

De novo-Methylierung

5-Methylcytosin als wichtiger Regulator in der Genetik

ANJA NAUMANN¹, NORBERT HOCHSTEIN¹, STEFANIE WEBER¹,
WALTER DOERFLER^{1, 2}

¹INSTITUT FÜR VIROLOGIE, UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

²INSTITUT FÜR GENETIK, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

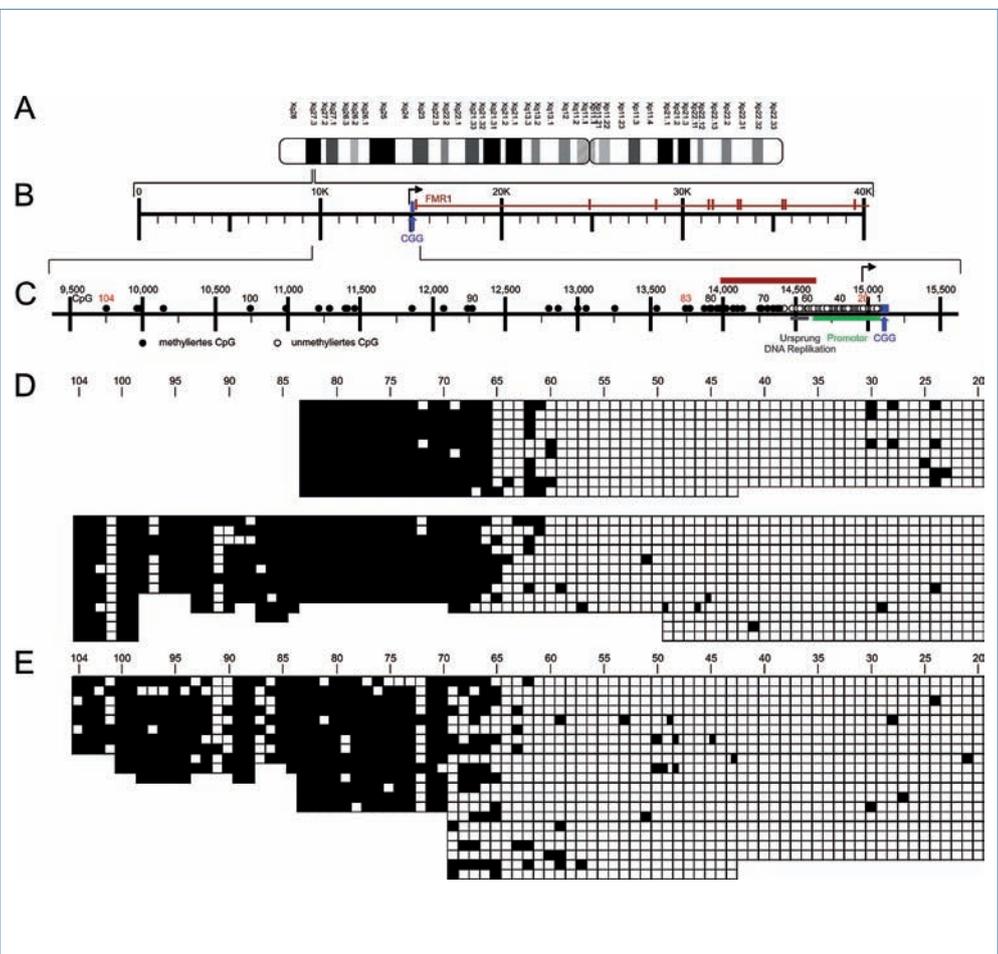
In der DNA vieler Organismen spielt das 5-Methylcytosin eine wichtige Rolle bei der langfristigen Abschaltung von Genen. Hier werden zwei Projekte vorgestellt: (i) DNA-Methylierung in der Promotor-Region des *FMR1*-Gens. (ii) *de novo*-Methylierung fremder DNA nach Integration in ein Säuger genom.

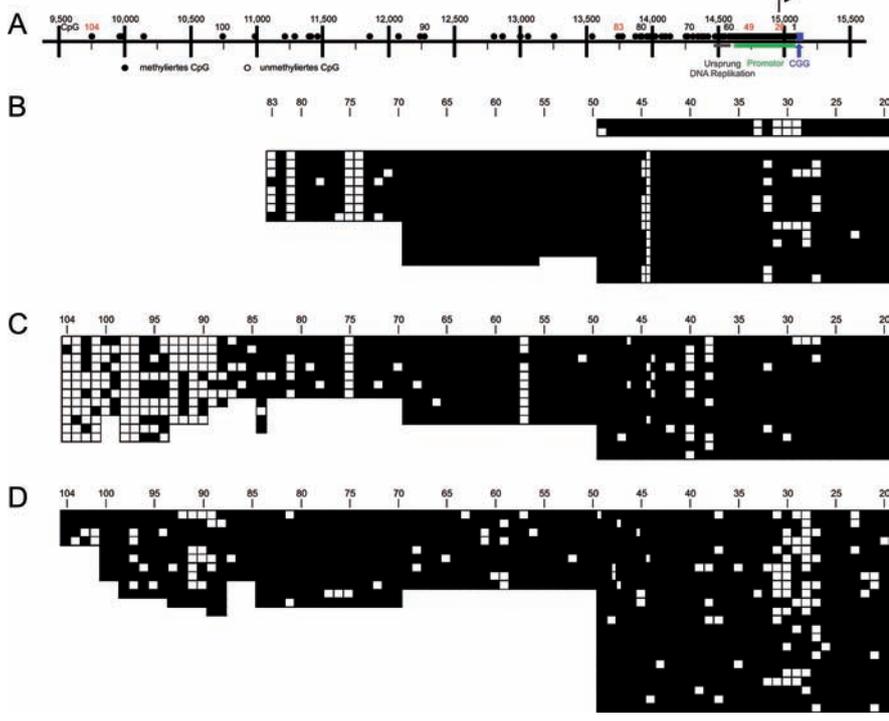
In the DNA of many organisms, 5-methylcytosine plays a major role in the long-term inactivation of genes. Here, two projects are described: (i) DNA methylation in the promoter region of the *FMR1* gene. (ii) The *de novo* methylation of foreign DNA integrated into a mammalian genome.

DNA-Methylierung – ein langfristiges genetisches Abschaltsignal

■ Unsere Arbeitsgruppe hat sich seit Mitte der 1970er-Jahre auf Untersuchungen zur Funktion eines der wesentlichen Regulationsprinzipien in der Genetik konzentriert, nämlich der des fünften Nukleotids 5-Methylcytosin (5-mC). Die Genome von Säugetieren und Pflanzen sind charakterisiert durch spezifische Verteilungsmuster von 5-mC. Diese Muster können in unterschiedlichen Zellarten verschieden sein und sind zum Teil äußerst stabil, können aber auch modifiziert werden, vor allem während der Entwicklung oder durch Umwelteinflüsse. Bei vielen Krankheiten, insbesondere bei Tumoren, sind gravierende Störungen in den Mustern der DNA-

► **Abb. 1:** Scharfe Grenze der DNA-Methylierung zwischen dem *FMR1*-Promotor und der davor gelegenen Region des Genoms. **A**, Schema des menschlichen X-Chromosoms. **B**, Karte der Region 27.3 des langen Arms des X-Chromosoms. *FMR1*-Gen: rot; CGG-Repetition: blau; Maßstab in 10.000 Nukleotiden (10K). **C**, vergrößerter Ausschnitt der Karte. Promotor: grün; Pfeil: Startpunkt der Transkription des *FMR1*-Gens; ein Ursprung der DNA-Replikation: grau. **D, E**, Die CGG-Paare sind zusammengedrängt dargestellt (□: unmethyliert; ■: methyliert), und zwar für beide Stränge der DNA aus menschlichen Tumorzellen (**D**) bzw. für nur einen DNA-Strang aus primären menschlichen Hautzellen (**E**). Die analysierte DNA stammt jeweils aus männlichen Zellen. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der CGG-Paare von der CGG-Repetition an aufwärts gezählt. Jede Reihe von links nach rechts entspricht dem Muster der Methylierung in einem Molekül, einem Chromosom; jede Spalte von oben nach unten einem CGG-Paar, dessen Methylierungsstatus jeweils in mehreren Molekülen überprüft worden ist. Die CGG-Paare sind in dieser Darstellung zusammengedrängt; ihr Abstand entspricht nicht demjenigen im Genom (aus [1]).





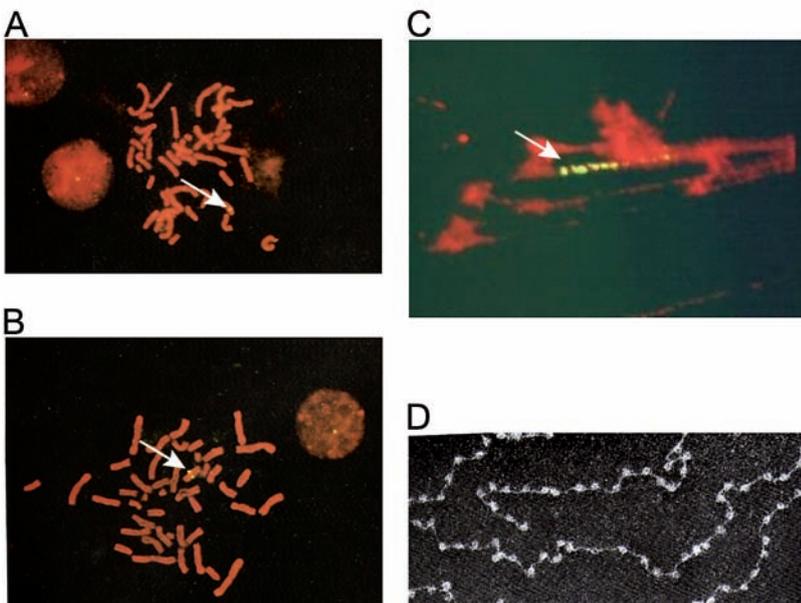
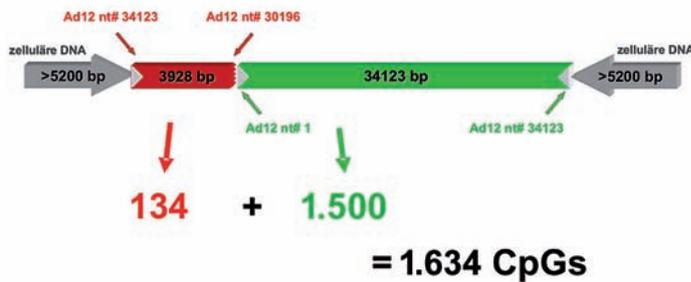
◀ **Abb. 2:** Verlust der scharfen Grenze der DNA-Methylierung im *FMR1*-Promotor von Individuen mit dem Fragilen X-Syndrom (FRAXA). Die Art der Darstellung und die Symbole entsprechen denjenigen in Abbildung 1A, Karte der Region. B–D, Methylierungsprofile in drei verschiedenen FRAXA-Individuen (aus [1]).

Methylierung bestimmter Gene und Genomabschnitte beschrieben worden.

Unsere Beiträge zur DNA-Methylierung zeigten, dass fremde DNA, die in ein etabliertes Genom integriert wird, *de novo* methyliert wird, was zur Abschaltung der fremden Gene führt. Die Methylierung zellulärer Promotoren wird als ein genetisches Signal zur langfristigen Abschaltung von Genen und als ein evolutionär alter Abwehrmechanismus verstanden. Diese langfristige Abschaltung spielt insbesondere während der Embryonalentwicklung eine große Rolle. Das Wiederanschalten von eigentlich langfristig abgeschalteten Genen kann z. B. bei der Entstehung von Tumorkrankheiten von Bedeutung sein. Auch bei der experimentellen Einführung fremder Gene in die Genome der verschiedensten Lebewesen kommt es häufig zur Abschaltung dieser Gene durch Promotor-Methylierung. Bei Versuchen zur Genterapie oder bei der Herstellung genmanipulierter transgener Organismen kommt es dadurch oft zur unerwünschten Abschaltung der künstlich eingeführten Gene.

Im Folgenden werden zwei Beispiele zur *de novo*-Methylierung von DNA beschrieben.

Struktur des Ad12-Integrates in der Zelllinie TR12



Das Fragile X-Syndrom (FRAXA)

FRAXA ist die zweithäufigste Ursache der geistigen Behinderung des Menschen. Ursächlich für diese Krankheit ist der Ausfall des auf dem menschlichen X-Chromosom encodierten *FMR1*-Gens sowie seines Produkts, des FMR1-Proteins, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription vieler Gene spielt. Dieser Funktionsverlust des

◀ **Abb. 3:** Integration von fremder, Adenovirus-Typ-12(Ad 12)-DNA in die DNA von Hamsterzellen. Das Schema (oben) zeigt ein integriertes intaktes Ad 12-DNA-Molekül (grün) und ein Bruchstück eines zweiten Ad 12-DNA-Moleküls (rot) in Hamster-DNA (graue Pfeile). A, B, Die an einer Stelle in das Hamsterchromosom (rot) integrierte Ad 12-DNA ist gelb markiert (weiße Pfeile). C, Das Chromosom aus A ist gestreckt, und man erkennt jetzt die zehn bis 15 Ad 12-DNA-Moleküle (Zelllinie T637, weißer Pfeil). In der Zelllinie TR 12, in der das Methylierungsmuster der integrierten Ad 12-DNA in Abbildung 4 analysiert wurde, sind nur ein Molekül und das Bruchstück eines zweiten übrig geblieben (B). D, Nukleosomenstruktur von integrierten Ad 12-Genomen in der Hamster-DNA (aus [2]).

FMR1-Gens ist durch die Inaktivierung des *FMR1*-Promotors (Regulators) durch *de novo*-Methylierung bedingt. Damit in Verbindung steht außerdem die Expansion einer CGG-Repetition im Endbereich dieses Gens. In begrenzter Länge kommt diese Wiederholung der genetischen Buchstabenfolge CGG normalerweise bei allen Menschen im ersten Exon des *FMR1*-Gens vor (**Abb. 1**). Aus unbekannten Gründen ist diese Repetition beim FRAXA extrem verlängert.

Wir haben das Methylierungsprofil in der Promotor-Region des menschlichen *FMR1*-Gens analysiert [1] und dabei entdeckt, dass etwa 700 bis 800 Nukleotide (66 bis 70 CpG-Paare) oberhalb der CGG-Repetition eine scharfe Grenze der DNA-Methylierung liegt (**Abb. 1D, E**). Diese scharfe Grenze findet sich in allen menschlichen Zellarten, in Zelllinien, in embryonalen und in Tumorzellen, ist aber beim FRAXA verloren gegangen (**Abb. 2**). Das Vorkommen dieser Grenze an der gleichen Stelle im Genom der Maus mit einer Sequenzübereinstimmung in dieser Region von nur 46,7 Prozent spricht für die allgemeine Bedeu-

tung dieser Grenze zwischen einem methylierten Genombereich und dem unmethylierten Promotor des *FMR1*-Gens. Die DNA der Grenzregion (roter Balken in **Abb. 1C**) bindet spezifisch an menschliche Kernproteine. Sie bildet eine Barriere für die Ausbreitung der DNA-Methylierung und hält den *FMR1*-Promotor damit unmethyliert und aktiv. Weshalb der Promotor beim FRAXA *de novo* methyliert wird, ist bisher unbekannt. Möglicherweise spielt dabei auch die Nähe des Promotors oder der Grenzregion zu einem Ursprung der DNA-Replikation (**Abb. 1C, 2D**) eine wichtige Rolle. Grenzregionen der DNA-Methylierung könnten für das Verständnis der Regelfunktion von 5-mC entscheidend sein.

De novo-Methylierung fremder integrierter DNA

Als ein Beispiel der *de novo*-Methylierung fremder integrierter DNA haben wir das Profil der DNA-Methylierung in einem Transgenom in Ad12(Adenovirus Typ 12)-induzierten Hamstertumorzellen bestimmt [1]. Die DNA der untersuchten Hamstierzelle

TR12 trägt ein nahezu intaktes Ad12-DNA-Molekül (34.125 Nukleotide) und ein 3.928 Nukleotide langes Bruchstück eines zweiten Ad12-DNA-Moleküls, die beide kovalent aneinander gebunden und in die zelluläre DNA integriert sind (**Abb. 3**). Die Ad12-DNA im Viruspartikel ist nicht methyliert. Nach Infektion der Hamstierzelle und Integration der Ad12-DNA in das Genom der transformierten Zelle wird die Ad12-DNA, wie jede fremde DNA, fast vollständig, aber selektiv *de novo* methyliert (**Abb. 4**). Nur die an den Enden gelegenen Abschnitte der integrierten Ad12-DNA, die E4-Region, bleibt unmethyliert und wird aktiv transkribiert. Wahrscheinlich ist die ungehemmte Aktivität der viralen E4-Region für das Wachstum der TR12-Zellen von Bedeutung. Die integrierte Ad12-DNA wird wie die zelluläre DNA in Nukleosomen mit H3- und H4-Histonen verpackt. In den abgeschalteten Genombereichen der Ad12-DNA sind die Histone H3 und H4 nicht acetyliert, können damit an die Ad12-DNA-Bereiche binden und zu ihrer Abschaltung beitragen [2].



▲ **Abb. 4:** Methylierungsprofil der integrierten Ad12-DNA in der Zelllinie TR12. Alle 1.634 CG-Paare in den integrierten Ad12-Genomen der Zelllinie TR12 (Abb. 3) sind auf ihren Methylierungszustand hin analysiert worden [2]. Symbole wie in Abbildung 1 erklärt. Jede Zeile entspricht einem integrierten Ad12-DNA-Molekül (aus [2]).

Fazit

In der DNA vieler Organismen spielt das fünfte Nukleotid 5-mC eine wichtige Rolle bei der langfristigen Abschaltung von Genen und wahrscheinlich auch bei der Organisation der DNA in Chromosomen.

Danksagung

Die hier beschriebenen Arbeiten aus unserem Laboratorium wurden unterstützt durch die Fritz Thyssen Stiftung, Köln, durch

amaxa/Lonza, Köln sowie das Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Erlangen.

Literatur

- [1] Naumann A, Hochstein N, Weber S et al. (2009) A distinct DNA methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 85:606–616
- [2] Hochstein N, Muiznieks I, Mangel L et al. (2007) The epigenetic status of an adenovirus transgenome upon long-term cultivation in hamster cells. *J Virol* 81:5349–5361

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Walter Doerfler
Institut für Klinische und Molekulare Virologie
Universität Erlangen-Nürnberg
Schlossgarten 4
D-91054 Erlangen
Tel.: 09131-85-26002
walter.doerfler@viro.med.uni-erlangen.de

AUTOREN



Walter Doerfler, Anja Naumann, Norbert Hochstein, Stefanie Weber (v. li. n. re.).

Anja Naumann

Jahrgang 1983. 2002–2007 Biologiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2007 Promotionsarbeit.

Stefanie Weber

Jahrgang 1981. 2002–2007 Biologiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2007 Promotionsarbeit.

Norbert Hochstein

Jahrgang 1977. 1997–2003 Biologiestudium an der Universität zu Köln. 2003–2007 Forschung am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg. 2007 Promotion (Universität zu Köln). 2007–2008 Feodor Lynen-Forschungsspendium am Institut für Genetik und

Pathologie, Universität Uppsala, Schweden. Seit 2008 Leiter in der F&E-Abteilung der Qiagen GmbH, Hilden.

Walter Doerfler

Jahrgang 1933. 1952–1958 Medizinstudium an der LMU München. 1959 Promotion. 1961 Approbation als Arzt. 1961–1963 MPI für Biochemie, München. 1963–1966 Department of Biochemistry, Stanford University, USA. 1966–1978 Professor, Rockefeller University, New York, USA. 1972–2002 Professor am Institut für Genetik, Universität zu Köln. Seit 2002 Professor emeritus activ, Universität zu Köln und Gastprofessor am Institut für Virologie, Universität Erlangen.