

DNA-Methylierung

Königin oder Arbeiterin? Epigenetik entscheidet

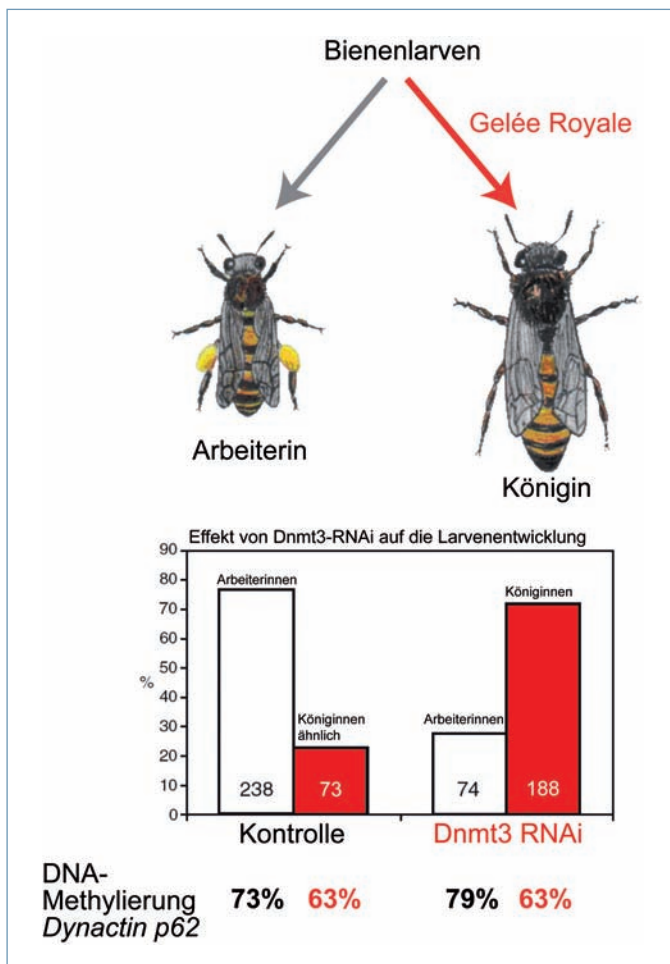
SANDRA WEIB, RALF GILSBACH, LUTZ HEIN
INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE UND
TOXIKOLOGIE, UNIVERSITÄT FREIBURG

Die Methylierung der DNA ist ein wichtiger epigenetischer Mechanismus. Methoden zur genomweiten Untersuchung dieser Modifikation werden in diesem Artikel beispielhaft an der Entwicklung der Bienenlarve diskutiert.

Methylation of DNA is an important epigenetic mechanism. In the present article methods to assess genomwide DNA methylation are discussed using the honeybee larvae development as a model.

■ Epigenetik bezeichnet die Vererbung von Merkmalen, die nicht auf Änderungen in der DNA-Sequenz zurückgeführt werden können.

Im engeren Sinne wird im Rahmen der Epigenetik meist die direkte Modifikation der DNA, z. B. durch Methylierung verstanden.



◀ **Abb. 1:** Epigenetik der Bienen-Entwicklung. Gelée Royale fördert die Differenzierung von Bienenlarven zu Königinnen. Ursache für diese natürliche Differenzierung scheint ein enthaltener Methyltransferase-Inhibitor zu sein, denn dieser Phänotyp kann auch durch eine RNAi-vermittelte Senkung der Dnmt3-Expression imitiert werden (unterer Teil, modifiziert nach [5]). RNAi: RNA-Interferenz; Dnmt3: DNA-Methyltransferase 3.

Aber auch andere Prozesse, die über die Bindung an methylierte DNA-Abschnitte, über Histon- und Chromatin-Modifikationen oder microRNA die Genexpression ändern, werden unter dem Begriff Epigenetik zusammengefasst.

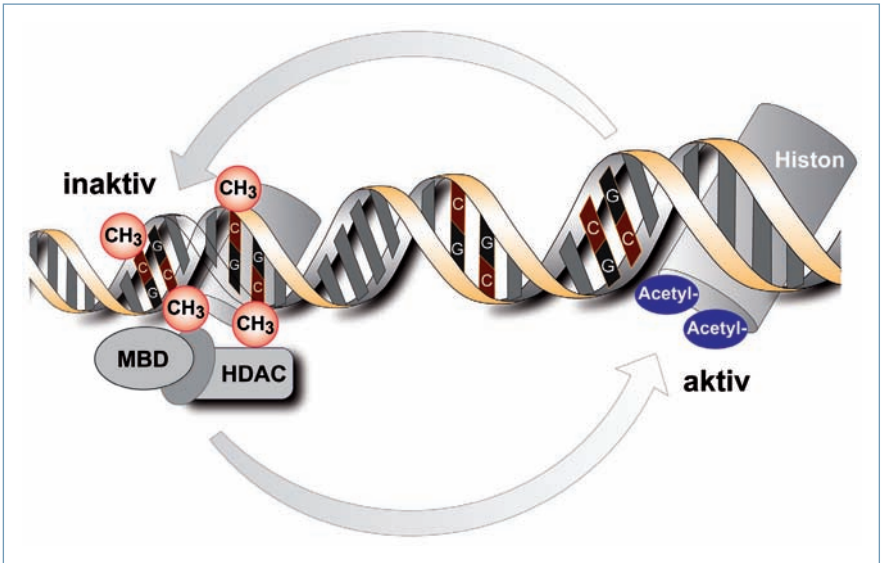
Epigenetische Mechanismen sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt^[1]. In Krebszellen werden Tumorsuppressorgene durch DNA-Methylierung im Promotorbereich abgeschaltet, sodass die Zellen schneller proliferieren können. Epigenetik steuert die Differenzierung von Zellen und Geweben, indem zelltypspezifische Genprogramme an- oder abgeschaltet werden. Ein interessantes Beispiel für die Bedeutung der Epigenetik ist die Entwicklung von Bienenköniginnen oder Arbeiterinnen (**Abb. 1**). Bienenlarven, die während der gesamten Larvenentwicklung mit Gelée Royale gefüttert werden, entwickeln sich zu Königinnen. Larven, die nach dem dritten Stadium nur noch Pollen und Honig erhalten, werden Arbeiterinnen. Wie kann es gelingen, epigenetische Mechanismen dieser biologischen Prozesse aufzuklären? Hierzu sind Methoden erforderlich, die es erlauben, die DNA-Methylierung im gesamten Genom eines Organismus oder Zelltyps mit möglichst hoher Auflösung zu detektieren. Im Folgenden sollen zwei dieser Methoden näher vorgestellt werden.

DNA-Methylierung

Bei Säugetieren findet die DNA-Methylierung ausschließlich an Cytosinbasen statt, die in der 5'-Cytosin-Guanin-3'-Folge stehen (**Abb. 2**). Diese DNA-Sequenz bezeichnet man als CpG-Dinukleotid. CpG-reiche Regionen werden auch CpG-Inseln genannt. Werden diese CpG-Regionen methyliert, so wird die Transkription verhindert, da Transkriptionsfaktoren nicht mehr an die entsprechenden DNA-Abschnitte binden können.

Genomweite DNA-Methylierungsanalyse

Ziel der genomweiten Methylierungsanalyse ist es, diejenigen DNA-Abschnitte zu identi-



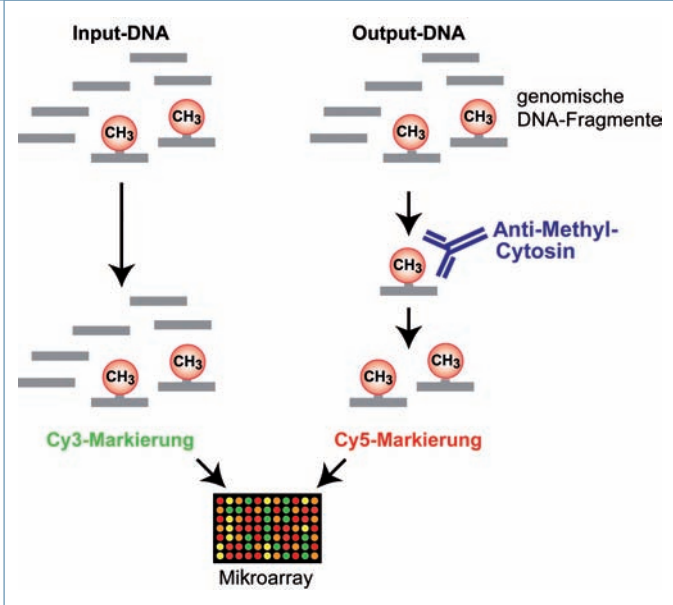
▲ **Abb. 2:** Kontrolle der Genexpression durch DNA-Methylierung. Schematische Darstellung der DNA mit inaktiver Transkription versus aktiver Transkription. Sowohl eine Methylierung der DNA als auch eine Deacetylierung von Histonen (HDAC, Histon-Deacetylase) führt zu einer Stilllegung von Genen. Methyl-bindende Proteine (MBDs) binden methylierte CpG-Abschnitte und führen durch Rekrutierung weiterer Proteine zu einer transkriptionellen Regulation.

fizieren, die insbesondere im Promotorbereich von Genen differenziell methyliert sind. Hierzu werden methylierte DNA-Abschnitte anhand ihrer Affinität zu Methylcytosin-bindenden Proteinen oder Antikörpern angereichert und in einem zweiten Schritt durch einen Mikroarray detektiert. Bei der Methode der Immunpräzipitation methylierter DNA (MeDIP, **Abb. 3**) wird zunächst genomische DNA aus Zellen oder Geweben mittels Ultraschall in kleine, 300–500 (maximal 1.000) Basenpaare lange Fragmente zerkleinert^[2, 3]. Anschließend werden methylierte CpG-enthaltende Fragmente mittels eines Anti-5-Methylcytosin-Antikörpers immunpräzipitiert. Mit diesem Verfahren kann man methylierte DNA-Abschnitte je nach Methylierungsgrad bis zu 100fach anreichern. Schließlich werden immunpräzipitierte („Output-DNA“) und Kontroll-DNA-Fractionen („Input-DNA“) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, z. B. Cy3 und Cy5, markiert und zur Hybridisierung auf einem Mikroarray inkubiert. Die für diese Anwendung kommerziell angebotenen Mikroarrays decken die Promotorbereiche des gesamten Genoms in einem engen Raster ab. Die Auflösung der Methode hängt von der Größe der geschnittenen DNA-Fragmente und der Dichte der DNA-Sonden auf dem Mikroarray ab. Die maximale Ortsauflösung dieser Methode liegt in der Regel zwischen der mittleren DNA-Fragmentlänge und dem genomischen Abstand der DNA-

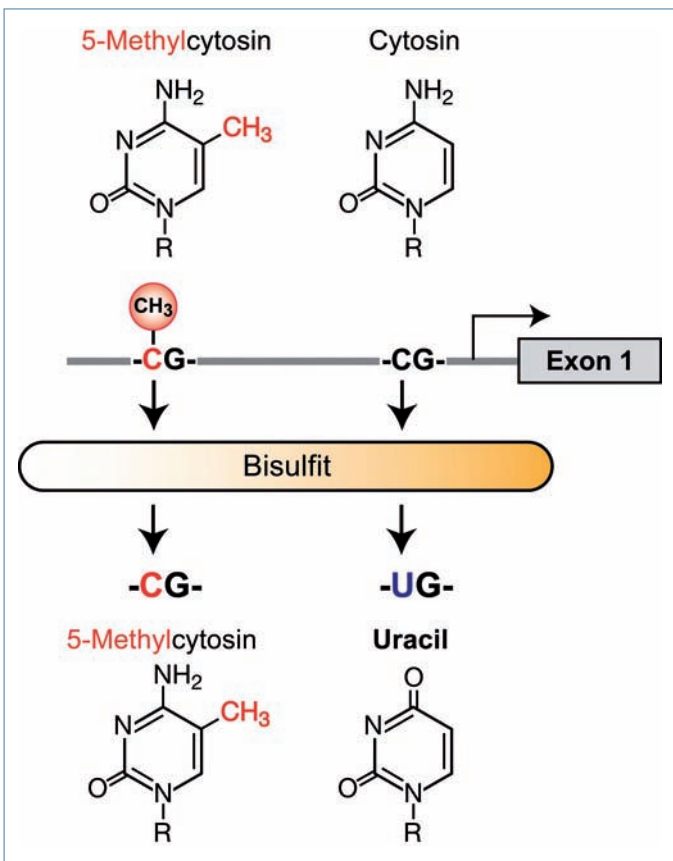
Sonden auf dem Mikroarray. Im Idealfall können so genomweit methylierte DNA-Abschnitte mit einer Auflösung von 100–300 Basenpaaren identifiziert werden. Ein Nachteil der Methode ergibt sich aus der Tatsache, dass geringfügige Methylierungsänderungen in stark methylierten DNA-Abschnitten wie z. B. in CpG-Inseln nur schwer erfasst werden können, da der relative Unterschied im Methylierungsstatus hierbei nicht zum Tragen kommt.

Genespezifische Methylierungsanalyse durch Bisulfit-Sequenzierung

Um die MeDIP-Mikroarray-Ergebnisse zu validieren und die exakten Positionen methylierter Cytosine in einer DNA-Sequenz zu bestimmen, kann die so genannte Bisulfit-Sequenzierung der entsprechenden Kandidaten-Abschnitte im Genom angewandt werden (**Abb. 4**). Grundlage dieser Methode ist die Konversion von unmethylierten Cytosinen zu Uracil durch Bisulfit^[4]. Methylierte Cytosine werden durch diese Reaktion nicht beeinflusst. Die so konvertierte DNA kann anschließend mit verschiedenen quantitativen Sequenzierungsmethoden ausgewertet werden. Bei der Wahl dieser Methode ist die Quantifizierbarkeit entscheidend, um auch feine Änderungen des Methylierungsmusters zu erfassen. In der Praxis haben sich zwei Prinzipien durchgesetzt, wobei man zwischen direkter und indirekter Sequenzierung unterscheidet. Im



◀ **Abb. 3:** Genomweite DNA-Methylierungsanalyse mittels Immunpräzipitation methylierter DNA (MeDIP). Gescherte Fragmente genomischer DNA werden durch einen Anti-Methylcytosin-Antikörper präzipitiert und die Anwesenheit methylierter DNA-Fragmente (Output-DNA, rechts) wird mit der Referenzprobe (Input-DNA, links) mittels Mikroarray verglichen.



◀ **Abb. 4:** Sequenzspezifische DNA-Methylierungsanalyse. Schematische Darstellung der Reaktion von genomischer DNA mit Natriumbisulfit. Unmethylierte Cytosine werden mittels Bisulfit oxidativ zu Uracil desaminiert (rechts). Methylierte Cytosine sind vor dieser Reaktion geschützt und werden nicht konvertiert (links).

ersten Fall wird die zu untersuchende Region durch eine PCR amplifiziert und direkt analysiert. Die Sequenzierung von Einzelbasen kann mittels *single nucleotide primer extension* (SNuPE) erfolgen, die Analyse von Fragmenten mit bis zu 150 Basenpaaren mit der Pyrosequenzierung. Im Gegensatz dazu werden die PCR-Produkte im Fall der indirekten Sequenzierung zunächst in Plasmidvektoren kloniert. Für jedes PCR-Produkt wird eine Vielzahl von Einzelklonen sequenziert. Fasst man diese Ergebnisse wie in **Abbildung 1** für die Bienen dargestellt zusammen, erhält man

eine quantitative Aussage über den Methylierungsgrad spezifischer DNA-Positionen.

Enthält Gelée Royale DNA-Methyltransferase-Inhibitoren?

Bienenlarven, Arbeiterinnen und Königinnen sind genetisch identische Organismen. Allein die Fütterung von Gelée Royale führt zur Entwicklung von Königinnen, die z. B. im *Dynactin-p62*-Gen eine geringere DNA-Methylierung zeigen (**Abb. 1**, unten)^[5]. Aufgrund dieser Befunde lag es nahe zu vermuten, dass Gelée Royale einen DNA-Methyltransferase-

Inhibitor enthält. In der Tat kann allein die Hemmung der Methyltransferase Dnmt3 mittels RNA-Interferenz den Methylierungsstatus von *Dynactin* reduzieren und die Entwicklung von Königinnen begünstigen^[5]. Die Suche nach dem epigenetischen Wirkstoff im Gelée Royale ist in vollem Gange.

Fazit

Durch Zuhilfenahme dieser Methoden konnte bestätigt werden, dass sowohl die Genexpression als auch die Zelldifferenzierung durch epigenetische Mechanismen moduliert werden können. In welchem Umfang diese Mechanismen andere biologische Vorgänge und die Entstehung von Krankheiten beeinflussen, lässt sich nun anhand der vorgestellten Methoden entschlüsseln. ■

Literatur

[1] Jaenisch, R., Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33: 245–254.
 [2] Zilberman, D., Henikoff, S. (2007): Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134: 3959–3965.
 [3] Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., Schübeler, D. (2005): Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 37: 853–862.
 [4] Fernandez-Fernandez, A., Esteller, M.: DNA methylation analysis by bisulfite sequencing. Protocol 34, The epigenome network of excellence, www.epigenome-noe.net.
 [5] Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. (2008): Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319: 1827–1830.

Korrespondenzadresse:



1 Prof. Dr. Lutz Hein¹
 2 Sandra Weiß²
 Dr. Ralf Gilsbach³
 Institut für Exp. und Klin. Pharmakologie und Toxikologie
 Universität Freiburg
 Albertstraße 25
 D-79104 Freiburg im Breisgau
 Tel.: 0761-2035314
 Fax: 0761-2035318
 Lutz.Hein@pharmakol.uni-freiburg.de

