

DNA-Methylierung: Geninaktivierung durch sequenzspezifische DNA-Methylierungen

Von Walter Doerfler*

Bei molekularbiologischen Untersuchungen eukaryotischer Organismen spielt die Aufklärung der an der Regulation der Genexpression beteiligten Mechanismen eine wichtige Rolle. Alle Zellen eines Organismus enthalten die gleichen Gene, unterscheiden sich aber im Muster der Genexpression. Es gibt viele Hinweise darauf, daß das Expressionsmuster von Tumorzellen und normalen Zellen völlig verschieden ist. Ein eingehend untersuchtes molekulares Signal zur Regulation der Genexpression in Eukaryonten ist ein modifiziertes Nucleotid mit der Base 5-Methylcytosin (5-mC). An gut charakterisierten eukaryotischen Systemen konnte gezeigt werden, daß das Einfügen von 5-mC in spezifische Sequenzen, insbesondere in die Promotor-Regionen, eine Geninaktivierung bewirken kann. Studien an viralen und anderen eukaryotischen Systemen halfen, die Beziehung zwischen Ursache und Wirkung zu erkennen. Inaktive Gene sind häufig in der Promotor-Region hypermethyliert, aktive Gene sind hypomethyliert. Der biochemische Mechanismus, der einer Geninaktivierung durch Methylierungen spezifischer DNA-Sequenzen zugrunde liegt, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es ist vorstellbar, daß Promotor-Methylierungen die Bindung zellulärer Proteine beeinflussen, die am Erkennen des Promotors eines Gens beteiligt sind. Strukturveränderungen durch Methylierung der DNA in Promotor-Regionen könnten ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Wahrscheinlich ist die DNA-Methylierung ein Signal, das zur Langzeitinaktivierung von Genen führt, da man annehmen muß, daß DNA-Methylierungsmuster nur durch DNA-Replikation und gleichzeitige spezifische Inhibierung postreplikativer Methylierungen verändert werden können.

1. Einleitung

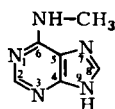
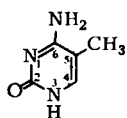
Der primäre genetische Code, die Nucleotidtriplets in Desoxyribonucleinsäure (DNA), und seine Rolle bei der Bestimmung der Aminosäuresequenz in Proteinen sind weitgehend erforscht^[1]. Vergleicht man den genetischen Code mit den aus der Linguistik bekannten Prinzipien^[2], so könnte man ihn dem Vokabular einer Sprache gleichsetzen. Die Kenntnis des Vokabulars einer Sprache gibt jedoch noch keine Hinweise auf ihre grammatischen und syntaktischen Eigenarten. Entsprechend genügt die Kenntnis des primären genetischen Codes noch nicht, um die

Genexpression und ihre Regulation zu verstehen. Viele Molekularbiologen widmen sich heute der Erforschung der regulatorischen Signale des genetischen Codes (sekundäre und tertiäre Codierung). Besonders in höheren Organismen, den Eukaryonten, scheinen diese Regulationsprinzipien des genetischen Codes kompliziert zu sein. In diesem Aufsatz soll die mögliche Funktion eines scheinbar einfachen genetischen Signals, des modifizierten Nucleotids 5-mC, charakterisiert werden. Experimente mit eukaryotischen Systemen ergaben, daß 5-mC als wesentlicher Bestandteil spezifischer Nucleotidsequenzen eine wichtige Rolle bei der langfristigen Inaktivierung eukaryotischer Gene spielen kann (Übersichtsartikel^[3-6]).

Der Codierungs- und Signalwert der vier Desoxyribonucleotid-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin

[*] Prof. Dr. W. Doerfler
Institut für Genetik der Universität
Weyertal 121, D-5000 Köln 41

in natürlich vorkommenden DNAs kann durch spezifische Modifikationen ergänzt werden. In DNA findet man modifizierte Nucleotide mit den Basen 5-mC und N⁶-Methyladenin (N⁶mA). Das Auftreten weiterer modifizierter Nucleotide in DNA kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber mit den üblicherweise benutzten Techniken nur schwer nachweisbar (siehe Abschnitt 2).



5-Methylcytosin (5-mC) N⁶-Methyladenin (N⁶mA)

In DNA aus Prokaryonten findet man 5-mC und N⁶mA, in DNA höherer Eukaryonten kommt vorwiegend 5-mC vor. Die biologischen Funktionen von 5-mC und N⁶mA waren lange Zeit ein Rätsel. Allein daß sie einen Schutz gegen Restriktionsendonucleasen in Mikroorganismen bieten, gilt als sicher^[7]. In fast allen Fällen können Restriktionsendonucleasen^[8] DNA an Nucleotidsequenzen, die spezifisch methyliert sind, nicht schneiden (Tabelle 1), da eine Wechselwirkung zwischen Restriktionsendonucleasen und methylierter DNA nicht möglich ist. Es gibt jedoch interessante Ausnahmen von dieser Regel. Das Restriktionsendonucleasenpaar *DpnI* und *DpnII* aus *Diplococcus pneumoniae* ist isoschizomer, d. h. beide Enzyme erkennen die Nucleotidsequenz 5'-GATC-3' und schneiden an dieser Stelle. Die Aktivität von *DpnI* ist davon abhängig, ob N⁶mA in der Erkennungssequenz vorhanden ist; *DpnII* wird hingegen durch dieses modifizierte Nucleotid vollständig inhibiert^[9] (Tabelle 1). Dieses Beispiel zeigt, daß scheinbar unerhebliche Modifizierungen wie die Methylgruppe in N⁶mA einen positiven oder negativen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen spezifischen Proteinen, in diesem Fall Restriktionsendonucleasen, und DNA ausüben können. Die Richtung des Einflusses eines Modulators ist also a priori nicht festgelegt, sie scheint entscheidend von der Nucleotidsequenz und der Art der Protein-DNA-Wechselwirkung abzuhängen.

Tabelle 1. Restriktionsendonucleasen werden durch sequenzspezifische DNA-Methylierung blockiert [a].

Enzym	Ursprung	Erkennungssequenz [b]	Modifizierte refraktäre Sequenz
a) 5-mC-sensitiv			
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG ¹ CG	G ^m CGC
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C ¹ CGG	C ^m CGG
<i>MspI</i>	<i>Moraxella species</i>	C ¹ CGG	^m CCGG
<i>BsuRI</i>	<i>Bacillus subtilis</i> R	GG ¹ CC	GG ^m CC
b) N ⁶ mA-sensitiv			
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G ¹ AATTC	GA ^m ATTC
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	¹ GATC	G ^m ATC
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	G ^m A ¹ TC (!)	GATC (!)
<i>DpnII</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	GA ¹ TC	G ^m ATC
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YTI	T ¹ CGA	TCG ^m A

[a] Diese Tabelle zeigt Beispiele methylierungssensitiver Restriktionsendonucleasen. [b] Die Sequenz für einen Strang ist in der Richtung 5'→3' dargestellt. Die vertikalen Pfeile bezeichnen die Phosphodiester-Bindung, die gespalten wird. Alle dargestellten Sequenzen sind palindromisch. [c] Isoschizomere Restriktionsendonucleasen, die die gleiche Sequenz erkennen und spalten.

DNA-Methylierungen oder Veränderungen spezifischer Muster von DNA-Methylierungen scheinen auch bei der Reparatur von DNA, bei der genetischen Rekombination, bei der Viruslatenz, bei der Differenzierung, bei der Inaktivierung eines der X-Chromosomen und möglicherweise auch bei Veränderungen, die zur Transformation von Zellen zu Tumorzellen führen, beteiligt zu sein. Insbesondere bei den angeführten komplexen biologischen Prozessen ist anzunehmen, daß Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster direkt oder indirekt die Expression spezifischer Gene oder Gengruppen beeinflussen können. Veränderte Expressionsmuster einer Zelle können komplexe Veränderungen im funktionellen Phänotyp differenzierter Zellen oder Tumorzellen bewirken.

In diesem Beitrag wird zusammenfassend über die Ergebnisse berichtet, die gezeigt haben, daß bei den höheren Eukaryonten DNA-Methylierungen an spezifischen Sequenzen in der Promotor- und 5'-Region eines Gens zur Inaktivierung des Gens führen können. Dabei kann der inaktivierende Effekt von 5-mC auf Gene durch Modulation spezifischer Protein-DNA-Wechselwirkungen an spezifischen Sequenzen der Promotor-Region eines Gens (siehe Abb. 1), durch strukturelle Veränderungen der DNA oder durch Kombination beider Vorgänge zustande kommen. Da aktive Demethylierung von DNA bis jetzt nicht eindeutig nachzuweisen war, können DNA-Methylierungsmuster nur durch DNA-Replikation und gleichzeitige Inhibierung der „Maintenance“-DNA-Methyltransferasen (siehe Abschnitt 2) verändert werden. Es ist deshalb anzunehmen, daß Methylierungen spezifischer Nucleotide in der Promotor-Sequenz eines Gens zu dessen langfristiger Inaktivierung führen. In diesem Zusammenhang ist wichtig hervorzuheben, daß ein Gen natürlich auch ohne Promotor-Methylierung inaktiviert werden kann, z. B. einfach aufgrund spezifischer Protein-DNA-Wechselwirkungen in spezifischen Promotor-Regionen. Zusätzliche Methylierung der Promotor-Region dient wahrscheinlich zur Sicherung der Langzeit-Inaktivierung. Unmethylierte Promotor-Regionen garantieren nicht die Genaktivität: „Eine unverschlossene Tür ist nicht zwangsläufig offen“^[10].

Über DNA-Methylierung und ihre möglichen biologischen Funktionen ist in den letzten Jahren sehr viel publiziert worden. Es ist hier nicht beabsichtigt, einen vollständigen Überblick über dieses interessante Gebiet zu geben, da zahlreiche Übersichtsartikel^[3-6, 10-18] und drei Monographien von Taylor^[19], Trautner^[20] sowie Razin, Cedar und Riggs^[21] zum Thema veröffentlicht wurden. Dieser Beitrag soll stattdessen eine kritische Darstellung neuerer Entwicklungen auf diesem Forschungsgebiet sein.

2. Grundlagen der DNA-Methylierung

Methoden zum Nachweis methylierter Basen in DNA sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. In DNA, besonders höherer Eukaryonten (Wirbeltiere), findet man 5-mC überwiegend in der Dinucleotidsequenz CpG, weniger häufig in den Dinucleotidsequenzen CpC, CpT oder CpA^[29]; in Säuger-DNA sind sogar bis zu 90% des vorkommenden 5-mCs im Dinucleotid CpG. Es ist interessant, daß das Dinucleotid CpG in der DNA von Eukaryonten statistisch auffallend unterrepräsentiert ist^[30]. In der DNA von Wir-

Tabelle 2. Methoden zum Nachweis methylierter Basen in DNA.

1. Säurehydrolyse von DNA gefolgt von
 - a) zweidimensionalen chromatographischen oder chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren [22]
 - b) Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, z. B. [23]
 - c) Massenspektrometrie
 Nachteile: Niedrige Sensitivität, keine Sequenzspezifitäten.
2. Analyse durch methylierungssensitive Restriktionsendonucleasen zusammen mit Southern-Transfer [24] und DNA-DNA-Hybridisierung.
 - a) isoschizomere Restriktionsendonucleasen [25] [a]
 - b) Vergleich einzelner Restriktionsendonucleasen [b] mit klonierten Genen [4]
 Nachteile: Analyse ist auf bestimmte Sequenzen beschränkt. Nicht alle 5-mC-Gruppen werden erfaßt.
3. Genomische Sequenzierung („genomic sequencing“) [26]
 Direkte Bestimmung aller 5-mC-Reste in einer DNA-Sequenz
 Nachteile: Analyse ist beschränkt auf kurze Sequenzen (ca. 100–200 Nucleotide).
4. Immunologische Methoden – Antisera gegen 5-mC
 Nachteile: Spezifität fraglich.

[a] Zelluläre DNA wird mit *Hpa*II oder *Msp*I (Tabelle 1) gespalten, die beide an der 5'-CCGG-3'-Sequenz schneiden. 5'-C^mCCGG-3' kann nicht von *Hpa*II, 5'-C^mCCGG-3' nicht von *Msp*I geschnitten werden. So ist es möglich, die 5'-CCGG-3'-Sequenzen von den methylierten Formen der gleichen Sequenz zu unterscheiden. Nach der Spaltung werden DNA-Fragmente durch Elektrophorese auf Agarose- oder Polyacrylamidgelen getrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen, und spezifische Sequenzen können durch Hybridisierung mit dem [³²P]-markierten [27], klonierten Gen und durch Autoradiographie erkannt werden. – [b] Für die meisten der Sequenzen, die 5-mC enthalten, stehen keine isoschizomeren Restriktionsendonucleasenpaare zur Verfügung. Bis zu einem gewissen Grad kann man trotzdem diese Modifikationen erkennen. Das zu analysierende Gen muß kloniert und in einem E.-coli-Stamm hochgezogen werden, der für C-Methylierungen defizient ist (*mec*⁻ [28]). Das Spaltungsmuster des klonierten, nicht methylierten Gens wird dann mit der Genomsequenz verglichen, z. B.: Methylierung der 5'-GCGC-3'-Sequenz (5'-G^mC^mGCGC-3') kann durch Benutzung der methylierungssensitiven Restriktionsendonuclease *Hha*I festgestellt werden.

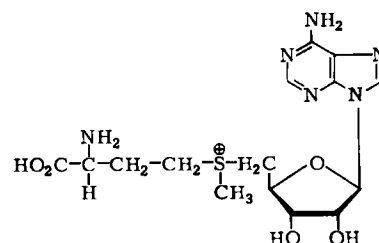
beltieren macht das CpG-Dinucleotid 1% aller Dinucleotide aus, statistisch wären 4% zu erwarten. Im allgemeinen entsprechen die in der Natur vorkommenden Nucleotidsequenzen nicht einer statistischen Verteilung der vier Nucleotide; Nucleotidsequenzen sind vielmehr das Ergebnis zahlreicher funktioneller Optimierungsprozesse. Die Tatsache einer Selektionierung gegen das CpG-Dinucleotid in der DNA von Eukaryonten weist bereits auf seine spezielle funktionelle Bedeutung hin. Gestützt wird diese Vermutung durch die Entdeckung, daß vorwiegend dieses Dinucleotid methyliert wird, und daß gerade diese Modifizierung das Gen inaktivieren kann.

Es wird auch angenommen, daß die Unterrepräsentation des CpG-Dinucleotids in der DNA von Wirbeltieren am hohen Methylierungsgrad des Cytosins in diesem Dinucleotid liegt und an der Tendenz von 5-mC zu Thymin desaminiert zu werden. Dadurch kann es zu einer Umwandlung des CpG-Dinucleotids in TpG kommen^[31].

Obwohl das CpG-Dinucleotid in der DNA von Wirbeltieren stark unterrepräsentiert ist, findet man Häufungen von CpG-Dinucleotiden am 5'-Ende des Globin-gens^[32] und am 5'- und Promotor-Ende der E1-Region von Adenovirus-Typ-12(Ad12)- und Adenovirus-Typ-2(Ad2)-DNA^[4,33]. Auffallend häufig tritt CpG auch in der Nähe vom „major histocompatibility complex“ (MHC) bei Mäusen und Menschen, am 5'-Ende des Dihydrofolat-Reduktase-Gens der Maus und des α-2-Kollagen-Gens des Huhns^[34] auf. Über die Bedeutung dieser CpG-Häufungen kann man bisher nur spekulieren.

Die DNA-Methylierung erfolgt postreplikativ und wird durch spezifische Enzyme, die DNA-Methyltransferasen,

katalysiert. Einige dieser DNA-Methyltransferasen aus Prokaryonten wurden hochgereinigt und genau charakterisiert. Über die DNA-Methyltransferasen von Eukaryonten weiß man erheblich weniger^[11,35]. Die DNA-Methyltransferasen benutzen S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor. Funktionell kann man zwei Typen von



S-Adenosylmethionin (SAM)

DNA-Methyltransferasen unterscheiden, obwohl ungeklärt ist, ob es tatsächlich zwei Enzyme gibt: 1) De-novo-DNA-Methyltransferasen methylieren spezifische Sequenzen unmethylierter DNA. 2) „Maintenance“-DNA-Methyltransferasen erkennen hemimethylierte DNA, d. h. ein doppelsträngiges DNA-Molekül, in dem nur einer der Stränge Methylgruppen enthält. Solch ein hemimethylierter Doppelstrang entsteht, wenn nach DNA-Replikation nur einer der beiden DNA-Stränge methyliert ist. Maintenance-DNA-Methyltransferasen erkennen methylierte Basen in hemimethylierter DNA und methylieren Cytidinreste in der symmetrisch gegenüberliegenden Position im unmethylierten DNA-Strang (Abb. 1).

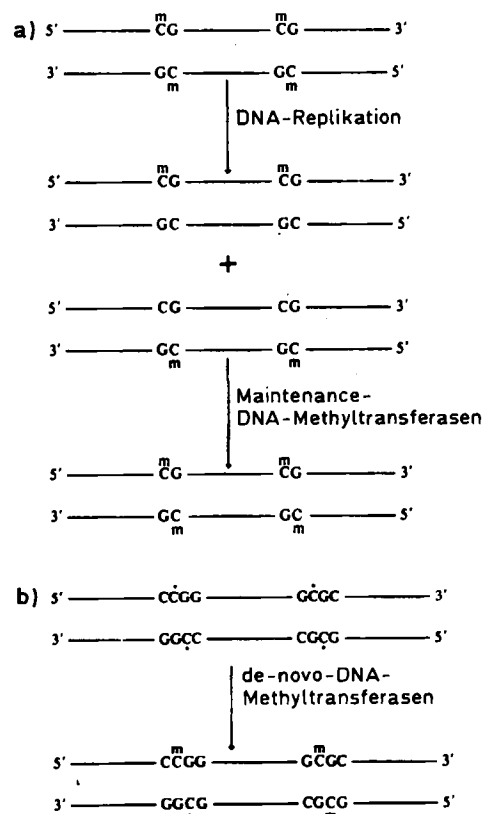


Abb. 1. a) Maintenance- und b) de-novo-DNA-Methylierung [5].

Aus Untersuchungen an einem viralen System ergab sich der direkte Nachweis für das Vorkommen von de-novo-Methylierung bei Eukaryonten. Virale Systeme haben überhaupt eine große Rolle bei der Aufklärung der Funktion sequenzspezifischer DNA-Methylierungen in Säugersystemen gespielt^[4]. Die DNA menschlicher Adenoviren ist z. B. nur methyliert, wenn die virale DNA in die Wirts-DNA längere Zeit integriert ist^[36–38] (Tabelle 3). DNA aus Virionen (Viruspartikeln)^[22, 23, 39] oder extrachromosomale Formen intrazellulärer viraler DNA sind nicht methyliert^[40, 41]. Diese Befunde führten zu dem Schluß, daß Adenovirus-DNA erst einige Zeit nach der Integration^[46–48] in die DNA der Wirtszelle de-novo-methyliert wird. Es ist noch ungeklärt, wie die DNA-Methyltransferasen des Wirts „informiert“ werden, virale DNA-Moleküle, die erst kurze Zeit vorher in die Wirts-DNA eingebaut wurden, in sequenzspezifischen Mustern zu methylieren^[42, 43, 45]. Da die parentale virale DNA keine 5-mC-Gruppen enthält, muß die Methylierung in diesem Fall de novo erfolgen.

Tabelle 3. DNA-Methylierung des Genoms menschlicher Adenoviren [a].

Art der Adenovirus-DNA	Methylierungsgrad	Lit.
DNA in Viruspartikeln verpackt	Nicht methyliert [b]	[22, 23, 39]
Freie virale DNA in infizierten Säugerzellen (produktive oder abortive Systeme), parental und auch neu synthetisiert	Nicht methyliert	[40, 41]
Integrierte Adenovirus-DNA in etablierten Zelllinien	Methyliert in hochspezifischen Mustern: Aktive Gene sind hypo-, inaktive hypermethyliert	[40, 42–45]
Integrierte Adenovirus-DNA in erst kürzlich induzierten Tumoren	Hypomethyliert. Allmähliches Ansteigen der DNA-Methylierung mit der Anzahl der Passagen der Tumorzellen. Zunahme der Methylierung ist nicht willkürlich.	[37, 38]

[a] Die einzige methylierte Base ist 5-mC [22, 23]. [b] Grenze der Erkennbarkeit <0.04% 5-mC [23].

Die Genome einiger cytoplasmatischer DNA-Viren, z. B. des Iridovirus FV3 (Froschvirus 3), sind stark methyliert, in mehr als 20% aller Cytidinreste liegt 5-mC vor^[49]. FV3 codiert seine eigene DNA-Methyltransferase, die die virale DNA im Cytoplasma der infizierten Zelle modifiziert^[50].

Von großer Wichtigkeit ist die Frage, ob eukaryotische Zellen über einen enzymatischen Mechanismus zur aktiven Demethylierung verfügen. Über aktive Demethylierung in Extrakten aus dem Kern von Maus-Erythroleukämiezellen ist berichtet worden^[51]. Sollte es in Zellen keine Möglichkeit zur aktiven Demethylierung geben, bliebe als einziger Weg zur Veränderung spezifischer Methylierungsmuster durch Entfernen von Methylgruppen die DNA-Replikation und die gleichzeitige spezifische Inhibierung der Maintenance-DNA-Methyltransferasen. Der Mechanismus für die spezifische Veränderung von Methylierungsmustern bliebe ungeklärt, auch wenn eine „Demethylase“ gefunden würde.

Es stellt sich noch ein weiteres interessantes Problem: Die DNA-Replikation bei Säugern verläuft zeitlich häufig bimodal^[52], d. h. eine bestimmte Gruppe von Genen, die

sogenannten Haushaltsgene, die in praktisch jeder Zelle aktiv sind, werden während der ersten Hälfte der S-Phase des Zellzyklus repliziert und gewebespezifische Gene, die nur in bestimmten Organen exprimiert werden, z. B. das Insulingen in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas, replizieren in den Zellen früh, in denen sie exprimiert werden und spät in Geweben, in denen sie normalerweise nicht exprimiert werden. Als Folge dieser zeitlich spezifischen Replikationsmuster bestimmter Gengruppen werden diese Gene vorübergehend hemimethyliert bleiben (siehe Abb. 1), wenigstens solange, bis sie durch Maintenance-DNA-Methyltransferasen wieder vollständig methyliert werden. Es stellt sich die Frage, ob diese Gene während dieses Zwischenzustandes der Hemimethylierung für kurze Zeit exprimiert werden können. So könnte es sogar für inaktive Gene im klassischen Sinne dieses Konzeptes ein enges, zeitlich begrenztes Fenster geben, in dem sie aktiv werden könnten. Um diese Möglichkeiten weiter zu untersuchen, ist es wichtig herauszufinden, ob hemimethylierte Gene aktiv oder inaktiv sind.

In mehreren Laboratorien untersucht man zur Zeit die Möglichkeit, ob spezifische DNA-Methylierungen spezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen verändern können. Vor kurzem wurde ein Protein aus menschlicher Placenta gereinigt, das etwas besser an 5-mC-reiche DNA-Sequenzen bindet^[53]. Ohne Zweifel wird die gerade begonnene Forschungstätigkeit auf diesem interessanten biochemischen Gebiet weiterhin erheblich zunehmen.

3. Die Grundstruktur eukaryotischer Gene

Einige der hier präsentierten Konzepte werden besser verständlich sein, wenn zuvor die Grundstruktur eukaryotischer Gene^[54, 55] erklärt worden ist. Ein eukaryotisches Gen besteht aus der am 5'-Ende der DNA gelegenen Kontrollregion und dem eigentlichen Gen, das am 3'-Ende zu finden ist (Abb. 2). Die Bezeichnungen 5' und 3' beziehen

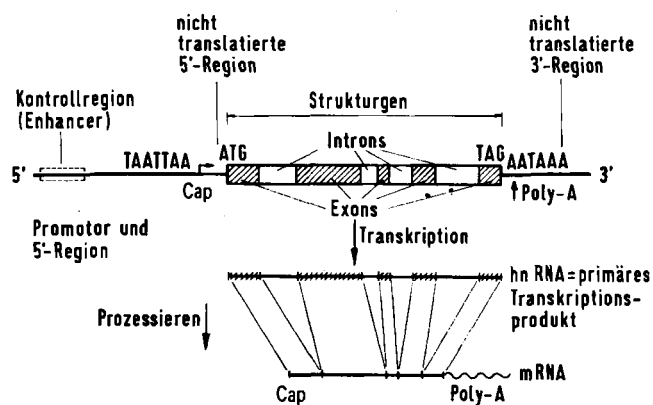


Abb. 2. Schematische Darstellung des Aufbaus eukaryotischer Gene mit Transkription und Prozessieren.

sich auf die Positionen auf dem codierenden Strang des DNA-Moleküls, und nach der gängigen Konvention wird 5'→3' von links nach rechts geschrieben wie Text in europäischen Sprachen. Der Teil der Kontrollregion, an den die transkribierenden Enzyme binden, wird Promotor genannt. Die Kontrollregion ist durch die „TAATAAA- (Goldberg-Hogness-)Box“, die „Cap-Stelle“ (Initiierung

der Transkription) und die „upstream“ (5') gelegenen Kontrollelemente charakterisiert. Diese Bestandteile sind essentiell für die Genexpression, insbesondere weil sie spezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen ermöglichen; die genauen biologischen Funktionen dieser Wechselwirkungen sind aber noch nicht bekannt. An den Hauptteil des eukaryotischen Gens schließen sich 5'- und 3'-Regionen an, die nicht für Proteinsequenzen codieren. Am 3'-Ende des Gens liegt ein ATAAA-Signal, das die Anknüpfung eines Polyadenylsäurerestes an die mRNA vermittelt. Der Hauptteil des Gens besteht aus Introns (intervenierende Sequenzen), die während des Umbaus des primären Transkriptionsproduktes (hnRNA=hochmolekulare nucleare RNA) zur mRNA durch Spleißen herausgeschnitten werden; die Exons (exprimierte Sequenzen) werden dabei miteinander verknüpft. Das mRNA-Molekül wird mit dem ersten funktionellen AUG-Triplett beginnend translatiert. Genau genommen besteht das funktionelle Gen nur aus der Summe der Exons. Die Rolle der nicht translatierten 5'- und 3'-Sequenzen (zwischen der Cap-Stelle und dem AUG-Initiationscodon bzw. jenseits des Terminationscodons) ist nicht bekannt. Die DNA-Sequenzen, deren Funktion durch spezifische Methylierung moduliert wird (Geninaktivierung), liegen in der Promotor- und 5'-Sequenz eines Gens.

4. Welche Befunde stützen die These, sequenzspezifische DNA-Methylierung führe zur Geninaktivierung?

Die ersten Spekulationen über Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierung und Kontrolle der Genaktivität gehen auf das Jahr 1964 zurück^[56] und basierten auf Untersuchungen von Bakteriensystemen. 1975 wurden klarer definierte Hypothesen formuliert und ein Bezug zu höheren Eukaryonten hergestellt^[57-59]. Wenig später wurde die Vermutung, inaktive Gene seien hyper-, aktive Gene hypomethyliert, experimentell bestätigt. Solche *inversen Korrelationen*^[43] wurden in verschiedenen eukaryotischen Systemen in vielen Laboratorien beobachtet. Da die experimentellen Befunde schon wiederholt zusammenfassend beschrieben worden sind^[3-6], soll hier darauf nur cursorisch eingegangen werden.

4.1. Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression: Inverse Korrelationen

Inverse Korrelationen zwischen dem Ausmaß der DNA-Methylierung und dem Grad der Expression eines bestimmten Gens wurden in verschiedenen Systemen durch Analyse einer Anzahl eukaryotischer und viraler Gene nachgewiesen. Da diese Studien bisher hauptsächlich auf 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Sequenzen beschränkt waren, konnte man nicht erwarten, daß diese Korrelation ohne Ausnahme bei allen untersuchten Genen existiert, denn auch andere CG enthaltende Sequenzen könnten an der Kontrolle beteiligt sein. Das Auffinden solcher inverser Korrelationen erlaubt noch nicht zu entscheiden, ob

DNA-Methylierung der Grund oder die Folge der Geninaktivierung ist.

Inverse Korrelationen wurden durch das Studium von DNA-Methylierungen eines bestimmten Gens in verschiedenen Organen eines Organismus oder durch Untersuchungen viraler Systeme nachgewiesen^[37, 40, 42-45, 60-72]. In einem bestimmten Gen, das in einem Organ exprimiert wurde, waren viele der 5'-CCGG-3'-Sequenzen nicht methyliert; in anderen Organen, die dieses Gen nicht exprimierten, waren diese Sequenzen vollständig methyliert.

Virale Systeme lieferten bemerkenswert klare Resultate. In integrierten viralen Genomen waren nicht exprimierte Gene hypermethyliert, transkribierte Gene wiesen hingegen einen niedrigeren Grad der DNA-Methylierung auf.

Tabelle 4. Inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und E2a-Expression in den Zelllinien HE1, HE2 und HE3.

Zelllinie [73]	E2a-Gene und späte Promotoren [44], die in integrierter Form persistieren	mRNA [74]	E2a-Protein [75]	Methylierung [40] von 14 CCGG-Sequenzen im E2a-Gen
HE1	+	+	+	-
HE2	+	-	-	+
HE3	+	-	-	+

In Tabelle 4 sind Beispiele von Ad2-transformierten Zelllinien aufgeführt. In dieser Aufstellung werden Expression und Methylierung des E2a-Gens der integrierten Ad2-DNA miteinander verglichen^[40]. Es wurden vor allem die 5'-CCGG-3'-Regionen untersucht, da das isoschizomere Restriktionsendonucleasepaar *HpaII* und *MspI*^[25] zur Verfügung stand, das eine Bestimmung des Methylierungsgrades aller 5'-CCGG-3'-Sequenzen in DNA ermöglichte. Bei vielen Genen scheint der Methylierungsgrad dieser Regionen von spezieller Bedeutung zu sein. In einigen Fällen^[37, 45] fanden sich inverse Korrelationen zwischen Genexpression und Methylierungsgrad des 5'-CpG-3'-Dinucleotids auch in der Sequenz 5'-GCGC-3', der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuclease *HhaI*.

Die inverse Korrelation zwischen Genaktivität und DNA-Methylierung von 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Sequenzen gilt, wie zu erwarten, nicht ohne Ausnahme. Bevor solchen scheinbaren Diskrepanzen Bedeutung zugemessen werden kann, muß sichergestellt werden, daß die Methylierungsmuster des betreffenden Gens eingehend analysiert wurden. Bei manchen Genen könnten DNA-Methylierungen an anderen als den *HpaII*- oder *HhaI*-Schnittstellen bei der Regulation von Bedeutung sein. Ungewöhnliche Methylierungsmuster wurden für die durch Östrogen induzierbaren Vitellogenin-Gene A1 und A2 in Hepatocyten von *Xenopus laevis* beobachtet^[76]. Diese Gene sind stark methyliert, obwohl sie exprimiert werden können, während andere *Xenopus-laevis*-Gene die üblichen inversen Korrelationen zeigen.

4.2. Keine Expression in-vitro-methylierter Gene

Das Aufstellen von Korrelationen kann in der Biologie interessante Fragen aufwerfen, es bringt aber keinerlei

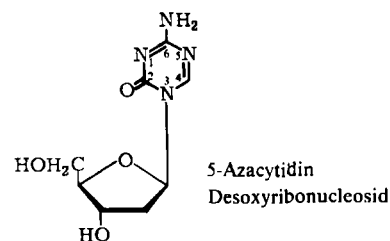
Hinweis auf die Beziehung zwischen Ursache und Wirkung. Um zu entscheiden, ob DNA-Methylierung die Ursache oder die Folge der Geninaktivierung ist, wurden in-vitro-methylierte klonierte Gene in den Kern von *Xenopus-laevis*-Oozyten^[77-81] oder in Säugerzellen^[82-84] injiziert und die Aktivitäten dieser Gene gemessen. Gene, die an spezifischen Stellen methyliert waren, wurden nicht exprimiert. Die Benutzung sequenzspezifischer de-novo-DNA-Methyltransferasen aus prokaryotischen Organismen ermöglichte die Ermittlung spezifischer Sequenzen, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sind. Die in-vitro-Methylierung anderer Sequenzen, wie der 5'-GGCC-3'-Sequenz, beeinflussten die Genexpression nicht^[33, 79]. Diese Resultate, die an verschiedenen Systemen und in verschiedenen Laboratorien gewonnen wurden, stützten die Annahme, daß spezifisch methylierte Sequenzen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielten. Weiterhin zeigten diese Beobachtungen, daß spezifische DNA-Methylierung die Transkription inhibiert – wenigstens bei den untersuchten Genen – und nicht eine Folge der Geninaktivierung ist.

Andere Autoren^[85] benutzten eine DNA-Methyltransferase aus Rattenleber, die alle CpG-Dinucleotide eines proviralen Moloney-Mausleukämie-DNA-Klones methylierte. Die biologische Aktivität der methylierten Klone war im Transfektionstest um drei Größenordnungen reduziert, wogegen Methylierungen von 35 5'-CCGG-3'-Sequenzen durch die prokaryotische DNA-Methyltransferase *HpaII* einen schwächeren Effekt ausübte. Wurden dagegen Polyoma-DNA oder SV40-DNA an allen CpG-Dinucleotiden durch das gleiche Rattenleberenzym in vitro methyliert, blieben die viralen DNAs unverändert infektiös^[86]. Bei diesen Experimenten konnte allerdings noch nicht ausgeschlossen werden, daß die transfizierte DNA repliziert und dadurch demethyliert worden war. Das klonierte Mausleukämie-Provirus wurde durch Methylierung mit der DNA-Methyltransferase *HpaII* nur geringfügig inaktiviert^[71]. Offensichtlich unterscheiden sich die methylierbaren, für die Expression relevanten Sequenzen bei den einzelnen Genen erheblich.

Nach unseren Erfahrungen ist es äußerst wichtig, daß Arbeiten über in-vitro-Methylierung von Adenovirus-Genen eine eingehende Untersuchung des Methylierungsgrades des gleichen Gens, aber in transformierten Zellen integriert, vorausging^[40, 43, 45]. Da nur zwei hochgereinigte DNA-Methyltransferasen, *HpaII* und *HhaI*, für diese Studien zur Verfügung standen, mußte zunächst sichergestellt werden, daß die 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Regionen tatsächlich an der Regulation dieses speziellen Gens beteiligt sind, d. h. in-vivo-Studien waren eine wichtige Voraussetzung für die Planung der in-vitro-Untersuchungen. Entscheidend war ferner, daß die in-vitro-DNA-Methylierung von Genen vollständig erfolgt war, bevor die Transkriptionsaktivität dieser Gene getestet wurde. Der Methylierungsgrad wurde durch Spaltung mit den Restriktionsendonucleasen *HpaII*, *MspI* oder *HhaI*, gefolgt von Southern-Blotting^[24] und Hybridisierungsexperimenten, überprüft. Die spezifische in-vitro-DNA-Methylierung und die Analyse der Auswirkungen dieser Modifizierungen auf die Genexpression wurden, wie in den Abschnitten 5 und 6 gezeigt wird, noch verfeinert.

4.3. Hemmung von DNA-Methyltransferasen durch 5-Azacytidin

Weitere Hinweise auf die Rolle der DNA-Methylierung bei der Regulation der Genexpression wurden durch Studien mit dem Cytidinanalogon 5-Azacytidin (Desoxyribonucleosid) erhalten.



Das modifizierte Nucleosid kann in DNA eingebaut, aber nicht in 5-Position methyliert werden. Die inhibitorische Wirkung von 5-Azacytidin auf die DNA-Methylierung beruht aber vorwiegend auf seiner Fähigkeit, die Aktivitäten der DNA-Methyltransferasen und anderer Enzyme zu hemmen^[87-90]. In verschiedenen Systemen war es möglich, abgeschaltete Gene zu aktivieren und zu exprimieren^[90-94]. Im Originalbericht über die genaktivierende Eigenschaft des 5-Azacytidins wurde die Aktivierung einer komplexen Gruppe zellulärer Funktionen beschrieben, die zur in-vitro-Differenzierung von Mausfibroblasten zu Muskelzellen führte, die in Kultur kontrahierten^[95]. Spezifische Gene konnten durch Behandlung mit 5-Azacytidin sogar bei Tieren^[96] und beim Menschen^[97] angeschaltet werden. So stimulierte 5-Azacytidin die foetale Hämoglobinsynthese bei anämischen Pavianen, und es verbesserte selektiv die γ -Globinsynthese bei Patienten mit β^+ -Thalasämie; die Demethylierung der beteiligten γ -Globingene konnte nachgewiesen werden^[97]. Da 5-Azacytidin für den Menschen hochtoxisch ist, sollten Patienten nicht behandelt werden, ohne vorher Gefahren und Vorteile in jedem einzelnen Fall genau abzuwägen.

Es ist nicht zu erwarten, daß alle abgeschalteten zellulären Gene durch Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin reaktiviert werden können. Abwesenheit von DNA-Methylierung scheint eine notwendige aber nicht ausreichende Voraussetzung für die Genaktivierung zu sein^[37, 67, 98, 99]. Etwas so Essentielles wie die Genaktivität ist wahrscheinlich mehreren regulatorischen Mechanismen unterworfen, zu denen auch die spezifische DNA-Methylierung zählt. So kann die Behandlung mit 5-Azacytidin, je nach Art der Inaktivierung eines bestimmten Gens, zur Aktivierung dieses Gens oder einer Gruppe von Genen führen oder auch nicht; z. B. konnten die inaktiven, hypermethylierten, späten viralen Gene in einer Ad12-transformierten Hamsterzelllinie (T637), in der die viralen Gene in das Wirtsgenom integriert waren, mit 5-Azacytidin nicht aktiviert werden, obwohl sich eine Veränderung des DNA-Methylierungsmusters nachweisen ließ^[33]. In Hamsterzellen werden „späte“ Gene von Ad12 ohnehin nicht exprimiert^[106]. Die Interpretation der durch Induktion mit 5-Azacytidin erzielten Resultate ist wahrscheinlich komplizierter als bisher angenommen, da die Toxizität dieser Verbindung zusätzliche, bisher kaum verstandene Auswirkungen auf die Zelle haben kann.

In in-vitro-Untersuchungen inhibierten chemische Carcinogene den Transfer von Methylgruppen auf hemimethylierte DNA durch DNA-Methyltransferasen aus der Milz der Maus. Vielleicht führen carcinogene Verbindungen durch eine Vielzahl von Mechanismen^[100] zu erblichen Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster und verändern dadurch die Muster der Genexpression in Tumorzellen.

5. Wirkung der spezifischen Methylierung von Promotor- und 5'-Ende viraler Gene

In vielen eukaryotischen und viralen Systemen geht die Abwesenheit von DNA-Methylierung an den 5'-Enden und/oder Promotor-Regionen eines Gens mit der Aktivität desselben einher^[45, 98, 99, 101–105]. Das Vitellogenin-Gen des Huhns kann durch Östrogenbehandlung aktiviert werden, und diese Aktivierung ist von einer Demethylierung der 5'-CCGG-3'-Region am 5'-Ende dieses Gens begleitet^[104]. Die Transkription eines Gens wird vor allem über sein Promotor- und 5'-Ende reguliert; deshalb erscheint es plausibel, daß hauptsächlich DNA-Methylierungen an diesen Stellen die Genexpression beeinflussen. Innerhalb der Promotor-Region können wahrscheinlich unterschiedliche Sequenzen für die Regulation verschiedener Gene von Bedeutung sein.

Wir haben den Methylierungsgrad vieler 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Sequenzen in integrierten Adenovirus-Genen dreier Ad12-transformierter Hamsterzelllinien^[45] genau analysiert. Die meisten der frühen viralen Gene wurden in diesen Zelllinien exprimiert (horizontale Pfeile in Abb. 3). Die 5'- und Promotor-Regionen dieser Gene waren an den 5'-CCGG-3'- (\diamond in Abb. 3) und an den 5'-GCGC-3'-Sequenzen (in Abb. 3 nicht gezeigt) nicht methyliert. Der Grad der Methylierung der 3'-Hauptteile der frühen viralen Gene korreliert mit der Aktivität dieser Gene nicht immer. Die 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Sequenzen der integrierten späten viralen Gene, die in diesen Zelllinien nicht exprimiert werden, sind alle methyliert^[43, 45] (Ergebnisse in Abb. 3 nicht gezeigt). In der Zelllinie HA12/7 (Abb. 3) wird die E3-Region nicht exprimiert (kein horizontaler Pfeil) und die 5'-CCGG-3'- und 5'-GCGC-3'-Sequenzen am 5'- und Promotor-Ende dieser Region sind alle methyliert.

In viralen Systemen haben Studien über Zusammenhänge zwischen Methylierung und Geninaktivierung regelmäßig besonders klare Resultate erbracht^[4, 5]. Begreiflicherweise müssen die späten viralen Gene in DNA virus-transformierter Zellen inaktiviert werden und in diesem Zustand durch spezielle Sicherheitsmaßnahmen gehalten werden, z. B. durch die Einfügung von Methylgruppen an

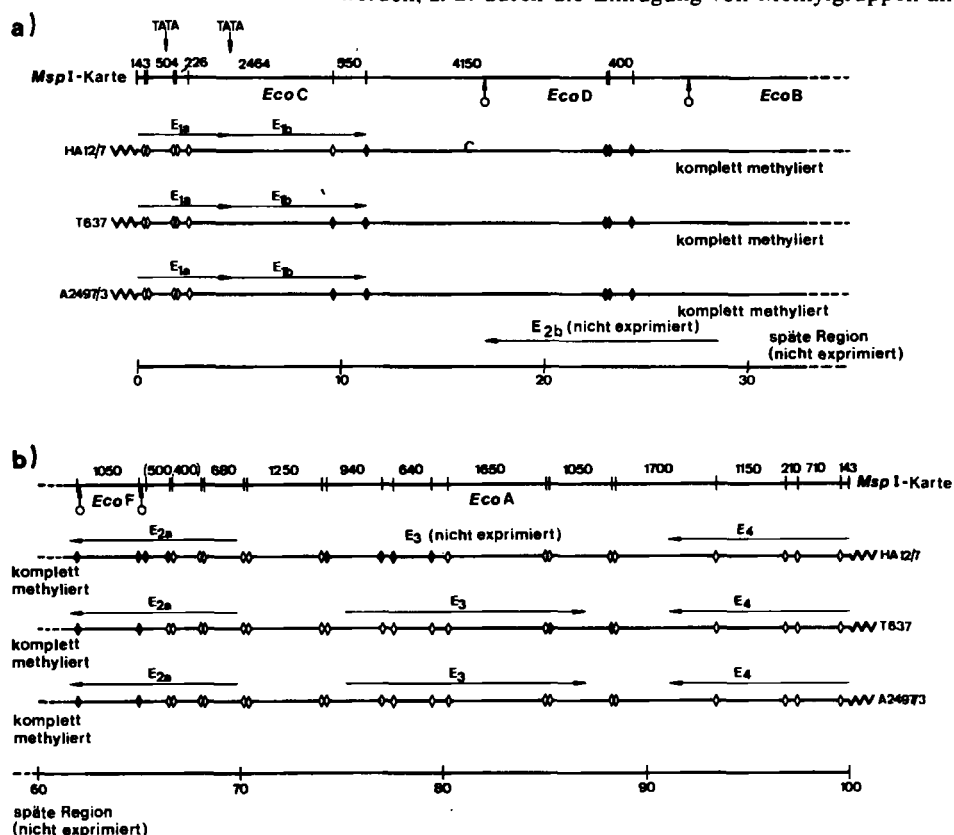


Abb. 3. Funktionskarte des linken (a) und des rechten (b) Endes des Adenovirus-Typ-12-DNA-Moleküls, das in die Zelllinien HA12/7, T637 oder A2497-3 integriert ist. Die horizontalen Linien stellen die Ad12-Genome (—) dar, die in die Genome der Zelllinien (---) integriert sind. Die MspI-Karte des linken (a) und rechten (b) Endes der Ad12-DNA wird jeweils durch die oberste Linie repräsentiert. Vertikale Balken auf und Symbole über den horizontalen Linien deuten die MspI-Schnittstellen bzw. die Größe einiger der MspI-Fragmente an. Die Symbole \diamond bezeichnen die EcoRI-Schnittstellen. TATA markiert die Lage des Goldberg-Hogness-Signals in der Ela-Region. Die nicht methylierten bzw. methylierten 5'-CCGG-3'-Regionen im integrierten Ad12-Genom der Linien HA12/7, T637 und A2497-3 sind durch offene (\diamond) bzw. geschlossene Symbole (\bullet) gekennzeichnet. Horizontale Pfeile bezeichnen die Position und die Richtung der Transkription der jeweiligen frühen Region in den einzelnen Zelllinien. Das Vorhandensein von Pfeilen zeigt Expression der betreffenden Regionen des Ad12-Genoms. MspI-Schnittstellen rechts der EcoRI-D/B- und links der EcoRI-A/F-Grenzen sind nicht kartiert. Außerdem sind die frühen Regionen der Ad12-DNA [106, 107] eingetragen. Die Skalen am unteren Rand jeder Darstellung zeigen die Länge der Teileinheiten des viralen Genoms, die das Molekül in 100 gleich große Abschnitte unterteilen. Die Karte der E1-Region der Ad12-DNA ist in [108] beschrieben. Die Abbildung entstammt [45].

spezifischen Sequenzen. Anderenfalls könnte die Aktivierung dieser Gene zur Virusreplikation und Zerstörung dieser Zellen führen. Es werden deshalb die stabil transformierten Zellen selektiert, in denen die Methylierungsmuster der viralen Gene eine permanente Inaktivierung der späten viralen Gene gewährleisten. Dieser besonders strenge Selektionsmodus könnte die auffallenden inversen Korrelationen zwischen DNA-Methylierung und Genaktivität erklären, die für viele integrierte virale Gene beschrieben wurden^[4].

6. Wirkung der in-vitro-Methylierung des Promotor- und 5'-Endes eukaryotischer Gene

Die Bedeutung der Promotor-Region für DNA-Methylierung und Geninaktivierung kann experimentell nachgewiesen werden. Drei Wege sollen hier beschrieben werden: 1. Methylierung der Promotor-Region des Globingens^[109]. Bei der Insertion des methylierten Gens in das Genom der Rezeptorzellen war das Globingen inaktiv. Das nicht methylierte Globingen dagegen blieb in einem ähnlichen Experiment aktiv. 2. Der Ela-Promotor von Adenovirus-Typ-12-DNA wurde vor das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase(CAT)-Gen^[102] im Konstrukt^[*] pSVO-CAT inseriert, in dem eine Promotor-Insertion möglich war^[110]. Bei der Transfektion in Säugerzellen war der nicht methylierte Promotor aktiv, 5'-CCGG-3'- oder 5'-GCGC-3'-methylierte Promotoren waren dagegen inaktiviert, wenn die Methylgruppen „upstream“ zur TAATAAA-Box lagen^[102]. 3. Wir haben die Transkriptionsaktivität des klonierten Adenovirus-Typ-2-E2a-Gens nach Injektion in die Kerne von Oozyten von *Xenopus laevis* getestet^[77,78]. Dieses Gen codiert für ein DNA-Bindungsprotein^[111]. Wurden drei 5'-CCGG-3'-Sequenzen der 5'- und der Promotor-Region des E2a-Gens methyliert, so war das Gen nach der Injektion inaktiv. Nach Methylierung von elf 5'-CCGG-3'-Sequenzen im 3'-Hauptteil des Gens blieb die Aktivität jedoch erhalten^[105].

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit der Vorstellung, daß Methylierung nur weniger Nucleotide, vielleicht sogar von nur einem Nucleotid, in einer entscheidenden Region des Promotors das zugehörige Gen inaktiviert. Ob diese Entdeckung auf andere eukaryotische Gene ohne weiteres übertragen werden kann, muß noch untersucht werden.

An dieser Stelle ist aber eine wichtige Warnung auszusprechen: Bei der Planung von in-vitro-Methylierungsexperimenten sollte man sich bei der Auswahl der Sequenzen, die in vitro methyliert werden, durch Analyseergebnisse am gleichen Gen im inaktiven Zustand, wie es in lebenden Zellen vorkommt, leiten lassen. Nur so kann man sicher sein, Nucleotidsequenzen zu modifizieren, die tatsächlich eine Funktion bei der permanenten Inaktivierung eines speziellen Gens ausüben können. Als Beispiel sei noch einmal das E2a-Gen der Adenovirus-Typ-2-DNA angeführt (Tabelle 4): In Ad2-transformierten Zellen, die dieses Gen nicht exprimieren, sind alle vierzehn 5'-CCGG-3'-Sequenzen am zweiten C methyliert, was darauf hinweist, aber nicht beweist, daß 5-mC bei der Regulation in dieser

Sequenz eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu sind in einer Ad2-transformierten Zelllinie, die das E2a-Gen exprimiert, die gleichen Sequenzen unmethyliert^[40]. Die Ergebnisse der obengenannten in-vitro-Methylierungsexperimente, die im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden, sind ein überzeugender Beweis für das generelle Konzept der Geninaktivierung durch DNA-Methylierung; nach den Befunden ist die 5'-CCGG-3'-Sequenz in der 5'-Region, zumindest bei diesem Gen, entscheidend für die Genregulation durch DNA-Methylierung. Experimenten, bei denen Sequenzen für die in-vitro-Methylierung eher zufällig ausgewählt werden und bei denen mit Enzymen fraglicher Spezifität gearbeitet wird, mangelt es möglicherweise an funktioneller Bedeutung.

6.1. Inhibierung der Transkription des γ -Globingens durch spezifische Methylierung des Promotors

Die vollständige Methylierung der CpG-Sequenzen in der 5'-Region des γ -Globingens zwischen den Nucleotiden -760 bis +100 verhindert die Transkription dieses Gens^[109]. Es gibt elf CpG-Dinucleotide in diesem Bereich von 860 Nucleotiden. Bisher ist noch nicht geklärt, welche dieser Nucleotide bei der Abschaltung der Genexpression entscheidend sind. Die Autoren haben das in-vitro-Methylierungsverfahren benutzt^[82], das auf der Replikation eines Gens, in diesem Fall des γ -Globingens, im Einzelstrangvektor M13 in Anwesenheit von 5-Methyl-dCTP basiert. Durch die Auswahl eines entsprechenden Primer-Fragments für diese in-vitro-Replikation können spezifische Segmente des Gens in den benachbarten Sequenzen methyliert werden. Auf diese Weise werden Cytosinreste in einem bestimmten Segment methyliert; diese Methode ermöglicht aber nicht die Identifizierung funktionell signifikanter Nucleotide. Das klonierte γ -Globingen, das auf diese Art in verschiedenen Regionen hemimethyliert wurde, wurde dann mit dem Thymidin-Kinase(tk)-Gen des Herpes-simplex-Virus in Ltk⁻-Mauszellen, einer etablierten Mauszelllinie, cotransfiziert. Zellklone, die sowohl das γ -Globingen als auch das Thymidin-Kinase-Gen enthielten, wurden selektiert. Das CpG-Methylierungsmuster, das in vitro erzeugt worden war, blieb in beiden Strängen des Gens erhalten und wurde zuverlässig in diesem System vererbt. Über ähnliche Beobachtungen bei anderen Genen wurde schon berichtet^[112]. Methylierungen in der 5'-Region (von -760 bis +100) des γ -Globingens unterdrückten die Globinexpression, Methylierung der C-Gruppen im γ -Globingen von +100 bis +1950 im 3'-Hauptbereich des Gens beeinflussten die Globingen-Transkription jedoch nicht^[109]. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den vom Adenovirus-System her bekannten Befunden. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß in 15 Säugergenen die 5'- und Promotor-Regionen besonders zahlreich CpG-Dinucleotide aufweisen, wogegen die 3'-Regionen eher arm an solchen Sequenzen sind^[113]. Eine Häufung von CpG-Sequenzen am linken Terminus der Adenovirus-DNA wurde bereits früher beschrieben^[4,33]. Diese CpG-reichen Sequenzen liegen vor der Ela-Region, die für die Expressionsregulation der meisten anderen frühen Adenovirus-Gene verantwortlich ist^[114].

[*] Unter einem Konstrukt versteht man einen vielfach manipulierten Plasmid-Vektor, in den fremde DNA inseriert wurde.

6.2. Methylierung von drei 5'-CCGG-3'-Sequenzen in der 5'-Region des E2a-Gens von Adenovirus-Typ 2 inaktiviert dessen Transkription in *Xenopus-laevis*-Oozyten

Schon in Abschnitt 4.1 wurde die inverse Korrelation zwischen der Methylierung aller 5'-CCGG-3'-Sequenzen des Ad2-E2a-Gens in virustransformierten Hamsterzellen und dem Ausmaß, in welchem dieses Gen exprimiert wird, beschrieben (Tabelle 4)^[40]. Ferner wurde gezeigt, daß in-vitro-Methylierung aller vierzehn 5'-CCGG-3'-Sequenzen des klonierten E2a-Gens durch die prokaryotische *HpaII*-DNA-Methyltransferase nach Mikroinjektion in *Xenopus-laevis*-Oozyten zur Inhibierung der Transkription führt (Abschnitt 4.2)^[77,78]. Das nicht methylierte klonierte E2a-Gen wird in diesen Zellen exprimiert. Auch über die Konstruktion teilmethylierter Klone des E2a-Gens wurde berichtet^[105]. Im Promotor-(5')-methylierten Konstrukt sind drei 5'-CCGG-3'-Sequenzen am 5'-Ende des Subklons methyliert. Eine dieser Sequenzen liegt 215 Basenpaare (bp) oberhalb (bp 26 169 der Ad2 DNA) und zwei liegen 5 und 23 bp unterhalb der Cap-Stelle (bp 25931 und 25949 der Ad2-DNA) des E2a-Gens (Abb. 4). Dieses Konstrukt war bei Mikroinjektion in Kerne von *Xenopus-laevis*-Oozyten transkriptionsinaktiv. Im Gen-(3')-methylierten Konstrukt wurden elf 5'-CCGG-3'-Sequenzen des Hauptteils der transkribierten Genregion in vitro-methyliert (Abb. 4).

Dieses Konstrukt wurde nach Mikroinjektion in *Xenopus-laevis*-Oozyten transkribiert, und zumindest ein Teil der Ad2-spezifischen RNA wurde an der gleichen Stelle initiiert, wie in Ad2-infizierten menschlichen Zellen (Abb. 5)^[105]. Beide scheinmethylierten Konstrukte wurden in *Xenopus-laevis*-Oozyten in Ad2-spezifische RNA transkribiert. Scheinmethylierungsexperimente wurden wie Methylierungsexperimente durchgeführt, jedoch in Abwesenheit des Methylgruppendonors SAM. Diese Resultate zeigen, daß DNA-Methylierungen am oder nahe beim Promotor und 5'-Ende des E2a-Gens zur Inhibierung der Transkription des Gens führen. Vielleicht würde eine Methylgruppe zur Inaktivierung des Gens ausreichen; in-vivo-Methylierung von mehr als einem Cytosin könnte zur „Informationssicherung durch Redundanz“ dienen oder eine andere Bedeutung haben.

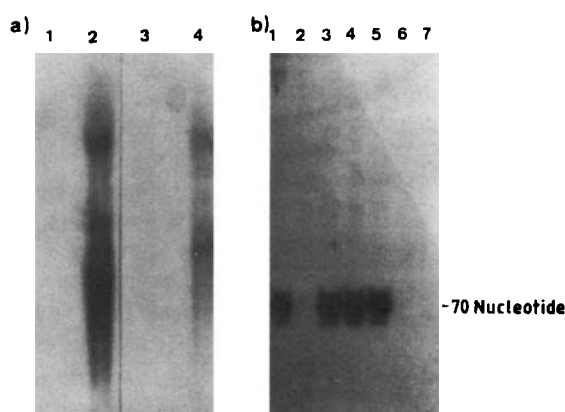


Abb. 5. Methylierung dreier 5'-CCGG-3'-Sequenzen im *HindIII*-*EcoRI*-Fragment des Ad2-DNA-E2a-Gens (Abb. 4) bewirkt Inhibierung der Transkription. a) *Xenopus-laevis*-Oozyten wurden injiziert mit dem *HpaII*-methylierten (Spur 1) oder nicht methylierten (Spur 2) Plasmidklon, der das gesamte *Bam*HI-*HindIII*-Fragment des E2a-Gens enthält, oder mit dem *EcoRI*-*HindIII*-Promotor-(5')-methylierten Konstrukt (Spur 3) oder dem *Bam*HI-*EcoRI*-Gen-(3')-methylierten Konstrukt (Spur 4). In jedem Experiment wurden 5 ng DNA in Oozyten injiziert. Die gesamte intrazelluläre RNA wurde 24 h nach der Injektion aus 15 Oozyten extrahiert und auf einem 0.8proz. Agarosegel, das 2.2 M Formaldehyd enthielt, fraktioniert. Die RNA wurde dann auf Nitrozellulosefilter übertragen, und Ad2-spezifische RNA-Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit ³²P-markierter Ad2-DNA und Autoradiographie nachgewiesen. b) RNAs wie unten beschrieben wurden mit dem *KpnI*-*HindIII*-Fragment der Ad2-DNA-E2a-Region (Abb. 4) hybridisiert. Dieses Fragment wurde vorher mit γ-³²P-ATP und Polynucleotid-Kinase 5'-markiert. Die Hybride wurden mit S1-Nuclease (200 Einheiten) behandelt, auf einem Sequenzgel getrennt und durch Autoradiographie identifiziert. Ursprung der RNA-Präparationen in den einzelnen Spuren: 1: Ad2-infizierte Zellen, 12 h nach der Inoculation; 2: Oozyten, injiziert mit dem Promotor-(5')-methylierten Konstrukt; 3: Oozyten, injiziert mit dem Gen-(3')-methylierten Konstrukt; 4: Oozyten, injiziert mit dem klonierten nicht methylierten E2a-Gen; 5: wie in Spur 4 außer, daß das klonierte E2a-Gen auf einem dam⁻-*E. coli*-Stamm gezüchtet wurde; 6: wie Spur 5, außer daß das dam⁻-Plasmid an den 5'-CCGG-3'-Regionen vollständig methyliert wurde; 7: RNA aus *Zea mays*, negative Kontrolle. Diese Abbildung entstammt [105].

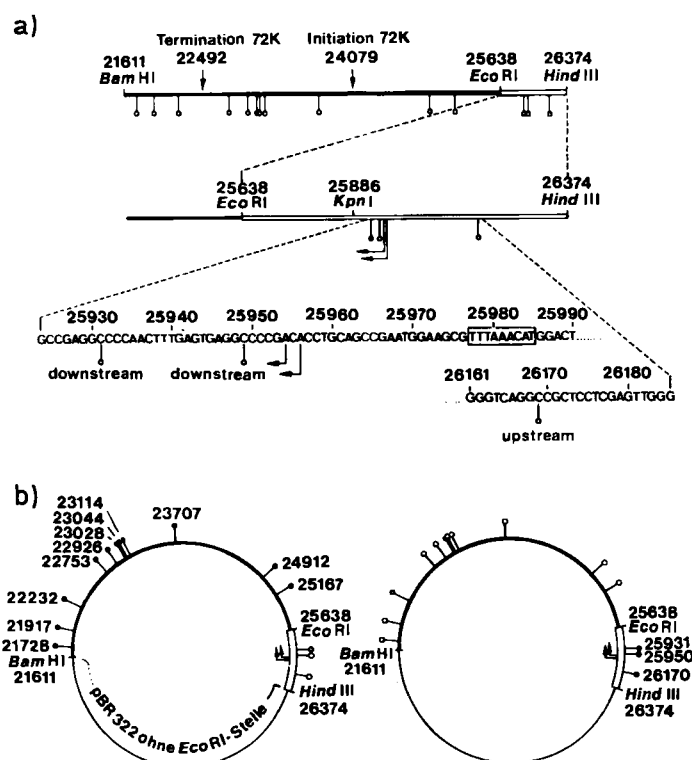


Abb. 4. a) Oben: Detaillierte Karte des E2a-Subklons (des *Bam*HI-*HindIII*-Fragmentes) der Adenovirus-Typ-2-DNA; Mitte und Unten: Karte der Promotor-(5')-methylierten und Gen-(3')-methylierten Konstrukte. Das DNA-Bindungsprotein (DBP = 72-Kilodalton-Protein) wird von rechts nach links gelesen. ↓: Initiations- und Terminationsstellen der Translation des 72-Kilodalton-Proteins; †: 5'-CCGG-3'-Region; ‡: 5'-C^mCGG-3'-Region. Die Nucleotidsequenz eines Teiles der Promotor- und Cap-Regionen (—) sind zusätzlich dargestellt. Die E2a-Region hat kein kanonisches TATA-(Hogness-Goldberg-)Signal. Das mögliche Äquivalent eines solchen Signals wird durch ein Viereck bei 25980 angezeigt. b) Konstrukt, das in der Promotor-Region nicht methyliert (links) oder methyliert (rechts) ist. Nach Injizierung in *Xenopus-laevis*-Oozyten wird im ersten Fall Ad2-spezifische mRNA gefunden, im zweiten nicht. Diese Abbildung entstammt [105].

Der E2a-Promotor der Ad2-DNA wurde ebenfalls in die *HindIII*-Schnittstelle des pSVO-CAT-Konstruktes eingebaut, und die Aktivität der nicht methylierten oder der methylierten DNA wurde nach Transfektion in menschliche HeLa-Zellen getestet. Die Ergebnisse der in-vitro-Promotor-Methylierung waren im Säugersystem die gleichen wie im Amphibien-Oozytensystem: Der methylierte Promotor war inaktiv, der nicht methylierte aktiv^[115].

6.3. Expression des CAT-Gens in Säugerzellen unter Kontrolle von Adenovirus-Typ-12-Promotoren: Auswirkungen der Promotor-Methylierung auf die Genexpression

Die Auswirkungen von DNA-Methylierungen in spezifischen Promotor-Regionen auf die Genexpression wurden mit Hilfe sensitiver und quantitativer Testsysteme untersucht. Das Konstrukt pSVO-CAT enthält das prokaryotische Gen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) und davor eine *Hind*III-Schnittstelle, an der ein Promotor inseriert werden kann^[110]. Die E1a- und Protein-IX-Gen-Promotoren der Adenovirus-Typ-12-DNA induzierten nach Insertion in pSVO-CAT und Transfektion in Mauszellen die CAT-Expression (Abb. 6, 7)^[102].

Die CAT-aktivierende Funktion des frühen SV40-Promotors im Plasmid pSV2-CAT ist gegenüber der Methylierung durch *Hpa*II- oder *Hha*I-DNA-Methyltransferase an 5'-CCGG-3'- bzw. 5'-GCGC-3'-Sequenzen insensitive, da dem Promotor diese Sequenzen fehlen. Die CAT-codierende Sequenz dieses Plasmids enthält vier *Hpa*II- und keine *Hha*I-Schnittstelle. Methylierungen an den 5'-CCGG-3'-Sequenzen in der codierenden Region beeinflussen die CAT-Expression nicht. Die als E1a-Promotor der Ad12-DNA verwendete Sequenz umfaßt die am weitesten links gelegenen 525 Basenpaare des viralen Genoms und enthält zwei 5'-CCGG-3'- und drei 5'-GCGC-3'-Sequenzen oberhalb des am weitesten links gelegenen TATA-Signals. Methylierung der *Hpa*II- oder *Hha*I-Schnittstellen blockiert diesen Promotor in Mauszellen (Abb. 7)^[102]. Ähnliche Ergebnisse erhält man mit dem E1a-Promotor in menschlichen HeLa-Zellen und BHK21-Hamsterzellen. Auch hier wird dieser Promotor durch Methylierung inaktiviert^[127]. Der Promotor des Protein-IX-Gens der Ad12-DNA enthält eine 5'-CCGG-3'- und eine 5'-GCGC-3'-Se-

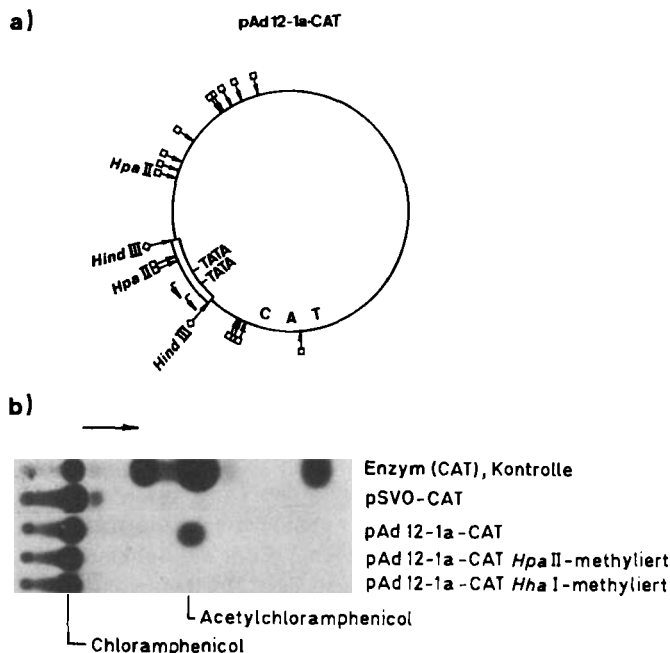


Abb. 7. Der E1a-Promotor von Adenovirus-Typ-12-DNA aktiviert die CAT-Expression und wird durch Methylierung inaktiviert. a) Karte des pAd12-1a-CAT-Konstrukts. ∇ bezeichnet 5'-CCGG-3'(*Hpa*II)-Regionen, \leftarrow die ungefähre TATA-Position. b) Die pAd12-1a-CAT-Präparation wurde durch *Hpa*II- oder *Hha*I-DNA-Methyltransferase in vitro methyliert. Abbildung nach [102].

quenz unterhalb und zwei 5'-GCGC-3'-Sequenzen mehr als 300 bp oberhalb der TATA-Box, wahrscheinlich sogar außerhalb des Promotors. Der Protein-IX-Promotor wird durch Methylierung dieser Sequenzen nicht inaktiviert^[102]. Diese Daten zeigen, daß 5'-Methylierungen an kritischen Sequenzen in der Promotor-Region die Transkription teilweise oder vollständig inhibieren; Methylierung von Berei-

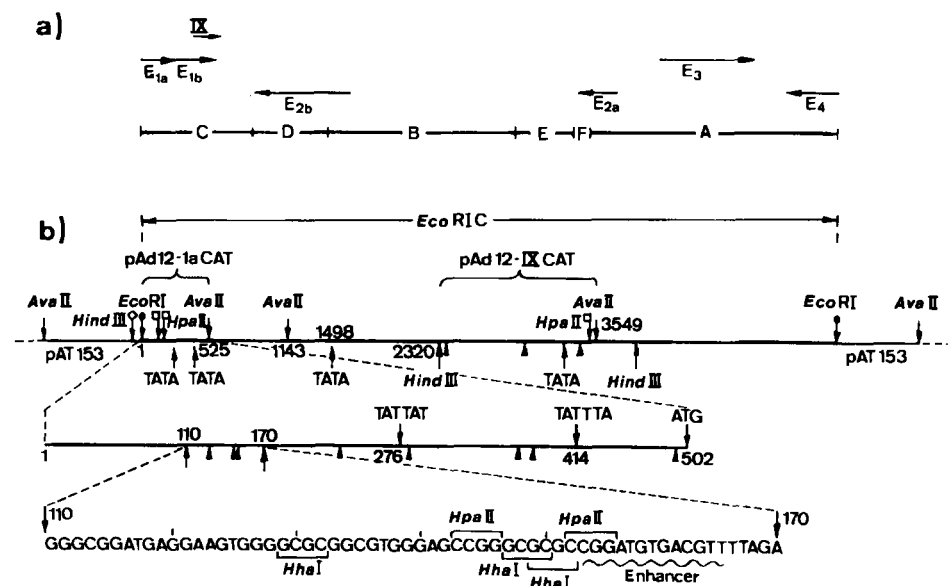


Abb. 6. Karte des Adenovirus-Typ-12-Genoms und funktionelle Organisation seines linksterminalen *Eco*RI-C-Fragments. a) Karte der Ad-12-DNA [45]. E1a, E1b, E2a, E2b, E3 und E4 bezeichnen die frühen Regionen des viralen Genoms; IX die Position des Protein-IX-Gens. Die Buchstaben A-F beziehen sich auf DNA-Fragmente auf der *Eco*RI-Restriktionskarte. b) Oben: Detaillierte Karte des linksterminalen *Eco*RI-C-Fragments, Restriktionsstellen wie angezeigt. Die Zahlen beziehen sich auf Basenpaare (bp) vom linken Terminus der viralen DNA an gezählt. TATA (TATTAT, TATTTA) bezeichnen die angenommenen Hogness-Goldberg-Boxen. Mitte und unten: Die Karte zwischen bp 1 und 502 bzw. 110 und 170 [108]. *Hpa*II(5'-CCGG-3')- und *Hha*I(5'-GCGC-3')-Regionen (\blacktriangle) sind eingetragen. Abbildung nach [102].

chen weit oberhalb und wahrscheinlich auch von Sequenzen unterhalb des TATA-Signals scheinen die Expression dieses Gens nicht zu beeinflussen.

Die Ergebnisse, die in den drei vorhergehenden Abschnitten diskutiert wurden, demonstrieren die Sensitivität zweier Adenovirus-Promotoren und des Globingen-Promotors gegenüber sequenzspezifischen Methylierungen. Nach den Befunden an viralen Systemen müssen für die Geninaktivierung spezifische Stellen methyliert werden. Einer der viralen Promotoren (E2a von Ad2) wurde in Amphibien-Oozyten und in Säugerzellen getestet. In beiden Systemen war die Sensitivität gegenüber Methylierungen die gleiche. Geninaktivierung durch spezifische Promotor-Methylierung wurde mit Hilfe extrachromosomaler viraler Gene^[102, 105] oder des in die Rezeptor-Zell-DNA integrierten γ -Globingens^[109] untersucht. Die in Abschnitt 4 erörterten Resultate aus Korrelationsexperimenten und die in diesem Abschnitt geschilderten sprechen alle für eine regulative Funktion spezifischer Promotor-Methylierungen bei den höheren Eukaryonten.

7. Auftreten von 5-mC in *Drosophila* ist fraglich

Drosophila gehört zu den genetisch und molekularbiologisch am sorgfältigsten analysierten eukaryotischen Systemen überhaupt. Es ist noch fraglich, ob die DNA der *Drosophila*-Zellen 5-mC enthält. Viele der Standardmethoden haben immer wieder negative Resultate erbracht^[23, 116, 117]. Auch in der DNA von *Saccharomyces cerevisiae* scheint es keine modifizierten Basen zu geben^[118]. Vor kurzem wurde berichtet, daß mit immunologischen Methoden in *Drosophila*-DNA ein 5-mC-Nucleotid in ungefähr 12500 Basen nachgewiesen werden konnte^[119]. Es ist anzunehmen, daß selbst ein sehr niedriges 5-mC-Niveau regulatorische Funktionen haben kann, wenn das modifizierbare Nucleotid in strategisch wichtigen Sequenzen vorkommt. Es ist aber auch möglich, daß DNA-Methylierung als regulatorisches Element erst ziemlich spät in der Phylogenese aufgetreten ist. Daher könnten *Drosophila* und andere niedere Eukaryonten – ebenso wie die Prokaryonten – in der Lage sein, ohne diesen Regulationsmechanismus auszukommen. Es wird an diesem Problem, das für mich noch nicht endgültig geklärt ist, weitergearbeitet werden müssen.

8. Mögliche Rolle der DNA-Methylierung bei komplexen biologischen Phänomenen: Differenzierung, Mutagenese und Onkogenese

Es ist unbestritten, daß die Inaktivierung eines der X-Chromosomen in weiblichen Zellen – wenigstens teilweise – durch spezifische DNA-Methylierungen erklärt werden kann^[90, 120]. Gene auf einem inaktivierten X-Chromosom können in wachsenden Zellen durch Zugabe des 5-mC-Analogons 5-Azacytidin reaktiviert werden. Gene der reaktivierten X-Chromosomen können durch ihre Produkte identifiziert werden, da bei den Reaktivierungsexperimenten Heterokaryons benutzt wurden. Das inaktive X-Chromosom war das menschlicher Zellen in Maus-Mensch-Hybridzellen. Dieses interessante Beispiel zeigt, daß kom-

plexe Muster unterschiedlicher Genexpression, sowie die Abschaltung ganzer Gengruppen durch DNA-Methylierung als Langzeitsignal zur Geninaktivierung gesteuert werden können. Ähnlich ist es auch vorstellbar, daß spezifische Methylierungsmuster an der Regulation anderer komplexer biologischer Phänomene beteiligt sind.

8.1. Differenzierung

Differenzierung von Zellen zu Organen mit spezifischer Funktion sowie die Entwicklung pluripotenter, undifferenzierter Zellen zu Organismen mit vielen hochspezialisierten Zellsystemen können als Resultat eines sehr komplizierten Programmes von Genaktivierungen und -inaktivierungen betrachtet werden. In hochspezialisierten Zellen müssen viele Gene permanent abgeschaltet sein, und es gibt eine Reihe von Befunden, die die Annahme stützen, daß spezifische DNA-Methylierung wenigstens einer der entscheidend beteiligten Mechanismen ist. Wir wissen noch nicht, welche Mechanismen für die Spezifität der de-novo-DNA-Methylierung verantwortlich sind, die wahrscheinlich dieses Inaktivierungsprogramm steuern. Spekulationen über eine spezialisierte Anordnung von DNA in Chromatin sind allein nicht zufriedenstellend, da das Problem dann nur auf die Frage reduziert wird, wie Chromatinanordnungen entstehen können, die spezifisch genug sind, um Signalfunktion für DNA-Methyltransferasen zu haben. Auf jeden Fall wird in Zukunft der detaillierten Analyse von DNA-Methyltransferasen hohe Priorität eingeräumt werden müssen.

Wenn spezifische DNA-Methylierungen ein Signal für die langfristige Geninaktivierung sind, dann ist es wenig plausibel, daß Gene, die gelegentlich reaktiviert werden müssen oder nur ein niedriges Aktivitätsniveau haben, durch DNA-Methylierung inaktiviert werden. Es müssen also zusätzlich zur DNA-Methylierung noch andere Mechanismen an der Geninaktivierung beteiligt sein; z. B. könnten spezifische Proteine, die an regulatorische DNA-Sequenzen binden in das Geschehen eingreifen. DNA-Methylierungen können diese Protein-DNA-Wechselwirkungen möglicherweise modulieren. Zum Beispiel müssen bestimmte Gene, die für essentielle Funktionen codieren, gelegentlich reaktiviert werden und dürfen daher nicht permanent abgeschaltet sein. Ein weiteres interessantes Beispiel sind Gene, die durch Steroide aktiviert werden können. Diese Gene sind normalerweise nicht methyliert. Bei anderen Genen verstehen wir die zeitliche Veränderung der Aktivität noch nicht gut genug, um das Ausmaß der DNA-Methylierung vorhersagen zu können. Man nimmt an, daß hochspezialisierte Gene nur in bestimmten Organen eines Organismus aktiv bleiben. Kann man jedoch ausschließen, daß diese spezifischen mRNAs nicht gelegentlich auch in anderen Zellen des Organismus gebildet werden? Sollte dies nötig sein, wäre DNA-Methylierung nicht das geeignete Signal, um diese Gruppe von Genen zu inaktivieren. Man kann nach diesen Überlegungen Gene in mindestens drei Klassen einteilen^[17]:

1. Permanent inaktive Gene
2. Inaktive Gene, die gelegentlich reaktiviert werden
3. Aktive Gene

Diese Einteilung ist auf jeden Fall zu verfeinern, wenn die Unterschiede in den Genaktivitäten besser verstanden werden. In dieser einfachen Klassifizierung wäre die DNA-Methylierung als Inaktivierungssignal nur für die Gene der ersten Klasse geeignet.

8.2. Mutagenese

Es gibt Untersuchungen^[94], die zeigen, daß die scheinbare Inaktivierung eines Gens, z. B. die Inaktivierung des Thymidin-Kinasegens in „tk⁻-Mutanten“, auf spezifische DNA-Methylierung zurückzuführen ist. Die scheinbare Mutation konnte in diesem speziellen Fall rückgängig gemacht werden, indem man die Mutantenzellen in Anwesenheit von 5-Azacytidin wachsen ließ. Wie in Abschnitt 4.3 ausführlich erklärt wurde, hemmt diese Verbindung die Maintenance-DNA-Methyltransferasen und führt so zu einer Verringerung der DNA-Methylierung und dadurch zur Induktion inaktivierter Gene. Dieses interessante Experiment unterstreicht die Notwendigkeit, die Definition und das Konzept des Begriffes Mutation neu zu überdenken.

8.3. Maligne Tumoren

Die Hinweise häufen sich, daß die DNA in vielen Tumoren im Gegensatz zur DNA in normalen Zellen erheblich hypomethyliert ist^[121]. Der niedrigere Methylierungsgrad wurde bei DNA allgemein^[122], wie auch bei spezifischen Genen beobachtet^[123]. Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen in vielen Parametern, bestimmt auch in einem veränderten Expressionsmuster vieler Gene – nicht nur der gerade modernen Onkogene^[124, 125]. Beide Befunde – geringere DNA-Methylierung und veränderte Muster der Genexpression – sind gut miteinander vereinbar. Es wird noch viel Arbeit erfordern, die Spezifität dieser Genaktivierungen zu zeigen und zwischen Ursache und Wirkung zu unterscheiden. Der Leser sei aber vor voreiligen Schlüssen gewarnt: Es konnte bisher noch kein kausaler Zusammenhang zwischen geringem Methylierungsgrad und maligner Transformation nachgewiesen werden. Es könnte sich auch hier um eines der vielen Epiphänomene handeln, die in der Vergangenheit irrtümlich für ätiologische Faktoren gehalten wurden. Trotzdem muß die Suche nach der Spezifität der Veränderungen in Methylierungsmustern in Tumorzellen fortgeführt werden.

Abschließend möchte ich ein Beispiel aus unserer eigenen Arbeit am Adenovirus-System anführen^[37, 38, 126]: Die Analyse der Methylierungsmuster von Adenovirus-Typ-12-DNA in virusinduzierten Tumoren ergab, daß in DNA von Tumorzellen die integrierte virale DNA-Sequenz stark hypomethyliert geblieben war, obwohl virale DNA nicht stark exprimiert wurde. Nach Explantation der Tumorzellen in Kultur nahm das Ausmaß der Methylierung der viralen DNA mit der Anzahl der Passagen der kultivierten Tumorzellen ständig zu. Dieses Ansteigen der DNA-Methylierung war nicht willkürlich, sondern folgte einem bestimmten Muster, das letztlich zur Hypermethylierung der integrierten, späten viralen Gene führte^[38]. Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, als die Zellen bald nach der Explantation aus dem Tumor subkloniert wurden. Zur Zeit wissen wir noch nicht, welche Faktoren das Zustandekommen spezifischer Methylierungsmuster des viralen Genoms

nach der Insertion in das Wirtsgenom regulieren. Gleichzeitig – aber vielleicht ohne kausalen Zusammenhang – mit dem Ansteigen der Methylierung der viralen DNA, zeigte das virale Genom eine erhöhte Tendenz aus dem Zellgenom exzidiert zu werden und damit während der frühen Passagen nach der Explantation aus der Wirtszelle wieder verlorenzugehen^[38].

9. Ausblick

Wie es so oft in der Forschung der Fall ist, haben Untersuchungen über die biologische Funktion der DNA-Methylierung mehr Probleme aufgeworfen als gelöst. Die DNA-Methylierung ist zu einem schnell expandierenden Studienobjekt geworden. Die wichtigsten Themen, die zur Zeit in vielen Laboratorien untersucht werden, sind die folgenden:

1. Promotor-Methylierungen an spezifischen Stellen und Sequenzen und ihre Auswirkungen auf die Genaktivität,
2. Bedeutung und Modus der Bildung komplexer DNA-Methylierungsmuster, speziell in den Nicht-Promotor-Regionen von Genen,
3. Spezifität und Regulation der Aktivität von DNA-Methyltransferasen in eukaryotischen Zellen,
4. aktive Demethylierung,
5. Anwendung von Sequenzierungstechniken^[26], um präzise DNA-Methylierungsmuster zu erhalten, speziell in inaktivierten Promotor-Sequenzen,
6. Mechanismus und biologische Bedeutung der Veränderungen in Methylierungsmustern,
7. Bindung spezifischer Proteine an methylierte DNA,
8. Rolle der DNA-Methylierung bei der Bildung von Chromatin,
9. Funktion der DNA-Methylierung in komplexen biologischen Prozessen.

Petra Böhm danke ich für ihre kompetente redaktionelle Mitarbeit an diesem Aufsatz. Die Forschung im Laboratorium des Autors wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB74-C1), vom Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und durch eine Spende der Hoechst AG unterstützt.

Eingegangen am 1. August 1984 [A 517]

- [1] Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966).
- [2] W. Doerfler, *Med. Hypotheses* 9 (1982) 563.
- [3] A. Razin, A. D. Riggs, *Science* 210 (1980) 604.
- [4] W. Doerfler, *J. Gen. Virol.* 57 (1981) 1.
- [5] W. Doerfler, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 93.
- [6] M. Ehrlich, R. Y.-H. Wang, *Science* 212 (1981) 1350.
- [7] W. Arber, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 14 (1974) 1.
- [8] R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 117.
- [9] S. Lacks, B. Greenberg, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4060.
- [10] A. D. Riggs, P. A. Jones, *Adv. Cancer Res.* 40 (1983) 1.
- [11] D. Drahovsky, T. L. J. Böhm, *Int. J. Biochem.* 12 (1980) 523.
- [12] Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47 (1982).
- [13] A. Razin, J. Friedman, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25 (1981) 33.
- [14] R. H. Burdon, R. L. P. Adams, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 294.
- [15] D. N. Cooper, *Hum. Genet.* 64 (1983) 315.
- [16] W. Doerfler, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108 (1984) 79.
- [17] W. Doerfler in G. Klein: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 4, Raven Press, New York 1984, S. 217.
- [18] W. Doerfler, K. D. Langner, I. Kruczek, L. Vardimon, D. Renz in A. Razin, H. Cedar, A. D. Riggs: *DNA Methylation*, Springer, New York 1984, S. 221.

- [19] J. H. Taylor: *DNA Methylation and Cellular Differentiation*, Springer, New York 1984.
- [20] T. A. Trautner: *Methylation of DNA in Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108 (1984).
- [21] A. Razin, H. Cedar, A. D. Riggs: *DNA Methylation*, Springer, New York 1984.
- [22] U. Günthert, M. Schweiger, M. Stupp, W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3923.
- [23] D. Eick, H.-J. Fritz, W. Doerfler, *Anal. Biochem.* 135 (1983) 165.
- [24] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503.
- [25] C. Waalwijk, R. A. Flavell, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 3231.
- [26] G. M. Church, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1991.
- [27] P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg, *J. Mol. Biol.* 113 (1977) 237.
- [28] M. G. Marinus, N. R. Morris, *J. Bacteriol.* 114 (1973) 1143.
- [29] Y. Gruenbaum, T. Naveh-Many, H. Cedar, A. Razin, *Nature London* 292 (1981) 860.
- [30] H. Subak-Sharpe, R. R. Burk, L. V. Crawford, J. M. Morrison, J. Hay, H. M. Keir, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31 (1966) 737.
- [31] A. P. Bird, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 1499.
- [32] G. Felsenfeld, J. Nickol, J. McGhee, M. Behe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 (1982) 577.
- [33] W. Doerfler, I. Kruczek, D. Eick, L. Vardimon, B. Kron, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 (1982) 593.
- [34] M. L. Tykocinski, E. E. Max, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 4385.
- [35] S. Hattman in P. D. Boyer: *The Enzymes*, Vol. 14, Academic Press, London 1981, S. 517.
- [36] D. Sutter, M. Westphal, W. Doerfler, *Cell* 14 (1978) 569.
- [37] I. Kuhlmann, W. Doerfler, *Virology* 118 (1982) 169.
- [38] I. Kuhlmann, W. Doerfler, *J. Virol.* 47 (1983) 631.
- [39] U. von Acken, D. Simon, F. Grunert, H.-P. Döring, H. Kröger, *Virology* 99 (1979) 152.
- [40] L. Vardimon, R. Neumann, I. Kuhlmann, D. Sutter, W. Doerfler, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 2461.
- [41] U. Wienhues, W. Doerfler, unveröffentlicht.
- [42] D. Sutter, W. Doerfler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44 (1979) 565.
- [43] D. Sutter, W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 253.
- [44] L. Vardimon, W. Doerfler, *J. Mol. Biol.* 147 (1981) 227.
- [45] I. Kruczek, W. Doerfler, *EMBO J.* 1 (1982) 409.
- [46] W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60 (1968) 636.
- [47] W. Doerfler, *J. Virol.* 6 (1970) 652.
- [48] W. Doerfler, R. Gahlmann, S. Stabel, R. Deuring, U. Lichtenberg, M. Schulz, D. Eick, R. Leisten, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 109 (1983) 193.
- [49] D. B. Willis, A. Granoff, *Virology* 107 (1980) 250.
- [50] D. B. Willis, R. Goorha, A. Granoff, *J. Virol.* 49 (1984) 86.
- [51] R. A. Gjerset, W. D. Martin, Jr., *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8581.
- [52] M. A. Goldman, G. P. Holmquist, M. C. Gray, L. A. Caston, A. Nag, *Science* 224 (1984) 686.
- [53] L.-H. Huang, R. Wang, M. A. Gama-Sosa, S. Shenoy, M. Ehrlich, *Nature London* 308 (1984) 293.
- [54] R. Breathnach, P. Chambon, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 349.
- [55] J. R. Nevins, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 441.
- [56] P. R. Srinivasan, E. Borek, *Science* 145 (1964) 548.
- [57] R. Sager, R. Kitchin, *Science* 189 (1975) 426.
- [58] R. Holliday, J. E. Pugh, *Science* 187 (1975) 226.
- [59] A. D. Riggs, *Cytogenet. Cell Genet.* 14 (1975) 9.
- [60] J. K. Christman, P. Price, L. Pedrinan, G. Acs, *Eur. J. Biochem.* 81 (1977) 53.
- [61] A. P. Bird, M. H. Taggart, B. A. Smith, *Cell* 17 (1979) 889.
- [62] R. C. Desrosiers, C. Mulder, B. Fleckenstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3839.
- [63] J. D. McGhee, G. D. Ginder, *Nature London* 280 (1979) 419.
- [64] J. L. Mandel, P. Chambon, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 2081.
- [65] J. C. Cohen, *Cell* 19 (1980) 653.
- [66] R. V. Guntaka, P. Y. Rao, S. A. Mitsialis, R. Katz, *J. Virol.* 34 (1980) 569.
- [67] L. H. T. van der Ploeg, R. A. Flavell, *Cell* 19 (1980) 947.
- [68] N. E. Hynes, U. Rahmsdorf, N. Kennedy, L. Fabiani, R. Michalides, R. Nusse, B. Groner, *Gene* 15 (1981) 307.
- [69] H. Stuhlmann, D. Jähner, R. Jaenisch, *Cell* 26 (1981) 221.
- [70] H. Weintraub, A. Larsen, M. Groudine, *Cell* 24 (1981) 333.
- [71] J. H. Hoffman, D. Steffen, J. Gusella, C. Tabin, S. Bird, D. Cowing, R. A. Weinberg, *J. Virol.* 44 (1982) 144.
- [72] S. S. Smith, J. C. Yu, C. W. Chen, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 4305.
- [73] J. L. Cook, A. M. Lewis, Jr., *Cancer Res.* 39 (1979) 1455.
- [74] H. Esche, *J. Virol.* 41 (1982) 1076.
- [75] K. Johansson, H. Persson, A. M. Lewis, U. Pettersson, C. Tibbetts, L. Philipson, *J. Virol.* 27 (1978) 628.
- [76] S. Gerber-Huber, F. E. B. May, B. R. Westley, B. K. Felber, H. A. Hoshbach, A.-C. Andres, G. U. Ryffel, *Cell* 33 (1983) 43.
- [77] L. Vardimon, I. Kuhlmann, H. Cedar, W. Doerfler, *Eur. J. Cell Biol.* 25 (1981) 13.
- [78] L. Vardimon, A. Kressmann, H. Cedar, K. Maechler, W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1073.
- [79] L. Vardimon, U. Günthert, W. Doerfler, *Mol. Cell Biol.* 2 (1982) 1574.
- [80] L. Vardimon, D. Renz, W. Doerfler, *Recent Results Cancer Res.* 84 (1983) 90.
- [81] A. Fradin, J. L. Manley, C. L. Prives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5142.
- [82] R. Stein, A. Razin, H. Cedar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3418.
- [83] D. E. Waechter, R. Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1106.
- [84] M. L. McGeady, C. Jhappan, R. Ascione, G. F. van de Woude, *Mol. Cell Biol.* 3 (1983) 305.
- [85] D. Simon, H. Stuhlmann, D. Jähner, H. Wagner, E. Werner, R. Jaenisch, *Nature London* 304 (1983) 275.
- [86] M. Graessmann, A. Graessmann, H. Wagner, E. Werner, D. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6470.
- [87] J. K. Christman, N. Weich, B. Schoenbrun, N. Schneiderman, G. Acs, *J. Cell Biol.* 86 (1980) 366.
- [88] P. A. Jones, S. M. Taylor, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 2933.
- [89] F. Creusot, G. Acs, J. K. Christman, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2041.
- [90] P. A. Jones, S. M. Taylor, T. Mohandas, L. J. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1215.
- [91] S. M. Taylor, P. A. Jones, *Cell* 17 (1979) 771.
- [92] M. Groudine, R. Eisenman, H. Weintraub, *Nature London* 292 (1981) 311.
- [93] K. F. Conklin, J. M. Coffin, H. L. Robinson, M. Groudine, R. Eisenman, *Mol. Cell Biol.* 2 (1982) 638.
- [94] M. Harris, *Cell* 29 (1982) 483.
- [95] P. G. Constantinides, P. A. Jones, W. Gevers, *Nature London* 267 (1977) 364.
- [96] J. DeSimone, P. Heller, L. Hall, D. Zwiers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4428.
- [97] T. J. Ley, J. DeSimone, N. P. Anagnou, G. H. Keller, R. K. Hymphries, P. H. Turner, N. S. Young, P. Heller, A. W. Nienhuis, *N. Engl. J. Med.* 307 (1982) 1469.
- [98] M.-O. Ott, L. Sperling, D. Cassio, J. Levilliers, J. Sala-Trepat, M. C. Weiss, *Cell* 30 (1982) 825.
- [99] R. Stein, N. Sciaky-Gallili, A. Razin, H. Cedar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2422.
- [100] V. L. Wilson, P. A. Jones, *Cell* 32 (1983) 239.
- [101] R. A. Flavell, F. Grosfeld, M. Busslinger, E. de Boer, D. Kioussis, A. L. Mellor, L. Golden, E. Weiss, J. Hurst, H. Bud, H. Bullman, E. Simpson, R. James, A. R. M. Townsend, P. M. Taylor, W. Schmidt, J. Ferluga, L. Leben, M. Santamaria, G. Atfield, H. Festenstein, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 (1982) 1067.
- [102] I. Kruczek, W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7586.
- [103] L. Sanders Haigh, B. Blanchard Owens, S. Hellewell, V. M. Ingram, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5332.
- [104] A. F. Wilks, P. J. Cozens, I. W. Mattaj, J.-P. Jost, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4252.
- [105] K.-D. Langner, L. Vardimon, D. Renz, W. Doerfler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2950.
- [106] J. Ortin, K. H. Scheidtmann, R. Greenberg, M. Westphal, W. Doerfler, *J. Virol.* 20 (1976) 355.
- [107] H. Esche, B. Siegmund, *J. Gen. Virol.* 60 (1982) 99.
- [108] J. L. Bos, J. L. Polder, R. Bernards, P. I. Schrier, P. J. van den Elsen, A. J. van der Eb, H. van Ormondt, *Cell* 27 (1981) 121.
- [109] M. Busslinger, J. Hurst, R. A. Flavell, *Cell* 34 (1983) 197.
- [110] C. M. Gorman, L. F. Moffat, B. H. Howard, *Mol. Cell Biol.* 2 (1982) 1044.
- [111] P. C. van der Vliet, A. J. Levine, *Nature London New Biol.* 246 (1973) 170.
- [112] R. Stein, Y. Gruenbaum, Y. Pollak, A. Razin, H. Cedar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 61.
- [113] M. McClelland, R. Ivarie, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 7865.
- [114] N. Jones, T. Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3665.
- [115] U. Weyer, K.-D. Langner, W. Doerfler, unveröffentlicht.
- [116] S. S. Smith, C. A. Thomas, Jr., *Gene* 13 (1981) 395.
- [117] S. Urieli-Shoval, Y. Gruenbaum, J. Sedat, A. Razin, *FEBS Lett.* 146 (1982) 148.
- [118] J. N. Proffitt, J. R. Davie, D. Swinton, S. Hattman, *Mol. Cell Biol.* 4 (1984) 985.
- [119] C. W. Achwal, P. Ganguly, H. S. Chandra, *EMBO J.* 3 (1984) 263.
- [120] T. Mohandas, R. S. Sparkes, L. J. Shapiro, *Science* 211 (1981) 393.
- [121] R. M. Hoffman, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, im Druck.
- [122] J. N. Lapeyre, F. F. Becker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979) 698.
- [123] A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Nature London* 301 (1983) 89.
- [124] J. M. Bishop, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 301.
- [125] D. J. Slamon, J. B. de Kernion, I. M. Verma, M. J. Cline, *Science* 224 (1984) 256.
- [126] I. Kuhlmann, S. Achten, R. Rudolph, W. Doerfler, *EMBO J.* 1 (1982) 79.
- [127] D. Knebel, U. Weyer, W. Doerfler, unveröffentlicht.