

Die Beziehung der enzymatischen Methylierung invers repetitiver DNA Sequenzen zur Transkription in Maus P815 Mastocytoma Zellen

The Relation of Enzymatic Methylation of Inverted DNA Repeats to Transcription in Mouse P815 Mastocytoma Cells

Thomas L. J. Boehm und Dusan Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie der Universität Frankfurt am Main, Theodor Stern-Kai 7,
D-6000 Frankfurt a. M. 70

Z. Naturforsch. **35 c**, 611–620 (1980); eingegangen am 30. Januar 1980

Enzymatic Methylation, Inverted DNA Repeats, Transcriptional Control

The isolation of transcribed DNA sequences of P815 cells and the partial characterization with respect to their sequence composition and relative rates of enzymatic DNA methylation are reported in this paper. Transcribed regions were purified by affinity chromatography using immobilized heterogenous nuclear RNA of P815 cells. About 10% of total genome was found in this fraction. Reassociation analyses showed differences in sequence composition of transcribed *versus* non-transcribed DNA fractions. The relative proportion of inverted repeats was doubled in the transcribed fraction whereas ordinary highly repetitive sequences comprising mainly of satellite DNA were found almost exclusively in the non-transcribed regions of the P815 genome. About 70% of transcribed portions corresponds to unique and intermediary DNA sequences. After labelling of cells with L-[Methyl-³H]methionine and [¹⁴C]deoxycytidine relative rates of enzymatic DNA methylation were computed for different kinetic components of transcribed and non-transcribed portions of P815 genome. No difference was found except in inverted repeats. In transcribed DNA the relative rate of enzymatic DNA methylation was only about 40% of that of the non-transcribed ones. We have quantitated this hypomethylation and found that there is, in average, about one 5-methylcytosine residue in 100 nucleotides of transcribed inverted repeats, compared to about 2.5 5-methylcytosines in non-transcribed fractions. In view of these data we propose that the enzymatic methylation of inverted DNA repeats negatively controls the transcriptional process in a given genomic region.

Einleitung

Die biologische Funktion der enzymatischen Methylierung der DNA eukaryotischer Zellen ist bisher unklar. Neu-synthetisierte DNA wird nach der Verknüpfung der kürzesten Replikationsintermediate methyliert [1, 2]. Das Produkt dieser Reaktion, das 5-Methylcytosin, lässt sich in einer großen Zahl verschiedener Nukleotidsequenzen nachweisen [3–5]. Die diese Reaktion katalysierenden Enzyme benutzen S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator und zeigen relative Spezifität in der Auswahl der spezifischen Methylierungssequenzen [6–8].

Kürzlich haben wir gezeigt, daß das Ausmaß der enzymatischen DNA-Methylierung in verschiedenen Sequenzklassen der DNA aus mehreren Säugetierzellen unterschiedlich ist. Invers repetitive Sequenzen des Typs ABC.. C'B'A' zeigten den höchsten Gehalt an 5-Methylcytosin [9–10]. L-Ethionin, ein

Ethyl-Analog des L-Methionins induziert eine Reexpression verschiedener Gene [11]. In Friend Erythroleukämiezellen konnten Christman *et al.* [12] dies mit einer verminderten Methylierung in der gesamten DNA korrelieren. Diese Hypomethylierung ist in invers repetitiven Sequenzen besonders ausgeprägt [13].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung transkribierter DNA Regionen im Genom von P815 Mastocytoma Zellen. Wir zeigen hier, daß in transkribierten DNA Regionen invers repetitive Sequenzen untermethyliert sind.

Material und Methoden

Chemikalien

Alle radioaktiven Verbindungen wurden von Amersham Buchler (Amersham, UK) bezogen; [¹⁴C]-Desoxycytidin hatte eine spezifische Aktivität von 429 Ci/mol, L-[Methyl-³H] hatte 50 Ci/mmol. Hydroxylapatit (HTP DNA grade) und Agarose A 50 m

Sonderdruckanforderungen an PD Dr. D. Drahovsky.
0341-0382/80/0700-0611 \$ 01.00/0



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.

waren von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, FRG), CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde von Pharmacia (Freiburg, FRG) geliefert, Harnstoff (Urea ultrapure) war von Schwarz-Mann (Heidelberg, FRG). Alle anderen Chemikalien (AR) wurden von Merck (Darmstadt, FRG) bezogen.

Zellkultivierung

P815 Maus Mastocytoma Zellen wurden auf BD2F₁-Mäuse ([C57Bl/6 × DBA/2]F₁) in sieben-tägigen Intervallen transplantiert. Nach intraperitonealer Inokulation von etwa 10⁶ Zellen tötet der Tumor die tumortragenden Tiere innerhalb von 8–10 Tagen. Zur Zellkultivierung wurden die P815 Zellen am 7. Tag nach der Inokulation aus der Aszitesflüssigkeit gewonnen, dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in McCoy 5a Medium (+ 20% fötales Kälberserum) in einer Zell-dichte von 0,2 × 10⁶/ml resuspendiert. Die Generationszeit der Zellen beträgt unter diesen Bedingungen etwa 13–14 Stunden.

Zur Markierung der DNA wurden pro 100 ml Kulturmedium 5 µCi [¹⁴C]Desoxycytidin und 150 µCi L-[Methyl-³H]Methionin hinzugefügt. Die Inkorporation der Radioaktivität in die verschiedenen DNA-Basen in Anwesenheit von 20 mM Natriumformiat im Kulturmedium wurde schon früher beschrieben [9]. Die ¹⁴C-Radioaktivität wurde in allen Pyrimidinen, die ³H-Radioaktivität nur in 5-Methylcytosin gefunden.

DNA-Isolierung, Fragmentlängenbestimmung und Trennung verschiedener Sequenzklassen

Die DNA wurde aus den Zellen nach 48 h Kultivierung isoliert (3 Zellteilungen) und durch Ultraschall fragmentiert [9]. Die Längenbestimmung erfolgte wie schon beschrieben [9]. Die sonizierte DNA wurde nach einem schon beschriebenen reassoziationskinetischen Verfahren in vier verschiedenen Sequenzkomponenten aufgetrennt [13]. Die Fraktionierung der DNA erfolgte mit Hydroxylapatit-Säulen, die bei 60 °C und ohne Luftdruck betrieben wurden, um das Brechen langer Fragmente möglichst zu vermeiden. Einzelsträngige Strukturen wurden mit 0,15 M und doppelsträngige DNA mit 0,4 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.8) stufenweise eluiert. Die Trennung invers repetitiver von normal hoch repetitiven Sequenzen erfolgte durch Denaturierung und Renaturierung bis zu einem maximalen Cot-Wert

von 2 × 10⁻⁴ mol sec l⁻¹ [14, 15]. Unter diesen Bedingungen finden keine biomolekularen Reaktionen statt und nur nahe aneinanderliegende invers repetitive Sequenzen bilden in unimolekularer Reaktion doppelsträngige Strukturen, die sich mittels Hydroxylapatit isolieren lassen [16, 17]. Im Falle der Trennung langer DNA-Fragmente an Hydroxylapatit wurde durch Kontrollexperimente sichergestellt, daß die Bindung der Moleküle weder durch eine mangelnde Bindungseffektivität noch durch unspezifische Retention an Hydroxylapatit bedingt war. Dies wurde bewiesen, indem die verschiedenen DNA-Fraktionen ein zweites Mal über Hydroxylapatit-Säulen getrennt wurden.

Die Agarose A 50 m-Chromatographie wurde wie von Pearson *et al.* [18] beschrieben durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen bei der Behandlung der DNA mit einzelstrangspezifischer Nuklease S1 (E. C. 3.1.4.21) waren wie schon beschrieben [9].

Isolierung heterogener nuklearer RNA

Die Isolierung der gesamten nukleären RNA wurde wie schon früher beschrieben durchgeführt [19]; die nachfolgende Separation heterogener nuklearer RNA basiert auf Untersuchungen von Holmes und Bonner [20] und wurde wie folgt durchgeführt:

Die isolierte gesamte nukleare RNA wurde in 2 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) – 1 mM EDTA gelöst und an einer Sepharose 2B Säule (2,6 × 42) im gleichen Puffer bei einer Flußrate von 19 ml/h chromatographiert. Dabei finden sich etwa 3 ± 1% der Masse im Ausschlußvolumen, welches gesammelt und mit einem doppelten Volumen kaltem Alkohols nach Zugabe von Natriumazetat (Endkonzentration 2%) präzipitiert wurde.

Durch Puls-Markierung mit [³H]Uridin vor der RNA-Isolierung konnte die Identität der im Ausschlußvolumen befindlichen RNA mit der heterogenen nukleären RNA wahrscheinlich gemacht werden [20, 21].

Affinitätschromatographie mit immobilisierter heterogener nuklearer RNA

Die isolierte heterogene nukleare RNA wurde zur nachfolgenden Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose 4B nach folgendem Verfahren immobilisiert:

hnRNA und CNBr-Sepharose 4B wurden nach Äquilibrierung in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH

6,0) miteinander kombiniert und bei 4 °C für 9 h unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Bindung der hnRNA wurde durch Messung der optischen Dichte des Puffers verfolgt. Nach kompletter Bindung der hnRNA an die Sepharose wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und in 0,2 M Tris·HCl, pH 8,0 resuspendiert, worin es über Nacht bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln verblieb, um restliche reaktivierte Gruppen des Gels zu inaktivieren. Danach erneutes Waschen in destilliertem Wasser und Resuspendierung in Adsorptionspuffer (10 mM Tris·HCl, pH 7,6–100 mM NaCl-1 mM EDTA-25% (w/v) Formamid). Ein Gramm Sepharose enthielt durchschnittlich etwa 75–100 µg RNA.

Die Adsorption der DNA wurde in möglichst kleinem Volumen vorgenommen, wobei die kombinierten Lösungen in einem Zentrifugenröhrchen ständig geschüttelt wurden. Vor der Zugabe zur hnRNA-Sepharose wurde die DNA kurz im kochenden Wasserbad denaturiert. Das Massenverhältnis von zugegebener DNA zur immobilisierten hnRNA war immer kleiner als 1:10.

Die Bindungsseffizienz der DNA an immobilisierte hnRNA wurde durch Rechromatographie-Experimente mit 95–98% bestimmt, die unspezifische Bindung war mit 0,5% vernachlässigbar. Kontrollexperimente zeigten, daß bei verschieden langer Hybridisierung der DNA mit immobilisierter hnRNA nach etwa 60 min eine Sättigung eingetreten war.

Die Lösung wurde dann zentrifugiert und das Gel gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Die gebundene DNA wurde dann durch Resuspendierung in Elutionspuffer (10 mM Tris·HCl, pH 7,6-100 mM NaCl-1 mM EDTA-97% (w/v) Formamid) bei 70 °C eluiert.

Die kombinierten Fraktionen der ungebundenen und gebundenen DNA wurden gegen Wasser dialysiert und durch Gefriertrocknung vor weiterer Verarbeitung konzentriert.

Basenanalyse und Bestimmung des Ausmaßes der DNA-Methylierung

Zur Basenanalyse markierter DNA Fragmente wurden die Proben in 96%iger Ameisensäure bei 175 °C für 90 min hydrolysiert und in absteigender Papierchromatographie (24 h) in Isopropanol/HCl/H₂O (68:6:26, v/v) getrennt.

Die getrockneten Papiere wurden in Streifen geschnitten, die Radioaktivität mit H₂O eluiert und in

einem Dioxan-Scintillator gemessen. Die Position der Basen wurde mit unmarkierten Vergleichsproben bestimmt.

Relative Raten der DNA-Methylierung (M_{rel}) wurden aus den gefundenen Radioaktivitäten in Pyrimidinbasen nach folgender Formel berechnet:

$$M_{\text{rel}} = \frac{[^3\text{H}-5]\text{Methylcytosin (cpm)}}{[^1\text{C}]\text{Cytosin (cpm)}}.$$

Die absolute Rate der DNA-Methylierung (M_{abs}) ergab sich aus der Verteilung der ¹⁴C-Radioaktivität in 5-Methylcytosin und Cytosin nach der von Kappeler [22] angegebenen Formel:

$$M_{\text{abs}} = \frac{[^1\text{C}-5]\text{Methylcytosin (cpm)} \times 100\%}{[^1\text{C}-5]\text{Methylcytosin (cpm)} + [^1\text{C}]\text{Cytosin (cpm)}}.$$

Ergebnisse

Verteilung invers repetitiver DNA Sequenzen im Genom von P815 Zellen

Das Genom von P815 Zellen enthält verschiedene Sequenzkomponenten, die sich reassoziationskinetisch voneinander unterscheiden lassen. Die Cot-Analyse [23] der P815 DNA (Abb. 1) läßt nach rechnerischer Auflösung des komplizierten Reassoziationsverhaltens der gesamten DNA vier verschiedene Sequenzklassen erkennen. Langsam reassoziierende DNA-Sequenzen machen etwa 64% der gesamten DNA aus, etwa 23% finden sich in einer intermediären Komponente und etwa 13% erscheinen in der hoch-repetitiven Fraktion (siehe Tab. I). Diese Fraktion konnte durch reassoziationskinetische Manipulation in zwei Komponenten differenziert werden: (a) normal hoch repetitive Sequenzen des Typs ABC..ABC (etwa 8,5% des gesamten Genoms), und (b) sogenannte invers repetitive Sequenzen des Typs ABC..C'B'A' (etwa 4,5% des Genoms) [14, 24].

Wie wir schon gezeigt haben, enthält nur etwa ein Drittel des P815 Genoms invers repetitive Sequenzen [24]. Durch enzymatische Spaltung invers repetitive Sequenzen enthaltender DNA-Fragmente konnte gezeigt werden, daß jeweils nur ein Teil dieser Strukturen in doppelsträngiger Form vorlag. So ergaben sich bei der Untersuchung von DNA-Frag-

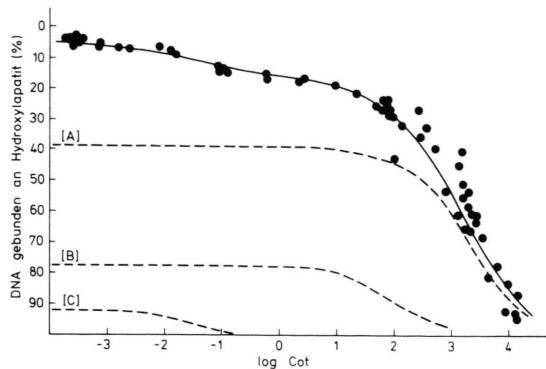


Abb. 1. Reassoziation gesamter nuklearer DNA aus P815 Zellen. Die gesamte DNA der mittleren Fragmentlänge 0,45 kbp wurde im kochenden Wasserbad für 10 min denaturiert und nach Reassoziation bis zu verschiedenen Cot-Werten bei 60 °C mit Hydroxylapatitchromatographie auf das Ausmaß der Reassoziation untersucht. Die durchgezogene Linie entspricht einer rechnergestützten Anpassung, die überlagerten gestrichelten Linien entsprechen drei verschiedenen Komponenten der Gesamt-DNA: [A] Langsam reassozierende Fragmente, [B] intermediär repetitive Fraktionen und [C] schnell reassozierende DNA-Komponente. Diese Komponenten sind in Tab. I weiter charakterisiert. Die rechnerische Auswertung der Daten erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Britten *et al.* [23], das in [24] beschrieben ist.

menten der Längen 0,6, 3,0 und 6,0 kbp in etwa gleiche absolute Werte für den doppelsträngigen Anteil, der etwa 3,3–3,6% der gesamten DNA ausmachte. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die gleiche Anzahl invers repetitiver Sequenzen gebildet wurde. Die hier für P815 Zellen zusammengefaßten Befunde sind vergleichbar mit denen aus anderen Säugetierzellen, wenn man die hier ange-

wandte Isolationsmethode [14, 24] für invers repetitive Sequenzen berücksichtigt [15, 17, 18, 25–27].

Verteilung transkribierter DNA-Regionen im P815 Genom

Die oben erläuterte Trennung der gesamten P815 DNA in eine invers repetitive Sequenzen enthaltene Fraktion (35%) und einen Anteil ohne diese Sequenzen (65%) läßt die Frage auftreten, ob nicht etwa transkribierte Regionen in einem dieser Fraktionen häufiger vorkommen. Dieses Problem wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie an immobilisierter hnRNA untersucht, wobei wir diese Methode anwendeten, um die Nachteile der im allgemeinen benutzten Verfahren zur Analyse von Hybridisierungsexperimenten (Hydroxylapatit-Chromatographie, Nuclease S1-Spaltung) zu umgehen, da diese nicht zwischen DNA/DNA- und DNA/RNA-Duplexen zu unterscheiden erlauben. In ersten Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß die Fähigkeit von heterogener nuklearer RNA mit DNA-Molekülen zu hybridisieren durch die Affinitätschromatographie nicht signifikant verändert wurde. In P815 Zellen sind etwa 7,8% der unique DNA Sequenzen zu gesamter nuklearer RNA komplementär [19]. Vergleicht man nun den Anteil von unique DNA Sequenzen, die zu immobilisierter hnRNA in dem unter Material und Methoden beschriebenen Bedingungen komplementär sind, so zeigt sich bei einem Wert von $6,8 \pm 1,0\%$ kein signifikanter Unterschied. Somit läßt sich die Affinitätschromatographie der hier beschriebenen Art für die selektive

Tab. I. Charakterisierung von vier kinetischen Komponenten in der DNA von P815 Zellen.

| Reassoziations-komponent | Fraktion | | Cot _{1/2} beobachtet ^a | Cot _{1/2} rein ^c | Kinetische Komplexität ^d | Wieder-holungs-frequenz ^e | Anzahl verschiedener Sequenzen ^f |
|--------------------------|----------------|--------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | % ^a | Größe ^b | | | | | |
| langsam | 64 ± 3 | 1,67 | 2100 | 1282 | $1,67 \times 10^9$ | 1 | $1,11 \times 10^6$ |
| intermediär | 23 ± 2 | 0,57 | 475 | 100 | $8,13 \times 10^7$ | 7 | $2,71 \times 10^5$ |
| schnell | 9 ± 2 | 0,23 | 0,35 | 0,03 | $2,39 \times 10^4$ | 9830 | 80 |
| ,,zero-time“ | 4 ± 1 | 0,12 | n. d. ^g | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. |

^a Berechnet aus den Daten der Abb. 1.

^b Chemische oder analytische Komplexität in 10^9 Nukleotiden (die analytische Komplexität der Gesamt-DNA aus P815 Zellen ist $2,76 \times 10^9$ Nukleotide).

^c Cot_{1/2} für einen rein vorliegenden Komponenten entspricht dem Produkt aus Cot_{1/2} in gesamter DNA und Fraktion der gesamten DNA in diesem Komponenten.

^d Durchschnittliche kinetische Komplexität relativ zu der von *E. coli*.

^e Die Wiederholungsfrequenz wird durch Division der analytischen Komplexität jedes Komponenten durch seine durchschnittliche kinetische Komplexität berechnet.

^f Die Anzahl verschiedener Sequenzen wird durch Division der kinetischen Komplexität durch eine gegebene Sequenzlänge berechnet. Wir haben hier 0,3 kbp für repetitive und 1,5 kbp für unique Sequenzen angenommen [24].

^g n. d., Nicht definierbar.

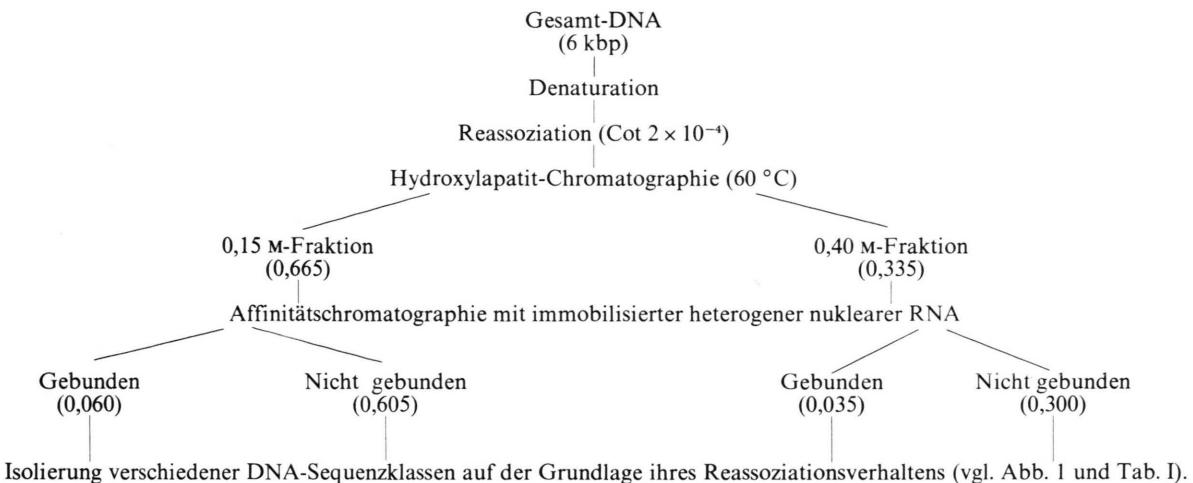


Abb. 2. Flußdiagramm der Methode zur Isolierung transkribierter DNA mittels der Affinitätschromatographie an immobilisierter heterogener nuklearer RNA. Die gesamte DNA (Fragmentlänge 6 kbp) wurde denaturiert und nach kurzer Reassoziation ($Cot 2 \times 10^{-4}$) an Hydroxylapatit-Säulen getrennt. Diese so erhaltenen Fraktionen mit bzw. ohne invers repetitive Sequenzen wurden dann nach der Affinitätschromatographie auf eine einheitliche Länge von 0,6 kbp gebracht und nach einem in ref. [13] beschriebenen Verfahren auf den Gehalt einzelner Sequenzkomponenten untersucht.

Isolierung und Reinigung transkribierter DNA Sequenzen benutzen.

Mit Hilfe dieser Methode untersuchten wir dann die Bindung der DNA-Fraktionen, welche invers repetitive Sequenzen enthalten, bzw. nicht enthalten. Etwa 10% der Fraktion, die invers repetitive Sequenzen enthält, ist zu immobilisierter hnRNA komplementär, was etwa 3,5% des gesamten Genoms entspricht. Von DNA-Fragmenten ohne invers repetitive Sequenzen binden sich etwa 9%, was einem Anteil von etwa 6% des gesamten Genoms entspricht.

Aus dieser Untersuchung folgt, daß transkribierte Regionen relativ gleichförmig unter die beiden oben beschriebenen Anteile des P815 Genoms verteilt sind.

Alle in diesem Versuch erhaltenen DNA-Fraktionen wurden nach einer Ultraschallbehandlung zur Gewinnung kurzer Fragmente (0,6 kbp) einer reassoziationskinetischen Analyse unterworfen, um die Anteile der verschiedenen Sequenzklassen in diesen Fraktionen zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Tabn. II und III zusammengefaßt und zeigen, daß ein beträchtlicher Unterschied in der Zusammensetzung aus einzelnen Sequenzkomponenten innerhalb der oben beschriebenen DNA Fraktionen besteht.

DNA-Fragmente, die invers repetitive Sequenzen enthalten und zudem an immobilisierter hnRNA ge-

bunden werden, zeigen eine relative Zunahme an unique, intermediär repetitive und invers repetitive Sequenzen im Vergleich zu denen, welche nicht mit hnRNA hybridisieren (Tab. II). Bei letzteren läßt sich eine starke Erhöhung des Gehalts normal hoch repetitive Sequenzen feststellen.

Die Tatsache, daß invers repetitive Sequenzen in transkribierten Regionen häufiger vorkommen, weist darauf hin, daß zumindest ein Teil dieser Sequenzklassen in transkribierter DNA konzentriert ist.

Tab. III zeigt die Ergebnisse, die bei der Analyse der Fragmente, welche keine invers repetitive Sequenzen enthalten, erhalten wurden. Auffallend ist auch hier, daß Moleküle, die zu immobilisierter hnRNA nicht komplementär sind, einen sehr hohen Anteil an normal hoch repetitive Sequenzen aufweisen. Hier beträgt das Verhältnis zu komplementären Molekülen fast 7:1. Dieser Befund ist insofern interessant, als diese Sequenzklassen die Satelliten DNA aus P815 Zellen enthält [9, 24].

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß transkribierte DNA invers repetitive DNA Sequenzen enthält. Dieser Schluß wird auch durch die Ergebnisse des folgenden Experiments bestätigt. Untersucht man nämlich die Bindung von DNA-Molekülen mit und ohne invers repetitive Sequenzen an immobilisierte hnRNA in Abhängigkeit von der verwendeten Fragmentlänge, so zeigt sich das in Abb. 3 ge-

Tab. II. Sequenzgehalt von invers repetitive Sequenzen enthaltenden DNA Fragmenten (6 kbp).

| Sequenzkomponent | Zusammensetzung ^a | |
|---|------------------------------------|--|
| | Gebunden an hnRNA ^b [%] | Nicht gebunden an hnRNA ^c [%] |
| unique und inter-mediat̄ repetitive Sequenzen | 71,0 | 63,0 |
| normal hoch repetitive Sequenzen | 16,8 | 30,7 |
| invers repetitive Sequenzen | 12,1 | 6,3 |

^a Die Sequenzzusammensetzung wurde nach einer Sonication bis zu einer Fragmentlänge von 0,6 kbp bestimmt. Die Anteile wurden aus der Verteilung der Radioaktivität der mit [³H]-Thymidin markierten DNA berechnet. Die Ergebnisse eines typischen Experiments werden gezeigt. Drei unabhängige Experimente lieferten in etwa gleiche Ergebnisse mit einer maximalen Abweichung von 10%.

^b Die gebundene Fraktion entsprach 3,5% der gesamten DNA.

^c Die Fraktion, die nicht an heterogene nukleare RNA gebunden wurde, entsprach 30,0% der gesamten DNA.

Tab. III. Sequenzgehalt von DNA Fragmenten (6 kbp) ohne invers repetitive Sequenzen.

| Sequenzkomponent | Zusammensetzung ^a | |
|---|------------------------------------|--|
| | Gebunden an hnRNA ^b [%] | Nicht gebunden an hnRNA ^c [%] |
| unique und inter-mediat̄ repetitive Sequenzen | 95,0 | 72,0 |
| normal hoch repetitive Sequenzen | 5,0 | 28,0 |
| invers repetitive Sequenzen | — ^d | — |

^a Siehe Fußnote a der Tab. II.

^b Die gebundene Fraktion entspricht etwa 6,0% der gesamten DNA.

^c Ungebundene Fraktion entspricht 60,5% der gesamten DNA.

^d Unterhalb der Nachweisgrenze.

zeigte Resultat. Die Bindung der DNA an hnRNA zeigt einen parallelen Verlauf im Längenintervall 6–14 kbp. Unterhalb einer Länge von 6 kbp jedoch ergeben sich signifikante Unterschiede. Die Bindung von Molekülen, die keine invers repetitive Sequenzen enthalten, fällt scharf ab, während die Kurve für Moleküle mit invers repetitive Sequenzen fast in Linearität abnimmt. Somit läßt sich auch

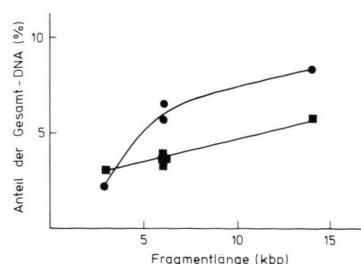


Abb. 3. Bindung von DNA-Fragmenten an immobilisierte heterogene nukleare RNA. Die Analyse folgte dem experimentellen Verfahren der Abb. 2, nur daß verschiedene lange Fragmente untersucht wurden. [■] Fragmente, die inverse repetitive Sequenzen enthalten, [●] Fragmente, die keine inverse repetitive Sequenzen enthalten. Jeder Punkt entspricht dem Durchschnitt aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, wobei die Abweichung vom gezeigten Mittelwert nie größer als 15% war.

hier der Schluß ziehen, daß zumindest ein Teil invers repetitiver DNA Sequenzen mit transkribierter DNA vergesellschaftet ist.

Enzymatische Methylierung in zu immobilisierter hnRNA komplementären DNA Sequenzen

Alle DNA-Sequenzklassen, die nach der in Abb. 2 dargestellten und im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Methode isoliert wurden, wurden im Hinblick auf ihre enzymatische Methylierung näher charakterisiert. Für diese Studie war die DNA mit L-[Methyl-³H]Methionin und [¹⁴]Desoxycytidin markiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tab. IV dargestellt. Es zeigt sich, daß kein Unterschied zwischen unique, intermediär repetitiven und normal hoch repetitiven Sequenzen in transkribierten und nicht-transkribierten DNA-Regionen des P815 Genoms besteht. Der entscheidende Unterschied findet sich in invers repetitiven Sequenzen, die in transkribierter DNA nur etwa 40% der enzymatischen Modifikation in nicht-transkribierter DNA aufweisen.

Anzahl methylierter Stellen in invers repetitiven DNA Sequenzen in transkribierten und nicht-transkribierten Regionen

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse lassen eine Korrelation zwischen Hypomethylierung in invers repetitiven Sequenzen und transkriptioneller Aktivität in dieser Region vermuten. Deshalb ist es von Interesse, die Anzahl methylierter Stellen in beiden Fraktionen invers repetitiver Sequenzen zu berechnen.

Tab. IV. Enzymatische Methylierung in DNA Sequenzen aus transkribierten und nicht-transkribierten Regionen des P815 Genoms.

| Sequenzkomponent | Relative Raten der enzymatischen DNA Methylierung ^a | | |
|---|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| | Gesamt-DNA | Transkribierte DNA ^b | Nicht-transkribierte DNA ^b |
| Native DNA | 1,00 | — | — |
| unique Sequenzen | 0,71 | 0,71 (0,65; 0,75) | 0,72 (0,70; 0,74) |
| unique und intermediär repetitive Sequenzen | 0,91 | 0,93 (0,83; 1,01) | 0,95 (0,83; 1,06) |
| normal hoch repetitive Sequenzen | 2,21 | 2,16 (1,98; 2,34) | 2,19 (1,96; 2,40) |
| invers repetitive Sequenzen | 3,29 | 1,48 (1,29; 1,84) | 3,49 (3,33; 3,62) |

^a Die relativen Raten der enzymatischen Methylierung in den einzelnen DNA Fraktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben berechnet. Der Durchschnitt und die Spannweite (Klammer) der Ergebnisse aus zumindest drei unabhängigen Experimenten sind angegeben.

^b Die transkribierten DNA Sequenzen wurden mit Hilfe der im Text beschriebenen Affinitätschromatographie mit immobilisierter heterogener nuklearer RNA isoliert.

Etwa $6,4 \times 10^7$ Nukleotide finden sich in der Fraktion der invers repetitiven Sequenzen des P815 Genoms. Davon sind 18,4% oder $11,7 \times 10^6$ Nukleotide in transkribierten Regionen lokalisiert (siehe Tab. II und Abb. 3). Die absolute Methylierungsrate der gesamten P815 DNA beträgt 3,6% [10]. Aus den Daten der Tab. IV läßt sich dann berechnen, daß die Methylierungsrate in invers repetitiven Sequenzen transkribierter Regionen $3,6 \times 1,48 = 5,3\%$ beträgt; in den anderen invers repetitiven Sequenzen findet sich eine absolute Methylierungsrate von $3,6 \times 3,49 = 12,6\%$.

Nimmt man nun bei einem (G + C)-Gehalt von 40% [9] eine gleiche Verteilung methylierbarer Sequenzen an, so ergibt sich, daß in invers repetitiven Sequenzen der transkribierten Regionen $1,24 \times 10^5$ 5-Methylcytosine zu finden sind, und $1,31 \times 10^6$ 5-Methylcytosine in solchen nicht-transkribierter DNA. Damit ergibt sich weiter, daß $(1,24 \times 10^5 / 1,17 \times 10^5 =) 1,07$ 5-Methylcytosine auf 100 Nukleotide einer durchschnittlichen invers repetitiven Sequenz in transkribierter DNA kommen. Dem stehen $(1,31 \times 10^6 / 0,52 \times 10^6 =) 2,52$ 5-Methylcytosine per 100 Nukleotide einer Sequenz aus nicht-transkribierten Abschnitten gegenüber.

Mit diesen Werten läßt sich die Zahl unmethylierter Stellen in invers repetitiven Sequenzen transkribierter DNA mit $(2,52 - 1,07 =) 1,45$ per 100 Nukleotide angeben.

Diskussion

Wir haben in dieser Arbeit gezeigt, daß invers repetitive Sequenzen, nach der Methode von Wilson und Thomas [14] isoliert, in einem Drittel des

Genoms von P815 Zellen verteilt sind. Dieser Befund korreliert mit Daten aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen in verschiedenen Säugetierzellen [17, 18, 25, 26]. Weiterhin haben wir eine neue Methode zur Isolierung transkribierter DNA Sequenzen mit der Affinitätschromatographie mit immobilisierter heterogener nuklearer RNA vorgestellt. Diese ermöglichte die direkte Charakterisierung transkribierter Regionen und wir konnten zeigen, daß eine Hypomethylierung invers repetitiver Sequenzen mit der Transkription in dem betreffenden Genomabschnitt korreliert ist.

Dieser Befund läßt eine Beteiligung der enzymatischen Methylierung an der Regulation der Transkription im Genom höherer Zellen vermuten. Zahlreiche Befunde stützen eine solche Annahme:

(i) Christman *et al.* [12] zeigten, daß die durch Ethionin induzierte Reexpression des Hämoglobins in Friend-Zellen zur Hypomethylierung der gesamten DNA in Beziehung steht.

(ii) Die durch Ethionin hervorgerufene Hypomethylierung der DNA stellte sich in invers repetitiven Sequenzen aus P815 Zellen als besonders ausgeprägt heraus [13].

(iii) Bird und Southern [28] haben gezeigt, daß in somatischer rDNA aus *Xenopus laevis*-Erythrocyten zumindest eine spezifisch unmethylierte Position vorhanden ist.

In einer nachfolgenden Arbeit hat Bird [29] gezeigt, daß jedes Muster einer Methylierung bzw. Nichtmethylierung in CpG-Dinukleotiden durch einen semi-konservativen Kopiermechanismus während der Zellteilung erhalten bleibt.

Vor kurzem sind zwei verschiedene Modelle zur Genregulation und Zellentwicklung auf der Grund-

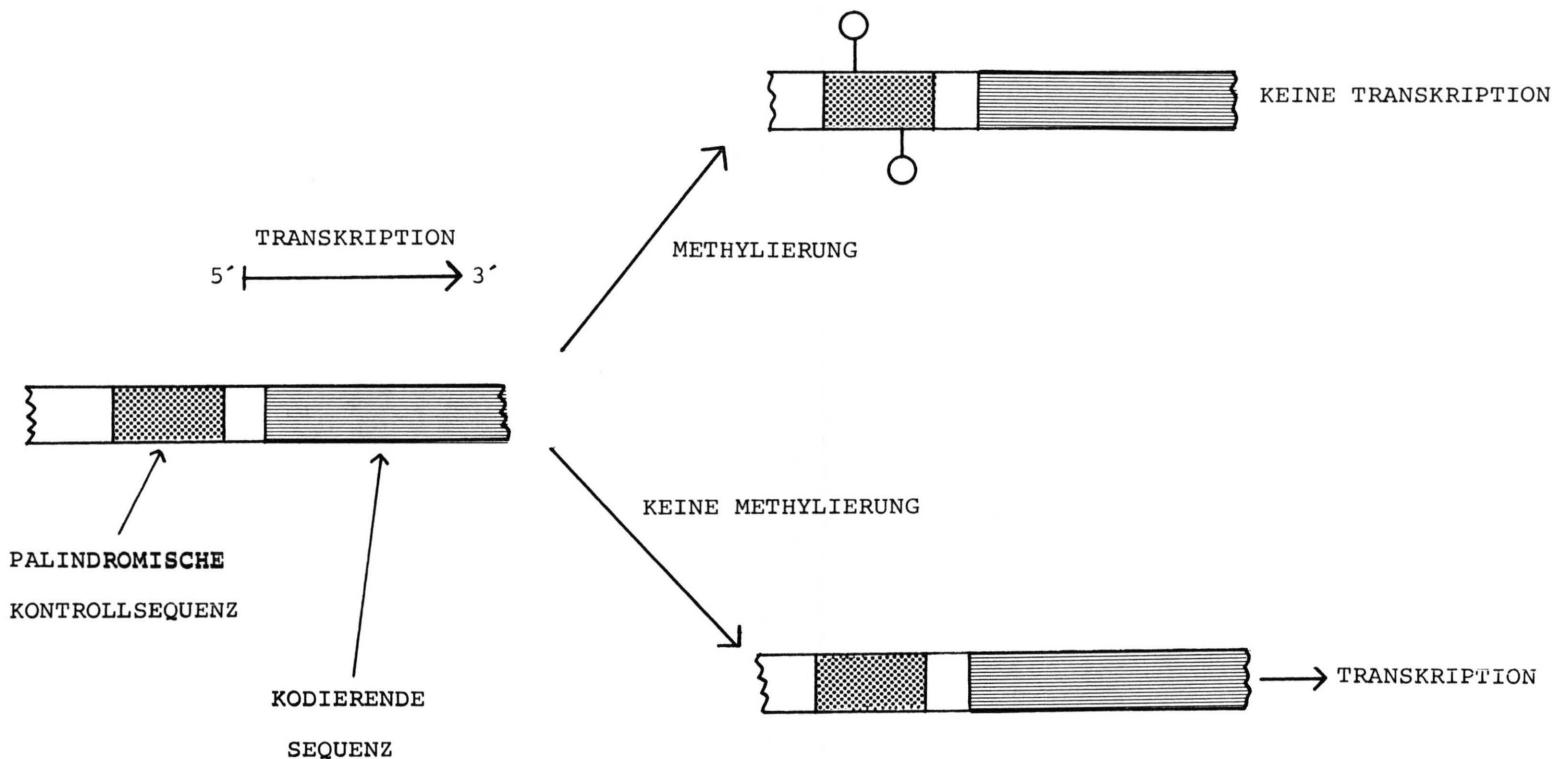


Abb. 4. Modell für die Rolle der enzymatischen DNA Methylierung bei der Transkriptionskontrolle. Am 5'-Ende eines Gens liegt eine palindromische Kontrollsequenz, welche bei Methylierung eine Transkription verhindert. Siehe Text für ausführliche Darstellung.

lage der enzymatischen DNA-Methylierung entwickelt worden [30, 31]. Diese Autoren postulieren in ihren Ausführungen ein Enzym, welches halbmethylierte (asymmetrische) DNA-Sequenzen nach der Replikation ergänzt („maintaining enzyme“). Diese Forderung wird in den Untersuchungen von Bird [29] bestätigt. Der semi-konservative Erhaltungsmechanismus ist somit zur Erklärung der Konstanz einer Differenzierungsstufe auch nach Zellteilungen heranzuziehen. Wenn aber ein neuer Entwicklungsschritt, d. h. Differenzierung, eintreten soll, so muß man die Existenz eines Initiationsenzymes fordern, welches vorher unmethylierte Stellen wieder methyliert. Die Existenz eines derartigen Mechanismus wird von Bird [29] für unwahrscheinlich gehalten. Wir haben jedoch in eigenen Arbeiten nachweisen können, daß ein derartiger Mechanismus nicht ausgeschlossen ist. Dieser Befund stützt sich auf Untersuchungen der enzymatischen DNA Methylierung in somatischen Zellhybridien, in denen eine außerordentliche Zunahme der Methylierungsrate gefunden wurde, was für eine stattgefundenen Methylierung bisher unmethylierter DNA-Sequenzen spricht [32].

Die Quantifizierung der Hypomethylierung invers repetitiver Sequenzen in transkribierten Regionen des P815 Genoms hat gezeigt, daß im Durchschnitt etwa 1,5 methylierbare Sequenzen in 100 Nukleotiden eines invers repetitiven Abschnittes nicht methyliert wurden. Bedenkt man, daß die in transkribierten Anteilen des P815 Genoms vorhandenen invers repetitiven Sequenzen nur 0,43% der gesamten DNA ausmachen (vgl. Tab. II, Abb. 3), dann entspricht der Hypomethylierung um etwa 60% in dieser Fraktion ein Anteil der 5-Methylcytosine der gesamten DNA von 0,83%. Dieser Unterschied kann durch Analyse der Methylierungsraten unfraktionierter DNA nicht bestimmt werden. Dies könnte die Befunde von Pollock *et al.* [33], Baur *et al.* [34] und Singer *et al.* [35] erklären, die keine Änderung des 5-Methylcytosin-Gehaltes in differenzierenden Zellen feststellen konnten. Des weiteren sind nach unseren Ergebnissen die Befunde von Solage und Cedar [36] verständlich, die keinen Unterschied in der Me-

thylierung aus transkribierten und nicht-transkribierten Regionen nach DNAase I-Spaltung fanden.

Ein weiterer interessanter Hinweis auf die mögliche funktionelle Bedeutung invers repetitiver Sequenzen im eukaryotischen Genom ergibt sich aus dem Vergleich unserer früheren Befunde zur Zahl transkribierter DNA-Abschnitte in P815 Zellen und den hier berichteten Ergebnissen: in P815 Zellen sind etwa $0,4\text{--}0,5 \times 10^5$ verschiedene Transkripte in nuklearer RNA vorhanden [19, Boehm und Drahovsky (zur Veröffentlichung eingereicht)]. Dividiert man diese Zahl durch die Anzahl der in transkribierten Regionen vorhandenen invers repetitiven Sequenzen ($0,4\text{--}0,6 \times 10^5$, siehe auch [24]), so ergibt sich, daß einer Transkriptionseinheit im Durchschnitt eine invers repetitive Sequenz gegenübersteht. Tatsächlich konnte bei der Sequenzierung der sogenannten „5'-flanking“-Sequenzen des α -globin-Gens von Mäusen nachgewiesen werden, daß eine invers repetitive Sequenz unmittelbar vor der vermuteten Anlagerungsstelle für die RNA-Polymerase liegt [37]. Dieser Befund und die offensichtliche Korrelation von Hypomethylierung in invers repetitiven Sequenzen und Transkription des betreffenden Abschnittes lassen uns ein Modell postulieren (Abb. 4), in dem die enzymatische Methylierung invers repetitiver Sequenzen eine Transkription des betreffenden DNA-Abschnittes negativ kontrolliert. Sind solche Sequenzen nicht methyliert, findet eine Transkription statt. Bedingungen, unter denen *in vivo* die enzymatische Methylierung invers repetitiver Sequenzen nicht stattfindet, werden gegenwärtig in unserem Laboratorium untersucht.

Während der Vorbereitung dieses Manuskripts zeigten McGhee und Ginder [38], sowie Chambon und Mitarbeiter [39, 40] eine Korrelation von Hypomethylierung bestimmter DNA-Sequenzen in der Nachbarschaft von mehreren Genen des Huhns und deren Transkription in bestimmten Geweben auf.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (Dr. 104/5).

- [1] R. L. P. Adams, *Biochim. Biophys. Acta* **335**, 365 (1974).
- [2] D. Drahovsky u. A. Wacker, *Naturwissenschaften* **62**, 189 (1975).
- [3] R. Salomon, A. M. Kaye u. M. Herzberg, *J. Mol. Biol.* **43**, 581 (1969).
- [4] T. W. Sneider, *J. Biol. Chem.* **246**, 4774 (1971).
- [5] T. W. Sneider, *J. Biol. Chem.* **247**, 2872 (1972).
- [6] D. Drahovsky u. R. N. Morris, *J. Mol. Biol.* **57**, 475 (1971).
- [7] D. Drahovsky u. R. N. Morris, *J. Mol. Biol.* **61**, 343 (1971).
- [8] D. Drahovsky u. R. N. Morris, *Biochim. Biophys. Acta* **277**, 245 (1972).
- [9] D. Drahovsky, T. L. J. Boehm u. W. Kreis, *Biochim. Biophys. Acta* **563**, 28 (1979).
- [10] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, *Z. Naturforsch.* **34 c**, 558 (1979).
- [11] R. L. Hancock, P. J. Forrester, F. L. Lorscheider, P. C. W. Lai u. D. M. Hay, in *Oncodevelopmental Gene Expression* (Fishman u. Selt, Hrsg.), p. 247, Academic Press, New York 1976.
- [12] J. K. Christman, P. Price, L. Pedrinan u. G. Acs, *Eur. J. Biochem.* **81**, 53 (1977).
- [13] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, *Eur. J. Cancer* **15**, 1167 (1979).
- [14] D. A. Wilson u. C. A. Thomas, Jr., *J. Mol. Biol.* **84**, 115 (1974).
- [15] T. R. Cech u. J. E. Hearst, *Cell* **5**, 429 (1975).
- [16] D. E. Graham, B. R. Neufeld, E. H. Davidson u. R. J. Britten, *Cell* **1**, 127 (1974).
- [17] C. W. Schmid u. P. L. Deininger, *Cell* **6**, 345 (1975).
- [18] W. R. Pearson, R.-J. Wu u. J. Bonner, *Biochemistry* **17**, 51 (1978).
- [19] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, *Z. Naturforsch.* **34 c**, 436 (1979).
- [20] D. S. Holmes u. J. Bonner, *Biochemistry* **12**, 2330 (1973).
- [21] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, *Int. J. Biochem.* **11**, 15 (1980).
- [22] J. W. Kappler, *J. Cell. Physiol.* **75**, 21 (1970).
- [23] R. J. Britten, D. E. Graham u. B. R. Neufeld, *Methods Enzymol.* **29**, 363 (1974).
- [24] T. L. J. Boehm u. D. Drahovsky, *Int. J. Biochem.* **11**, 251 (1980).
- [25] P. L. Deininger u. C. W. Schmid, *J. Mol. Biol.* **106**, 773 (1976).
- [26] M. M. Wilkes, W. R. Pearson, J.-R. Wu u. J. Bonner, *Biochemistry* **17**, 60 (1978).
- [27] E. H. Davidson, D. E. Graham, B. R. Neufeld, M. E. Chamberlin, C. S. Amerson, B. R. Hough u. R. J. Britten, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **38**, 295 (1976).
- [28] A. P. Bird u. E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* **118**, 27 (1978).
- [29] A. P. Bird, *J. Mol. Biol.* **118**, 49 (1978).
- [30] R. Holliday u. J. E. Pugh, *Science* **187**, 226 (1975).
- [31] A. D. Riggs, *Cytogen. Cell Genet.* **14**, 9 (1975).
- [32] D. Drahovsky, S. Kaul, T. L. J. Boehm u. A. Wacker, *Biochim. Biophys. Acta* **607**, 201 (1980).
- [33] J. M. Pollock, Jr., M. Swihart u. J. H. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **5**, 4855.
- [34] R. Baur, H. Wohlert u. H. Kröger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**, 1263 (1979).
- [35] J. Singer, J. Roberts-Ems, F. W. Luthardt u. A. D. Riggs, *Nucleic Acids Res.* **7**, 2369 (1979).
- [36] A. Solage u. H. Cedar, *Biochemistry* **17**, 2934 (1978).
- [37] Y. Nishioka u. P. Leder, *Cell* **18**, 875 (1979).
- [38] J. D. McGhee u. G. D. Ginder, *Nature* **280**, 419 (1979).
- [39] J. L. Mandel u. P. Chambon, *Nucl. Acids Res.* **7**, 2081 (1979).
- [40] M. T. Kuo, J. L. Mandel u. P. Chambon, *Nucl. Acids Res.* **7**, 2105 (1979).