS One* 2013;8(12):e82989
- 107 Lillycrop K, Phillips E, Jackson A et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005;135(6):1382-6
- 108 Lillycrop K, Rodford J, Garratt E et al. Maternal protein restriction with or without folic acid supplementation during pregnancy alters the hepatic transcriptome in adult male rats. *Br J Nutr* 2010;103(12):1711-9
- 109 Giudicelli F, Brabant A, Grit I et al. Excess of methyl donor in the perinatal period reduces postnatal leptin secretion in rat and interacts with the effect of protein content in diet. *PLoS One* 2013;8(7):e68268
- 110 Burgde G, Lillycrop K, Phillips E et al. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009;139(6):1054-60
- 111 Liu J, Yu B, Mao X et al. Effects of intrauterine growth retardation and maternal folic acid supplementation on hepatic mitochondrial function and gene expression in piglets. *Arch Anim Nutr* 2012;66(5):357-71
- 112 Liu J, Chen D, Mao X et al. Effects of maternal folic acid supplementation on morphology and apoptosis-related gene expression in jejunum of newborn intrauterine growth retarded piglets. *Arch Anim Nutr* 2011;65(5):376-85
- 113 Liu J, Chen D, Yu B et al. Effect of maternal folic acid supplementation on hepatic one-carbon unit associated gene expressions in newborn piglets. *Mol Biol Rep* 2011;38(6):3849-56
- 114 Jing-Bo L, Ying Y, Bing Y et al. Folic acid supplementation prevents the changes in hepatic promotor methylation status and gene expression in intrauterine growth-retarded piglets during early weaning period. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2013;97(5):878-886
- 115 Langie S, Achterfeldt S, Gorniak J et al. Maternal folate depletion and high-fat feeding from weaning affects DNA methylation and DNA repair in brain of adult offspring. *FASEB J* 2013;27(8):3323-34
- 116 Bermingham E, Bassett S, Young W et al. Post-weaning selenium and folate supplementation affects gene and protein expression and global DNA methylation in mice fed high-fat diets. *BMC Med Genomics* 2013;6:7

- 117 Delaney C, Garg S, Fernandes C et al. Maternal diet supplemented with methyl-donors protects against atherosclerosis in F1 ApoE(-/-) mice. *PLoS One* 2013;8(2):e56253
- 118 Huang Y, He Y, Sun X et al. Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse offspring fed a high-fat diet. *Int J Mol Sci* 2014;15(4):6298-313
- 119 Cordero P, Campion J, Milagro F et al. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation. *Mol Genet Metab* 2013;110(3):388-95
- 120 Sable P, Randhir K, Kale A et al. Maternal micronutrients and brain global methylation patterns in the offspring. *Nutr Neurosci* 2015;18(1):30-6
- 121 Mejos K, Kim H, Lim E et al. Effects of parental folate deficiency on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. *Nutr Res Pract* 2013;7(4):281-6
- 122 Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M et al. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 2011;31:177-201
- 123 Qiu A, Jansen M, Sakaris A et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006;127(5):917-28
- 124 Zhao R, Goldman I. The molecular identity and characterization of a proton-coupled folate transporter PCFT; biological ramifications and impact on the activity of permetrexed. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(1):129-39
- 125 Kamen B, Smith A. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(8):1085-97
- 126 Ashokkumar B, Mohammed Z, Vaziri N et al. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. *Am J Clin Nutr* 2007;86(1):159-66
- 127 Subramanian V, Chatterjee N, Said H. Folate uptake in the human intestine: promoter activity and the effect of folate deficiency. *J Cell Physiol* 2003;196(2):403-8
- 128 Ifergan I, Assaraf Y. Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitam Horm* 2008;79:99-143
- 129 Kelly P, McPartlin J, Goggins M et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65(6):1790-5
- 130 Pfeiffer C, Sternberg M, Fazili Z et al. Unmetabolized folic acid is detected in nearly all serum samples from US children, adolescents, and adults. *J Nutr* 2015;145(3):520-31
- 131 Baker H, Frank O, Deangelis B et al. Role of placenta in maternal-fetal vitamin transfer in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141(7):792-6
- 132 Sweeney M, McPartlin J, Weir D et al. Evidence of unmetabolized folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. *Br J Nutr* 2005;94(5):727-30
- 133 Troen A, Mitchell B, Sorensen B. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *J Nutr* 2006;136(1):189-194

- 134 Bahlmann F. Der fetale Kreislauf (Abbildung). In: Merz E. (Hrsg). Sonographische Diagnostik in Gynäkologie und Geburtshilfe: Lehrbuch und Atlas (Band 2). 2001, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S.481
- 135 Hollingsworth J, Maruoka S, Boon K et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 2008;118(10):3462-9
- 136 Li C, Cropley J, Cowley M et al. A sustained dietary change increases epigenetic variation in isogenic mice. *PLoS Genet* 2011;7(4):e1001380
- 137 Kotsopoulos J, Sohn K, Kim Y. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. *J Nutr* 2008;138(4):703-9
- 138 Kim Y, Christman J, Fleet J et al. Moderate folate deficiency does not cause global hypomethylation of hepatic and colonic DNA or c-myc-specific hypomethylation of colonic DNA in rats. *Am J Clin Nutr* 1995;61(5):1083-90
- 139 Finnell R, Spiegelstein O, Wlodarczyk B et al. DNA methylation in *Folbp1* knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J Nutr* 2002;132(8):2457S-2461S
- 140 Smith A, Kim Y, Refsum H. Is folic acid good for everyone? *Am J Nutr* 2008;87:517-33
- 141 Bae S, Ulrich C, Bailey L et al. Impact of folic acid fortification on global DNA methylation and one-carbon biomarkers in the Women's health Initiative Observational Study cohort. *Epigenetics* 2014;9(3):396-403
- 142 Keyes M, Jang H, Mason J et al. Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon. *J Nutr* 2007;137(7):1713-7
- 143 Cho C, Sánchez-Hernández D, Reza-López S et al. High folate gestational and post-weaning diets alter hypothalamic feeding pathways by DNA methylation in Wistar rat offspring. *Epigenetics* 2013;8(7):710-9
- 144 Simmons R, Stringfellow S, Glover M et al. DNA methylation markers in the postnatal developing rat brain. *Brain Res* 2013;1533:26-36
- 145 Chang G, Gaysinskaya V, Karataev O et al. Maternal high- fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide- producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci* 2008;28(46):12107-19
- 146 Plagemann A, Harder T, Brunn M et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009;587(20):4963-76
- 147 Plagemann A, Roepke K, Harder T et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med* 2010;38(4):393-400
- 148 Salbaum J, Kruger C, Kappen C. Mutation at the folate receptor 4 locus modulates gene expression profiles in the mouse uterus in response to preconceptional folate supplementation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(10):1653-61
- 149 Gray J, Nakouzi G, Slowinska-Castaldo B et al. Functional interactions between the LRP6 WNT co-receptor and folate supplementation. *Hum Mol Genet* 2010;19(23):4560-72

- 150 Grapp M, Wrede A, Schweizer M et al. Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* 2013;4:2123
- 151 Steinfeld R, Grapp M, Kraetzner R et al. Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. *Am J Hum Genet* 2009;85(3):354-63
- 152 Jhaveri M, Wagner C, Trepel J. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. *Mol Pharmacol* 2001;60(6):1288-95
- 153 Boshnjaku V, Shim K, Tsurubuchi T et al. Nuclear localization of folate receptor alpha: a new role as a transcription factor. *Sci Rep* 2012;2:980
- 154 Kane M, Elwood P, Portillo R et al. Influence on immunoreactive folate-binding proteins of extracellular folate concentration in cultured human cells. *J Clin Invest* 1988;81(5):1398-406
- 155 Xiao S, Hansen D, Horsley E et al. Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(1):6-28
- 156 Yasuda S, Hasui S, Yamamoto C et al. Placental folate transport during pregnancy. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72(9):2277-84
- 157 Elnakat H, Ratnam M. Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. *Front Biosci* 2006;11:506-19
- 158 Lindzon G, Medline A, Sohn K et al. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 2009;30(9):1536-43
- 159 Deghan M, Ishiguro L, Sohn K et al. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model. *PLoS One* 2014;9(1):e84635
- 160 Wijchers P, Festenstein R. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trend Genet* 2011;27(4):132-40
- 161 Lee J, Davidow L, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 1999;21(4):400-4
- 162 Lee J. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix. *Cell* 2000;103(1):17-27
- 163 Nesterova T, Popova B, Cobb B et al. Dicer regulates Xist promotor methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of Dnmt3a. *Epigenetics Chromatin* 2008;1(1):2
- 164 Junaid M, Kuizon S, Cardona J et al. Folic acid supplementation dysregulates gene expression in lymphoblastoid cells- implications in nutrition. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412(4):688-92
- 165 Kumamoto T, Oshio S. Effect of fetal exposure to bisphenol A on brain mediated by X-chromosome inactivation. *J Toxicol Sci* 2013;38(3):485-94
- 166 Vieira M, Saraiva M. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts* 2014;5(1):45-54

- 167 Stauder A, Dickson P, Aldred A et al. Synthesis of transthyretin (pre-albumin) mRNA in choroid plexus epithelial cells, localized by *in situ* hybridization in rat brain. *J Histochem Cytochem* 1986;34(7):949-52
- 168 Herbert J, Wilcox J, Pham K et al. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology* 1986;36(7):900-11
- 169 Fleming C, Nunes A, Sousa M. Transthyretin: more than meets the eye. *Prog Neurobiol* 2009;89(3):266-76
- 170 Huang J, Leweke F, Oxley D et al. Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Med* 2006;3(11):e428
- 171 Sullivan G, Mann J, Oquendo M et al. Low cerebrospinal fluid transthyretin levels in depression: correlations with suicidal ideation and low serotonin function. *Biol Psychiatry* 2006;60(5):500-6
- 172 Li X, Zhang X, Ladiwala A et al. Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro. *J Neurosci* 2013;33(50):19423-33
- 173 Velayudhan L, Killick R, Hye A et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;28(2):369-75
- 174 Kerridge C, Belyaev N, Nalivaeva N et al. The A β -clearance protein transthyretin, like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain. *J Neurochem* 2014;130(3):419-31
- 175 LaFerla F. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(11):862-72
- 176 Liu H, Li W, Zhao S et al. Folic acid attenuates the effects of amyloid β oligomers on DNA methylation in neuronal cells. *Eur J Nutr* 2015 [Epub ahead of print]
- 177 Li W, Liu H, Yu M et al. Folic acid administration inhibits amyloid β -peptide accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *J Nutr Biochem* 2015;26(8):883-91
- 178 Duthie S, Horgan G, de Roos B et al. Blood folate status and expression of proteins involved in immune function, inflammation, and coagulation: biochemical and proteomic changes in the plasma of humans in response to long-term synthetic folic acid supplementation. *J Proteome Res* 2010;9(4):1941-50
- 179 Lisowski P, Wieczorek M, Goscik J et al. Effects of chronic stress on prefrontal cortex transcriptome in mice displaying different genetic backgrounds. *J Mol Neurosci* 2013;50(1):33-57
- 180 Martinho A, Goncalves I, Costa M et al. Stress and glucocorticoids increase transthyretin expression in rat choroid plexus via mineralcorticoid and glucocorticoid receptors. *J Mol Neurosci* 2012;48(1):1-13
- 181 Gonzalez A, Podvin S, Lin S et al. Ecr4 expression and its product augurin in the choroid plexus: impact on fetal brain development, cerebrospinal fluid homeostasis and neuroprogenitor cell response to CNS injury. *Fluids Barriers CNS* 2011;8(1):6
- 182 Tadross J, Patterson M, Suzuki K et al. Augurin stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis via the release of corticotrophin-releasing factor in rats. *Br J Pharmacol* 2010;159(8):1663-71

- 183 Stankiewicz A, Goscik J, Swiergiel A et al. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex. *BMC Neuroscience* 2014;15:130
- 184 Giertz H, Iurna I. Zur Aktivierung der sympathischen Überträgerstoffe durch Methyldonatoren. *Arch Exper Path u Pharmakol* 1955;224:295-9
- 185 Kreutzig T. Hormone des Nebennierenmarks: Noradrenalin und Adrenalin. In: Kreutzig T (Hrsg). *Kurzlehrbuch Biochemie*. 2010, 10. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, S.312
- 186 Oldendorf W, Szabo J. Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am J Physiol* 1976;230(1):94-8
- 187 Cornford E, Braun L, Oldendorf W. Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. *J Neurochem* 1978;30(2):299-308
- 188 Tsunedomi R, Oagwa Y, Iizuka N et al. The assessment of methylated BASP1 and SRD5A2 levels in the detection of early hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2010;36(1):205-12
- 189 Beyer C, Hutchison J. Androgens stimulate the morphological maturation of embryonic hypothalamic aromatase-immunoreactive neurons in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;98(1):74-81
- 190 Matsumoto A. Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Res Bull* 1997;44(4):539-47
- 191 Rosario E, Pike C. Androgen regulation of β -amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 2008;57(2):444-453
- 192 Ramsden M, Nyborg A, Murphy M et al. Androgens modulate beta-amyloid levels in male rat brain. *J Neurochem* 2003;87(4):1052-5
- 193 Quintela T, Alves C, Goncalves I et al. 5Alpha-dihydrotestosteron up-regulates transthyretin levels in mice and rat choroids plexus via an androgen receptor independent pathway. *Brain Res* 2008;1229:18-26
- 194 Wang L, Zhang Z, Li Q et al. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum Reprod* 2009;24(3):562-79
- 195 Zahibi S, Eriksson U, Wentzel P. Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats. *Reprod Toxicol* 2007;23(4):486-98
- 196 Dolinoy D, Huang D, Jirtle R. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(32):13056-61
- 197 Caldwell P, Manziello A, Howard J et al. Gene expression profiling in the fetal cardiac tissue after folate and low-dose trichloroethylene exposure. *Birth defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(2):111-27
- 198 Hoile S, Lillycrop K, Grenfell L et al. Increasing the folic acid content of maternal or post-weaning diets induces differential changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA expression and promotor methylation in rats. *Br J Nutr* 2012;108(5):852-7

- 199 Kim H, Choi Y, Kim K et al. Effect of paternal folate deficiency on placental folate content and folate receptor α expression in rats. *Nutr Res Pract* 2011;5(2):112-6
- 200 Quinlivan E, Gregory J 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):221-5
- 201 Pfeiffer C, Caudill S, Gunter E et al. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442-50
- 202 Downing C, Johnson T, Larson C et al. Subtle decreases in DNA methylation and gene expression at the mouse Igf2 locus following prenatal alcohol exposure: effects of a methyl-supplemented diet. *Alcohol* 2011;45(1):65-71
- 203 Tsang V, Fry R, Niculescu M et al. The epigenetic effects of a high prenatal folate intake in male mouse fetuses exposed in utero to arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;264(3):439-50
- 204 Waterland R, Dolinoy D, Lin J et al. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 2006;44(9):401-6
- 205 Schaible T, Harris R, Dowd S et al. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum Mol Genet* 2011;20(9):1687-96
- 206 McKay J, Williams E, Mathers J. Effect of maternal and post-weaning folate supply on gene-specific DNA methylation in the small intestine of weaning and adult *apc* and wild type mice. *Front Genet* 2011;2:23
- 207 Gonda T, Kim Y, Salas M et al. Folic acid increases global DNA methylation and reduces inflammation to prevent *Helicobacter*-associated gastric cancer in mice. *Gastroenterology* 2012;142(4):824-833
- 208 Kulkarni A, Dangat K, Kale A et al. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DN methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One* 2011;6(3):e17706
- 209 Maloney C, Hay S, Rees W. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *Br J Nutr* 2007;97(6):1090-8
- 210 Cho K, Mabasa L, Bae S et al. Maternal high-methyl diet suppresses mammary carcinogenesis in female rat offspring. *Carcinogenesis* 2012;33(5):1106-12
- 211 Le Leu R, Young G, McIntosh G. Folate deficiency diminishes the occurrence of aberrant crypt foci in the rat colon but does not alter global DNA methylation status. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(10):1158-64
- 212 Guay F, Palin M, Matte J et al. Effects of breed, parity and folic acid supplement on the expression of leptin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation. *Biol Reprod* 2001;65(3):921-7
- 213 Cravo M, Pinto A, Chaves P et al. Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: correlation with nutrient intake. *Clin Nutr* 1998;17(2):45-9

- 214 Crider K, Quinlivan E, Berry R et al. Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. *PLoS One* 2011;6(12):e28144
- 215 Jung A, Smulders Y, Verhoef P et al. No effect of folic acid supplementation on global DNA methylation in men and women with moderately elevated homocysteine. *PLoS One* 2011;6(9):e24976
- 216 Steegers-Theunissen R, Obermann-Borst S, Kremer D et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4(11):e7845
- 217 Boecke C, Baccarelli A, Kleinman K et al. Gestational intake of methyl donors and global LINE-1 DNA methylation in maternal and cord blood: prospective results from a folate-replete population. *Epigenetics* 2012;7(3):253-60
- 218 Haggarty P, Hoad G, Campbell D et al. Folate in pregnancy and imprinted gene and repeat element methylation in the offspring. *Am J Clin Nutr* 2013;97(1):94-9
- 219 Ba Y, Yu H, Liu F et al. Relationship of folate, vitamin B12 and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr* 2011;65(4):480-5
- 220 Cooper W, Khulan B, Owens S et al. DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *FASEB J* 2012;26(5):1782-90
- 221 Hoyo C, Murtha A, Schildkraut J et al. Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy. *Epigenetics* 2011;6(7):928-36
- 222 Vasquez K, Kuizon S, Junaid M et al. The effect of folic acid on GABA(A)-B1 receptor subunit. *Adv Exp Med Biol* 2013;775:101-9

8 Anhang

8.1 Studienüberblick

In Tabellen 14 bis 18 werden Studien aufgeführt, in denen am Maus-, Ratten-, Schwein- und Humanmodell sowie im Zellversuch Einflüsse einer prä- und/ oder postnatalen folsäure- bzw. methylreichen oder -armen Diät auf die DNA-Methylierung und/ oder die Genexpression untersucht wurden. Die Literaturrecherche zeigt, dass die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiet bereits am Ende der 1980er Jahren begannen, ein Großteil der Studien wurde jedoch erst in den letzten 5 Jahren durchgeführt.

Tabelle 14: Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methyleichen/-armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Mausmodell untersucht wurde

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Salbaum 2013 (148)	Mutation Folt4/ ♀/ adult	Uterus	pränatal: ↑ Folsäure (12,5 mg / kg KG/ Tag)		- global: Affymetrix Mouse 430 2.0 microarray - gensezifisch: H3 lysine K4 (Protein) → Veränderung von Genen, die <i>involviert</i> sind in <i>Fettstoffwechsel, Proteinsynthese,</i> <i>Mitochondrienfunktion, Zellzyklus und</i> <i>Zellaktivierung</i> → Einfluss auf <i>Histonmethylierung</i>
Xiao 2005 (155)	n.b./ n.b./ Fetus	Gehirn, Darm, Lunge,...	pränatal: ↑ oder ↓ Folsäure (Dosis n.b.)		- gensezifisch: FR α , hnRNP-E1 (Protein) → selective Hochregulation von FR α und hnRNP-E1, assoziiert mit <i>multiplen</i> <i>Anomalien in fetalen Geweben</i>
Gray 2010 (149)	Lrp6 (-/-)/ ♀/ Fetus+ adult	Gehirn (fetal), Leber (adult)	pränatal: ↑ Folsäure (2 vs 10 mg / kg)		- global: Affymetrix Mouse 430 2.0 microarray → Veränderung von Genen, die <i>involviert</i> sind in <i>Signaltransduktion sowie</i> <i>Proliferation, Morphologie und</i> <i>Differenzierung von Zellen</i>
McKay 2011 (104)	C57BL/6/ ♂+ ♀/ Fetus	Darm	pränatal: ↓ Folsäure (0,4 vs 2 mg / kg)	- gensezifisch: Slc394a, Esr1, Igf2 → Slc394a: <i>Hypomethylierung</i> → Geschlechtsunterschied	
Finnell 2002 (139)	Folbp1 (-/-)/ n.b./ Fetus	Gehirn, Leber	pränatal: ↑ Folsäure (25mg/ kg/ d)	- global: Radiomarkierte 3(H)dCTP → <i>Hypomethylierung</i>	
Downing 2011 (202)	C57BL/6/ n.b./ Fetus	Embryo, Plazenta	pränatal: methyleich (Dosis n.b.) + Ethanol	- gensezifisch: Igf2 Locus → durch Diät Aufhebung der <i>ethanol</i> - bedingten <i>Hypomethylierung</i>	
Caldwell 2010 (197)	C57BL/6/ n.b./ Fetus	Herz	pränatal: ↑ Folsäure (Dosis n.b.) + Trichlorethen	- global: Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST array durch Folsäure zusätzliche Veränderung der Expression von Genen <i>involviert</i> u.a. in <i>Transkription, Differenzierung, Zellzyklus</i> und Apoptose	

Fortsetzung Tabelle 14

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA-Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Wang 2009 (194)	C57BL/6/ n.b./ Fetus	Gehirn	pränatal: ↑ Folsäure (Dosis n.b.) + Ethanol		- 509 miRNA: miRNA microarray chip → durch Folsäure teilweise Aufhebung der veränderten Genexpression
Tsang 2012 (203)	CD1/ ♂/ bei Geburt	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (2,2 vs 11 mg/ kg) + Arsen	- gensezifisch: Mouse 16k CpG- island microarray → Veränderung der Methylierung von ca. 3.000 Genen, involviert in neuronale Entwicklung, Krebs, Zellzyklus, Signalwege (v.a. WNT)	- gensezifisch: Mouse gene specific Taqman Gene Expression Assay → Veränderung der Expression von <i>DNMT3a</i>
Barua 2014 (103)	C57BL/6/ ♂+ ♀/ bei Geburt	Gehirn- hemisphäre	pränatal: ↑ Folsäure (0,4 vs 4 mg/ kg)	- gensezifisch: Bisulfitemodifikation, PCR → DNA-Methylierungsprofil verändert: Gene involviert in Entwicklung und Autismus, Imprinting Gene	- gensezifisch: RT-PCR; <i>Dio3</i> , <i>Polg2</i> , <i>Rn111</i> , <i>Ube2s</i> , <i>Ths23</i> ... → veränderte Expression der Kandidatengene
Waterland 2006 (204)	Agouti/ n.b./ bei Geburt	Schwanz- spitze	pränatal: methyreich (Dosis n.b.)	- gensezifisch → Hypermethylierung des <i>Axin</i> (<i>Fu</i>), einhergehend mit verändertem Phänotyp	
Huang 2014 (118)	C57BL/6/ ♂/ 7/ 15 Wochen	Weißes Fettgewebe	pränatal: ↑ Folsäure (2 vs 5 bzw. 40 mg/ kg) ab 7 Wochen postnatal: ↑ Fett	- global: MethyFlash Methylated DNA Quantification Kit → Hypermethylierung nach exzessiver pränataler Folsäurezufuhr	- gensezifisch: RT-PCR; <i>TNF-α</i> , <i>IL-6</i> , <i>Leptin</i> , <i>Adiponectin</i> → <i>Adiponectin</i> ↓
Carlén 2013 (101)	C57BL/6* DBA/ ♂+ ♀/ 11 Monate	Gehirn (PFC, NAC, VTA)	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (4,2 vs 15 mg/ kg), B12, Methionin, Cholin, Biotin, Zink u/o Fett	- global: Luminometri Methylation Assay (LUMA) - gensezifisch: RT-PCR → durch methyreiche Diät teilweise Abschwächung der fettinduzierten Veränderungen → globale Hypermethylierung in bestimmten Regionen (♂)	- gensezifisch: RT-PCR; <i>DAT</i> , <i>MOR</i> → durch methyreiche Diät teilweise Abschwächung der fettinduzierten Veränderungen

Fortsetzung Tabelle 14

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA-Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Langie 2013 (115)	C57BL/6/ ♂/ 6 Monate	Gehirn	pränatal u. Stillzeit: ↓ Folsäure (0,4 vs 2 mg/ kg) postnatal: ↑ Fett	- global: HPLC, Tandem- MS - gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfatkonvertierter DNA; Ogg1, Neil1, Muhy, Xrcc1 → Veränderungen	- gensezifisch: RT-PCR; Ogg1, Neil1, Muhy, Xrcc1 → Veränderungen
Hollings- worth 2008 (135)	C57BL/6/ n.b./ 2-3 Monate	Lunge	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (2 vs 17 mg/ kg), B12, Methionin, Cholin, Betain (mehrere Generationen)	- global: CpGlobal - gensezifisch: PCR, MALDI-TOF mass spectrometry; Runx3 → Veränderungen; exzessive Hypermethylierung von Runx3	- gensezifisch: RT-PCR; Runx3, Nfacc1, Jak2, Rcor3, Ube1 → verminderde Expression von Runx3 reversibel durch demethylierende Substanz
Delany 2013 (117)	ApoE (-/-)/ ♂/ 4/ 17/ 28/ 34 Wochen	Leber, T-Zellen	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (3 vs 13,5 mg/ kg), B12, Methionin, Cholin postnatal: ↑ Fett	- global: MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit - gensezifisch: QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit → globale Hypermethylierung in den T-Zellen	- gensezifisch: Ccr2, Ccr5, Cxcr3 → methy/reiche Diät führt in CD3+ T-Zellen zu verminderter Expression von Ccr2
Schäible 2011 (205)	C57BL/6/ ♂+ ♀/ 5/ 13 Wochen	Kolon- mukosa (Tumor- gewebe)	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (1,6 vs 5 mg/ kg), B12, Cholin, Betain + Dextransulfat	- global: Methylation-specific amplification microarray - gensezifisch: Bisulfit-modifikation (Methylation-Gold-Kit) → veränderte Methylierung, erhöhte Anfälligkeit für Kolitis	- global: Whole mouse Genome microarray → Expression von ca. 1.000 Genen verändert
McKay 2011 (206)	C57BL/6* Apc/ n.b./ 3 Wochen + adult	Dünndarm	pränatal u. Stillzeit: ↓ Folsäure	- gensezifisch: PCR; p53, Igf2, Apc, p16 → Veränderungen	
Dolinoj 2007 (196)	Agouti/ n.b./ 3 Wochen	Schwanz- spitze	pränatal und Stillzeit: ↑ Folsäure (4,3 mg/ kg), B12, Cholin, Betain + Bisphenol A	- gensezifisch: Bisulfitmodifikation, PCR → durch methy/reiche Diät Aufhebung der durch BPA induzierten Hypomethylierung	

Fortsetzung Tabelle 14

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA-Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Berming- ham 2013 (116)	C57BL/6/ ♀/ 3 Monate	Leber, Kolon	prä- und postnatal: ↓ Folsäure (0,4 vs 1,8 mg/ kg), ↑ Selen, ↑ Fett	- global: HPLC - gensezifisch: <i>Slc2a4</i> → nach adäquater Zufuhr in der Leber globale Hypomethylierung	- global: Agilent Technologies → verminderde Expression von <i>Slc2a4</i>
Li 2011 (136)	C57BL/6/ n.b./ 5 Wochen	Leber	prä- und postnatal: ↑ Folsäure (1,5 vs 15 mg/ kg), B12, Methionin, Cholin, Betain, Zink (6 Generationen)	- global: HPLC - gensezifisch: Agilent 105K mouse CpG Islands microarray → erhöhte epigenetische Variabilität	
Nohara 2011 (102)	C57BL/6/ ♂+ ♀/ n.b.	Leber	postnatal: ↓ Methylgruppen (Dosis n.b.) + Arsen	- global: LC/ESI-MS → geschlechtsspezifische Unterschiede	- gensezifisch: Methode n.b.: <i>DNMT1</i> → geschlechtsspezifische Unterschiede
Keyes 2007 (142)	C57BL/6/ ♂/ 9/23 Monate	Kolon	postnatal: ↑ Folsäure (0 vs 4,5 bzw. 18 µmol/ kg)	- global: LC/ESI-MS - gensezifisch: Bisulfitmodifikation, PCR; <i>p16</i> → ältere Tiere: Hypomethylierung, höherer Folatgehalt führt zu höherer globalen Methylierung	- gensezifisch: Taqman Gene Expression Assay; <i>p16</i> → ältere Tiere: höherer Folatgehalt führt zu höherer Methylierung des <i>p16</i> Promoters
Gonda 2012 (207)	Transgen/ n.b./ adult	Magen (Tumorgewebe)	postnatal: ↑ Folsäure (Dosis n.b.) + Helicobacter	- global: Methylation sensitive cytosine incorporation assay → Folsäuresupplementation verhindert globale Hypo- methylierung	- global: Illumina MouseWG-6v2 Bead Chip expression arrays → Folsäuresupplementation antizündliche Wirkung aus

Tabelle 15: Studien, in denen der Einfluss einer prä- / postnatal verabreichten folsäure- bzw. methy/reichen/ -armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Rattenmodell untersucht wurde

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Kim 2011 (199)	Sprague- Dawley/ ♀/ Geburt	Plazenta	präkonzeptionell / (paternal): ↓ Folsäure (0 vs 8 mg / kg)		- gensezifisch: Westernblot; <i>FRα</i> (<i>Protein</i>) → nach <i>paternalem Folsäuredefizit</i> stärkere Expression von <i>FRα</i>
Mejos 2013 (121)	Sprague- Dawley/ n.b./ 3 Wochen	Leber	präkonzeptionell / (paternal): ↓ Folsäure (0 vs 8 mg / kg)	- global: MethylFlash™ Methylated DNA Methylation Quantification Kit → nach <i>Folsäuredefizit globale</i> <i>Hypomethylierung</i>	- gensezifisch: Methode n.b.; <i>FRα</i> , <i>IGF-2</i> , <i>IGF-1</i> (<i>Protein</i>) → <i>keine signifikanten Unterschiede</i> → <i>positive Korrelation zwischen globaler</i> <i>Methylierung und Proteinexpression</i>
Kulkarni 2011 (208)	Wistar/ ♀/ Schwanger- schaftsende	Plazenta	pränatal: ↑ Folsäure (2 vs 8 mg / kg) (↓ B12, ↑ n3-FS DHA)	- global: Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit → <i>globale Hypomethylierung nach</i> <i>folsäurereicher und B12-armen</i> <i>Diät; kann durch n3-Fettsäure DHA</i> <i>aufgehoben werden</i>	
Cho 2013 (143)	Wistar/ ♂/ 7 Monate	Hypo- thalamus (linke Seite)	pränatal: ↑ Folsäure (2 vs 20 mg / kg) ab 3 Wochen postnatal: ↑ Folsäure (2 vs 20 mg / kg)	- global: Pyrosequenzierung bisulfiti- konvertierter DNA - gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA; <i>POMC</i> → <i>globale Methylierung unverändert</i> → <i>POMC- Hypomethylierung nach</i> <i>dauerhaft folsäurereicher Diät</i>	- gensezifisch: RT-PCR, Taqman assay; <i>NPY</i> , <i>POMC</i> , <i>BDNF</i> , <i>5-HTR1A</i> , <i>5-HTR2A</i> , <i>5-HTR2C</i> → <i>pränatal folsäurereiche Diät verändert die</i> <i>Genexpression sättigungsregulierender</i> <i>Neuropeptide</i>
Altobelli 2013 (106)	Wistar/ ♂/ 1 Tag	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg) ↓ Protein	- global: Methylierungsmuster → <i>Veränderungen nach pränatal</i> <i>proteinarmer Diät sind durch</i> <i>Folsäuregabe teilweise reversibel</i>	- global: RatRef-12 Expression BeadChip Microarray (Illumina) → <i>Veränderungen nach pränatal proteinarmer</i> <i>Diät sind durch Folsäuregabe teilweise</i> <i>reversibel</i>
Lillycrop 2005 (107)	Wistar/ ♂+♀/ 4 Wochen	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg) ↓ Protein	- gensezifisch: Methylation- sensitive PCR; <i>PPARα</i> , <i>PPARγ</i> , <i>GR</i> , <i>AcyI-CoA-Oxidase</i> → <i>Veränderungen nach pränatal</i> <i>proteinarmer Diät sind durch</i> <i>Folsäuregabe reversibel</i>	- gensezifisch: RT-PCR; <i>PPARα</i> , <i>PPARγ</i> , <i>GR</i> , <i>AcyI-CoA-Oxidase</i> → <i>Veränderungen nach pränatal proteinarmer</i> <i>Diät sind durch Folsäuregabe reversibel</i>

Fortsetzung Tabelle 15

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Lillycrop 2010 (108)	Wistar/ ♂/ 3 Monate	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg) ↓ Protein		- global: Agilent 014879 whole rat genome array - gensezifisch: RT-PCR, TNF α , NO synthase c-Fos, NF κ B, Protein UCP3 thyroid receptor → Veränderungen nach pränatal proteinärmer Diät sind durch Folsäuregabe teilweise reversibel
Zahibi 2007 (195)	n.b./ ♀/ Tag 10 nach Konzeption	Dottersack	Pränatal: ↑ Folsäure i.v. (Dosis n.b.) + Streptozotin		- gensezifisch: Methode n.b.; ROS scavenging enzymes, Vegf-A, Folbp-1 → durch Folsäuregabe Normalisierung der durch Diabetes bedingten Veränderungen
Maloney 2007 (209)	Rowett Hooded/ ♂+♀/ maternal+ feta	Leber	pränatal: ↓ Folsäure (0 vs 10 mg), ↓ Methionin, ↓ Cholin	- global: Cytosin extension assay (Radioaktivität) → keine Veränderungen beobachtet	
Sie 2013 (99)	Sprague- Dawley/ n.b./ 3/ 14 Wochen	Leber	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (2 vs. 5 mg) postnatal: ↑ Folsäure (2 vs. 5 mg)	- global: Messung der in-vitro-Methyl-Aufnahmekapazität von DNA - gensezifisch: RT- PCR; Ppar- γ , p53, p16 ER α , Apc → nach matemaler folsäurereicher Diät globale Hypomethylierung → nach postnatal folsäurereicher Diät globale Hypomethylierung → gensezifische Veränderungen	
Sie 2011 (98)	Sprague- Dawley/ ♂/ 32 Wochen	Kolon- mukosa	Pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (2 v 5 mg) postnatal: ↑ Folsäure (2 v 5 mg)	- global: LC/ESI-MS → nach matemaler folsäurereicher Diät globale Hypomethylierung → nach postnatal folsäurereicher Diät globale Hypomethylierung	

Fortsetzung Tabelle 15

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA-Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Ly 2011 (100)	Sprague- Dawley/ ♀/ 3/ 28 Wochen	Brustdrüse (Tumorgewebe)	Pränatal und Stillzeit: ↑ Folsäure (2 vs 5 mg/ kg) Postnatal: ↑ Folsäure (2 vs 5 mg/ kg) + Dimethylbenoz[α]anthra- zen (DMBA)	- global: Messung der in-vitro-Methyl- Aufnahmekapazität von DNA → nach maternaler folsäurereicher Diät globale Hypomethylierung	- gensezifisch: Methode n.b.: DNMT → nach postnatal folsäurereicher Diät verminderte DNMT- Aktivität
Höile 2012 (198)	Wistar/ ♂+ ♀/ 3 Monate	Leber	Pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg) Postnatal: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg)	- gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA; PEPCK → geschlechtsspezifische Veränderungen	- gensezifisch: RT-PCR; PEPCK → geschlechtsspezifische Veränderungen
Chmur- zynska 2012 (105)	Wistar/ n.b./ 10 Wochen	Viszerales Fettgewebe	pränatal u. Stillzeit: Folsäure (2 vs 5 mg/ kg) (↓ Protein) postnatal: ↑ Fett	- global: Imprint® Methylated DNA Quantification Kit → Hypermethylierung nach fettreicher Diät	- gensezifisch: RT-PCR; Leptin-Gen → keine Veränderungen
Giudicelli 2013 (109)	Sprague- Dawley/ ♂+ ♀/ n.b.	Fettgewebe	pränatal u. Stillzeit: ↑ Folsäure (2 vs 15mg/ kg), B12, Methionin, Cholin, Zink (↓ Protein)	- gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA; Leptin- Gen → Hypermethylierung nach mehrreicher Diät	- gensezifisch: RT-PCR; Leptin-Gen → keine signifikanten Veränderungen nach mehrreicher Diät trotz geringerer Leptinsekretion
Cho 2012 (210)	Sprague- Dawley/ ♀/ n.b.	Kolon (Tumorgewebe)	Pränatal und Stillzeit: ↑ Folsäure (2 vs 10 mg), B12, Methionin, Cholin Postnatal: s.o. + N-methyl-N-nitrosoham- stoff (NMA)	- global: Imprint® Methylated DNA Quantification Kit → nach maternaler methyl/reicher Diät kein Unterschied	- gensezifisch: RT-PCR; MeCP, p53, Hdac1 → nach pränatal sowie prä- und postnatal mehrreicher Diät geringere Expression von Histondeacetylase Hdac1

Fortsetzung Tabelle 15

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Sable 2015 (120)	Wistar/ n.b./ Geburt+ 3+ 12 Wochen	Gehirn	Pränatal: ↑ Folsäure (Dosis n.b.) (↑ n3-Fettsäuren, ↓ B12) postnatal: s.o.	- global: Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit → bei Geburt: nach pränatal/ folsäurericher (und B12-arm) Diät globale Hypomethylierung → nach 3 Monaten: nach pränatal/ sowie prä- und postnatal/ folsäurericher Diät globale Hypermethylierung; Prävention durch pränatale n3-F-S-Zufuhr → Kontrolle: 3 Wochen postnatal höhere globale Methylierung	- global: mRNA microarray
Cordero 2013 (119)	Wistar/ ♂/ adult	Leber, Kolon	postnatal: ↑ Folsäure (Dosis n.b.), B12, Cholin, Betain (↑ Fett, Zucker)	- global: Methode n.b. - gensezifisch: Methode n.b.; LepR, SrebF2, Agpat3, Esr1 → nach postnatal methy/reicher Diät globale Hypomethylierung sowie Veränderungen der gensezifischen Methylierung	- global: mRNA microarray
Burdge 2009 (110)	Wistar/ ♂+♀/ 3 Monate	Leber, Muskel, Fettgewebe	Pränatal: ↓ Protein 4 Wochen postnatal: ↑ Folsäure (1 vs 5 mg) 8 Wochen postnatal: ↑ Fett	- gensezifisch: Methylation-sensitive restrictions-Endonuklease RT-PCR; PPAR α , GR, I/R → nach postnatal methy/reicher Diät Veränderungen, unabhängig von maternaler Diät	- gensezifisch: RT-PCR; PPAR α , GR, I/R → nach postnatal methy/reicher Diät Veränderungen, unabhängig von maternaler Diät
Kotsopoulos 2008 (137)	Sprague- Dawley/ ♀/ adult	Leber	postnatal: ↓↑ Folsäure (0/ 2/ 8 mg/ kg)	- global: Messung der in-vitro- Aufnahmekapazität von DNA → nur nach postnatal folsäureärmer Diät bis Pubertät globale Hyper- methylierung	- global: Messung der in-vitro- Aufnahmekapazität von DNA → nur nach postnatal folsäureärmer Diät bis Pubertät globale Hyper- methylierung

Fortsetzung Tabelle 15

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ genspezifisch)	Genexpression (global/ genspezifisch)
Kim 1995 (138)	Sprague- Dawley/ ♂/ 15/ 24 Wochen	Leber, Kolon	postnatal: ↓ Folsäure (0 vs 8 mg/ kg)	- global: Radioaktiv markierte Methylgruppen (Sss1) - genspezifisch: Methode n.b.; c-myc protoonogene → <i>kein Einfluss auf globale und genspezifische Methylierung</i>	
Wainfan 1989 (79)	Fischer/ ♂/ 8-10 Wochen	Leber	postnatal: ↓ Folsäure (Dosis n.b.), B12, Methionin	- global: DNA MTase Reaktion (Radiomarkierung) → <i>Hypomethylierung</i>	
Le Leu 2000 (21)	Sprague- Dawley/ ♂/ n.b.	Kolon (Tumorgewebe)	postnatal: ↓ Folsäure (Dosis n.b.) + Azoxymethan	- global: Methode n.b. → <i>kein Unterschied der globalen Methylierung zwischen den Gruppen</i>	

Tabelle 16: Studien, in denen der Einfluss einer prä-/ postnatal verabreichten folsäure- bzw. methyleichen/-armen Diät auf DNA- Methylierung und Genexpression am Schweinmodell untersucht wurde

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Liu 2011 (112)	Yorkshire IUGR/ n.b./ n.b.	Dünndarm	pränatal: ↑ Folsäure (1,8 vs 30,3 mg/ kg)		- gensezifisch: RT-PCR; DNMT1, p53, Bcl-1, Bax, Mp9, Apex1, Tdg → Aufhebung der durch IUGR bedingten Veränderungen durch Folsäure pränatal
Liu 2011 (113)	Yorkshire IUGR/ n.b./ n.b.	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (1,3 vs 30 mg/ kg)		- gensezifisch: RT-PCR; MAT, CBS, MTHFR, DNMT1, PPAR γ , GR, Ob-R, AOX → Aufhebung der durch IUGR bedingten Veränderungen durch Folsäure pränatal
Liu 2012 (111)	Yorkshire IUGR/ n.b./ n.b.	Leber	pränatal: ↑ Folsäure (1,3 vs 30 mg/ kg)		- gensezifisch: Methode n.b. → Aufhebung vieler durch IUGR bedingten Veränderungen durch Folsäure pränatal
Guay 2001 (212)	Yorkshire, Chinese Meishan/ ♀/ Gestations- alter: 25 Tage	Embryo, Uterus, Rückenspec k	pränatal: ↑ Folsäure (5 mg/ kg) + Glycin		- gensezifisch: Semiquantitative PCR; Leptin → teilweise verminderte Expression von Leptin
Jing-Bio 2012 (114)	Rasse n.b. IUGR/ n.b./ 5 Wochen	Leber	postnatal: ↑ Folsäure (5 mg/ kg)	- gensezifisch: Methode n.b.; PPAR α , PPAR γ , GR, PEPCK → Aufhebung der durch IUGR bedingten Veränderungen durch postnatale Folsäurezufuhr	- gensezifisch: Methode n.b.; PPAR α , PPAR γ , GR, PEPCK → Aufhebung der durch IUGR bedingten Veränderungen durch postnatale Folsäurezufuhr

Tabelle 17: Studien, in denen der Einfluss der prä- und/ oder postnatalen Folsäure- Aufnahme auf die DNA- Methylierung und/ oder die Genexpression am Humanmodell untersucht wurde

Autor	Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Cravo 1998 (213)	n.b./ adult	Kolomuko sa (Polypen)	Folsäure (5 mg/ Tag) Dauer n.b.	- global: Methode n.b → bei Patienten mit 1 Polypen Abnahme der Hypomethylierung nach Supplementierung	
Crider 2011 (214)	♀/ adult	Blut (un-koaguliert/ koaguliert)	6 Monate lang: Folsäure (100/ 400/ 4000 µg/ Tag)	- global: LC-MS/MS (Tandem-MS) → globale Hypomethylierung der DNA in koaguliertem Blut	
Bae 2014 (141)	♀/ post- menopausal	Leukozyten (peripheres Blut)	vor/ während/ nach Anreicherungsperiode	- global: LC-ESI-MS/MS → während Anreicherungsperiode ist ein hoher Folatgehalt der Erythrozyten assoziiert mit einem niedrigen Level der globalen Methylierung	
Ono 2012 (73)	♀/ adult	Leukozyten (peripheres Blut)	Einteilung Folsäurekonsum anhand Fragebogen	- global: Luminometric Methylation Assay → höhere Folataufnahme ist assoziiert mit einem niedrigeren Level der globalen Methylierung	
Ramper- saud 2000 (76)	♀/ post- menopausal	Leukozyten (peripheres Blut)	7 Wochen lang: Folsäuredepletion (118 µg/ Tag), 7 Wochen lang: Folsäurererpletion (200/ 415 µg/ Tag)	- global: Messung der in-vitro- Aufnahmekapazität von DNA → niedrigere Folatzufuhr ist assoziiert mit einem niedrigeren Level der globalen Methylierung	
Jacob 1998 (75)	♀/ post- menopausal	Lympho- zyten (peripheres Blut)	5 Wochen lang: 56 µg Folsäure/ Tag 4 Wochen lang: 111 µg Folsäure/ Tag 3 Wochen lang: 516 µg Folsäure/ Tag	- global: bacterial CpG methylase → niedrige Folatzufuhr ist assoziiert mit einem niedrigeren Level der globalen Methylierung	

Fortsetzung Tabelle 17

Autor	Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Jung 2011 (215)	♂+♀/ adult Homo- cysteinämie	Leukozyten (peripheres Blut)	3 Jahre lang: 800 µg Folsäure/ Tag	- global: LC-MS/MS (Tandem-MS) → kein Einfluss der Folsäurezufuhr auf die globale Methylierung beobachtet	
Fiorito 2014 (74)	♂+♀/ adult Koronare Herz- erkrankung	Vollblut	Erfassung der Versorgung mit B-Vitaminen (EPICOR Studie)	- gensezifisch: Methode n.b.; 33 Kandidatengene → inverser Zusammenhang zwischen B-Vitamin- Zufuhr und Methylierung der Kanalidatengene	
Steegers- Theunissen 2009 (216)	♂+♀/ 12-18 Monate	Vollblut	Erfassung der perinatalen Folsäuresupplementierung mittels Fragebogen	- gensezifisch: MS, PCR, IGF2 → maternale Folsäuresupplemen- tierung ist assoziiert mit höherer Methylierung des IGF2	
Boecke 2012 (217)	♂+♀/ Getrennt Neu- geborene, Schwangere	Nabel- schnurblut, Vollblut	Erfassung der pränatalen Aufnahme von Methylgruppen mittels Fragebogen	- gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA; LINE-1 → Keine Assoziation zwischen pränatal/ methy/reicher Diät und Methylierung → hohe maternale Cholinaufnahme ist assoziiert mit niedrigerer Methylierung bei Jungen	
Haggarty 2013 (218)	Geschlecht n.b./ Neu- geborene, Schwangere	Nabel- schnurblut, Vollblut	Erfassung der pränatalen Nährstoffversorgung mittels Fragebogen	- gensezifisch: Pyrosequenzierung bisulfitkonvertierter DNA; PEG3, IGF2, LINE-1 → Folsäuresupplementierung nach der 12. Schwangerschaftswoche ist assoziiert mit Hyper- methylierung von IGF2 und Hypomethylierung von PEG3 und LINE-1	

Fortsetzung Tabelle 17

Autor	Geschlecht/ Alter	Organ	Zeitfenster der Diätexposition	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Ba 2011 (219)	Geschlecht n.b. Neu- geborene, Schwangere	Nabel- schnurblut, Vollblut	Erfassung der perinatalen Vitaminsupplementierung mittels Fragebogen	- gensezifisch: EZ DNA Methylation- Gold™ Kit, RT-PCR; <i>IGF2</i> (Promotor 2+3) → <i>maternaler B12-Level (nicht Folat) ist assoziiert mit Level der Promotormethylierung</i>	
Cooper 2012 (220)	♂+ ♀ Getrennt Neu- geborene	Nabel- schnurblut	Perikonzeptionelle Supplementierung (Folat, Vitamin A, B, C, D, Zink)	- gensezifisch: Bisulfit, PCR; 12 DMRs: <i>IGF2R</i> , <i>GTL2-2</i> , ... → <i>Hypomethylierung von IGF2R (♀) und GTL2-2 (♂)</i>	
Hoyo 2011 (221)	♂+ ♀ Getrennt Neu- geborene	Nabel- schnurblut (Leuko- zyten)	Erfassung der pränatalen Folsäuresupplementierung mittels Fragebogen	- gensezifisch: Pyrosequenzierung; 2 DMRs des <i>IGF 2</i> → <i>Hypomethylierung von DM R H19 (besonders in ♂)</i>	

Tabelle 18: Studien, in denen der Einfluss des Folsäurelevels im Medium auf die DNA- Methylierung und/ oder die Genexpression in vitro untersucht wurde

Autor	Stamm/ Geschlecht/ Alter	Organ	Folsäurelevel im Medium	DNA- Methylierung (global/ gensezifisch)	Genexpression (global/ gensezifisch)
Jhaveri 2001 (152)	human	Naso- pharynx Karzinom	Dosis n.b.	- gensezifisch: Methode n.b; H-cadherin → wenig Folsäure im Medium ist assoziiert mit Hypermethylierung von H-cadherin	- gensezifisch: RT-PCR; <i>ahFR</i> , H-cadherin → wenig Folsäure im Medium führt zu höherer Expression von <i>ahFR</i> (mRNA und Protein) und niedrigerer Expression von H-cadherin
Vasquez 2013 (22)	human	Neuro- blastom	0-250 ng/ ml		- gensezifisch: RT-PCR; <i>GABA(A)-B1</i> -Rezeptor → je mehr Folsäure im Medium, desto höher die Proteinlevel von <i>GABRB1</i>
Wasson 2006 (77)	human	Kolon- Karzinom	0 µmol/ L versus 3 µmol/ L	- global: Methylierungssensitiver Comet Assay - gensezifisch: <i>p53</i> → in folatreiem Medium reversible globale sowie gensezifische Hypomethylierung	
Junaid 2011 (164)	human	Lympho- blasten	0-500 ng/ ml		- global: Human whole genome expression microarray - gensezifisch: <i>FMRP</i> , <i>GPR37L1</i> , <i>TSSK3</i> → viel Folsäure im Medium führt zur Dysregulation von über 1.000 Genen, darunter auch <i>Imprinting</i> Gene (Bestätigung auf Proteinabene) → Grad der Veränderung ist konzentrations- abhängig

8.2 Isolierung der DNA aus den Organgeweben

8.2.1 Substanzen

Alle vorgefertigten Reagenzien wurden dem Kit NucleoBond® Buffer Set IV (Macherey Nagel) entnommen und die entsprechenden Säulen (maximale Ausbeute je Säule: 100 µg DNS) verwendet.

Puffer G2 800 mM GuHCl, 30 mM EDTA, 30 mM Tris/HCl, 5 % Tween 20, 0.5 % Triton X-100, pH 8.0
Puffer N2 100 mM Tris/H₃PO₄, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, pH 6.3, 0.15 % Triton X-100
Puffer N3 100 mM Tris/H₃PO₄, 15 % Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3
Puffer N5 100 mM Tris/H₃PO₄, 15 % Ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5
RNase A
Proteinase K
NucleoBond AXG 100 columns

8.2.2 Durchführung

1. Jede Gewebeprobe wurde einzeln aufgetaut und ca. 50- 100 mg in ein 14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube (Becton Dickinson#352059) überführt. Unter Zugabe von 10 ml des zuvor gemischten Puffer G2 und RNase A wurde das Gewebe mit dem Ultra Turrax (Firma) vollständig zerkleinert. Das Homogenisat wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und unter Zugabe von 100 µl Proteinase K (20 mg Proteinase /ml Proteinasepuffer) 30 Sekunden gründlich durchmischt (Vortex, Heidolph Reax control). Anschließend wurde die Probe im Thermocycler (Biometra Compact Line OV4) bei 50 °C für mindestens 2 Stunden (ohne Rotation) inkubiert, bis das Lysat klar war.
2. Zur Equilibrierung wurde die Säule (NucleoBond® AXG 100) auf einen leeren 50 ml Falcon gestellt und 2 ml Puffer N2 wurden zugegeben. Für die Absorption der DNA in der Probe wurden dem Lysat 5 ml Puffer N2 hinzupipettiert und nach 15 Sekunden Durchmischen (Vortex, Heidolph Reax control) ebenfalls auf die Säule gegeben. Anschließend wurden dreimal nacheinander 4 ml Puffer N3 zum Waschen auf die Säule pipettiert.
3. Die vorbereitete Säule wurde auf einen neuen 50 ml Falcon gestellt. Es wurden 5 ml Puffer N5 auf die Säule pipettiert und mit der darin eluierten DNS aufgefangen. Für

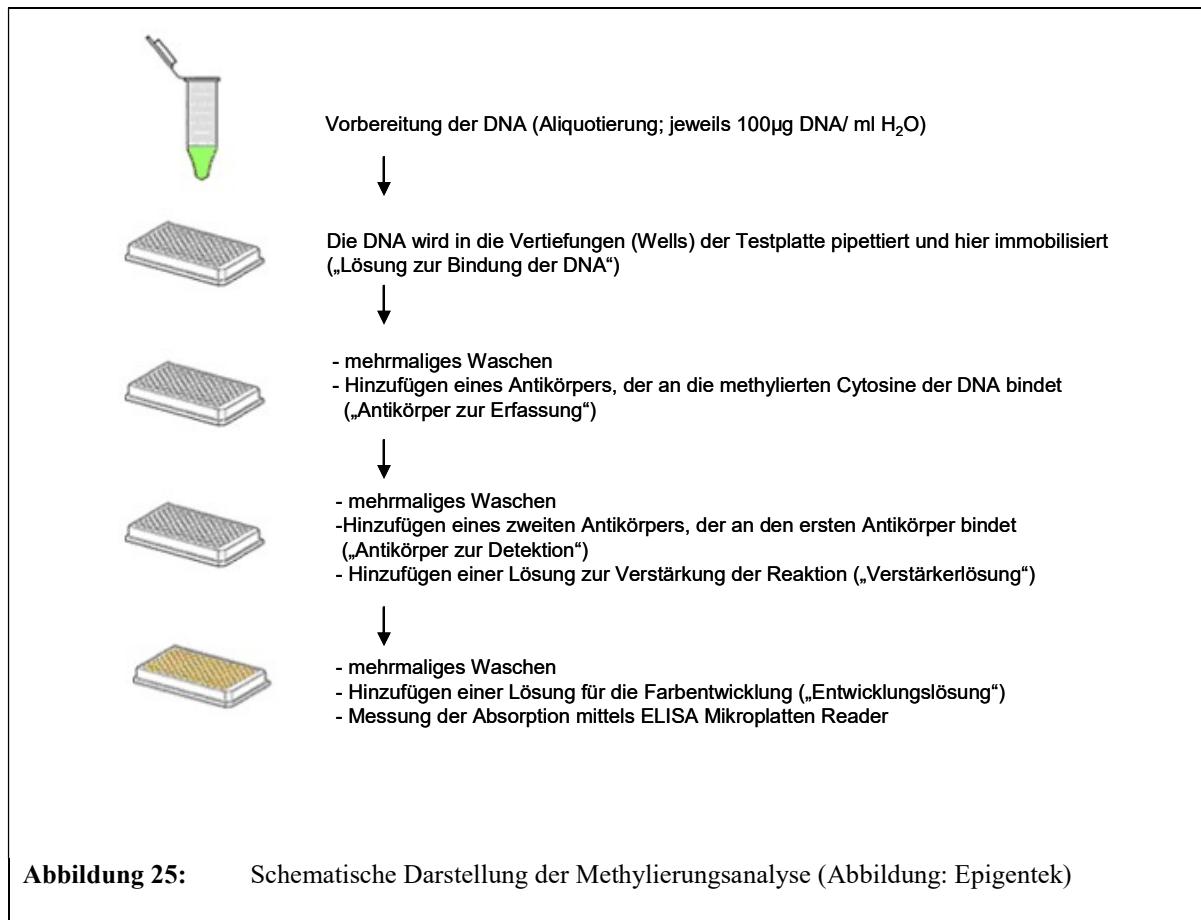
eine Optimierung der Ausbeute wurde das aufgefangene Lysat nochmals auf die Säule gegeben und in dem Falcon aufgefangen. Dem aufgefangenen Lysat wurden 3,5 ml Isopropanol zugegeben, durch Schwenken des Falcon gemischt und dann 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde dann 25 Minuten bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert (eppendorf Centrifuge 5810 R). Nach Verwerfen des Überstandes wurde dem im Falcon zurückbleibenden weißen Pellet 5 ml 70 %igem Ethanol zugegeben („Waschen“). Die Probe wurde dann 10 Minuten bei 4 °C mit 15.000 x g zentrifugiert (eppendorf Centrifuge 5417 R). Der Überstand wurde erneut verworfen, das im Falcon zurückbleibende weiße Pellet markiert und bei Raumtemperatur maximal 15 Minuten luftgetrocknet. Das getrocknete, durchsichtige Pellet wurde in 100 bis 200 µl H₂O gelöst und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß überführt. Die Proben mit der jeweiligen DNS wurden bei -20 °C gelagert.

8.3 DNA- Methylierungsanalyse

Die Vorteile dieser Methode liegen in der einfachen und schnellen Durchführung des Tests innerhalb von 4 Stunden unter konstanten Bedingungen, der colorimetrischen Quantifizierung mit geringem Aufwand und Risiko sowie der Möglichkeit einer flexiblen Probenbestimmung durch einzeln zu entnehmende Teststreifen der Mikrotiterplatte.

Zunächst wurde die jeweilige Konzentration der DNA in den einzelnen Proben mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt und es wurden Aliquots mit einer Konzentration von 100 µg DNA/ml H₂O hergestellt. Die in der Lösung enthaltene DNA der einzelnen Proben wurde dann auf einer 96-well-Mikrotiterplatte immobilisiert, deren kleine Vertiefungen jeweils mit einer DNS- affinen Substanz ausgekleidet waren. Der methylierte Anteil der DNA wurde dann mit einem 5-Methylcytosin-Antikörper erkannt und durch eine ELISA- ähnliche Reaktion quantifiziert; er verhält sich positiv proportional zur Intensität der Optischen Dichte (OD intensity). Die Absorptionsmessung erfolgte mittels ELISA Mikroplatten Reader (Tecan Sunrise ELISA Reader) bei einer Wellenlänge von 450nm.

Die einzelnen Schritte der Testdurchführung sind in Abbildung 25 dargestellt.



8.3.1 Substanzen

Alle vorgefertigten Reagenzien wurden dem Methylation Quantification Ultra Kit (Epigentek) entnommen.

8-Well Assay Strips	12
Waschpuffer	30 ml
Lösung zur Bindung der DNS	3 ml
Positivkontrolle	20 µl
Negativkontrolle	20 µl
Lösung zum Blocken	20 ml
Antikörper zur Erfassung	8 µl
Antikörper zur Detektion	20 µl
Verstärkerlösung	20 µl
Entwicklungslösung	10 ml
Stoplösung	6 ml

8.3.2 Durchführung

1. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die jeweilige Konzentration der DNA wurde mittels UV- Spektrophotometrie bestimmt (SmartSpec™ 3000, BIO RAD), durch Verdünnung auf einen Wert von 100 µg DNA/ ml H₂O (100 ng/ µl) eingestellt und 30 Sekunden durchmischt (Vortex, Heidolph Reax control).
2. In die insgesamt 96 Vertiefungen (Wells) der Testplatte wurden jeweils 28 µl der DNA-bindenden Lösung pipettiert.
3. Von jeder Probe wurden 2µl entnommen und in eine Vertiefung des Assay pipettiert; dies wurde für jede Probe 3mal durchgeführt, so dass von jeder Probe der Anteil der methylierten DNA 3mal gemessen werden kann. Die Positivkontrolle wurde mit der DNA-bindenden Lösung im Verhältnis 1:20 verdünnt; von dieser Lösung wurden 2 µl in eine Vertiefung des Assay pipettiert (jeweils 3mal). Es wurden 2 µl der Negativkontrolle in eine Vertiefung des Assay pipettiert (jeweils 3mal). Der Rahmen wurde geschwenkt, so dass die Lösung den gesamten Bodenbelag bedeckte. Die Inkubation der Proben erfolgte im Thermocycler (Biometra Compact Line OV4) zunächst 40 Minuten bei 37 °C, danach 40 Minuten bei 60 °C, bis die Lösung vollständig verdunstet war.
4. Den Proben wurden jeweils 150 µl der Blockadelösung mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette zugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation im Thermocycler bei 37 °C wurde der Überstand entfernt, 150 µl Waschpuffer (Verdünnung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10) zugegeben und wieder abgesaugt. Der Waschvorgang wurde 2mal wiederholt.
5. Die Lösung mit dem Antikörper wurde mit dem Waschpuffer auf 1 µg/ ml verdünnt (Verhältnis 1:1000); von dieser verdünnten Lösung wurden jeweils 50 µl mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette zu jeder Probe hinzugefügt. Nach einer 60minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert, 150 µl verdünnter Waschpuffer zugegeben und wieder abgesaugt. Der Waschvorgang wurde 3mal wiederholt.
6. Die Detektorlösung wurde mit dem verdünnten Waschpuffer im Verhältnis 1:5000 verdünnt; von dieser Lösung wurden jeweils 50 µl mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette zu jeder Probe hinzugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert, 150 µl verdünnter Waschpuffer zugegeben und wieder abgesaugt. Der Waschvorgang wurde 4mal wiederholt.
7. Die Verstärkerlösung wurde mit dem verdünnten Waschpuffer im Verhältnis 1:5000 verdünnt; von dieser Lösung wurden jeweils 50 µl mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette

zu jeder Probe hinzugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert, 150 µl verdünnter Waschpuffer zugegeben und wieder abgesaugt. Der Waschvorgang wurde 4mal wiederholt.

8. Jeweils 100 µl der Entwicklungslösung wurden mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette zu jeder Probe hinzugefügt und in der Dunkelkammer für 2,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine Blaufärbung der Proben eintrat. Es wurden dann jeweils 50 µl der Stopplösung mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette zu jeder Probe hinzugefügt, woraufhin sofort ein Farbumschlag zu gelb eintrat.
9. Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung erfolgt die Absorptionsmessung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 630 nm) mittels ELISA Mikroplatten Reader (Tecan Sunrise ELISA Reader).

8.4 Präparation des Hypothalamus

Das Gehirn wurde auf der Konvexität so plaziert, dass die basalen Strukturen oben lagen. Schnitt 1 erfolgte transversal durch das Chiasma opticum, Schnitt 2 transversal caudal der Corpora mammillaria und rostral der Pons (Abbildung 26, Teil A). Die entstandene Scheibe wurde auf die caudale Schnittfläche gelegt. Schnitt 3 und 4 wurden als Verlängerung der Capsula interna in der sagittalen Ebene geführt, Schnitt 5 horizontal in Höhe der Commissura anterior (Abbildung 26, Teil B). Der entstandene Block enthielt den Hypothalamus und wurde in ein 2ml-Kryo-Probengefäß überführt.

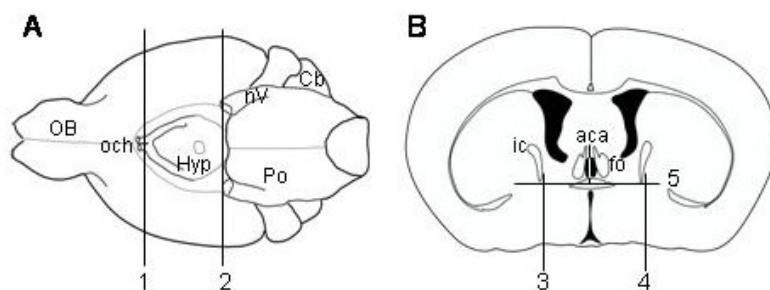


Abbildung 26: Schnittführung zur Hypothalamuspräparation (Schnitt 1-5)

Abkürzungen: aca, Commissura anterior; Cb, Cerebellum; fo, Fornix; ic, Capsula interna; Hyp, Hypothalamus; nV, Nervus trigeminus; Po, Pons; OB, Bulbus olfactorius; och, Chiasma opticum

8.5 Isolierung der RNA aus dem Hypothalamusgewebe

1. Das aufgetaute Hypothalamusgewebe wurde in 1 ml QIAzol Lysis Reagent homogenisiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Probe wurde für 15 sec auf dem Vortex gemischt und danach erneut für 2 - 3 min bei RT inkubiert.
2. Nach Zentrifugation bei 12.000 g bei 4°C für 15 min wurde die obere (wässrige) Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 1 Vol 70 % Äthanol zugegeben und gevortext.
3. Die Probe wurde auf eine RNeasy-Säule gegeben, die für 15 sec bei mindestens 8000 x g zentrifugiert wurde. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule nacheinander mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal je 500 µl RPE-Puffer gewaschen.
4. Abschließend erfolgte die Elution der RNA mit 30 - 50 µl RNase-freiem Wasser.

8.6 Zusammensetzung des Standardfutters

ssniff® R/M-H

Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen



Beschreibung

Dieses Futtermittel ist für Ratten und Mäuse im Erhaltungsstoffwechsel vorgesehen. Aufgrund der ausgewogenen Nährstoffkonzentrationen bei mittlerer Energiedichte und niedrigem Nitrosamin-Gehalt ist es auch als Basisfutter für Langzeitstudien gut geeignet.

Rohnährstoffe

	[%]
Trockensubstanz	87,7
Rohprotein (N x 6,25)	19,0
Rohfett	3,3
Rohfaser	4,9
Rohasche	6,4
N-freie Extraktstoffe	54,1
Stärke	36,5
Zucker	4,7

Energie

	[MJ/kg]
Bruttoenergie (GE)	16,3
Umsetzbare Energie (ME) *	12,8



Mineralstoffe

	[%]
Calcium	1,00
Phosphor	0,70
Natrium	0,24
Magnesium	0,22
Kalium	0,91
Fettsäuren	[%]
C 14:0	0,01
C 16:0	0,47
C 16:1	0,01
C 18:0	0,08
C 18:1	0,62
C 18:2	1,80
C 18:3	0,23
C 20:0	0,01
C 20:1	0,02
C 20:5	----
C 22:6	----

Aminosäuren

	[%]
Lysin	1,00
Methionin	0,30
Met+Cys	0,65
Threonin	0,68
Tryptophan	0,25
Arginin	1,14
Histidin	0,44
Valin	0,88
Isoleucin	0,76
Leucin	1,30
Phenylalanin	0,85
Phe+Tyr	1,43
Glycin	0,80
Glutaminsäure	3,90
Asparaginsäure	1,61
Prolin	1,25
Alanin	0,79
Serin	0,89

Vitamine

	per kg
Vitamin A	15.000 IE
Vitamin D ₃	1.000 IE
Vitamin E	110 mg
Vitamin K (als Menadion)	5 mg
Thiamin (B ₁)	18 mg
Riboflavin (B ₂)	23 mg
Pyridoxin (B ₆)	21 mg
Cobalamin (B ₁₂)	100 µg
Nicotinsäure	135 mg
Pantothensäure	43 mg
Folsäure	7 mg
Biotin	525 µg
Cholin-Cl	2.990 mg
Inositol	100 mg
Spurenelemente	per kg
Eisen	179 mg
Mangan	69 mg
Zink	94 mg
Kupfer	16 mg
Iod	2,2 mg
Selen	0,3 mg
Cobalt	2,1 mg

Futterzusammensetzung

absteigende Reihenfolge der Gruppen (RM)
Getreide und Getreidenebenprodukte, Ölsaatenprodukte, Mineralstoffe, pflanzliche Öle, Vitamine, Spurenelemente.

Energiedichte [MJ ME/kg] und Protein/Energie-Verhältnis [g XP/MJ ME]

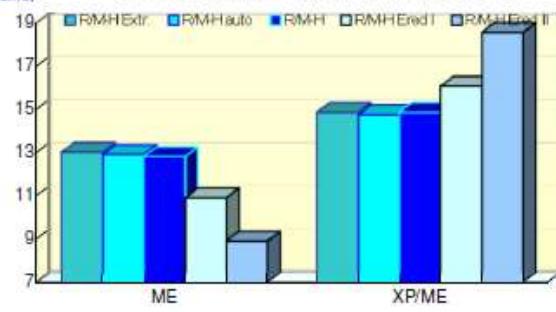
* ME berechnet nach der Schätzformel für Schweine, Anlage 4 der Futtermittelverordnung

Hauptprodukte

V1530-0 Mehl, einfach vermahlen
V1534-0 10 mm Pellets
V1535-0 15 mm Pellets

Produktion und Vertrieb

ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail: mail@ssniff.de
www.ssniff.de



Status: 08/2005

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift „Einfluss einer methylreichen Ernährung während der Schwangerschaft auf die globale DNA-Methylierung verschiedener Organgewebe sowie die hypothalamische Genexpression im Mausmodell“ selbst verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie zur Hilfeleistung herangezogene Personen und Institutionen vollständig genannt sind. Die Arbeit ist zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt worden.

Horn- Bad Meinberg

20.01.2017

B.Bruen

Ort

Datum

Unterschrift