

„Vier Basen im Genom sind nicht genug: Die Bedeutung epigenetischer Basen für die Entwicklung eines Organismus“

Silke Lambing

Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin....sicherlich können die meisten, die im Biologie-Unterricht aufgepasst haben, noch die vier Basen der DNA aufzählen. Ebenso wird bekannt sein, dass die bestimmte Abfolge von drei Basen für jeweils eine der 20 natürlichen Aminosäuren codiert. Bei der Genexpression entsteht durch Ablesen (Transkription) und Übersetzen (Translation) dieses Codes in eine Aminosäuresequenz das Protein. Da bei der Zellteilung eine Kopie an die Tochterzelle weitervererbt wird, besitzt in einem multizellulären Organismus jede Zelle dieselbe Erbinformation (Genom). Ist es hierbei nicht interessant, dass sich Zellen trotzdem in Aussehen und Funktion unterscheiden? Eine Muskelzelle braucht demnach andere Gene und Genprodukte als beispielsweise eine Fettzelle. Woher weiß die Transkriptions-Maschinerie, welche Gene und wie oft sie diese in den verschiedenen Zelltypen ablesen darf? An diesem Punkt kommt die Epigenetik ins Spiel! Es handelt sich im weitesten Sinne um vererbte oder durch Umwelteinflüsse erworbene Zelleigenschaften, die nicht direkt in der DNA-Sequenz festgelegt sind. Diese unterschiedlichen Eigenschaften werden hauptsächlich durch strukturelle Veränderungen an den von DNA umwickelten Histonen und der DNA selbst erreicht und werden als epigenetische Markierungen der DNA bezeichnet.

Die 5. Base 5-Methylcytosin

Die prominenteste und am besten charakterisierte epigenetische Markierung ist die Methylierung der Base Cytosin. 5-Methylcytosin, gerne als fünfte Base des Genoms bezeichnet, wurde erstmals 1948 zufällig von R. D. Hotchkiss während der Auftrennung der DNA-Basen mittels Papierchromatographie entdeckt [1]. Etwa 1 % aller Nukleotide in der DNA ist methyliertes Cytosin, wobei es in dieser Form fast ausschließlich vorliegt, sofern die Base Guanin in der DNA-Sequenz folgt. Aus diesem Grund sind etwa 70 % aller CpG-Dinukleotide der DNA in somatischem Gewebe von Säugern methyliert. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) sorgen für eine neue Methylierung und Beibehaltung dieser Methylierung, indem sie direkt nach Verdopplung der DNA auf den neusynthetisierten Strang eine Methylgruppe mit dem C5 von Cytosin kovalent verknüpfen. Sie spielen in der Epigenetik eine wichtige Rolle, da ohne ihre katalytische Aktivität das Methylierungsmuster in nachfolgenden Replikationsrunden verloren gehen würde. S-Adenosylmethionin (SAM) dient als Methyl-Donor [2]. Durch den nukleophilen Angriff des Thiols des Cystein-Rests im katalytischen Zentrum des Enzyms auf die zum C6-Atom benachbarte Doppelbindung von Cytosin entsteht zunächst eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Base. Anschließend kann dadurch das freie Elektronenpaar am C5 des Cytosin-Rings die Methylgruppe von SAM angreifen. Nach β -Eliminierung dissoziiert die methylierte Base wieder aus dem katalytischen Zentrum und das Enzym regeneriert (Abb. 1A und B I) [1,3].

5-Methylcytosin ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Die dichte Methylierung von Promotoren bewirkt, dass die zugehörigen Gene ausgeschaltet werden. Die DNA in dieser Genregion verdichtet sich, da sich Methyl-CpG-bindende Proteine anlagern und weitere Histon-modifizierende Enzyme rekrutieren, welche eine Chromatin-Kondensierung bewirken. Zudem wird die Transkriptionsmaschinerie durch diese Modifizierungen sterisch an der DNA-Bindung behindert. Durch Herstellung gewebespezifischer

Methylierungsmuster während der embryonalen Entwicklung kommt es zur Zelldifferenzierung. Es bleiben nur die Gene in den einzelnen Zelltypen aktiv, die für deren Zellidentität benötigt werden. Die Bedeutung der epigenetischen Base wird durch zahlreichen Krankheiten reflektiert, deren Ursachen auch mit Dysfunktionen in der DNA-Methylierung assoziiert sind. Veränderte Methylierungsmuster werden bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Krebs gefunden. Charakteristika von Tumorzellen sind eine generell geringere DNA-Methylierung im gesamten Genom und nur lokal an bestimmten Promotoren erhöhte Cytosin-Methylierung. Letztere bewirken häufig die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen, deren Genprodukt in gesunden Zellen eine Entartung der Zelle verhindern kann.

Bei der Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin handelt es sich um einen Prozess, der reversibel ist. Aus diesem Grund bietet sich die epigenetische Modifizierung der DNA als Angriffspunkt für Krebstherapeutika an. Die beiden Basenanaloga 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin hindern beispielsweise DNA-Methyltransferasen an der weiteren Methylierung und führen auf diese Weise zu einer passiven Demethylierung. Einer ihrer Wirkmechanismen besteht darin, die stillgelegten Gene von Tumorsuppressoren zu reaktivieren. Sie sind beide von der amerikanischen FDA (*Food and Drug Administration*) als Krebsmedikamente zugelassen [2].

5-Hydroxymethylcytosin - die 6. Base?

Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen über die Rolle von 5-Methylcytosin stellte sich die Frage, ob und auf welche Weise die Methylierung der DNA wieder entfernt werden kann, um die stillgelegten Gene zu reaktivieren. Es ist bekannt, dass während der Embryogenese unmittelbar nach der Befruchtung das elterliche Methylierungsmuster gelöscht wird und ein neues, individuelles Methylierungsmuster in den embryonalen Stammzellen während der Entwicklung des Embryos aufgebaut wird [4]. Existiert hierbei ein aktiver Demethylierungs-Mechanismus, der durch Enzyme

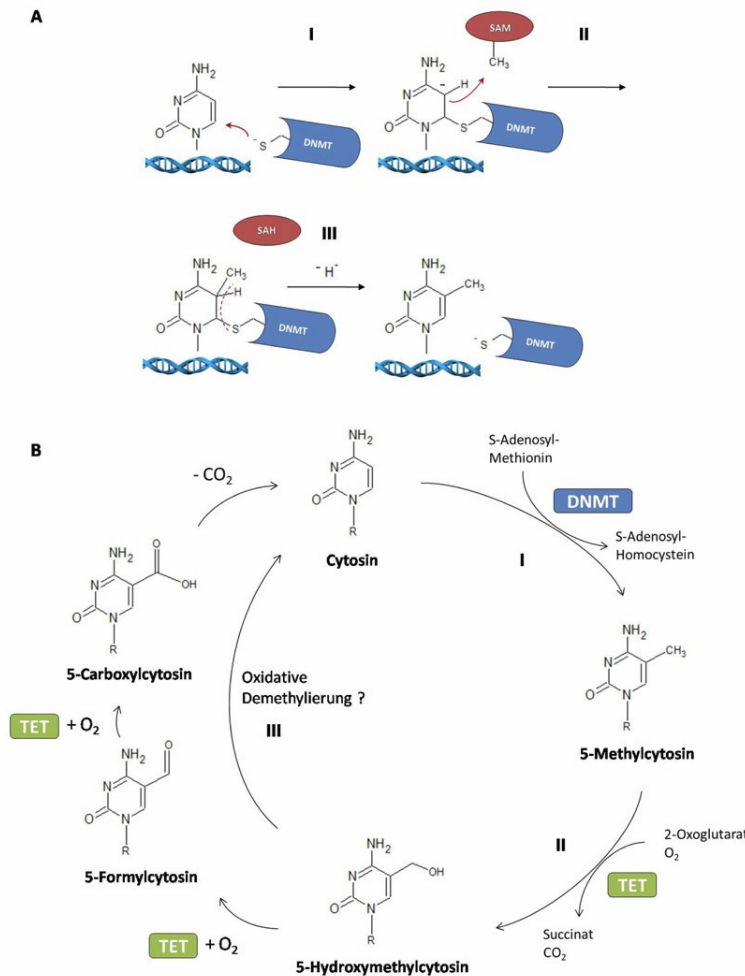


Abbildung 1: **A:** Reaktionsmechanismus der DNA-Methyltransferase (DNMT) zur Methylierung von Cytosin. Die einzelnen Schritte sind im Text erklärt. SAM= S-Adenosylmethionin, SAH= S-Adenosyl-Homocystein. **B:** Reaktionszyklus der Methylierung und oxidativen Demethylierung von Cytosin. TET= Ten Eleven Translocation

katalysiert wird? Oder geschieht dies passiv, indem die Aufrechterhaltung der Methylierung verhindert wird? Lange Zeit konnte dieses Rätsel nicht aufgedeckt werden, doch die Antwort scheint seit dem Jahr 2009 zum Greifen nahe. Zwei Forschungsgruppen entdeckten zeitgleich eine weitere modifizierte Form der Base Cytosin im menschlichen Genom: 5-Hydroxymethylcytosin. Kiaucionis und Heintz fanden diese zufällig bei der Untersuchung der Nukleotid-Zusammensetzung in Neuronen. Die Gruppe um Tahiliani entdeckte sie hingegen durch gezielte Suche nach dem Enzym, welches 5-Methylcytosin

weiter modifiziert, und konnte auf diese Weise die TET (*Ten Eleven Translocation*) Protein Familie identifizieren. Hierbei handelt es sich um 2-Oxoglutarat und Fe(II)-abhängige Dioxygenasen, die die Methylgruppe am C5 von Cytosin durch molekularen Sauerstoff (O₂) zu einer Hydroxygruppe oxidieren (Abb. 1B II) [2]. Ob 5-Hydroxymethylcytosin in den Demethylierungsmechanismus als Intermediat involviert ist, oder als feststehende Modifikation bestehen bleibt, ist noch nicht geklärt. Neuste Ergebnisse sprechen für eine aktive Demethylierung durch weitere Oxidation von 5-Hydroxymethylcytosin. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Dioxygenasen TET in der Lage sind, 5-Hydroxymethylcytosin über 5-Formylcytosin weiter zu 5-Carboxylcytosin zu oxidieren, welches durch Decarboxylierung zurück zu 5-Methylcytosin reagieren kann (Abb. 1B III). Zum anderen wurde neben 5-Hydroxymethylcytosin auch 5-Formylcytosin in der DNA von embryonalen Stammzellen entdeckt, welches mit Beginn der Differenzierung wieder reduziert wird [1]. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass die Anzahl von anfangs vier bekannten Basen zukünftig auf acht erweitert werden muss.

Epigenetischen Basen und Embryogenese

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand könnte 5-Hydroxymethylcytosin tatsächlich als der lange gesuchte Gegenspieler zu 5-Methylcytosin fungieren. Wie bereits erwähnt, wird in der frühen Embryogenese während der ersten Zellteilungen nach Verschmelzung des väterlichen und mütterlichen Vorkerns das elterliche Methylierungsmuster gelöscht und ein individuell neues aufgebaut. Die Arbeitsgruppe um Wossidlo zeigte, dass während des ersten Zellzyklus direkt nach der Befruchtung die Menge an 5-Hydroxymethylcytosin in der väterlichen DNA rapide ansteigt parallel zur Abnahme von 5-Methylcytosin. Diese Veränderung konnte nur in geringem Maße in der mütterlichen DNA beobachtet werden und sind Indizien dafür, dass das väterliche Methylierungsmuster aktiv über Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin schon im ersten Teilungszyklus gelöscht wird. Die mütterliche DNA ist hingegen weder zugänglich für die TET-vermittelte Oxidation noch für die DNMT-vermittelte Aufrechterhaltung der Methylierung und wird durch das

Ausbleiben dieser Veränderungen langsam und passiv in nachfolgende Teilungszyklen demethyliert [5]. Beim Vergleich der genomweiten Verteilung beider epigenetischer Basen in embryonalen Stammzellen von Mäusen und deren Differenzierung in embryonale Körperchen (ahmt *in vitro* in begrenztem Maße die embryonale Entwicklung nach) zeigte sich zudem, dass in den pluripotenten Stammzellen etwa 5 % aller CpGs mit 5-Hydroxymethylcytosin angereichert sind. Diese epigenetische Modifikation nimmt mit fortschreitender Differenzierung zu einem Embryo insbesondere bei Promotoren Stammzell-spezifischer Gene ab parallel zur Stilllegung dieser und weiterer Gene durch zunehmende Methylierung (Abb. 2A und B) [6].

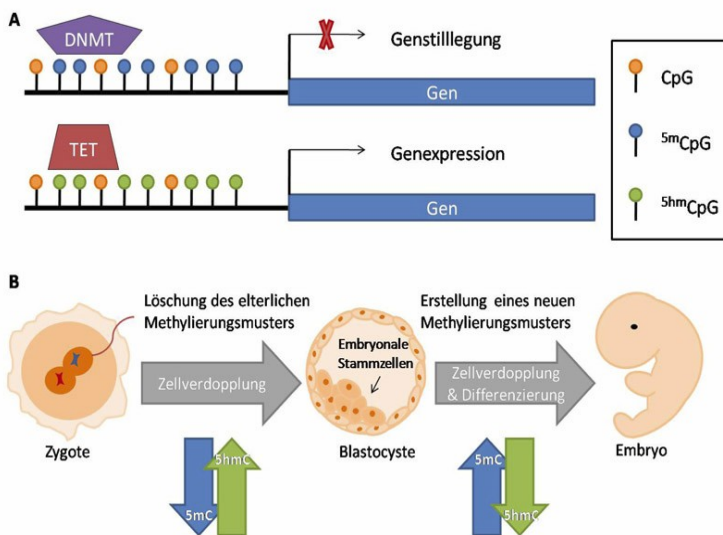



Abbildung 2: **A:** Mechanismus der Genexpressionskontrolle durch Modifikation der Base Cytosin innerhalb CpG Dinukleotide von Genpromotoren. **B:** Regulation der Embryogenese durch Veränderung des 5-Hydroxymethylcytosin- (5mC) und 5-Hydroxymethylcytosin-Niveaus, welches Einfluss auf die Genexpression hat (siehe A).

Schlussfolgerung und mögliche weitere Rollen von 5-Hydroxymethylcytosin

Während 5-Methylcytosin Gene herunter reguliert oder abschaltet und dadurch eine Differenzierung zu bestimmten Zelltypen einleitet und bewahrt, sorgt 5-Hydroxymethylcytosin als Gegenspieler für die Entfernung der Methylierung und folglich durch Reaktivierung von Genen für die Entstehung und Erhaltung eines pluripotenten Status in embryonalen Stammzellen. In ausdifferenziertem Gewebe ist 5-Hydroxymethylcytosin mit einem prozentualen Anteil von ca. 0,15 – 0,03 % aller Cytosine aus diesem Grund nur in äußerst geringen Mengen vorhanden. Überraschenderweise wurde die höchste Menge an 5-Hydroxymethylcytosin (0,3 - 0,7 %) jedoch in Gewebe des zentralen Nervensystems gemessen. Hier könnte die aktive Demethylierung neben ihrer wichtigen Bedeutung in der Embryogenese auch ein essentieller Bestandteil im Lern- und Speicherprozess des reifenden Gehirns sein. Letztlich häufen sich zudem die Beweise, dass Veränderungen im Hydroxymethylierungsmuster, ausgelöst durch Mutationen in den TET-Genen, ebenfalls zur Krebsentstehung beitragen könnten [4].

Die hier beschriebenen Rollen der beiden postreplikativen DNA-Modifikationen 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin verdeutlichen, dass neben dem genetischen Code der lange bekannten Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin ein weiterer Code auf epigenetischer Ebene existiert. Dieser Code scheint ebenfalls essentiell zu sein, da Dysfunktionen mit Krebs und einer fehlerhaften Entwicklung assoziiert werden. Die Epigenetik ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Modifikationen und Enzymen, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben Cytosin-Modifikationen auch weitere Formen der restlichen drei Basen in diesem Code existieren.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (Woche 2). Die Autorin, Silke Lambing, ist Studierende des Fachs Biomolecular Engineering (Master) an der TU Darmstadt</p> <p>E-Mail: silke.lambing@web.de</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung Prof. Dr. Harald Kolmar</p> <p>E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Wie viel Prozent aller Nukleotide in der DNA sind methyliertes Cytosin?</p>

Literatur:

- [1] Jurkowski, T.P. and A. Jeltsch, *Burning off DNA methylation: new evidence for oxygen-dependent DNA demethylation*. *Chembiochem*, 2011. **12**(17): p. 2543-5.
- [2] Dahl, C., K. Gronbaek, and P. Guldberg, *Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(11-12): p. 831-6.
- [3] Cyr, A.R. and F.E. Domann, *The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(2): p. 551-89.
- [4] Munzel, M., D. Globisch, and T. Carell, *5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. **50**(29): p. 6460-8.
- [5] Wossidlo, M., et al., *5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 241.
- [6] Ficz, G., et al., *Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 398-402.