

DNA-Methylierung – ein wichtiges genetisches Signal in Biologie und Pathogenese

Walter Doerfler

Institut für Genetik, Köln
Institut für Klinische und Molekulare
Virologie, Erlangen

Zusammenfassung

Das 5. Nukleotid, 5-mC, in der DNA ist in spezifischen Mustern im Genom angeordnet und erfüllt wichtige genetische Funktionen bei der langfristigen Abschaltung von Genen und bei der Strukturierung des Chromatins. Die spezifischen 5-mC Profile im menschlichen Genom, die in jedem Genomabschnitt und in jeder Zellart unterschiedlich sein können, sind daher von großer Bedeutung für das Verständnis der Genexpression auf den verschiedensten Ebenen: Inaktivierung eines der X Chromosomen, „genetic imprinting“, für wichtige Regelfunktionen bei der Entwicklung, für die Erklärung der Pathogenese genetischer Erkrankungen und von Tumorerkrankungen. Der vorliegende Artikel gibt eine Einführung in die Grundlagen und Konzepte der DNA-Methylierung.

Schlüsselwörter

Promotorinaktivierung, Chromatinstruktur, Insertion fremder DNA, de novo Methylierung, Zelluläre Methylierungs- und Transkriptionsmuster.

DNA Methylation – an Important Genetic Signal in Biology and Pathogenesis

Summary

In the mammalian genomes, the fifth nucleotide, 5-mC, in DNA is arranged in specific patterns and serves important functions in long-term gene silencing and in the organization of chromatin structure. The specific methylation profiles in human DNA are different from genome segment to genome segment and also in different cell types. For technical reasons, the analysis of DNA methylation patterns had not been included in the human genome project but will be paramount to understand the regulation of gene expression at many different levels and in many systems: Inactivation of one of the X chromosomes, genetic imprinting, regulation of gene expression during embryonic development, pathogenesis of genetic and tumor diseases. This article presents an introduction into the concepts and facts of DNA methylation.

Keywords

Long-term promoter inactivation, chromatin structure, foreign DNA insertion, de novo methylation, cellular methylation and transcription profiles

Einleitung

Unter dem Schlagwort „DNA methylation“ finden sich im August 2005 in PubMed 9419 Eintragungen; unter „DNA methylation and gene expression“ sind 4021 Zitate gespeichert. Seitdem man erkannt hat, dass die Einführung des fünften Nukleotids, 5-Methyldeoxycytidin (5-mC), in Promotorsequenzen direkt oder indirekt in Zusammenhang mit der Regulation der Genaktivität steht, ergaben sich zahlreiche Hinweise für eine allgemeine Bedeutung dieser DNA-Modifikation für viele essentielle genetische Funktionen: Bei der Inaktivierung eines der X Chromosomen, bei der differentiellen Inaktivierung von Genen während der Embryonalentwicklung, beim „genetic imprinting“, d.h. bei der Inaktivierung der Gene auf einem der beiden homologen Chromosomen, bei Veränderungen der Genaktivität in vielen Tumorerkrankungen, bei der Verursachung von genetischen Krankheiten u.a. In dieser Arbeit möchte ich einige grundlegende Ergebnisse und Konzepte aus der Forschung über DNA-Methylierung zusammenfassen, die für das Verständnis der Bedeutung der DNA-Methylierung in epigenetischen Prozessen und bei vielen biomedizinischen Anwendungen hilfreich sein werden.

Der Begriff Epigenetik wird in der Literatur weit verbreitet angewandt und häufig in Zusammenhang mit Mustern der DNA-Methylierung oder deren Änderungen gebracht. Allerdings sind alle Phänomene, die unter Epigenetik beschrieben werden, Ausdruck elementarer genetischer Mechanismen,

die erst erklärbar geworden sind, seit man die Funktion des fünften Nukleotids in der DNA zu verstehen versucht. Daher erscheint mir der Terminus *Epigenetik* historisch zwar begründbar aber eigentlich überflüssig, es sei denn man wollte damit andeuten, dass wichtige genetische Mechanismen mit Mendel'scher Genetik allein nicht zu verstehen sind.

Auf wenigen Seiten kann man ein komplexes Gebiet der Genetik, wie das der DNA-Methylierung, nur schlaglichtartig behandeln. Ich verweise daher auf eine Sammlung von 25 Artikeln über DNA-Methylierung – sowohl zur Grundlagen- wie zur angewandten Forschung, die in zwei Bänden der Serie *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Doerfler und Böhm, Hrsg., 2005/6) gegenwärtige Forschungsergebnisse auf diesem faszinierenden Gebiet zusammenfassen.

Historische Vorbemerkungen

Das fünfte Nukleotid, 5-Methyldeoxythymidin (5-mC), wurde 1925 in der DNA von Tuberkelbazillen durch Johnson and Coghill und 1948 in Kalbsthymus DNA von Hotchkiss entdeckt. Hier das Zitat aus Rollin Hotchkiss' Arbeit im *Journal of Biological Chemistry*: ... *a minor constituent designated „epicytosine“ is indicated, having a migration rate somewhat greater than that of cytosine. This small peak has been observed repeatedly in the chromatographic patterns from acid hydrolysates of a preparation of calf thymus deoxyribonucleic acid*

Natürlich spielen 5-mC und das zweite methylierte Nukleotid N⁶-Methyladenosin (N⁶m-A), das bei Säugern bisher nicht gefunden wurde, bei der Erklärung der Phänomene Restriktion und Modifikation bakterieller DNA und Phagen-DNA (Arber and Linn, 1969) eine entscheidende Rolle.

Die Diskussion um eine mögliche, damals noch hypothetische Funktion von 5-mC auch bei Eukaryonten wurde durch die Arbeiten von Riggs (1977) und Holiday and Pugh (1977) eröffnet. Durch Hemmung der DNA-Methyltransferasen (siehe unten) mit

einem Basenanalogue von Cytidin (C), dem 5-Azacytidin, konnte in undifferenzierten Fibroblasten die Regulation zahlreicher Gene so beeinflusst werden, dass in Kultur Zellen unterschiedlichster Gewebearten entstanden (Constantinides et al., 1977). Diese Resultate lieferten einen ersten wichtigen Hinweis darauf, dass Veränderungen in Methylierungsmustern von Säugergenen zur Aktivierung von Gengruppen führen konnten. Mit Hilfe des auch sonst für Untersuchungen molekularbiologischer Grundprinzipien sehr erfolgreichen Adenovirus-Systems konnte gezeigt werden, dass Promotormethylierungen und Geninaktivierung in kausaler Beziehung stehen (Sutter and Doerfler, 1980; Vardimon et al., 1980, 1982; Langner et al., 1984).

Der Nachweis von Proteinen, die spezifisch an methylierte DNA-Sequenzen zu binden vermögen, half zu verstehen, in welcher komplexen Weise modifizierte DNA-Sequenzen mit spezifischen Proteinen funktionell interagieren können (Huang et al., 1984; Meehan et al., 1989).

Im Laufe der Embryonalentwicklung von Säugern findet man umfassende Änderungen von Mustern der DNA-Methylierung. Zunächst ausgelöschte Muster werden nach dem Blastozystenstadium wieder *de novo* restituiert (Razin et al., 1984). Lange Zeit wurde vermutet, dass 5-mC in der DNA von *Drosophila melanogaster* nicht vorkommen würde. In Embryonalstadien von *Drosophila* spielen aber kleine Mengen von 5-mC eine funktionelle Rolle (Lyko et al., 2000).

Durch „gene targeting“ in embryonalen Stammzellen (ES) wurde eines der DNA-Methyltransferase-Gene mutiert. Nach Transfer der Mutation in die Keimbahn von Mäusen ergab sich ein rezessiv letaler Phänotyp (Li et al., 1992). Die durch den Verlust der DNA-Methyltransferase-Aktivität bedingte Minderung des 5-mC Gehaltes in der DNA von Mausembryonen führte zu Fehlbildungen und zum Tod der Embryonen. Diese Ergebnisse wiesen auf wichtige Funktionen der DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung hin.

Zur Biochemie der DNA-Methylierung

Die Methylgruppe am Cytidin wird während oder nach der DNA-Replikation durch DNA-Methyltransferasen meist in die Sequenz 5'-CG-3' eingeführt, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor dient. Die Methylgruppe liegt in der großen Grube der DNA-Doppelhelix. Die Verteilung von 5-mC im Genom ist nicht zufällig, sondern folgt stabilen, vererbaren Mustern, die spezifisch für Genomsegment und Zellart zu sein scheinen und interindividuell konserviert sein können. Zur Zeit liegen genaue Daten über die Muster der DNA-Methylierung im menschlichen Genom nur für ausgewählte DNA-Abschnitte vor (Doerfler, 2005).

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen zwei Arten der DNA-Methylierung: *de novo* Methylierung und *maintenance methylation*. Wird fremde DNA, z.B. die eines Virusgenoms (Sutter et al., 1978), in ein etabliertes Genom integriert, so wird diese fremde DNA häufig *de novo* methyliert, d.h. es wird einer zunächst unmethylierten DNA ein neues Muster der Methylierung aufgeprägt. Wahrscheinlich sind an dieser ***de novo* Methylierung** mehrere DNA-Methyltransferasen und andere Proteine der Zelle beteiligt. Auch die *de novo* Methylierung der DNA während früher Phasen der Embryonalentwicklung, in der es zur Ent- und anschließenden Remethylierung des Genoms kommt (Razin et al., 1984), könnte so erfolgen.

Bei der Methylierung während der normalen DNA-Replikation, die zur Aufrechterhaltung eines bereits bestehenden Musters der DNA-Methylierung dient (***maintenance methylation***), bleibt im Verlauf der semikonservativen Replikation der DNA das Muster der DNA-Methylierung in einem Strang erhalten. Dieses Muster kann für den neu synthetisierten Tochterstrang der DNA vom stehengebliebenen Methylierungsmuster im parental Matrizenstrang der DNA abkopiert und so übernommen werden. Man hat bisher vermutet, dass für diese Art der DNA-Methylierung nur eine DNA-Methyltransferase notwendig sei. Möglicherweise ist aber

auch diese Reaktion komplizierter. Das oben erwähnte Cytidin-Derivat 5-Azacytidin hemmt diese DNA-Methylierung, indem es vorübergehend kovalent an die DNA-Methyltransferase bindet und so zum teilweisen Verlust der DNA-Methylierung im Genom führt.

DNA-Methylierungsmuster können passiv ausgelöscht werden, indem in aufeinanderfolgenden Replikationszyklen der DNA die Methyltransferasen natürlich oder künstlich gehemmt werden. Es ist letztlich noch ungeklärt, ob es auch ohne DNA-Replikation zu einer aktiven Demethylierung, etwa durch Demethylasen in der Zelle kommen kann.

Im *Humangenomprojekt*, dessen Bedeutung auch für die Molekulare Medizin unbestreitbar ist, wurde das fünfte Nukleotid, 5-mC, in der menschlichen DNA „übersehen“. Damit fehlen für die Forscher, die an der Funktion dieser DNA-Modifikation interessiert sind, wesentliche 20% der Genominformation. Technisch wäre es allerdings nicht möglich gewesen, die Genomsequenz mit vertretbarem Zeitaufwand fertigzustellen, hätte man auch alle 5-mC Nukleotide bestimmen wollen. Neuere Bestrebungen versuchen diese Versäumnisse mit einem *Human Epigenome Project* nachzuholen (Rakyan et al., 2004).

Hier muss kurz auf die Methoden zum Nachweis von 5-mC eingegangen werden. Zunächst hat man dazu auf Methylierung empfindliche Restriktionsendonukleasen verwendet, insbesondere das Endonukleasenpaar HpaII und MspI. Beide Enzyme erkennen die Nukleotidsequenz 5'-CCGG-3', aber nur MspI schneidet die unmethylierte und die methylierte Sequenz. HpaII wird durch 5-mC gehemmt (Waalwijk and Flavell, 1978). Ein enzymatischer Ansatz kann aber nie alle 5-mC Nukleotide unabhängig von der Sequenzkombination erfassen. Dazu wird eine Technik angewandt, die alle 5-mC Nukleotide durch genomisches Sequenzieren zu bestimmen erlaubt (Frommer et al., 1992). Um die der DNA aufgeprägten 5-mC Muster vollständig zu erkennen, darf man indivi-

duelle DNA-Segmente nicht, wie beim üblichen Sequenzieren von DNA, molekular in einem Vektor klonieren oder PCR-Produkte direkt sequenzieren, weil dabei die ursprünglichen Methylierungsmuster verloren gehen würden. Man muss vielmehr individuelle DNA-Abschnitte direkt – genomisch – sequenzieren. Dazu wird, kurz zusammengefasst, die folgende Methode angewandt. Die DNA wird durch 0.3N Alkali vollständig denaturiert und anschließend mit Bisulfit behandelt, wodurch alle C's in Uridin (Us) umgewandelt werden, während alle 5-mCs gegenüber dieser Reaktion refraktär sind. Jetzt werden die Genomabschnitte, deren Methylierungsmuster erfasst werden sollen, mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Produkte werden kloniert, und die Nukleotidsequenz von etwa 10 Klonen wird ermittelt. Nach unserer Erfahrung ist es essentiell, einzelne DNA-Moleküle zu klonieren und zahlreiche Klone zu sequenzieren, um Artefakte zu vermeiden, die entstehen könnten, falls man PCR Produkte direkt sequenzieren würde. Durch die PCR werden alle U's in A's bzw. T's umgewandelt. In der Endsequenz verbleibende C's sind auf 5-mC's in der ursprünglichen genomischen Sequenz zurückzuführen. Durch Kontrollexperimente wird verifiziert, daß alle C's in T's umgewandelt worden sind. Dazu wird DNA bekannter Nukleotidsequenz entweder unmethyliert oder nach *in vitro* Methylierung mit der DNA-Methyltransferase SssI, die alle 5'-CG-3'-Dinukleotide methyliert, mit der Bisulfit-Sequenzierungsmethode analysiert. Mit dieser Methode, die heute zum Standard für Arbeiten über DNA-Methylierung geworden ist, kann man alle 5-mC's unabhängig von Position oder Nachbarsequenz erfassen. Viele verallgemeinernde Aussagen über die Funktion der DNA-Methylierung, die nicht auf dieser Methode beruhen, sind möglicherweise unvollständig und kritisch zu hinterfragen.

Konzept zu den Funktionen von 5-mC in der DNA

Soweit bisher bekannt, ist 5-mC das einzige modifizierte Nukleotid in der DNA von Säugern. Die am weitesten akzeptierte Funktion von 5-mC in der

Nukleotidsequenz von Promotoren ist verbunden mit der langfristigen Abschaltung von Genen (Doerfler, 1983). Man sollte die Funktionen von 5-mC in der DNA aber in einem tieferen Sinn verstehen. Als hilfreiche und durchaus relevante Analogie kann die Wirkung von modifizierten DNA-Sequenzen auf die Aktivität von Restriktionsendonukleasen bei Prokaryonten verstanden werden. Eine große Anzahl dieser bakteriellen Enzyme wird durch modifizierte Nukleotide, 5-mC oder bei Bakterien auch durch N⁶-Methyladenosin (N⁶-mA), in ihrer Funktion beeinflusst (Übersicht bei McClelland and Nelson, 1988). Neben der Art der Modifikation (5-mC oder N⁶-mA) ist die **Position** in einer spezifischen Nukleotidsequenz entscheidend. In vielen aber nicht allen Fällen inhibiert 5-mC oder N⁶-mA in der Erkennungssequenz die Aktivität der Endonuklease. Die Restriktionsendonuklease DpnII aus *Diplococcus pneumoniae* wird durch N⁶-mA in der Sequenz G(N⁶-mA)TC inhibiert. Dagegen ist die isoschizomere Endonuklease DpnI nur aktiv, wenn die identische Erkennungssequenz, G(N⁶-mA)TC, in beiden Strängen N⁶-mA methyliert ist. DpnI benötigt für seine Aktivität also N⁶-mA in der Erkennungssequenz, während DpnII dadurch gehemmt wird. Daraus ergibt sich die allgemein wichtige Erkenntnis, dass modifizierte Nukleotide die Interaktion mit spezifischen Proteinen in positiver **oder** negativer Weise beeinflussen können.

Es ist nicht vorhersagbar, in welcher Richtung sich eine Modifikation der Nukleotidsequenz auswirken kann; denn die Wirkungsweise der DNA-Modifikation hängt von der Erkennungssequenz in der DNA und dem dazu passenden Protein ab. Das gilt auch für die Inaktivierung von eukaryontischen Promotoren durch 5-mC. In vielen Fällen wird ein Promotor durch die Anwesenheit von 5-mC in einer spezifischen Promotorposition ab- oder heruntergeschaltet¹. Es gibt aber auch gegenteilige Beispiele. So sind die Promotoren und die gesamte DNA des Froschvirus FV3, eines Iridovirus, zwar vollständig 5'-CG-3' methyliert (Willis and Granoff, 1980), aber auch in Säugerzellen voll aktiv (Munnes et

al., 1995). Ihre Aktivität scheint sogar von dem hohen Methylierungsgrad abhängig zu sein.

Es bleibt also festzuhalten, dass die in der menschlichen DNA einzig bekannte Modifikation von DNA-Sequenzen, 5-mC, die Interaktionen **spezifischer** Nukleotidsequenzen mit **spezifischen** Proteinen moduliert, in Promotoren z.B. die von Transkriptionsfaktoren oder -inhibitoren. Die Auswirkung einer Modifikation hängt von dem spezifischen Protein und seiner Erkennungssequenz ab. Eine rein schematische Betrachtungsweise zu den Funktionen von DNA-Methylierung würde, wie bei anderen komplexen biochemischen Mechanismen, zu Fehleinschätzungen des weiten Spektrums biologischer Funktionen führen.

Die langfristige Abschaltung von Promotoren durch 5-mC, häufig in Kombination mit modifizierten Histonen (Allfrey et al., 1964, plus >1300 Literaturzitate), ist aber wahrscheinlich nur eine von mehreren Funktionen der DNA-Modifikation. Es ist nicht geklärt, ob die DNA- oder die Histon-Modifikation das primäre Ereignis bei der Promotorinaktivierung oder bei anderen Funktionen der DNA darstellt. Möglicherweise sind beide Arten der Modifikation untrennbar miteinander verbunden.

Eine allgemeinere Funktion von 5-mC liegt in der Organisation von Chromatin (477 Literaturstellen), und damit wirkt sich die Positionierung von 5-mC Nukleotiden auf viele Funktionen der DNA aus. Jeder Genomabschnitt ist charakterisiert durch hoch spezifische Muster in der Verteilung von 5-mC Nukleotiden. Die einzelnen Zellarten unterscheiden sich durch ihre spezifischen Transkriptionsprofile und Methylierungsmuster im Genom, worin sich ihre unterschiedlichen Funktionen manifestieren. Deshalb ist eine vollständige Analyse von Methylierungsmustern sehr aufwendig, denn man muss die gleichen DNA-Abschnitte aus verschiedenen Zellarten isolieren und mit der Bisulfit-Methode sequenzieren.

Beim Aufbau von Chromatin, von dessen Genomsegment-spezifischer Struktur alle Funktionen der DNA abhängig sind, ist 5-mC gewissermaßen die erste Instanz für die Modulation der funktionell vielfältigen Interaktionen der DNA mit spezifischen Proteinen. Je nach Art des Proteins wird die Gegenwart eines 5-mC Nukleotids die Bindung eines Proteins fördern, hemmen oder ganz verhindern. Dadurch wird ein Grundmuster des DNA-Proteinkomplexes „Chromatin“ festgelegt, von dem dann alle weiteren Protein-Protein- oder DNA-RNA-Protein-Wechselwirkungen abhängen, die letztlich die spezifische Struktur des Chromatins für jedes Segment in jeder Zellart durch ein charakteristisches Methylierungsmuster bestimmen. Offenbar weist jeder DNA-Abschnitt nicht nur ein spezifisches Methylierungsmuster auf, sondern besitzt auch ein Erinnerungsvermögen für dieses Muster. Integriert man unmethylierte spezifische DNA zurück in das homologe DNA-Segment im Genom der Zelle, so nimmt die inserierte unmethylierte DNA wieder das für diesen Genomlocus authentische Methylierungsmuster an (Hertz et al., 1999). Über die molekularen Strukturen oder Mechanismen, die diesem Erinnerungsvermögen zugrunde liegen, weiß man zur Zeit noch nichts.

De novo Methylierung fremder, in ein Genom integrierter DNA und die Folgen dieser Integration für die Methylierung zellulärer DNA

Wenn fremde, unmethylierte DNA, z.B. Adenovirus-DNA, in ein etabliertes Säuger- (Sutter et al., 1978) oder Pflanzengenom integriert wird, wird sie häufig *de novo* methyliert. Im Genom von Säugern sind die repetitiven, vor allem die retroviralen DNA-Sequenzen, die zusammen >90% des Genoms ausmachen, hypermethyliert. Man hat postuliert, dass die *de novo* Methylierung fremder DNA auf einem alten zellulären Abwehrmechanismus gegen die Aktivität fremder, bereits in das Genom eingedrungener Gene beruhen könnte (Doerfler, 1991; Yoder et al., 1997). In praktischer Hinsicht spielt diese *de novo* Methylierung deshalb eine wichtige Rolle, weil bei der Herstellung transgener Organismen, bei der Anwendung der knock-

in-Technologie, oder bei Insertionen fremder DNA, z.B. mit dem Ziel der Gentherapie, die fremden Gene schnell methyliert und möglicherweise inaktiviert werden können. Über den Mechanismus und die Voraussetzungen zur *de novo* Methylierung fremder DNA ist nur wenig bekannt. Wahrscheinlich hat vor allem die Umgebung der Insertionsstelle, an der die fremde DNA integriert wird, aber auch die Nukleotidsequenz des Integrates selbst einen Einfluss auf Ausmaß, Zeitpunkt und Muster der *de novo* Methylierung.

Monozygotische Zwillinge haben zwar einen identischen Genotyp, sind aber meist nicht völlig identisch. Dafür könnte es verschiedene Gründe geben, z.B. Unterschiede in der DNA Methylierung und der Modifikation von Histonen. Bei älteren, nicht bei neugeborenen, monozygotischen Zwillingen wurden kürzlich erhebliche Unterschiede im Gesamtgehalt und in der Verteilung von 5-mC und von acetylierten Histonen im Genom gefunden (Fraga et al., 2005). So könnten Diskordanzen im Auftreten genetisch bedingter Erkrankungen bei monozygotischen Zwillingen verständlich werden.

Es wird interessant sein, zu erforschen, ob in den repetitiven DNA-Sequenzen nicht nur spezifische Methylierungsmuster vorliegen, sondern ob dadurch auch neue Möglichkeiten für Codierungen zustandekommen könnten.

Fremde DNA gelangt in Organismen natürlich nicht nur durch Virusinfektionen, sondern fortlaufend in großen Mengen über die Nahrungsaufnahme. Im Gastrointestinaltrakt von Säugern wird diese fremde DNA zwar zum größten Teil abgebaut, Fragmente der DNA persistieren aber transient und in kleinen Mengen im Gastrointestinaltrakt und gelangen in verschiedene Organsysteme sowie in die Genome von Abwehrzellen. Diese Mechanismen haben wir am Modellorganismus Maus erstmalig nachweisen können (Schubbert et al., 1997).

Nach der Insertion fremder DNA in ein Säuger-genom kann es außerdem zu

Veränderungen der Methylierung in der zellulären DNA in der unmittelbaren Umgebung der Insertionsstelle kommen. Von noch allgemeinerem Interesse sind darüber hinaus weitreichende Veränderungen in den Methylierungsmustern der DNA von Zellen, in deren Genom fremde DNA integriert wurde (Heller et al., 1995). Von diesen Veränderungen, die die Methylierungs- und Transkriptionsmuster zellulärer Gene betreffen können, werden vor allem, aber nicht ausschließlich, repetitive zelluläre DNA-Sequenzen belangt. Diese bisher wenig untersuchten Mechanismen könnten auch bei der Onkogenese eine entscheidende Rolle spielen. Daher ist bei allen Manipulationen an etablierten Genomen, also bei der Herstellung transgener Organismen, bei knock-in- und knock-out-Protokollen, die Frage zu stellen, inwieweit es auch an anderen Stellen des Genoms als an der unmittelbaren Insertionsstelle zu strukturellen und funktionellen Veränderungen mit weitreichenden Folgen für die Zellen oder die betroffenen Organismen kommen könnte.

Anmerkung

1) Die Genetik kann man als älteste Sprache betrachten, ihre Prinzipien haben erstaunlich viele Gemeinsamkeiten mit denen von Sprachen (Doerfler, 1982). Durch die Einführung einer $-CH_3$ Gruppe an ein Cytidin wird die Funktion der betroffenen Nukleotidsequenz, z.B. in einem Promotor, elementar verändert. Vergleich: das Wort **Achtung** kehrt seinen Sinn durch eine kleine Modifikation um zu **Ächtung**.

Unterstützung

Die Arbeiten im Laboratorium des Autors wurden über viele Jahre von der DFG (SFB's 74 und 274), von der Wilhelm Sander-Stiftung, der Fritz Thyssen Stiftung sowie vom Zentrum für Molekulare Medizin Köln (TV 13) unterstützt.

Literaturliste

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:786-794.

Arber W, Linn S (1969) DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38:467-500.

Constantinides PG, Jones PA, Gevers W (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267:364-366.

Doerfler W (1982) In search of more complex genetic codes—can linguistics be a guide? *Med Hypotheses* 9: 563-579.

Doerfler W (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 52:93-124.

Doerfler W (1991) Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism - A proposal. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 372:557-564.

Doerfler W (2005) On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry (Moscow)* 70:505-524.

Doerfler W, Böhm P, editors (2005/6) On the biological function of DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, two volumes with 25 contributions, in press.

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

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-1831.

Heller H, Kämmer C, Wilgenbus P, Doerfler W (1995) Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5515-5519.

Hertz J, Schell G, Doerfler W (1999) Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 274:24232-24240.

Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187:226-232.

Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175:315-332.

Huang LH, Wang R, Gama-Sosa MA, Shenoy S, Ehrlich M (1984) A protein from human placental nuclei binds preferentially to 5-methylcytosine-rich DNA. *Nature* 308:293-295.

Langner KD, Vardimon L, Renz D, Doerfler W (1984) DNA methylation of three 5' C-C-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivates the E2a gene of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2950-2954.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.

Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408:538-540.

McClelland M, Nelson M (1988) The effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases - a review. *Gene* 74:291-304.

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58:499-507.

Munnes M, Schetter C, Hölker I, Doerfler W (1995) A fully 5'-CG-3' but not a 5'-CCGG-3' methylated late frog virus 3 promoter retains activity. *J Virol* 69:2240-2247.

Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A, Fischer J, Gut IG, Berlin K, Beck S (2004) DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* 2:e405

Razin A, Webb C, Szyf M, Yisraeli J, Rosenthal A, Naveh-Manly T, Sciaky-Gallili N, Cedar H (1984) Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2275-2279.

Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14:9-25.

Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice

reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:961-966.

Sutter D, Doerfler W (1980) Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:253-256.

Sutter D, Westphal M, Doerfler W (1978) Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* 14:569-585.

Vardimon L, Neumann R, Kuhlmann I, Sutter D, Doerfler W (1980) DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells. *Nucl Acids Res* 8:2461-2473.

Vardimon L, Kressmann A, Cedar H, Maechler M, Doerfler W (1982) Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1073-1077.

Waalwijk C, Flavell RA (1978) MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. *Nucl Acids Res* 5:3231-3236.

Willis DB, Granoff A (1980) Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CpG sequences. *Virology* 107:250-257.

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

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Walter Doerfler
Institut für Klinische und Molekulare Virologie
Universität Erlangen-Nürnberg
Schloßgarten 4
D-91054 Erlangen
Tel. 09131-852-6002
walter.doerfler@viro.med.uni-erlangen.de
walter.doerfler@uni-koeln.de