

5-Methylcytosin-Gehalt in Rattenerthyroleukämie-Zellen nach Induktion mit Dimethylsulfoxid

5-Methylcytosine Content in Erythroleucemic Cells of Rats after Induction with Dimethylsulfoxid

R. Baur*, N. Kluge **, H. Kröger* und H. Wohlert*

* Robert Koch-Institut Berlin, Abt. Biochemie, Nordufer 20, D-1000 Berlin 65

** Institut für Physiologische Chemie der Universität Hamburg, Molekularbiologie, Grindelallee 117, IV, D-2000 Hamburg 13

Z. Naturforsch. 37 c, 812–817 (1982); received April 19, 1982

5-Methylcytosine, Erythroleucemic Cells, Dimethylsulfoxid

Erythroleucemic cells of rats were induced by DMSO for the terminal erythroid differentiation. The base composition and the 5MC content of the DNA were analyzed by HPLC and a significant difference between non-induced and induced cells was *not* found. The analysis of labelled DNA by the restriction enzymes *Hha* I, *Hpa* II, and *Msp* I did not result in a different pattern before and after the induction. These results suggest that the 5MC content of the DNA does not change during the induced terminal erythroid differentiation.

Einleitung

Im Jahre 1948 [1] wurde erstmalig gefunden, daß die DNA aus eucaryonten Zellen eine seltene Base, nämlich das 5-Methylcytosin (5-MC) enthält. Über die biologische Bedeutung des Gehaltes an 5-MC sind sehr viele Spekulationen angestellt worden. Eine Beteiligung an Regulations- bzw. bei Differenzierungs-Vorgängen wird vermutet [2–10].

In Erythroleukämiezellen der Maus, die durch Transformation mit dem Friend-Virus-Komplex erzeugt wurden und die ständig den Viruskomplex in der Zellkultur freisetzen, wurde nach der induzierten erythroiden Differenzierung mit verschiedenen Induktoren eine hypomethylierte DNA gefunden [8–10].

Wir haben an Erythroleukämiezellen der Ratte, die durch Transformation mit DMBA erhalten wurden, nach Induktion der erythroiden Differenzierung den Gehalt an 5MC quantitativ bestimmt und nach möglichen Veränderungen im Schnittmuster nach Verdauung mit Restriktionsenzymen gesehen. Mit dieser Methodik fanden wir keine Veränderung im 5MC-Gehalt der DNA nach DMSO-Induktion.

Abkürzungen: DMSO, Dimethylsulfoxid; B+, Benzidin positiv; HPLC, High pressure liquid chromatography; 5MC, 5-Methylcytosin; DMBA, Dimethylbenzantranen; MEM, Modified Eagles Medium; FCS, Fetal calf serum; BrdU, Bromodesoxyuridin; HMBA, Hexamethylenbisacetamid.

0341-0382/82/0900-0812 \$ 01.30/0

Material und Methodik

1. Zellen

Die Herkunft der RED-2/D 5-Zellen wurde früher beschrieben [11]. Die Zellen wuchsen in MEM Joklik-modifiziert für Suspensionskulturen (GIBCO Kat. Nr. F-13) mit 10% FCS in 5% CO₂ Atmosphäre.

Die Zellen wurden nach der [³H]Uridinmarkierung (s. Methodik 2) in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /ml eingesetzt und nach 20 Std. geerntet (= Kontrolle). Die Induktion erfolgte mit 210 mM DMSO (= 1,5%, Merck, Darmstadt, DMSO für die Spektroskopie). Für den Induktionsversuch wurden ebenfalls $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingesetzt und nach 1, 2 resp. 3 Tagen geerntet. Für die 5-Tage-Induktion wurden 1×10^6 Zellen/ml eingesetzt und nach 20 Std. auf $0,8 \times 10^6$ /ml verdünnt. Der Anteil der hämoglobinproduzierenden benzidinpositiven (B+) Zellen wurde wie beschrieben in Suspension bestimmt [12].

2. Markierung der DNA mit [³H]Uridin

226×10^6 Zellen in Log-Phase wurden in 22 ml frischem MEM Joklik mod. für Suspensionskulturen (GIBCO Kat. Nr. F-13) plus 10% FCS bei 37 °C für 280 min mit 1 mCi [^{5.6-³H]Uridin (spez. Akt. 51,5 Ci/m mol; Amersham) inkubiert und anschließend in dem gleichen Medium auf $0,5 \times 10^6$ /ml verdünnt.}

3. Isolierung der DNA und Basen-Analyse

Diese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [13].



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.

4. Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen

Msp I (ca. 5 Einheiten) (Biolabs, New England) und *Hpa* II (ca. 5 Einheiten) (Boehringer) wurden 3 Stunden bei 37 °C mit ca. 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl einer Lösung (pH 7,4) inkubiert, welche 10 mmol/l Tris/HCl, 10 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l KCl, 1 mmol/l Dithioerythrit und 100 µg/ml Rinderserum-Albumin (RSA) enthielt.

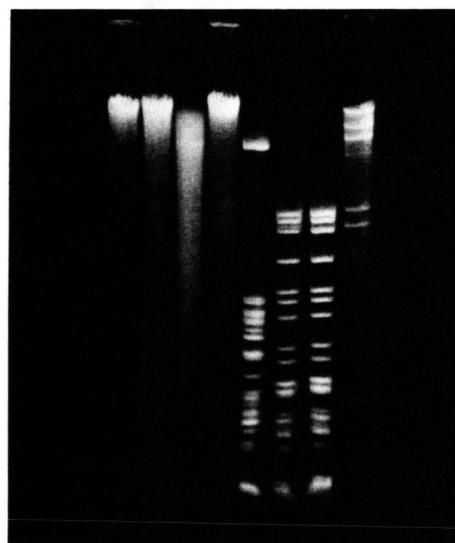
Hha I (ca. 5 Einheiten) (Biolabs, New England) wurde unter den gleichen Bedingungen inkubiert mit Ausnahme der Inkubationslösung. Diese setzte sich wie folgt zusammen: 50 mmol/l NaCl, 6 mmol/l Tris/HCl (pH 7,4), 6 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l Dithioerythrit und 100 µg/ml Rinderserum-Albumin RSA.

Als Kontrolle wurde von jeder DNA-Probe 2 γ DNA in 50 µl *Hha* I Puffer ohne Enzym 3 Std. bei 37 °C eingesetzt.

Die Pufferlösungen, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert. Danach wurde erst das RSA zugesetzt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 20 µl einer Lösung, enthaltend 0,1 mol/l EDTA, 50% Sucrose, 0,05% Bromphenolblau, 0,09 mol/l Tris, 0,09 mol/l H₃BO₃ (pH 7,0), gestoppt.

5. Agarose-Gelelektrophorese

0,5g Agarose wurden in 50 ml Boratpuffer (pH 8,3) (0,09 mol/l Tris/HCl, 0,09 mol/l H₃BO₃, 2,8 mmol/l EDTA) kurz aufgekocht und langsam auf 50 °C

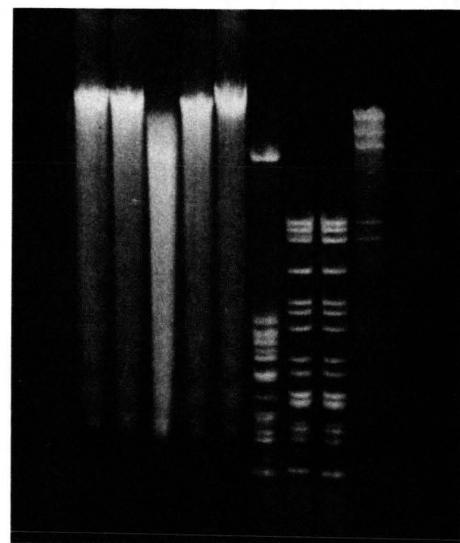


I) 1 2 3 4 5 6 7 8

- Tag 0
- 1 *Hha* I
- 2 *Hpa* II
- 3 *Msp* I
- 4 Kontrolle
- 5 λ-DNA *Hha* I
- 6 λ-DNA *Hpa* II
- 7 λ-DNA *Msp* I
- 8 λ-DNA *Hind* III*

* λ-DNA *Hind* III wird als käuflicher Längenstandard von der Firma Boehringer erworben.

- Fragment 1 ≈ 15,0 × 10⁶ Daltons
- Fragment 2 ≈ 6,4 × 10⁶ Daltons
- Fragment 3 ≈ 4,3 × 10⁶ Daltons
- Fragment 4 ≈ 2,9 × 10⁶ Daltons
- Fragment 5 ≈ 2,9 × 10⁶ Daltons
- Fragment 6 ≈ 1,4 × 10⁶ Daltons
- Fragment 7 ≈ 0,32 × 10⁶ Daltons



II) 1 2 3 4 5 6 7 8 9

- Tag 1
- 1 *Hha* I
- 2 *Hpa* II
- 3 *Msp* I
- 4 *Hha* I + *Hpa* II
- 5 Kontrolle
- 6 λ-DNA *Hha* I
- 7 λ-DNA *Hpa* II
- 8 λ-DNA *Msp* I
- 9 λ-DNA *Hind* III*

Abb. 1 a

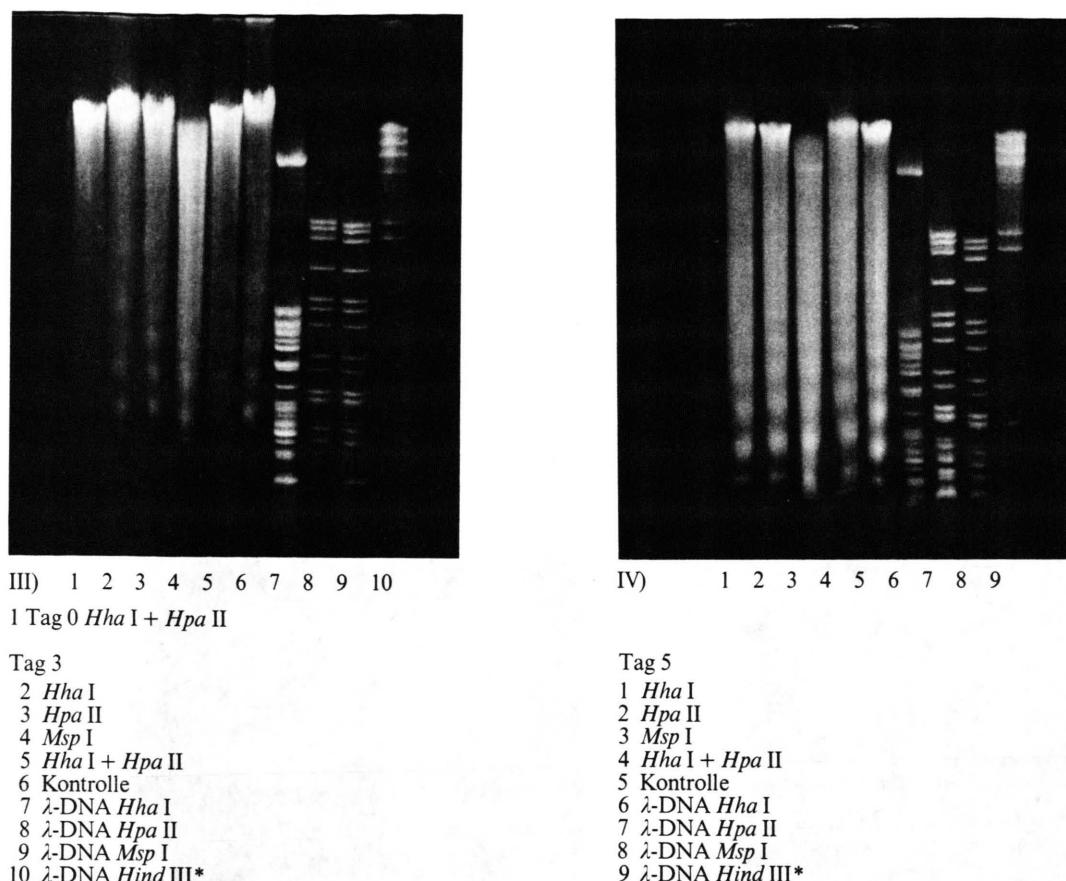


Abb. 1 a + 1 b. Gelektrophorese der mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Proben: Tag 0, Tag 1, Tag 3 und Tag 5. Jeweils 2 µg DNA wurden mit 5 Einheiten Enzym im entsprechenden Puffer 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Stopp-Reagenzes erfolgte die Aufgabe des Reaktionsgemisches auf 1%ige Agarosegele zur Trennung der DNA-Fragmente. Weitere Details siehe Methoden.

Abb. 1 b

temperiert. Nach Abkühlung wurde die Lösung mit 5 µl einer 5 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt und in Elektrophoreseröhrchen gegossen (9,2×0,6 cm). Die Gele wurden in Boratpuffer (pH 8,3) 0,5 µg/ml Ethidiumbromid vorelektrophoretisiert (15 min, 2 mA/Röhrchen). Nach Auftragen des Enzyman- satzes wurden die DNA-Fragmente unter den gleichen Bedingungen 3 Std. elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht (254 nm) photographiert (Abb. 1 a + b).

6. Radioaktivitätsmessung

Die Agarosegele wurden mit einem Gel slicer (Joyce Loebl) in 1 mm-Scheibchen geschnitten. Je 2 Gelscheibchen wurden in 1 ml H₂O₂ 20 min bei 70 °C inkubiert, gekühlt und nach Zugabe von 7 ml

Szintillator (Unisolve I, Koch u. Light Lab.) in einem Betaszint BF 5000 (Frieske u. Hoepfner) gemessen (Abb. 2).

Ergebnisse

1. Quantitative Bestimmung des Gehaltes an 5-Methylcytosin

Der Gehalt an 5-Methylcytosin in den induzierten Zellen bleibt konstant nach der Behandlung. Dabei spielt sowohl die Menge an DMSO als auch die Einwirkungszeit keine Rolle (s. Tab. I). Aus der Tabelle läßt sich weiter entnehmen, daß die Reproduzierbarkeit der Analysen sehr gut ist.

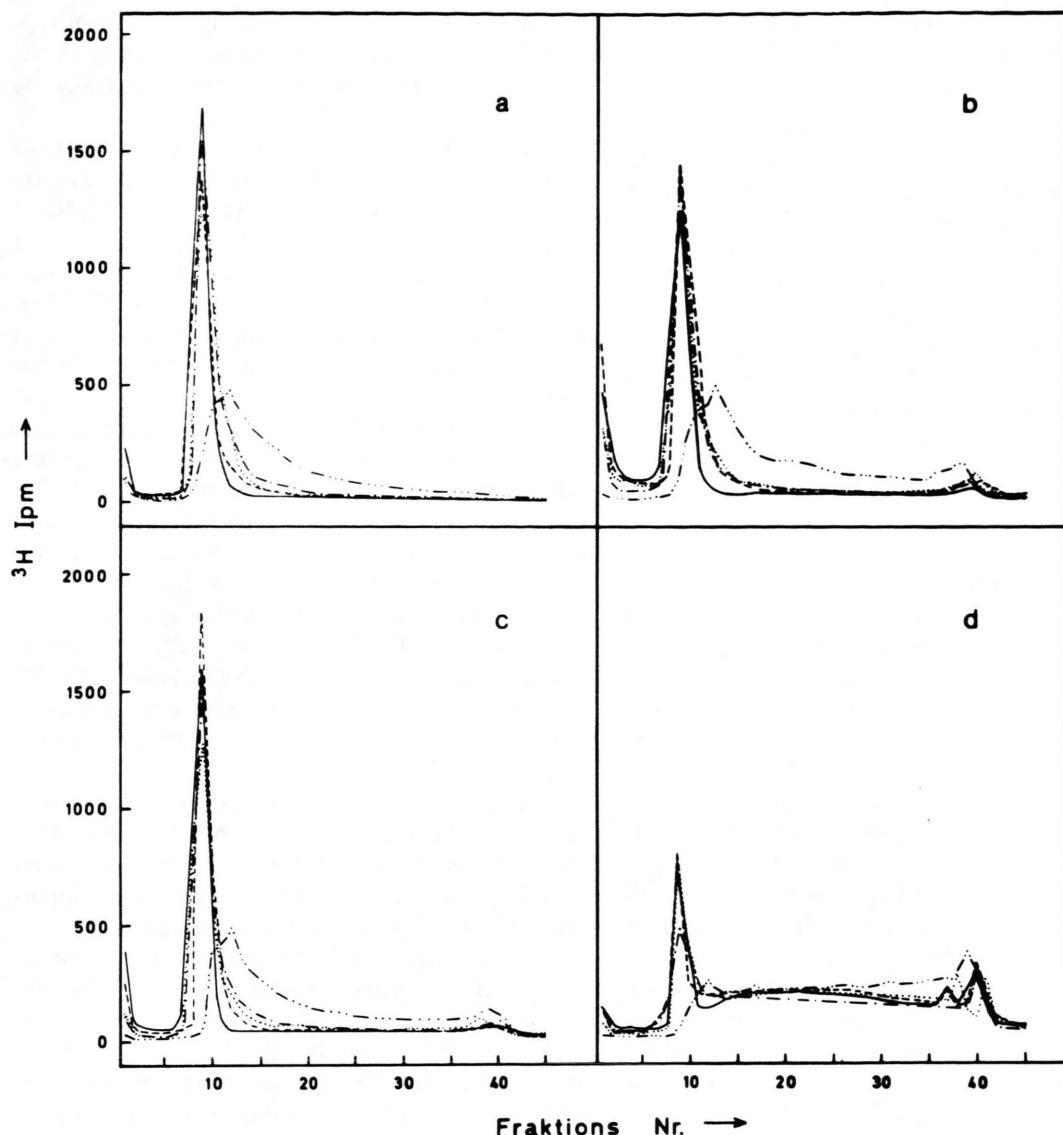


Abb. 2. Szintigraphische Auswertung der fraktionierten Gele. Zur Bestimmung der ^3H -markierten Fragmente wurden die Gele zerschnitten, die Scheiben in H_2O_2 gelöst, Szintillator zugesetzt und gemessen. a = Tag 0; b = Tag 1; c = Tag 3; d = Tag 5. — Kontrolle, - - - Hha I, - · - Hpa II, - - - - Hha I + Hpa II, - · - - Msp I. Weitere Details siehe Methoden.

Tab. I. Basen-Analyse der DNA aus Rattenerthyroleukämie-Zellen RED-2/D5 nach Induktion mit DMSO. Angegeben sind nMol%. B⁺ = Benzidin positiv.

Behandlung Tage	DMSO	Thy	Gua	Ade	Cyt	5MC	% B ⁺
0		28,8	20,3	29,4	20,6	0,94	4
2	280 (2,0%)	28,6	20,3	29,6	20,5	0,94	—
3	210 (1,5%)	28,3	20,9	29,4	20,5	0,91	18
4	210 (1,5%)	28,3	20,9	29,4	20,5	0,89	—
5	210 (1,5%)	28,6	20,7	29,2	20,6	0,91	45

2. Spaltung von ^3H Uridin-markierter DNA mit Restriktions-Enzymen

Wir haben die Empfindlichkeit der Methode noch verstärkt, indem wir die DNA mit Uridin markierten. Die radioaktive DNA wurde mit Hilfe von Restriktions-Enzymen gespalten, dann in 1 mm-Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität in diesen analysiert. Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, daß sich auch bei der Verwendung von Restriktions-Enzymen keine Unterschiede ergeben in der Spaltung der einzelnen DNA's. Auch mit dieser Methode läßt sich also unter der Behandlung mit DMSO kein unterschiedlicher Gehalt an 5-MC aufzeigen.

Diskussion

Die Differenzierung kann in Erythroleukämiezellen durch eine Reihe chemisch nicht verwandter Substanzen wie DMSO [14], Butyrat [15], Ethionin [9], HMBA [16], Purine [17], BrdU [18] u. a. Thymidinanaloga wie Propyldeoxyuridin [18], das nicht in die DNA eingebaut werden kann, induziert werden. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Induktion zur terminalen Differenzierung ein membranvermitteltes Ereignis einschließt [20]. Ob in der Folge davon die Genexpression durch Änderung im Methylierungsmuster reguliert wird, war die Ausgangsfrage für diese Arbeit. Die quantitative Bestimmung mit der HPCL des 5MC-Gehaltes vor und nach Induktion zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied. Die gleichen Ergebnisse wurden bei der durch verschiedenen Substanzen induzierten Differenzierung in Mäuseerythroleukämiezellen erhalten [9]. *In vitro* Methylierung von DNA nichtinduzierter und induzierter Erythroleukämiezellen mit homologer DNA Methyltransferase aus nichtinduzierten Zellen zeigte, daß DNA von indu-

zierten Zellen < 1,6% mehr Methylgruppen akzeptiert [9]. Da es sich um eine sehr rohe Enzym-Präparation handelt, ist diesen Daten mit großer Skepsis zu begegnen.

Auch die Verdauung von markierter DNA nicht-induzierter und induzierter Rattenerthyroleukämiezellen mit den Restriktionsenzymen *Hpa* II, *Hha* I und *Msp* I und anschließender Auf trennung im Agarosegel zeigt keinen Unterschied. Dieses Verfahren ist noch empfindlicher als die HPLC. Möglicherweise reicht die Auflösung immer noch nicht aus, um eventuell vorhandene Unterschiede im 5 MC-Gehalt zu erfassen.

Falls durch die Induktion Veränderungen in dem Methylgruppenbesatz bewirkt werden, müßten diese sehr gering sein. McGhee und Ginder [21] berichteten erstmalig über spezifische CCGG-Abschnitte in Küken-B-Globulin-Genen, die weniger methyliert sind in Erythrocyten und Retikulocyten als im Oviduct. Ähnliche Befunde wurden auch an anderen Genen erstellt [22–24]. Bei Studien an Viren wurden derartige Befunde ebenfalls erhoben [25–28]. Es gibt also in der Tat eine Reihe von Hinweisen dafür, daß die Methylierung der DNA eine regulatorische Funktion hat.

In der Tendenz kann man also die Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß bei der induzierten *terminalen* erythroiden Differenzierung eine Änderung in der quantitativen und vielleicht auch qualitativen Methylierung mit den vorliegenden Methoden nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist zu überprüfen, ob größere Veränderungen im Methylierungsmuster bereits in früheren Differenzierungsstadien ablaufen, etwa bei der Festlegung auf die erythroide Reihe [29]. Die induzierte terminale Differenzierung durchläuft verglichen mit der normalen Erythropoese nur einen vergleichsweise kurzen Abschnitt, nämlich vom Proerythroblasten zum Normoblasten.

- [1] R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. **175**, 315 (1948).
- [2] E. Scarano, Adv. Cytopharmacol. **1**, 1 (1971).
- [3] R. Holliday und J. E. Pugh, Science **187**, 226–232 (1975).
- [4] R. Sager und R. Kitchin, Science **189**, 426–433 (1975).
- [5] A. D. Riggs, Cytogenet. Cell Genet. **14**, 9–25 (1975).
- [6] C. B. Olson, Speculations in Science and Technology **2**, 365–373 (1979).
- [7] A. Razin und A. D. Riggs, Science **210**, 604–610 (1980).
- [8] K. Christman, P. Price, L. Pedrinan und G. Acs, Europ. J. Biochem. **81**, 53–61 (1977).
- [9] J. K. Christman, N. Weich, B. Schoenburn, N. Schneiderman und G. Acs, J. Cell. Biol. **86**, 366 (1980).
- [10] N. Weich, M. Schneiderman, G. Acs und K. Christman, Federat. Proc. Vol. **38**, 668 (1979).
- [11] N. Kluge, W. Ostertag, T. Sugiyama, D. Arndt-Jovin, Gel Steinheider, M. Furusawa und S. K. Dube, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**, 1237 (1976).
- [12] S. H. Orkin, F. J. Harosi und P. Leder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 98 (1975).

- [13] R. Baur, H. Wohlert und H. Kröger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 1263 (1979).
- [14] C. Friend, W. Scher, J. G. Holland und T. Sato, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 378 (1971).
- [15] E. Takahashi, M. Yamada, M. Saito, M. Kuboyama und E. Ogasa, Gann **66**, 577 (1975).
- [16] R. C. Reuben, R. L. Wife, R. Breslow, R. A. Rifkind und P. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**, 862 (1976).
- [17] J. F. Gusella und D. Housmann, Cell **8**, 263 (1976).
- [18] S. K. Dube, G. Gaedicke, N. Kluge, B. J. Weimann, H. Melderis, G. Steinheider, T. Crozier, H. Beckman und W. Ostertag, in: Proc. 4th Int. Sym. Princ. Takamatsu Res. Fund. Differentiation and Control of Tumor Cells, pp. 103–136, Univ of Tokyo Press 1974.
- [19] J. A. Bilello, J. Kühne, G. Koch und K. K. Gauri, in: Antiviral Chemotherapy: Design of Inhibitors of Viral Functions (ed. K. K. Gauri), pp. 111–121, (1981).
- [20] Y. Yamaguchi, N. Kluge, W. Ostertag und M. Furusawa, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **78**, 2325–2329 (1981).
- [21] J. D. McGhee und G. D. Ginder, Nature **280**, 419 (1979).
- [22] J. L. Mandel und P. Chambon, Nucleic Acid Res. **7**, 2081 (1979).
- [23] L. H. T. Van der Ploeg und R. A. Flavell, Cell **19**, 947 (1980).
- [24] C. Shen und T. Mariatis, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**, 1287 (1980).
- [25] D. Sutter, M. Westphal und W. Doerfler, Cell **14**, 569 (1978).
- [26] D. Sutter und W. Doerfler, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**, 253 (1980).
- [27] R. C. Desrosiers, C. Mulder und B. Fleckenstein, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76**, 3839 (1979).
- [28] J. C. Cohen, Cell **19**, 653 (1980).
- [29] L. H. T. Van der Ploeg und R. A. Flavell, Cell **19**, 947–958 (1980).