

Verteilung und enzymatische Hypermethylierung invers repetitiver DNA-Sequenzen in verschiedenen Mäuse- und menschlichen Zellen

Distribution and Enzymic Hypermethylation of Inverted DNA Repeats in Different Murine and Human Cells

Thomas L. J. Boehm und Dusan Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie der Universität Frankfurt, Abteilung für Therapeutische Biochemie, Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt am Main 70

Z. Naturforsch. **34 c**, 558 – 564 (1979); eingegangen am 2. Februar/6. April 1979

Reassociation Kinetics, Enzymatic DNA Methylation

A specific class of DNA sequences, the inverted repetitive sequences, forms a double-stranded structure within a single linear polynucleotide chain in denatured DNA. The reassociation process is unimolecular and occurs very fast. Quantitative analyses have shown that these sequences comprise about 4–5% of the nuclear DNA of various mammalian cells (P815 mouse mastocytoma, Hela, L cells, Raji and Chang cells, and human embryonic hepatocytes) and are interspersed within sequences of other degrees of repetitiveness.

After labeling the cells with L-[Methyl-³H]methionine and [¹⁴C]deoxycytidine, relative rates of enzymic DNA methylation were computed on the basis of ³H and ¹⁴C radioactivities found in pyrimidine residues of the nuclear DNA. The results indicate that DNA of inverted repetitive sequences is methylated to a level about 50% higher than the ordinary repetitive sequences and to about 300% higher than the unique and intermediary sequences.

The biological function of the inverted repeats as well as the role of their enzymic hypermethylation is unknown.

Einleitung

Im eukaryotischen Genom finden sich DNA-Sequenzen mit einer großen Wiederholungsfrequenz, die nach Denaturation proportional zu ihrem Repetitionsgrad doppelsträngige Strukturen bilden [1]. Diese repetitiven Sequenzen lassen sich in zwei Klassen einteilen:

- (a) „normal“ repetitive Sequenzen vom Typ ABC . . . ABC, die in einer bimolekularen Reaktion reassoziiieren ($C/C_0 = 1/1 + kCot$) und
- (b) „invers“ repetitive Sequenzen vom Typ ABC . . . CBA, die durch eine konzentrations-unabhängige, unimolekulare Reaktion ($C/C_0 = e^{-kt}$) innerhalb eines Polynukleotidstranges helikale Abschnitte bilden.

Für beide Arten repetitiver Sequenzen wird eine regulatorische Funktion diskutiert [2–5], insbesondere weil man fand, daß diese Sequenzen nicht zufällig im Genom verteilt sind [6, 7]. Man findet sie vielmehr in regelmäßigen Abständen zwischen unique Sequenzen verteilt.

Sonderdruckforderungen an PD Dr. D. Drahovsky
0341-0382/79/0700-0558 \$ 01.00/0

Wir haben kürzlich gezeigt [8], daß die invers repetitiven Sequenzen im Genom von Maus-P815-Mastocytoma-Zellen die höchste Methylierungsrate, das heißt die höchste enzymatische Umwandlungsrate von Cytosin in 5-Methylcytosin, aller DNA-Sequenzklassen besitzen. In dieser Arbeit zeigen wir, daß die Methylierung invers repetitiver Sequenzen auch in Maus-L-Fibroblasten und Hela-Zellen den höchsten Wert zeigt. Neben der Verteilung zwischen Sequenzen anderer Repetitivität scheint die enzymatische Hypermethylierung invers repetitiver Sequenzen ein allgemeines Charakteristikum des eukaryotischen Genoms zu sein.

Material und Methoden

(1) Charakterisierung der Zellen

(a) Mäusezellen

P815-Mastocytoma-Zellen wurden aus einem malignen Maustumor erhalten. Nach intraperitonealer Inokulation disseminiert der Tumor in die Brustdrüse und andere Organe und tötet die Tiere innerhalb von 8–10 Tagen. Die Zellen werden in Kultur in McCoy-5a-Medium gezüchtet und zeigen eine Generationszeit von etwa 12–14 Stunden.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Maus-L-Fibroblasten sind eine etablierte Zelllinie, die in Eagle's MEM-Medium eine Generationszeit von etwa 20 Stunden zeigen.

(b) menschliche Zellen

HeLa-Zellen entstammen einer permanenten Kultur (Eagle's MEM-Medium) und haben eine Generationszeit von 30 Stunden. Bei Chang-Zellen handelt es sich um eine dem menschlichen lymphatischen Gewebe entstammende fibroblastische Zelllinie, die in Eagle's MEM-Medium (+20% fötales Kälberserum v/v) eine Generationszeit von 24 Stunden haben.

Raji-Zellen sind eine maligne Zelllinie, die von menschlichen B-Lymphozyten abstammt und in RPMI-Medium (+10% fötales Kälberserum) gezüchtet wird (Generationszeit 24 Stunden). Embryonale Hepatocyten sind eine fibroblastische Zelllinie (Flow GmbH), die in Eagle's MEM-Medium (+10% fötales Kälberserum) eine Generationszeit von etwa 8 Tagen hat.

(2) DNA-Isolierung und Fraktionierung, Hydroxylapatit-Chromatographie

Die DNA wurde aus den gewaschenen Zellen nach einer modifizierten Methode [8] von Marmur [9] isoliert. Nach der letzten Alkoholpräzipitation wurde die DNA in 0,4 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 (SPB) gelöst und durch Ultraschallbehandlung in einem Branson-Sonifier (Branson Sonic Power, Danbury, U.S.A.) auf eine einheitliche Länge gebracht; die jeweilige Fragmentgröße wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt [8]. Zur Isolierung einzelner Sequenzklassen des Genoms der Zellen wurde nach dem in Abb. 1 dargestellten Schema vorgegangen. Die Hydroxylapatit-Chromatographie wurde, wie früher beschrieben [8], bei 60 °C durchgeführt; einzelsträngige Strukturen wurden mit 0,15 M SPB, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 0,4 M SPB stufenweise eluiert.

(3) Messung der enzymatischen Methylierung

Um die enzymatische Methylierung in den verschiedenen Zellen zu bestimmen, wurde die DNA für 2–3 Zellzyklen durch [¹⁴C]Desoxycytidin und L-[Methyl-³H]Methionin markiert. Zu einer Kultur von 100 ml Medium (Zelldichte $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden 5 µCi [¹⁴C]Desoxycytidin (Amersham Buch-

ler) und 150 µCi L-[Methyl-³H]Methionin (New England Nuclear) zugegeben.

Zur Basenanalyse der DNA wurde sie nach Isolierung und Fraktionierung in einzelne Sequenzklassen in 96% Ameisensäure hydrolysiert (175 °C, 90 min) und dann entweder in Butanol : conc. NH₃ : H₂O (86 : 1 : 13) oder in Isopropanol : HCl : H₂O (68 : 6 : 26) papierchromatographisch (MN 214, Macherey und Nagel, Düren) getrennt. Bei der Bestimmung der absoluten Methylierungsrate wurde das Butanol-System verwendet und die absolute Methylierungsrate nach Kappler [10] berechnet. Bei der Bestimmung der relativen Methylierungsrate wurde das Isopropanol-System benutzt und der Wert aus dem Verhältnis der ³H-Radioaktivität in 5-Methylcytosin und der ¹⁴C-Radioaktivität in Cytosin berechnet.

Ergebnisse

(1) Anteil einzelner Sequenzklassen im Genom von Maus- und menschlichen Zellen

Den Untersuchungen zur Verteilung und enzymatischen Methylierung verschiedener DNA-Sequenzklassen ging die Bestimmung ihres Anteils im Genom der untersuchten Zellen voraus. Dazu wurde die nukleare DNA wie unter Material und Methoden beschrieben isoliert und auf eine einheitliche Länge von 450 Basenpaaren gebracht [8]. Danach wurde die DNA, wie in Abb. 1 schematisch dargestellt ist, in einzelne Sequenzklassen entsprechend ihres Renaturierungsverhaltens fraktioniert. Nach Denaturation und Renaturation bis zu einem Cot von 0,1 finden sich nur hochrepetitive Sequenzen in doppelsträngiger Form, die sich mit Hilfe der Hydroxylapatitchromatographie von einzelsträngigen Strukturen abtrennen lassen. Diese können durch weitere Denaturation und Renaturation bis Cot kleiner 0,001 in normal und invers repetitive Sequenzen getrennt werden [8, 11]. Durch diese Methode ist es möglich, eine sehr homogene Fraktion invers repetitive Sequenzen zu erhalten [11, 12], wobei die Kontamination mit Satelliten-DNA nur gering ist [8, 11, 12]. Die beim ersten Hydroxylapatitschritt (Cot 0,1) noch einzelsträngige DNA wird bei 60 °C bis zu einem Cot von 1000 inkubiert und dann in intermediane und einmalige (unique) DNA-Sequenzen getrennt (Abb. 1). Die für die einzelnen Zellen ermit-

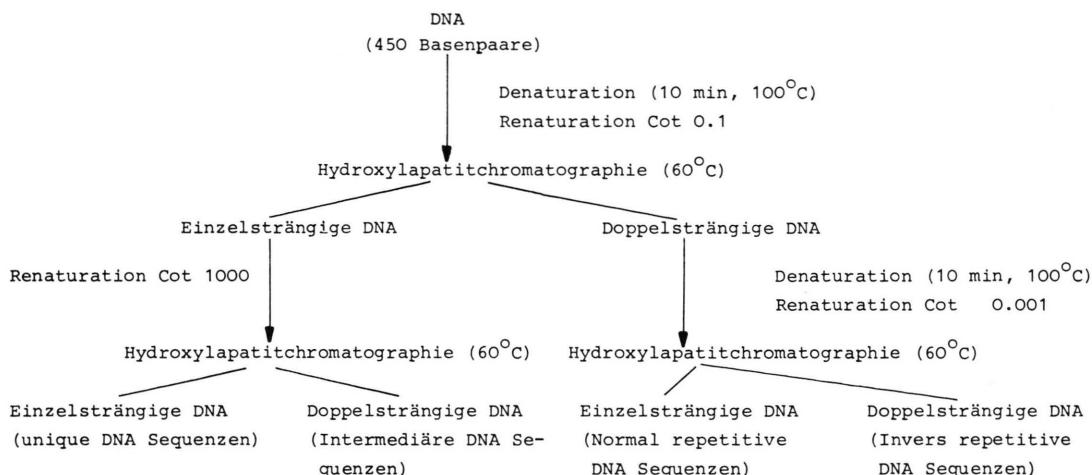


Abb. 1. Flußdiagramm zur Isolierung von unique, intermediären, normal und invers repetitiven Sequenzen aus der nukleären DNA.

telten Anteile an den verschiedenen Sequenzklassen sind in Tab. I aufgeführt. Unique DNA-Sequenzen machen etwa 60% des Genoms bei beiden Spezies aus, der Anteil der intermediären Sequenzen mit 25% und der der hochrepetitiven Sequenzen mit 12–13% zeigt ebenfalls Übereinstimmung. Der Anteil der invers repetitiven Sequenzen ist bei menschlichen Zellen im Vergleich zur DNA aus Mäusezellen erniedrigt.

(2) Die Verteilung repetitiver Sequenzen

Die hier berichteten Untersuchungen zur Verteilung repetitiver Sequenzen basieren auf der Reassoziation unterschiedlich langer denaturierter DNA-Fragmente bis zu einem Cot, an dem nur repetitive Sequenzen reassoziiieren. Man wird bei steigender Fragmentlänge der untersuchten DNA gerade dann

eine Erhöhung der an Hydroxylapatit gebundenen DNA-Fraktion erwarten, wenn die repetitiven Sequenzen in bestimmten Abständen regelmäßig im Genom verteilt sind [13]. Falls sich die repetitiven Sequenzen aber nur in einem bestimmten Teil des Genoms befinden, so sollte sich ein Anstieg der an Hydroxylapatit gebundenen DNA-Fraktion erst bei der Untersuchung sehr großer Fragmentlängen beobachten lassen. Untersuchungen in der hier beschriebenen Art, die zum ersten Mal von Davidson und Britten und deren Mitarbeitern durchgeführt wurden [13], haben gezeigt, daß repetitive Sequenzen im eukaryotischen Genom regelmäßig zwischen unique DNA-Sequenzen verteilt sind [13, 14]. Dieses Muster gilt im allgemeinen für drei Viertel bis vier Fünftel des Genoms der bisher untersuchten Spezies aus allen Teilen des phylogenetischen Stammbaums [3].

Tab. I. Anteil der DNA-Sequenzklassen am Genom von Mäuse- und menschlichen Zellen.

Zelle	unique Sequenzen [%]	intermediäre Sequenzen [%]	normal repetitive Sequenzen [%]	invers repetitive Sequenzen [%]
<i>Mäusezellen:</i>				
P815	63,0	24,0	8,5	4,5
L-Fibroblasten	61,0	26,6	7,9	4,5
<i>Menschliche Zellen:</i>				
Hela	65,0	22,6	8,0	4,4
Chang	60,5	26,0	11,5	2,0
Raji	58,0	28,0	11,8	2,2
Embryonale Hepatocyten	62,5	24,0	9,5	4,0

Tab. II. Verteilung verschiedener repetitiver Sequenzklassen im Genom von Mäuse- und menschlichen Zellen.

Reassoziationskinetik	DNA-Fraktion gebunden an Hydroxylapatit [%]			
	Mäusezellen ^a		menschliche Zellen ^b	
	Fragmentlänge 450 Bp	Fragmentlänge 14 000 Bp	Fragmentlänge 450 Bp	Fragmentlänge 14 000 Bp
Cot 100 (repetitive Sequenzen)	22,2±0,4	79,8±6,4	18,3±1,5	60,0±4,4
Cot 0,1 (hochrepetitive Sequenzen)	12,7±0,4	57,0±1,4	7,6±1,3	25,5±5,2
Cot 0,001 (invers repetitive Sequenzen)	4,5±0,1	30,0±7,1	3,2±1,2	10,3±0,5

^a Maus P815-Mastocytoma-Zellen und Maus-L-Fibroblasten.

^b Hela-, Chang-, Raji-Zellen und Embryonale Hepatocyten.

In Tab. II ist der Anteil repetitiver Sequenzen, die bei Cot 100 reassoziiert sind, aufgeführt. Bei einer Fragmentlänge von 450 Basenpaaren binden sich 22,2±0,4% der DNA aus Mäusezellen und 18,3±1,5% der DNA aus menschlichen Zellen an Hydroxylapatit. Bei Fragmenten von 14 000 Basenpaaren Länge erhöht sich dieser Anteil nach Reassoziation bis Cot 100 signifikant auf etwa 80% bei Mäuse- und 60% bei menschlichen Zellen. Untersuchungen zur Hyperchromizität und Spaltbarkeit mit Nuklease S1 der an Hydroxylapatit gebundenen DNA zeigen, daß tatsächlich nur ein kleiner Teil der gebundenen DNA aus doppelsträngigen Strukturen besteht [13]. Dies bedeutet, daß unique DNA-Sequenzen kovalent an repetitive Sequenzen gebunden sind und sich deshalb mit an Hydroxylapatit binden.

Untersucht man mit diesem Verfahren die Verteilung hochrepetitiver Sequenzen (normal und invers repetitive Sequenzen), die schon bei einem Cot von 0,1 reassoziiert sind, so zeigt sich, daß diese Verteilung nur in einem kleineren Teil des Genoms auftritt (Tab. II). Bei Mäusezellen binden sich unter diesen Bedingungen 57% des gesamten Genoms an Hydroxylapatit. Bei menschlichen Zellen ist dieser Anteil bedeutend geringer, er beträgt nur etwa 25,5±5,2% des Gesamtgenoms. Die oben beschriebenen Verfahren ermöglichen es, auch die Verteilung invers repetitiver Sequenzen im Genom zu untersuchen. Man läßt DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge bei einem Cot kleiner 0,001 reassoziiieren. Mit Hilfe der Hydroxylapatitchromatographie werden diejenigen Strukturen isoliert, die doppelsträngige Anteile enthalten. Man findet dabei, daß bei der Reassoziation von Fragmenten der Länge 14 000 Basen-

paare etwa 35% des P815-Genoms und etwa 25% des Maus-L-Fibroblasten-Genoms an Hydroxylapatit gebunden werden (Tab. II).

Dies deutet darauf hin, daß die invers repetitiven Sequenzen, die 4,5% des Mäusegenoms ausmachen, in etwa 30% des Genoms verteilt sind. Die Verteilung im Genom menschlicher Zellen ist wesentlich anders. Die invers repetitiven Sequenzen, deren Anteil zwischen 2,0–4,4% schwankt, sind in nur etwa 10–11% des Genoms nachzuweisen.

Die beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die invers repetitiven Sequenzen nur in einem kleinen Teil sowohl des Mäuse- als auch des menschlichen Genoms vorkommen. Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, befinden sich invers repetitive Sequenzen im Genom nur an bestimmten Häufungsstellen (cluster) [7]. Dabei ist der Abstand der invers repetitiven Sequenzen innerhalb der Häufungsstellen insgesamt geringer als der Abstand der Häufungsstellen untereinander. Diese Befunde sind mit den Ergebnissen der Reassoziationsexperimente, wie sie oben beschrieben wurden, vereinbar.

(3) Invers repetitive Sequenzen im Genom von Maus-L-Fibroblasten

Analysiert man den Anteil des Genoms von Maus-L-Fibroblasten, der bei verschiedener Fragmentlänge und Reassoziation bis Cot kleiner 0,001 an Hydroxylapatit gebunden wird (Abb. 2), so ergibt sich, daß bei einer Fragmentlänge von 6000 Basenpaaren 18% des gesamten Genoms, bei einer Fragmentlänge von 14 000 Basenpaaren 25% an Hydro-

xylapatit gebunden werden. Die Werte bei einer Reassoziation bei $Cot 0,1$ und $Cot 100$ sind in Abb. 2 zum Vergleich eingetragen; die Werte für die Fragmentlänge 14 000 Basenpaare sind oben schon erörtert worden.

Die Untersuchung der Verteilung invers repetitiver Sequenzen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ermöglicht die Analyse größerer Fragmente. Wilson und Thomas [7] haben für das gesamte Genom von Maus-L-Fibroblasten berichtet, daß der mittlere Abstand invers repetitiver Sequenzen innerhalb der oben beschriebenen Cluster etwa 11 000 Basenpaare und der Abstand der Mitten solcher Cluster etwa 180 000 Basenpaare betragen soll. Kombiniert man nun die Mittelwerte aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit den Ergebnissen reassoziationskinetischer Experimente, so kann man die durchschnittliche Anzahl invers repetitiver Sequenzen in solchen Clustern innerhalb des Genoms der Maus-L-Fibroblasten berechnen.

Für diese Berechnung muß man die Werte aus der Analyse der Fragmente der Länge 14 000 Basenpaare verwenden, da nur diese länger als der mittlere Abstand der invers repetitiven Sequenzen sind [7]. Die Anzahl der Fragmente dieser Größe in einem DNA-Stück der Länge 180 000 Basenpaare bei zufälliger Fragmentierung ergeben $180\,000/14\,000 = 12,86$ Fragmente. Da von diesen Fragmenten nur 25% bei Reassoziation bei Cot kleiner 0,001 an Hydroxylapatit gebunden werden (Abb. 2), bedeutet das, daß invers repetitive Sequenzen nur in $12,86 \times 0,25 = 3,21$ Fragmenten vorkommen. Dies entspricht einer Gesamtlänge von $3,21 \times 14\,000 = 45\,000$ Basenpaaren. Die durchschnittliche Zahl invers repetitiver Sequenzen n in einem solchen Cluster ergibt sich dann nach Abb. 3 aus $n = d/d' = 45\,000/11\,000 = 4$. Damit finden sich vier invers repetitive Sequenzen in einem Cluster des Genoms von Maus-L-Fibroblasten.

(4) Enzymatische Methylierung in verschiedenen Sequenzklassen von Maus-L-Fibroblasten und Hela-Zellen

Wir haben kürzlich gezeigt, daß invers repetitive Sequenzen in Maus-P815-Mastocytoma-Zellen die höchste Methylierungsrate aller Sequenzklassen aufweisen [8]. Eine analoge Studie mit Maus-L-Fibroblasten und Hela-Zellen ist in dieser Arbeit durchgeführt worden.

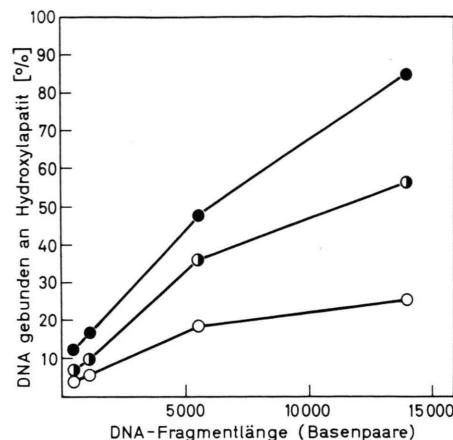


Abb. 2. Bindung der DNA aus Maus-L-Fibroblasten verschiedener Fragmentlängen an Hydroxylapatit unter verschiedenen Reassoziationsbedingungen. (●) Reassoziation bis $Cot 100$, (○) Reassoziation bis $Cot 0,1$, (○) Reassoziation bis $Cot 0,001$.

Zur Messung der Rate der enzymatischen Methylierung bedienten wir uns der Methode in ref. 8, bei der die Zellen in Kultur gleichzeitig mit [^{14}C]Desoxyctidin und L-[Methyl- 3H]Methionin markiert werden. Diese Doppelmarkierung der Zellen läßt nach einigen Zellzyklen ein charakteristisches Verteilungsmuster der Radioaktivität in den DNA-Basen entstehen [10]. Wie aus Tab. III hervorgeht, findet sich nahezu die gesamte Radioaktivität des L-[Methyl- 3H]Methionins in 5-Methylcytosin (96%), während die ^{14}C -Radioaktivität des [^{14}C]Desoxyctidins in allen Pyrimidinen gefunden wird. Um die Spezifität der 3H -Markierung in 5-Methylcytosin zu erhöhen, wird die Utilisierung markierter Methylgruppen

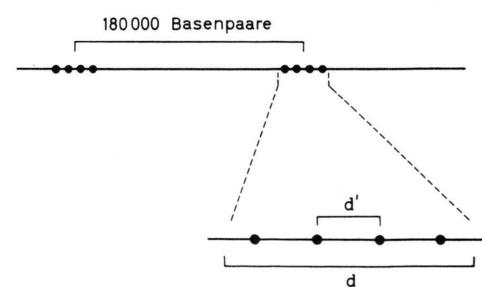


Abb. 3. Anordnung invers repetitiver DNA-Sequenzen im Genom von Maus-L-Fibroblasten. Der Abstand d' der einzelnen invers repetitiven Sequenzen in einem Cluster beträgt 11 000 Basenpaare, der Abstand der Mitten der Cluster 180 000 Basenpaare [7]. Ein Cluster enthält im Durchschnitt vier invers repetitive Sequenzen.

Tab. III. Verteilung der Radioaktivität in DNA-Pyrimidinen nach Markierung von Zellen *in vivo* mit [¹⁴C]Desoxycytidin und L[Methyl-³H]Methionin (unique DNA-Sequenzen aus P815-Zellen).

Pyrimidin	<i>R</i> _f -Wert in Isopropanol : HCl : H ₂ O (68 : 6 : 26)	³ H-Radioaktivität [%]	¹⁴ C-Radioaktivität [%]
Cytosin	0,42	1,0	37,0
5-Methylcytosin	0,48	96,0	1,0
Thymin	0,79	2,0	56,0
andere	—	1,0	6,0

pen des L[Methyl-³H]Methionins über den C1-Pool der Zelle durch Zugabe von Natriumformiat (20 mM) im Medium unterdrückt [8, 10]. Aus den ¹⁴C-Radioaktivitäten in Cytosin und 5-Methylcytosin erhält man nach der von Kappler angegebenen Formel [10] die absolute Methylierungsrate, also die prozentuale Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin. Da diese Methode aber eine sehr hohe spezifische Aktivität der DNA erfordert, ist sie für die Untersuchung kleiner Teile der DNA nur bedingt geeignet. Aus diesem Grunde haben wir die Methode der doppelten Markierung entwickelt [8], um so relative Methylierungsraten aus dem Verhältnis der ³H-Radioaktivität in 5-Methylcytosin und der ¹⁴C-Radioaktivität in Cytosin zu berechnen. Diese Technik ermöglichte es zum Beispiel, die relativen Methylierungsraten in den während der Reparatursynthese gebildeten DNA-Sequenzen zu messen [15].

Mit dieser Methode untersuchten wir die Methylierungsraten in verschiedenen Sequenzklassen von Maus-L-Fibroblasten und Hela-Zellen (Tab. IV) und konnten in diesen Fällen ebenso wie schon früher für Maus-P815-Zellen zeigen, daß die repetitiven Sequenzen eine höhere Methylierungsrate als die unique und intermediären Sequenzen aufweisen. Von den repetitiven Sequenzen zeigen die invers repetitive Sequenzen eine höhere Methylierungsrate als die normal repetitive Sequenzen, und sind im

Vergleich zu den unique Sequenzen etwa 250% (Maus-L-Fibroblasten) bzw. 217% (Hela-Zellen) höher methyliert. Die absoluten Methylierungsraten in der gesamten DNA dieser Zellen betragen für P815-Zellen 3,7%, für Maus-L-Fibroblasten 4,2% und für Hela-Zellen 3,9%.

Diskussion

Wir haben in dieser Arbeit gezeigt, daß invers repetitive Sequenzen im Genom verschiedener Mäuse- und menschlicher Zellen nicht zufällig, sondern in geordneter Form verteilt sind. Bei Maus-L-Fibroblasten konnten aus der Kombination elektronenmikroskopischer Daten von Wilson und Thomas [7] und den hier dargelegten Hydroxylapatit-Bindungsstudien (Abb. 2) die Anordnungsprinzipien invers repetitiver Sequenzen im eukaryotischen Genom verdeutlicht werden (Abb. 3). In Untersuchungen zur enzymatischen Methylierung der DNA haben wir in invers repetitive Sequenzen verschiedener Zellen die höchste Methylierungsrate aller untersuchten Sequenzklassen feststellen können. Die biologische Funktion der invers repetitive Sequenzen ist noch unbekannt. Wagner und Radmann [16] postulieren einen Mechanismus der genetischen Rekombination in eukaryotischen Zellen, in dem diese

Fraktion der DNA	P815		L-Fibroblasten		Hela	
	5-MeC C	C T	5-MeC C	C T	5-MeC C	C T
native DNA	0,14	0,64	0,07	0,76	0,80	0,36
unique DNA-Sequenzen	0,10	0,66	0,06	0,75	0,71	0,38
intermediäre DNA-Sequenzen	0,13	0,66	0,06	0,82	0,71	0,38
normal repetitive DNA-Sequenzen	0,31	0,55	0,11	0,64	1,43	0,30
invers repetitive DNA-Sequenzen	0,46	0,63	0,15	0,70	1,54	0,36

Tab. IV. Methylierungsraten in verschiedenen DNA-Sequenzklassen im Genom verschiedener Zellen.

Sequenzen eine entscheidende Rolle spielen. Weiterhin vermutet man in invers repetitiven Sequenzen Rezeptor- und Erkennungsstellen [5, 17–19] in Analogie zu DNA-Sequenzen mit zweifacher Rotationssymmetrie, die bei Bakterien durch Restriktionsenzyme [18–19] oder durch den *lac*-Repressor erkannt werden [17]. Zum anderen haben Wallace und Kass aufgrund theoretischer Überlegungen eine invers repetitive Struktur für Initiations- und Terminationsstellen der Transkription in eukaryotischer DNA gefordert [20, 21]. In ihrem Modell ist ein Gen bzw. eine proteincodierende DNA-Sequenz von zwei invers repetitiven Sequenzen eingeschlossen, die Initiations- und Terminationseigenschaften ha-

ben sollen. Aus dieser Sicht könnte die enzymatische Hypermethylierung der invers repetitiven Sequenzen von biologischer Bedeutung sein und ähnlich wie bei Restriktionsenzymen die Erkennung solcher Sequenzen durch regulatorische Proteine kontrollieren.

Acknowledgments

Diese Untersuchungen sind von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (Dr 104/5) und Teil einer Dissertation von T. L. J. B. am Fachbereich Humanmedizin der Universität Frankfurt am Main.

- [1] R. J. Britten u. D. E. Kohne, *Science* **161**, 529 (1968).
- [2] R. J. Britten u. E. H. Davidson, *Quart. Rev. Biol.* **46**, 111 (1971).
- [3] E. H. Davidson u. R. J. Britten, *Cancer Research* **34**, 2034 (1974).
- [4] S. Perlman, C. Philips u. J. O. Bishop, *Cell* **8**, 33 (1976).
- [5] T. Cavalier-Smith, *Nature* **262**, 255 (1976).
- [6] E. H. Davidson, D. E. Graham, B. R. Neufeld, M. E. Chamberlin, C. S. Amerson, B. R. Hough u. R. J. Britten, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 295 (1973).
- [7] D. A. Wilson u. C. A. Thomas, Jr., *J. Mol. Biol.* **84**, 115 (1974).
- [8] D. Drahovsky, T. L. J. Boehm u. W. Kreis, *Biochim. Biophys. Acta*, im Druck (1979).
- [9] J. Marmur, *J. Mol. Biol.* **3**, 208 (1961).
- [10] J. W. Kappler, *J. Cell. Physiol.* **75**, 21 (1970).
- [11] P. J. Dott, C. R. Chuang u. G. F. Saunders, *Biochemistry* **15**, 4120 (1976).
- [12] P. L. Deininger u. C. W. Schmid, *J. Mol. Biol.* **106**, 773 (1974).
- [13] E. H. Davidson, B. R. Hough, C. S. Amerson u. R. J. Britten, *J. Mol. Biol.* **77**, 1 (1973).
- [14] D. E. Graham, B. R. Neufeld, E. H. Davidson u. R. J. Britten, *Cell* **1**, 127 (1974).
- [15] D. Drahovsky, I. Lacko u. A. Wacker, *Biochim. Biophys. Acta* **447**, 139 (1976).
- [16] R. E. Wagner, Jr. u. M. Radman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3619 (1975).
- [17] W. Gilbert u. A. Maxam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3581 (1973).
- [18] T. J. Kelly u. H. O. Smith, *J. Mol. Biol.* **51**, 393 (1970).
- [19] W. Arber, *Prog. Nucl. Acid Res.* **14**, 1 (1974).
- [20] B. Wallace u. T. L. Kass, *Genetics* **77**, 541 (1974).
- [21] B. Wallace u. T. L. Kass, *Genetics* **82**, 139 (1976).