



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss des Folats auf den DNA Methylierungsstatus“

verfasst von

Mag. rer. nat. Amra Sarajlić

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 442

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Anthropologie

Betreuerin / Betreuer: Mag. Dr. Elisabeth Rudolph-König

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	1
2	DNA METHYLIERUNG	3
2.1	Einführung	3
2.2	DNA Demethylierung	6
2.3	DNA Methyltransferasen	9
	Dnmt1	11
	Struktur und Aufbau	12
	Interaktionspartner von Dnmt1	13
	Funktion	14
	Dnmt2	15
	Funktion	17
	Dnmt3	19
	Dnmt3a und Dnmt3b	19
	Aufbau	20
	Funktion	21
	Dnmt3L	22
3	HISTONMODIFIKATION	23
3.1	Acetylierung	25
3.2	Phosphorylierung	25
3.3	Methylierung	25
3.4	Ubiquitylierung	26
3.5	Histon-Code	26
3.6	Zusammenhang zwischen Histonmodifikation und DNA Methylierung	27
4	FUNKTION DER DNA METHYLIERUNG	29
4.1	Kontrolle der Genexpression	30
	Methyl-CG-bindende Proteine (MBP)	32
4.2	Genomische Prägung	32
4.3	Embryogenese	34
4.4	Inaktivierung des X-Chromosoms	36
4.5	Stilllegung von Transposons	37
5	DNA METHYLIERUNG und KRANKHEIT	38
5.1	Rett Syndrom	38
5.2	Angelman Syndrom und Prader-Willi Syndrom	39
5.3	ICF Syndrom	39
5.4	DNA Methylierung und Krebs	40
	PUNKTMUTATIONEN	40
	HYPOMETHYLIERUNG	41
	LOSS OF IMPRINTING (LOI)	42

HYPERMETHYLIERUNG.....	43
6 EINFLUSS DER UMWELT AUF DIE DNA METHYLIERUNG	45
7 FOLSÄURE	47
7.1 Struktur	47
7.2 Stoffwechsel	48
7.3 Bioverfügbarkeit und Bedarf	49
7.4 Funktion	51
Methioninsynthese und biologische Methylierungsreaktion.....	53
de novo Purin- und Thyminbiosynthese.....	54
7.5 Folsäuremangel und die Folgen	55
Ursachen für den Mangel.....	55
Anämie.....	56
7.6 Supplementierung	57
8 FOLAT, DNA METHYLIERUNG UND KRANKHEIT	60
8.1 Folate und Kolonkarzinomrisiko	60
MTHFR C677T Polymorphismus.....	62
Mechanismen der Folat-assoziierten Kolonkrebsentstehung.....	62
Zusammenfassung.....	67
8.2 Folate und Herz-Kreislauf-Erkrankungen	68
Der MTHFR C677T Polymorphismus.....	72
Mechanismus.....	72
Zusammenfassung.....	74
8.3 Folsäure und Schwangerschaft	75
Neuralrohrdefekte (NRD).....	75
Angeborene Herzfehler.....	78
Weitere Fehlbildungen.....	79
9 SCHLUSSBETRACHTUNG	80
10 ZUSAMMENFASSUNG	85
11 ABSTRACT	86
12 LITERATURVERZEICHNIS	87

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
Abbildung 1: Deaminierung von 5-Methylcytosin	4
Abbildung 2: Methylierung von Cytosin.....	5
Abbildung 3: DNA Methylierung in Säugetieren.....	6
Abbildung 4: DNA Demethylierung.	7
Abbildung 5: Darstellung eukaryotischer Dnmts und der prokaryotischen Dnmt.	9
Abbildung 6: Dnmt1-Spezifität.....	11
Abbildung 7: Struktur von Dnmt1	13
Abbildung 8: Evolutionäre Konservierung des Dnmt2 Proteins	15
Abbildung 9: Kristallstruktur der Dnmt2.....	16
Abbildung 10: Methylierung der tRNA ^{Asp} durch Dnmt2.....	17
Abbildung 11: Schematische Darstellung von Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L	19
Abbildung 12: Aufbau des Nukleosoms.....	23
Abbildung 13: Der Histoncode.....	27
Abbildung 14: Die Auswirkung der Methylierung von Genpromotoren	31
Abbildung 15: Lebenszyklus genomischer Prägungen	33
Abbildung 16: DNA Methylierung in den Keimzellen und im Embryo.....	35
Abbildung 17: DNA Methylierung und Krebs	41
Abbildung 18: Chemische Strukturformel der Folsäure.....	47
Abbildung 19: Folate im zellulären Stoffwechsel	52
Abbildung 20: Homocysteinstoffwechsel.....	73

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
Tabelle 1: Die Histonmodifikationen und Auswirkungen auf die Genexpression	24
Tabelle 2: Beispiele für methylierte Tumorsuppressorgene in Krebszellen.....	44
Tabelle 3: Empfohlene Tagesdosen für verschiedene Altersklassen.....	50
Tabelle 4: Mögliche Ursachen für den Folsäuremangel.....	55
Tabelle 5: Tolerable Upper Levels für Folsäure	58
Tabelle 6: Zusammenfassung der klinischen Studien über den Folateinfluss.....	66
Tabelle 7: Klinische Studien über Homocysteinsenkung und CVD	71
Tabelle 8: Zusammenfassung der Fall-Kontroll-Studien.....	77

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei der Frau Dr. Rudolph – König für ihre Unterstützung und ihre Hilfe.

Adnane, ne postoje te rijeci, koje bi mogle da opišu moju zahvalnost prema tebi.

Mojim roditeljima.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung

5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmc	5-Hydroxymethylcytosin
AdoHcy	S-Adenosylhomocystein
AdoMet	S-Adenosylmethionin
BAH1/2	Bromo-adjacent homology 1/2
BER	base excision repair
C-Ende	Carboxyl-Ende
CVD	cardiovascular disease
CXXC	Zink-Domäne
DHF	Dihydrofolat
DMAP1	DNA methyltransferase associated protein 1
DMG	Dimethylglycin
DMR	differentially methylated regions
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	DNA Methyltransferase
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
FA	Folsäure
FÄ	Folatäquivalente
H1, H2A, H2B, H3, H4	Histonproteine
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
ICF	Immunschwäche, Centromer-Instabilität, faziale Dysmorphien
ICR	imprinting control regions
Igf2	insulin-like growth factor-2
Igf2r	insulin-like growth factor-2 receptor
K	Lysin
KHK	koronare Herzkreislauferkrankung
MBD4	Methyl-CG-bindendes Protein 4
MBD	Methyl-bindende Domäne
MBP	Methyl-bindendes Protein
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase

NLS	nuclear localisation signal
NRD	Neuralrohrdefekte
PBD	PCNA bindende Domäne
PBHD	polybromo homology domain
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGA	Pteroylmonoglutaminsäure
PHD	plant homeodomain
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PWWP	
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure
S	Serin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SMC	glatte Muskelzellen
SMUG1	single strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1
T	Thymin
TET	ten eleven translocation- Enzym
THF	Tetrahydrofolat
TRD	target recognition domain
tRNA	Transfer-RNA
TS	Zielsequenz
TSG	Tumorsuppressorgen
UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A
XIST	Xi specific transcripts

1 EINFÜHRUNG

Der Begriff Epigenetik stammt von dem britischen Entwicklungsbiologen Conrad H. Waddington, und sollte die Entwicklung des Phänotyps aus dem Genotyp durch die Wechselwirkung zwischen den Genen und der Umwelt beschreiben. [WADDINGTON, 1942] Waddington leitete den Begriff von dem Wort Epigenese ab. ‚Epi‘ bedeutet auf Griechisch ‚über‘ oder ‚jenseits‘, wörtlich übersetzt bedeutet Epigenetik ‚jenseits der Genetik‘.

Der Begriff Epigenetik wurde bis zu den frühen 90er Jahren selten benutzt und auch seine Definition hat sich über die Jahrzehnte geändert. [JABLONSKA und LAMB, 2002] Riggs und Kollegen definierten die Epigenetik als mitotisch und/oder meiotisch vererbte, reversible Veränderungen der Genexpression und der DNA Struktur ohne die Veränderung der DNA Sequenz. [RUSSO et al, 1996]

Zu den epigenetischen Mechanismen gehören:

- die DNA Methylierung,
- die Modifikation der Histone (Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung, Ubiquitylierung und Phosphorylierung), und
- die RNA Interferenz. [LY et al, 2012]

Die DNA Methylierung gehört zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen. Sie ist an vielen wichtigen biologischen Vorgängen, wie der Kontrolle der Genexpression, der Chromatinstruktur, der Chromosomstabilität, der Inaktivierung des X-Chromosoms, der genomischen Prägung, sowie dem Schutz vor fremder DNA, beteiligt. [JURKOWSKA et al, 2011; LY et al, 2012] Zudem ist die DNA Methylierung essentiell für die Embryonalentwicklung und die Zelldifferenzierung. Eine Fehlfunktion kann zu Entwicklungsstörungen, zur Entstehung von Krankheiten und im schlimmsten Fall zum Tode der Zelle oder des Organismus führen. [HERMANN et al, 2004]

Die epigenetischen Modifikationen sind relativ stabil, können aber durch externe und/oder interne Faktoren beeinflusst werden. Zu den externen Faktoren zählen die Ernährung, das Rauchen und die körperliche Bewegung und zu den internen Faktoren der Alterungsprozess. [FRAGA et al, 2005]

Folate, Vitamin B₁₂, Betain, Cholin und Methionin können die DNA Methylierung sowie die Histonmethylierung durch die Regulation des C1-Stoffwechsels beeinflussen. [CHOI und FRISO, 2010]

Folate gehören zu den wasserlöslichen B Vitaminen, die in höheren Konzentrationen im grünen Gemüse, Spargel, Bohnen, Leber, Milch, Vollkornprodukten und Zitrusfrüchten vorkommen. [LY et al, 2012] Sie fungieren als Koenzyme bei der *de novo* Purin- und Pyrimidinbiosynthese und sind an der Methylierung von DNA und Histonen beteiligt. [CHOI und MASON, 2000]

Durch die Regulation der DNA Synthese, der Reparatur und der Methylierung sind die Folate für die Erhaltung der genomischen Stabilität notwendig. Bei einem Mangel an Nahrungsfolaten ist diese gestört und die DNA Reparatur gehemmt, was zu Strangbrüchen, Chromosomenschäden und maligner Entartung führen kann. [DUTHIE, 2011b]

Im ersten Teil dieser Arbeit wird vor allem die DNA Methylierung bei Säugetieren erläutert: die Struktur und die Funktion der DNA Methyltransferasen Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b, die Funktionsweise und die Bedeutung der DNA Methylierung, sowie die Krankheitsentstehung infolge gestörter DNA Methylierung.

Im zweiten Teil werden die Struktur, der Bedarf, der Stoffwechsel und die Funktion von Folaten beschrieben. Außerdem wird der Zusammenhang zwischen dem Folatmangel und der gestörten DNA Methylierung erörtert. Es soll anhand der neuesten Literatur die Rolle der Folate in der Karzinogenese und der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht werden.

2 DNA METHYLIERUNG

2.1 Einführung

Bereits 1948 hat Hotchkiss Methylierung in Kalbsthymus-DNA beschrieben. Seit dem wurde die DNA Methylierung in verschiedenen Organismen (Viren, Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren) nachgewiesen. [CHENG, 1995]

In Prokaryoten findet man zusätzlich zu der C5-Methylierung von Cytosin die Methylierung von N6-Adenin und N4-Cytosin. [HERMANN et al, 2004] Hier erfüllt die DNA Methylierung drei wichtige biologische Funktionen: Unterscheidung zwischen fremder (viraler) und zelleigener DNA, Kontrolle der DNA Replikation und des Zellzyklus und DNA Reparatur.

In Eukaryoten findet man ausschließlich Methylierung des Kohlenstoffatoms an der Position 5 von Cytosinen. 5-Methylcytosin (5mC) wird auch als die ‚fünfte Base‘ bei Säugetieren bezeichnet. Man findet es vor allem in 5'-CG-3' Nukleotidabfolgen und nur selten in nicht-CG Nukleotidabfolgen. [JELTSCH, 2002] Es existieren 56 Millionen CG Nukleotidabfolgen im menschlichen Genom, von denen 60-80% methyliert sind. Das entspricht 3-8% aller im Genom vorkommenden Cytosinen. Der Methylierungsgrad und die Methylierungsmustern sind vom Zelltyp abhängig. Die größten Abweichungen sind in embryonalen Stammzellen vorzufinden. [JURKOWSKA et al, 2011] Die Cytosin-Methylierung ist meist symmetrisch. Das bedeutet, dass die beiden DNA Stränge entweder ein unmethyliertes Cytosin oder ein 5mC enthalten. Damit ist eine korrekte Methylierung nach der DNA Replikation gesichert. [HAMID, 2012] Vor Kurzem wurde 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) in Säugetieren entdeckt. 5hmC entsteht durch die Oxidation der Methylgruppe des 5-Methylcytosins. [KRIAUCIONIS und HEINTZ, 2009]

Die CG Dinukleotide kommen zehnmal seltener als andere Dinukleotide im menschlichen Genom vor. Der Grund dafür liegt darin, dass die methylierten Cytosine viel leichter als unmethylierte zu Thymin deaminiert werden können. Die Folge ist eine TG Basenfehlpaarung (*mismatch*). [JURKOWSKA et al, 2011] Die Deaminierung des unmethylierten Cytosins zum Uracil wird seltener beobachtet. Die daraus

resultierenden UG *mismatches* werden durch Uracil-Glykosylase erkannt und repariert. Kommt es nicht zu einer Reparatur der TG Basenfehlpaarung, wird die Mutation bei der nächsten Teilung fixiert, indem die Guaninbase durch eine Adeninbase ausgetauscht wird (Abb. 1). Die Folge ist eine TA Punktmutation.



Abbildung 1: Deaminierung von 5-Methylcytosin [KUCH, 2008]

Es existieren auch Reparaturmechanismen, die diese Defekte erkennen und beheben können wie z. B. die Thymin-Glykosylase und das 5-Methylcytosin bindende Protein MBD4. Allerdings verläuft die Reparatur der TG Basenfehlpaarung nur sehr langsam. Folglich sind die CG Dinukleotide die Hotspots für Mutationen. Dadurch wurde die Anzahl der CG Dinukleotide im menschlichen Genom im Laufe der Evolution erheblich dezimiert. [HERMANN et al, 2004; JELTSCH, 2002]

Es gibt kleine Regionen des Genoms, die sogenannten CG Inseln, in denen der CG Gehalt nicht unterrepräsentiert ist. Die CG Inseln werden als DNA Regionen mit einer Länge von mindestens 550 bp und einer hohen CG Anzahl definiert. Sie kommen in 70% der Promotorregionen aller menschlichen Gene vor. Die CG Dinukleotide in den CG Inseln sind meistens unmethyliert, weshalb ihre Anzahl im Laufe der Evolution nicht vermindert wurde. [JELTSCH, 2002; JURKOWSKA et al, 2011]

In Eukaryoten spielt die DNA Methylierung bei der X-Chromosom Inaktivierung, der Genrepression, der genomischen Prägung (genomic imprinting), der Kontrolle der Transposons sowie der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle. Die Störungen des Methylierungsmusters sind mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie zum Beispiel mit psychischen Erkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems sowie Karzinomen, assoziiert. Methylierung von DNA ist essentiell für eine normale Entwicklung des menschlichen Embryos. [HERMANN et al, 2004]

Enzyme, die an der Methylierung beteiligt sind, werden DNA Methyltransferasen (Dnmt) genannt. Sie übertragen eine Methylgruppe auf das C5 Atom von Cytosinen. Der Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM oder AdoMet) fungiert als Methylgruppendonor (Abb. 2). [JURKOWSKA et al, 2011; MUELLER et al, 2010]

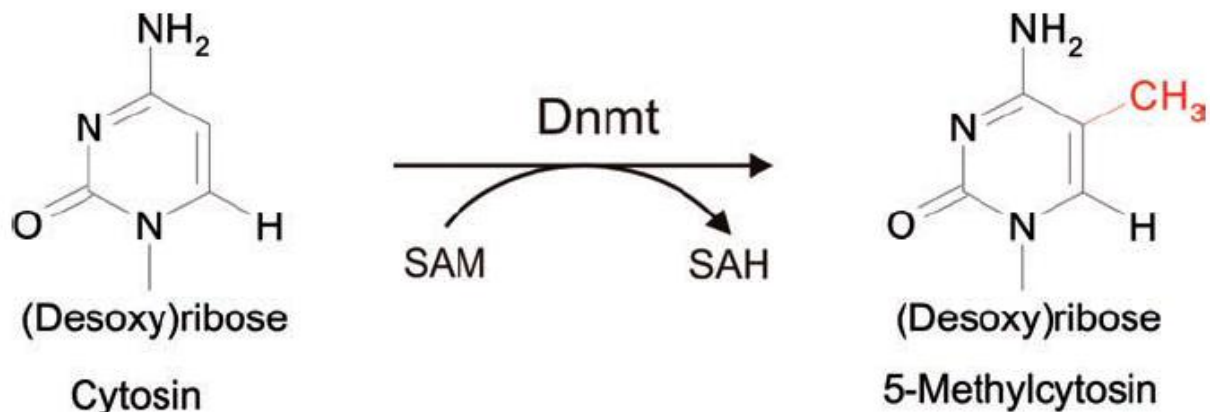


Abbildung 2: Methylierung von Cytosin. Die DNA-Methyltransferase (Dnmt) überträgt die Methylgruppe (rot) vom SAM (S-Adenosylmethionin) auf das Cytosin. SAH=S-Adenosylhomocystein. [MUELLER et al, 2010]

Es gibt zwei Arten der DNA Methylierung:

- die *de novo* und
- die maintenance DNA Methylierung.

Die ***de novo*** Methylierung (siehe Abbildung 3) ist charakteristisch für die Keimzellen und spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese. In diesem Fall werden die DNA Stränge methyliert, die wenig oder gar keine Methylierung aufzeigen. Es entsteht dabei ein neues Methylierungsmuster, das während des ganzen Lebens (mit wenigen gewebs-spezifischen Ausnahmen) erhalten wird.

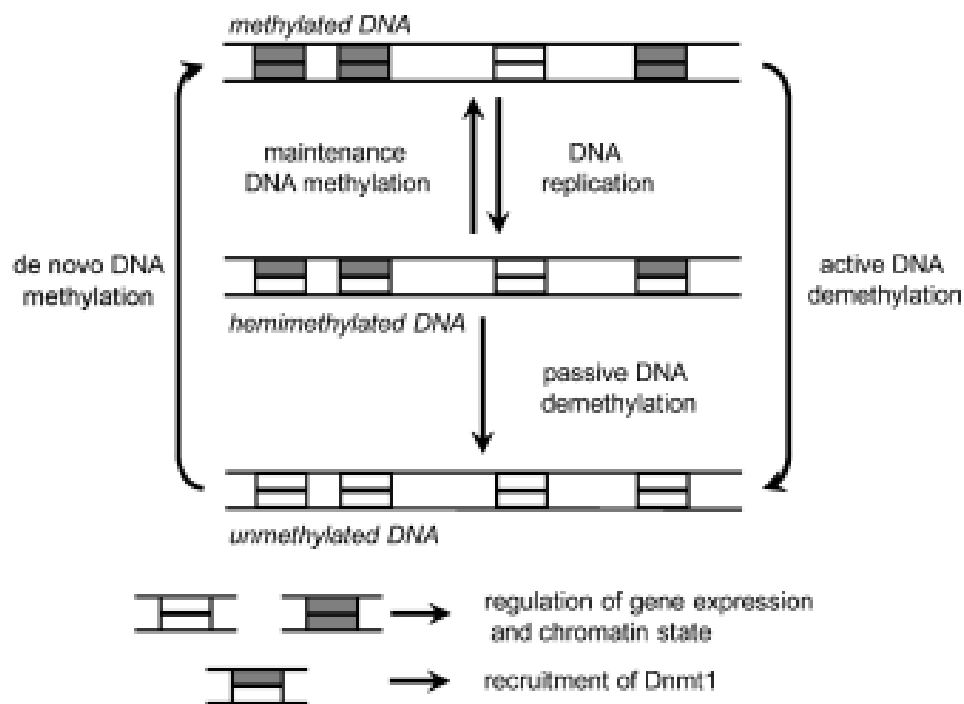


Abbildung 3: DNA Methylierung in Säugetieren. Unmethylierte CG Dinukleotide sind als weiße Kästchen und methylierte CG Dinukleotide als graue Kästchen dargestellt. [JURKOWSKA et al, 2011]

Nach jeder DNA Replikation entsteht hemimethylierte DNA, d.h. der neusynthetisierte Tochterstrang liegt unmethyliert vor. Der Tochterstrang wird von einer maintenance DNA Methyltransferase (Dnmt1) erkannt und methyliert. Diese Enzyme haben eine große Präferenz für hemimethylierte DNA. Die **maintenance** Methylierung ist zuständig für die Erhaltung des Methylierungsmusters nach der Replikation. [JURKOWSKA et al, 2011]

2.2 DNA Demethylierung

Das Methylierungsmuster in Säugetieren entsteht nicht nur durch DNA Methylierung sondern auch durch die DNA Demethylierung. 5-Methylcytosin wird dabei in Cytosin umgewandelt. Man unterscheidet zwischen passiver und aktiver Demethylierung (siehe Abbildung 4).

Ein Ausbleiben der Remethylierung des Cytosins nach der DNA Replikation wird als passive Demethylierung bezeichnet. In diesem Fall ist einer der Tochterstränge

unmethyliert und der Andere hemimethyliert. Die passive Demethylierung ist ein relativ langsamer Prozess. Um den Methylierungsgrad durch die passive Demethylierung um 5% zu reduzieren, werden fünf Replikationszyklen benötigt.

Aktive Demethylierung wird durch Enzyme ermöglicht. [JELTSCH, 2002] Bis jetzt wurden zwei aktive Mechanismen der DNA Demethylierung experimentell nachgewiesen. Die methylierte Base kann mit Hilfe von Deaminasen AID und APOBEC1 zu Thymin deaminiert werden. Das Thymin (T) wird anschließend von Glykosylase entfernt und durch Cytosin ersetzt.

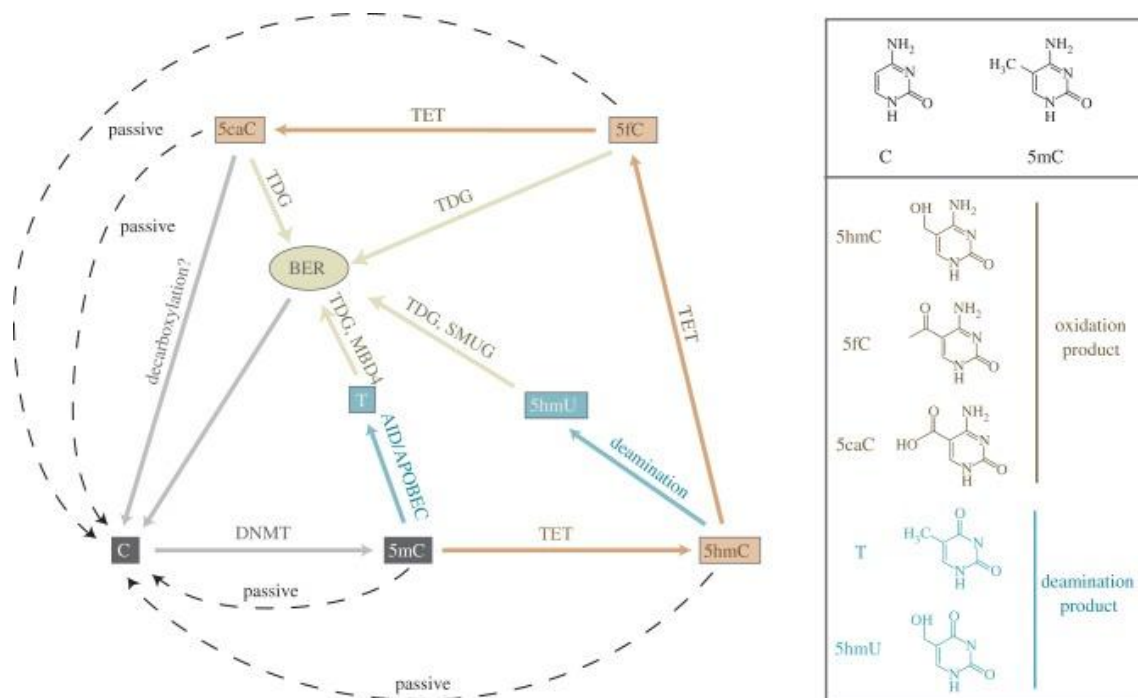


Abbildung 4: DNA Demethylierung.

Demethylierung von Cytosin erfolgt passiv (unterbrochene Linie) oder aktiv. 5mC kann mit Hilfe von AID/APOBEC Deaminasen (blau) zu Thymin (T) deaminiert oder durch TET Enzyme (braun) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) oxidiert werden. T, 5hmU (5-Hydroxymethyluracil), 5fC (5-Formylcytosin) und 5caC (5-Carboxylcytosin) können durch Glykosylasen (beige), wie z.B. TDG, SMUG1 (single strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1) und MBD4 (Methyl-CG-bindendes Protein 4), entfernt werden und vom DNA Reparatursystem (BER=base excision repair) durch Cytosin ersetzt. Zusätzlich können 5fC und 5caC passiv 'verloren' gehen. [SEISENBERGER et al, 2013]

Der zweite aktive Mechanismus benötigt TET (ten eleven translocation) Dioxygenasen. [SEISENBERGER et al, 2013] Bis jetzt wurden drei Enzyme der TET Familie, TET1, TET2 und TET3, beschrieben. Die TET Proteine können die 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5-Formylcytosin (5fC) und schließlich zu 5-Carboxylcytosin (5caC) oxidieren (siehe Abb. 4). Als Kofaktoren dienen 2-Oxoglutarat und Sauerstoff. 5hmC wird von Dnmt1 während der DNA Replikation nicht erkannt und kann somit zu einer passiven Demethylierung beitragen. [JURKOWSKI und JELTSCH, 2011b; WU und ZHANG, 2011] Zusätzlich kann 5hmC von TET Enzymen zu 5fC und 5caC oxidiert oder zu 5hmU (5-Hydroxymethyluracil) deaminiert werden. 5hmU, 5fC und 5caC können von Glykosylasen entfernt und mit Hilfe vom DNA Reparatursystem durch Cytosin ersetzt werden. [SEISENBERGER et al, 2013; WU und ZHANG, 2011]

Es wird vermutet, dass es auch möglich ist, die Methylgruppe direkt vom Methylcytosin zu entfernen. Die Schwierigkeit dabei ist, dass die C-C Bindung zwischen der Methylgruppe und der Desoxyribose des Cytosins energetisch schwer zu durchbrechen ist. [JELTSCH, 2002] Bislang konnte das Vorkommen von den DNA Demethylasen experimentell nicht nachwiesen werden. [SEISENBERGER et al, 2013]

Auf der Suche nach aktiven DNA Demethylasen fanden Chen et al. heraus, dass DNA Methyltransferasen, Dnmt1 und Dnmt3b, in vitro unter bestimmten Bedingungen (in Anwesenheit von Ca^{2+} Ionen und Abwesenheit von reduzierenden Reagenzien) auch als Demethylasen fungieren können. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Funktion und die Struktur der DnmTs überprüft werden sollten, insbesondere ihre Rolle in den Ca^{2+} abhängigen biologischen Prozessen wie Embryogenese, Zelldifferenzierung und Karzinogenese. Es sollte erwähnt werden, dass die Ca^{2+} Konzentrationen ($> 10\mu\text{M}$), die für die Demethylierungsreaktion erforderlich waren, viel höher sind als die Konzentrationen, die normalerweise in der Zelle vorzufinden sind ($\text{nM}-\mu\text{M}$). Deswegen nehmen die Wissenschaftler an, dass die Demethylierungsreaktion in vivo weitere Kofaktoren und/oder spezifische Signaltransduktionswege benötigt. [CHEN et al, 2013]

2.3 DNA Methyltransferasen

Die DNA Methylierung wird mit Hilfe von **DNA Methyltransferasen** (Dnmts) durchgeführt. Erste DNA Methyltransferase wurde von Gold und Hurwitz 1964 in *Escherichia coli* entdeckt. [JELTSCH, 2002]

Die DNA-Methyltransferasen werden in drei Familien aufgeteilt: Dnmt 1, Dnmt 2 und Dnmt 3.

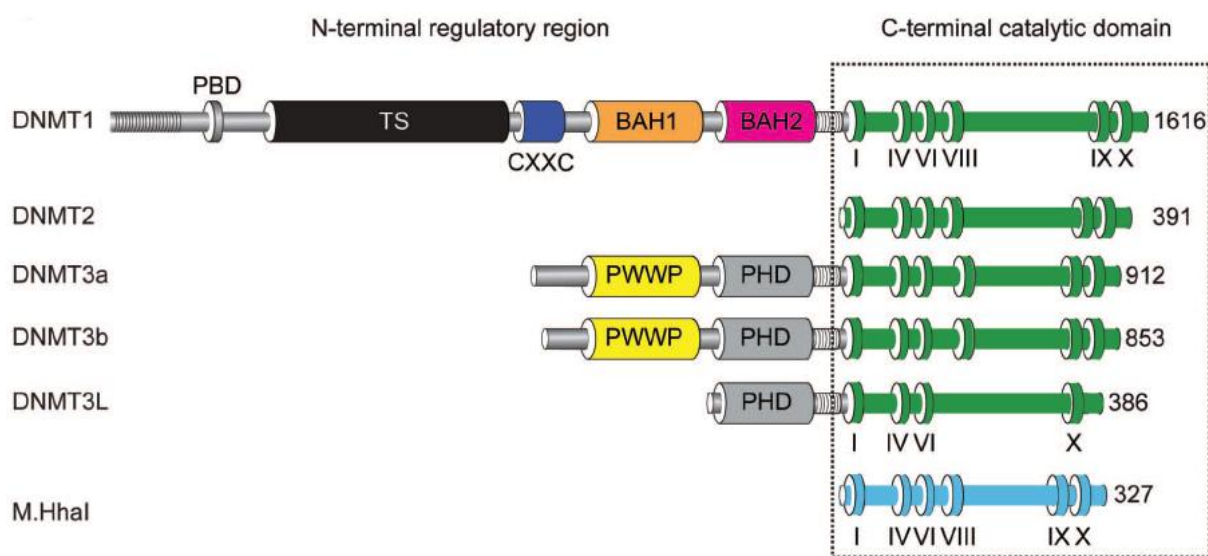


Abbildung 5: Schematische Darstellung eukaryotischer Dnmts und der prokaryotischen Dnmt, M. HhaI. PHD= *polybromo homology domain*, PBD= *proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bindende Domäne*, CXXC= Zink-Domäne, BAH1/2= *Bromo-adjacent homology 1/2*, TS= *targeting sequence* [QIN et al, 2011]

Zusätzlich zu Dnmts gibt es bei den Nicht-Säugetieren bestimmte Enzyme mit ähnlicher Funktion. In Pilzen findet man zusätzlich die Dim2-Enzyme (Methylierung von Cytosinen in asymmetrischer Anordnung) und in pflanzlichen Zellen die Chromomethylasen. [GOLL und BESTOR, 2005; JELTSCH, 2010]

Fast alle Organismen haben mindestens eine DNA Methyltransferase. Ausgenommen davon sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Oikopleura dioica* und *Caenorhabditis elegans*, die keine DNA-Methyltransferasen besitzen und bei denen bis jetzt keine DNA Methylierung nachgewiesen werden konnte. [BIRD, 2002; JURKOWSKI und JELTSCH, 2011a]

Kennzeichnend für alle eukaryotischen DNA Methyltransferasen ist ihre Struktur (Abb. 5). Sie bestehen aus einer katalytisch aktiven C-terminalen Domäne und einer größeren regulatorischen N-terminalen Domäne. Dnmt2 besitzt nur die C-Domäne. Der aminoterminal Teil ist für die Interaktion der Enzyme mit anderen Proteinen, DNA und Chromatin, sowie für die Lokalisierung der Enzyme im Zellkern zuständig.

Die C-terminale Domäne wird in zwei Domänen unterteilt. Die große Domäne inkludiert die Bindungsstelle für den Kofaktor S-Adenosylmethionin und das aktive Zentrum. Die kleine Domäne ist zuständig für die Erkennung spezifischer Zielsequenzen. [GOLL und BESTOR, 2005; HERMANN et al, 2004] Alle eukaryotischen C5 Methyltransferasen sind durch zehn hochkonservierte Aminosäuresequenz-Motive (I-X) gekennzeichnet, die als Marker bei der Identifizierung C5-DNA-Methyltransferasen dienen. Ihre Funktionen wurden noch nicht vollständig geklärt. Die Motive I und X (siehe Abb. 5) sind für die Bindung des Kofaktors SAM verantwortlich. Das Motiv IV enthält ein Prolin-Cystein Dipeptid, das ein Teil des aktiven Zentrums darstellt. Die nicht-konservierte Region zwischen Motiven VIII und IX, die sogenannte *target recognition domain* (TRD), ist an der Erkennung spezifischer DNA Sequenzen beteiligt. [CHENG, 1995; JELTSCH, 2002] Die Lage der hochkonservierten Motive der C-Domäne in eukaryotischen Dnmts ist in der Abbildung 5 zu sehen.

Eine weitere Gemeinsamkeit eukaryotischer DNA Methyltransferasen ist der *base flipping* Mechanismus. Dnmts lösen die Wasserstoffbrücken zwischen Cytosin und Guanin und drehen die Zielbase aus der Doppelhelix heraus.

Der Pyrimidinring der Cytosinbase wird an das reaktive Cystein im aktiven Zentrum der Transferase kovalent gebunden. Nach der Methylierung des Cytosins am C5 löst sich der Enzym-DNA-Komplex auf und der Kofaktor S-Adenosylhomocystein (SAH) wird freigegeben (siehe Abb. 2). [JELTSCH, 2002]

Dnmt1

Dnmt1 zeigt eine große Präferenz für hemimethylierte DNA (Abb. 6). Sie wird auch als *maintenance* Methyltransferase bezeichnet, da sie für die Erhaltung des Methylierungsmusters während der DNA Replikation verantwortlich ist. [GOYAL et al, 2006]

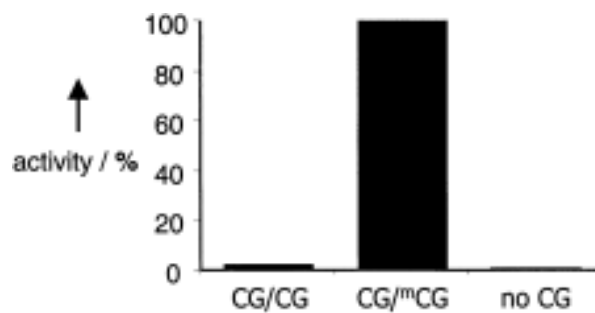


Abbildung 6: Dnmt1-Spezifität. Die katalytische Aktivität wird durch eine unmethylierte CG Sequenz, eine hemimethylierte CG-Sequenz oder ohne CG Sequenz ermittelt. [JELTSCH, 2002]

Mehrere Dnmt1 Isoformen wurden identifiziert. Abgesehen von Dnmt1, die in den meisten Körperzellen vorkommt, gibt es zwei gewebsspezifische Varianten, Dnmt1o (in Eizellen) und Dnmt1p (in Spermatozyten). Sie sind für den Erhalt elterlicher Prägungen während der ersten Teilung zuständig.

Die Dnmt1 Knock-out Mäuse sind nicht lebensfähig. Mutationen oder Verlust des Dnmt1- Gens führen zum Verlust der genomischen Prägung und Verlust der X-Chromosom Inaktivierung. Verlust der Dnmt1 Funktion steht außerdem mit Karzinogenese in direktem Zusammenhang. Mäuse mit Dnmt1 Mangel sind anfälliger für Tumore und zeigen erhöhte chromosomale Instabilität.

Struktur und Aufbau

Dnmt1 ist ein großes Enzym, bestehend aus 1620 Aminosäuren (Maus) bzw. 1616 Aminosäuren (Mensch). Die C- und die N-terminale Domäne sind durch eine Kette aus mehreren Glycin-Lysin Dipeptiden (*GK repeats*) miteinander verbunden (Abb. 7).

Der C-terminale Teil des Enzyms beinhaltet das aktive Zentrum des Enzyms, [JURKOWSKA et al, 2011] und steht unter allosterischer Kontrolle der N-terminalen Domäne des Enzyms. [FATEMI et al, 2001] Mehrere in vitro und in vivo Studien haben gezeigt, dass das Enzym ohne die N-Domäne keine Methylierungsaktivität aufweist. [FATEMI et al, 2001; MARGOT et al, 2003]

Die N-terminale Domäne des Enzyms besteht aus mehreren regulatorischen Domänen, die der Chromatinbindung, der Lokalisierung in Replikationsgabel, der Substraterkennung und dem Einschleusen in den Zellkern dienen. [MUELLER et al, 2010; SONG et al, 2012a]

Die Position der verschiedenen Domänen wurde in der Abbildung 5 veranschaulicht (beginnend vom N-Ende):

- Eine ladungsreiche oder DMAP1 (*DNA methyltransferase associated protein 1*) Interaktionsdomäne. Sie beteiligt sich an der Interaktion zwischen Dnmt1 und Dmap1, und ist für die Stabilität des Enzyms verantwortlich.
- Eine PBD Region (*proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bindende Domäne*) ist zuständig für die Lokalisation des Enzyms an der Replikationsgabel.
- Mindestens drei unabhängige NLS (*nuclear localisation signal*) Sequenzen.
- Eine TS (*targeting sequence*) Domäne ist für die Chromatinbindung zuständig.

- Eine CXXC Domäne (oder Zink-Domäne). Sie bindet an unmethylierte CG Sequenzen und ist notwendig für die katalytische Aktivität des Enzyms.
- Die BAH1 und BAH2 sind Bestandteile der PBHD Domäne (*polybromo homology domain*). Sie könnte an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein. [JURKOWSKA et al, 2011; SONG et al, 2012a]

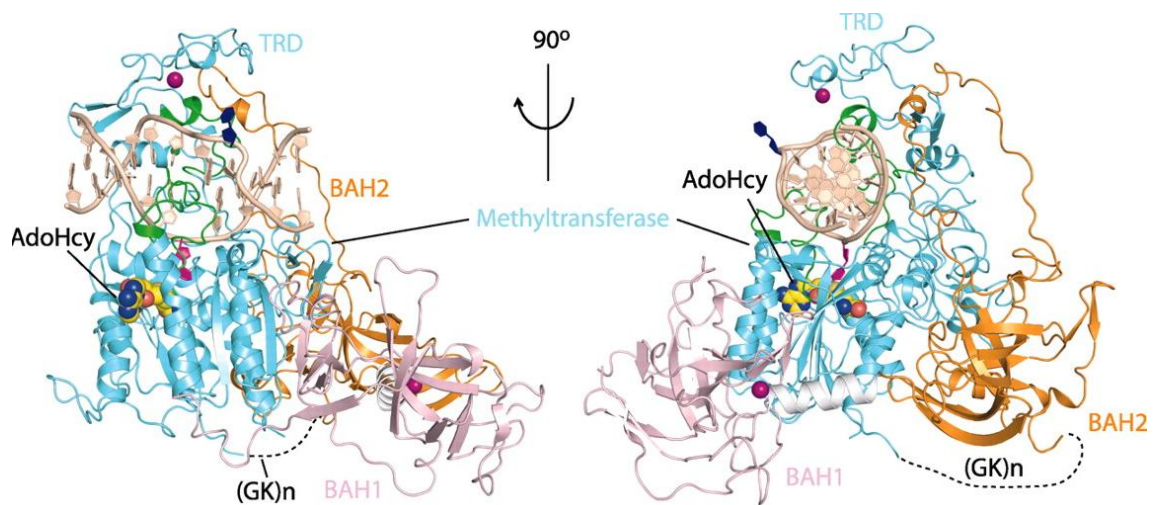


Abbildung 7: Struktur von Dnmt1. BAH= *Bromo-adjacent homology*, TRD= *target recognition domain*, AdoHcy= S-Adenosylhomocystein, (GK)n= Glycin-Lysin Dipeptid-Verbindung [SONG et al, 2012a]

Interaktionspartner von Dnmt1

Die N-terminale Domäne des Enzyms interagiert mit verschiedenen Proteinen, wie dem PCNA und den Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen und auch mit den *de novo* Methyltransferasen, Dnmt 3a und Dnmt 3b. Die Expression von Dnmt1 ist eng mit DNA Replikation verbunden. Das Enzym interagiert auch mit dem Retinoblastoma (Rb) Protein, einem Tumorsuppressorprotein. Es wurde gezeigt, dass Dnmt1 mit dem Transkriptionsrepressor DMAP1 und seinem Inhibitor RGS6 interagiert. Dnmt1 kann auch an den Transkriptionsfaktor E2F1

binden. Zusätzlich kann Dnmt1 mit den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC 2 und der Histonmethyltransferase Suv39H1 interagieren (siehe Kapitel Histonmodifikation). Letztendlich interagiert Dnmt1 mit den Methyl-CG-bindenden Proteinen (MBP2, MBP3 und MeCP2) und dem Heterochromatin-bindenden Protein HP1. Alle diese Interaktionen führen zur Unterdrückung der Transkription und der Stabilisierung der Chromatinstruktur. Die C-terminale Domäne interagiert nur mit dem Chaperone p23. [HERMANN et al, 2004; QIN et al, 2011]

Funktion

Wie schon erwähnt, besitzt Dnmt1 eine große Vorliebe für hemimethylierte DNA und dient der Erhaltung des Methylierungsmusters nach der DNA Replikation. Sie methyliert hemimethylierte DNA 15-30-mal stärker als unmethylierte Substrate. [GOLL und BESTOR, 2005; GOYAL et al, 2006]

Während der Interphase des Zellzyklus ist Dnmt1 diffus im Nukleoplasma verbreitet. In der S-Phase ist das Enzym in der Nähe der Replikationsgabel lokalisiert. Vermittelt wird diese Enzym-DNA Wechselwirkung durch die PBD Domäne, die TS Domäne sowie die PBHD Domäne. In der Replikationsgabel methyliert Dnmt1 die hemimethylierte CG Dinukleotide. [JURKOWSKA et al, 2011]

Die DNA Methyltransferase 1 wird außerdem für die *de novo* DNA Methylierung benötigt. Sie unterstützt die *de novo* Methyltransferasen, Dnmt 3a und Dnmt 3b, indem sie die neuen von Dnmt 3a/3b hemimethylierte CG Sequenzen methyliert. [FATEMI et al, 2002]

Einige Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass Dnmt1 eine verminderte Spezifität in der Gegenwart von methylierter DNA aufweist. Die *de novo* Methylierung der unmodifizierten DNA stieg an, während die Methylierung der hemimethylierten DNA leicht vermindert war. Die Bindung der methylierten DNA an die N-terminale Domäne des Enzyms steigert die *de novo* Methylierungsaktivität von Dnmt1. [FATEMI et al, 2001; GOYAL et al, 2006]

Zusätzlich zeigten mehrere Studien, dass die unmethylierte DNA das Enzym allosterisch inhibiert. Es wird vermutet, dass die Bindung der unmethylierten DNA an das N-Ende der Dnmt1 zur verminderten enzymatischen Aktivität führt. [FLYNN et al, 2003]

Dnmt2

Obwohl das Dnmt2 Protein eine hohe Konservierung sowohl in Pflanzen, Pilzen, wie auch in Tieren und Menschen (Abb. 8) aufweist, ist seine biologische Funktion nach wie vor ungeklärt. [MUELLER et al, 2010; SCHAEFER und LYKO, 2010]

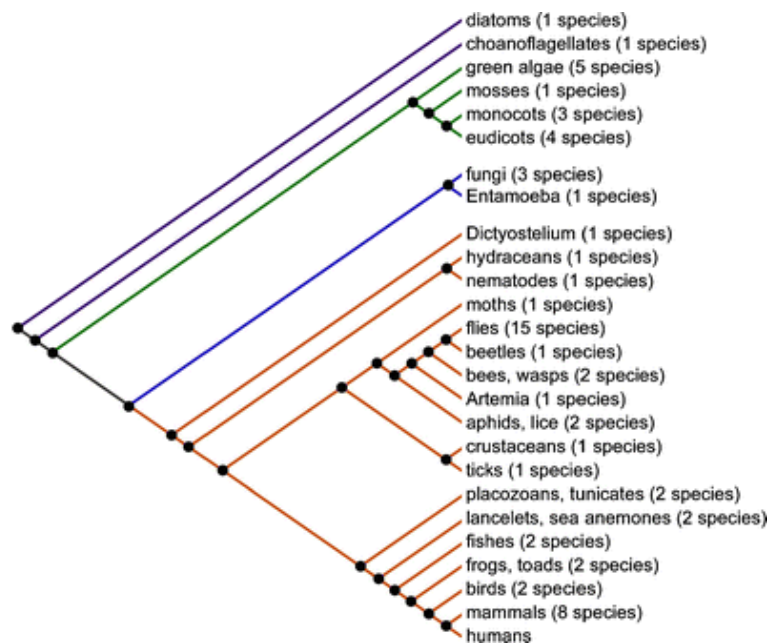


Abbildung 8: Evolutionäre Konservierung des Dnmt2 Proteins in Protisten, Pflanzen, Pilzen und Tieren [SCHAEFER und LYKO, 2010]

Das Dnmt2 Enzym ist relativ klein und besteht aus 391 Aminosäuren. Die Transferase enthält nur die C-terminale Domäne mit zehn konservierten Motiven. [JELTSCH, 2002] Der aminoterminal Teil fehlt. Die Struktur humaner Dnmt2 weist eine große Ähnlichkeit mit bakterieller Methyltransferase M.HhaI auf. Dnmt2 besteht aus einer kleinen Domäne, einer großen Domäne, mit dem aktiven

Zentrum und der SAM-Bindestelle, und einer *hinge*-Region (siehe Abb. 9). Die *target recognition domain* enthält ein CFT-Motiv, das sonst in keiner anderen DNA-Methyltransferase zu finden ist. [DONG et al, 2001; XU et al, 2010]

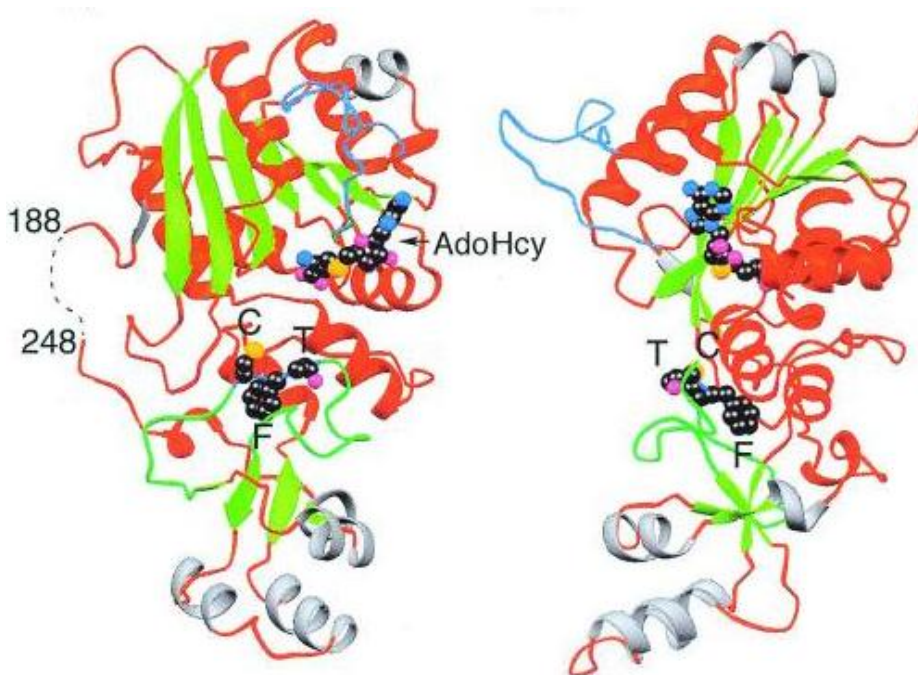


Abbildung 9: Kristallstruktur der Dnmt2. AdoHcy= S-Adenosylhomocystein, CFT-Motiv in der target recognition domain [DONG et al, 2001]

Dnmt2 ist vor allem in somatischen Zellen exprimiert. Das Expressionsmuster entspricht dem von Dnmt1. [DONG et al, 2001]

Die DNA Methyltransferasen sind überwiegend im Zellkern zu finden, während Dnmt2 im Zytoplasma und im Zellkern vorzufinden ist, wo sie mit der Kernmatrix in Verbindung steht. Die genaue Funktion dieser Verbindung ist unbekannt. [SCHAEFER und LYKO, 2010]

Funktion

Dnmt2 besitzt eine nur sehr schwache katalytische DNA Methylierungsaktivität. [DONG et al, 2001; GOLL und BESTOR, 2005] Allerdings konnten Goll und Kollegen in ihrer Studie die tRNA Methylierungsaktivität humaner Dnmt2 nachweisen (Abb. 10).

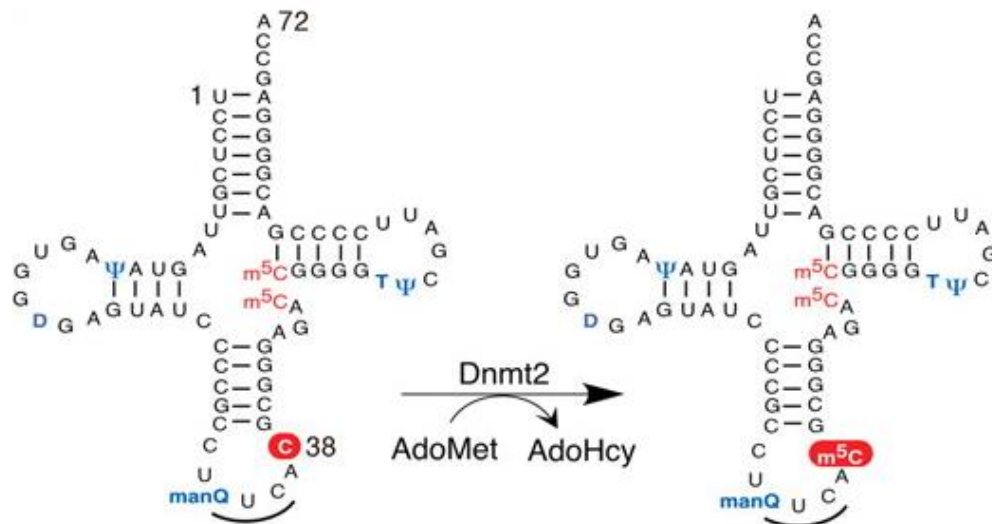


Abbildung 10: Methylierung der tRNA^{Asp} durch Dnmt2 [GOLL et al, 2006]

Das Enzym methyliert Cytosin 38 auf der Anticodonschleife der tRNA^{Asp}. [GOLL et al, 2006] Zur Methylierung der tRNA^{Asp} verwendet Dnmt2 den DNA-Methylierungsmechanismus. [JURKOWSKI et al, 2008] Schäfer und Kollegen fanden weitere tRNAs (tRNA^{Val} und tRNA^{Gly}), die von Dnmt2 methyliert werden. [SCHAEFER et al, 2010]

tRNA Methylierung spielt eine große Rolle für die Stabilität und die Faltung der Transfer-RNA. Eine Störung der Faltung oder der Stabilität könnte Einfluss auf Proteinsynthese haben, insbesondere unter Stressbedingungen. [SCHAEFER und LYKO, 2010]

In Anbetracht dieser Tatsachen stellt sich die Frage: ist Dnmt2 eine DNA Methyltransferase?

Das Enzym kommt in allen Tieren und Pflanzen vor, die auch DNA-Methyltransferasen 1 und 3 haben. Außerdem gibt es ein paar Organismen, die ausschließlich Dnmt2 besitzen (*Dnmt2-only organisms*). Einige davon sind *Drosophila melanogaster*, *Entamoeba* und *Dictyostelium*. Es wurde lange angenommen, dass sie keine methylierte DNA haben. Bei allen drei wurde mittlerweile eine geringe Menge an Methylcystein, vor allem in Retroelementen, nachgewiesen. [GOYAL et al, 2006; SCHAEFER und LYKO, 2010]

Die Struktur humaner Dnmt2 weist eine große Ähnlichkeit mit den eukaryotischen und den prokaryotischen DNA Methyltransferasen. Trotzdem zeigt Dnmt2 nur eine schwache DNA Methylierungsaktivität. Ihre biologische Funktion ist noch immer unbekannt und wird stark erforscht. [JURKOWSKI et al, 2008] Dnmt2 Knock-out Mäuse zeigten einen normalen Phänotyp. [OKANO et al, 1998] Die Arbeitsgruppe von Goll berichtete in ihrer Studie, dass Dnmt2 tRNA methylieren kann. Dnmt2 mutierte Mäuse und Pflanzen waren lebensfähig, fertil und ihr Methylierungsmuster war normal. [GOLL et al, 2006] Bis jetzt berichtete nur eine Studie von Dnmt2 mutierten Zebrafischen mit Differenzierungsstörungen in verschiedenen Organen. [RAI et al, 2007]

Die hohe Konservierung der Struktur, die starke phylogenetische Verbreitung und die Expression in allen somatischen Zellen sind ein Zeichen dafür, dass Dnmt2 eine Funktion hat, die aber für das Überleben der Zelle und des Organismus nicht notwendig ist. [GOLL und BESTOR, 2005]

Es besteht die Vermutung, dass Dnmt2 von den DNA Methyltransferasen abstammt und dass ein früheres Dnmt2 Enzym von der DNA auf die tRNA als Substrat gewechselt hat. [JURKOWSKI und JELTSCH, 2011a]

Dnmt3

Die Dnmt3 Methyltransferasen wurden erst 1998 entdeckt. [OKANO et al, 1998]
Dnmt3-Homologe findet man nur in Pflanzen und Tieren, in Pilzen fehlen sie.
[JURKOWSKI und JELTSCH, 2011a]

Die Dnmt3 Familie der DNA Methyltransferasen beinhaltet Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L (Abb. 11).

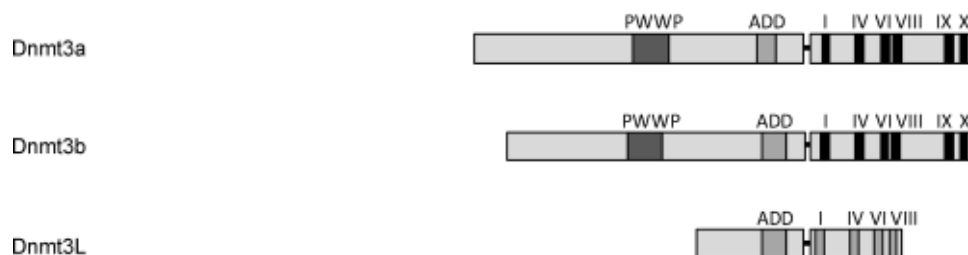


Abbildung 11: Schematische Darstellung von Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L [JURKOWSKA et al, 2011]

Dnmt3a und Dnmt3b

Dnmt3a und Dnmt3b sind aktive Methyltransferasen, die für die Etablierung von den DNA Methylierungsmustern während der Embryogenese und der Keimzellentwicklung verantwortlich sind. Sie werden als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet. Beide Enzyme zeigen gleiche Präferenz für die hemimethylierte sowie die nichtmethylierte DNA. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle für die Erhaltung von DNA Methylierungsmustern im Heterochromatin. [GOWHER und JELTSCH, 2001; OKANO et al, 1998]

Im Gegensatz zu Dnmt1 sind Dnmt 3a und 3b im embryonalen Gewebe überexprimiert. In somatischen Zellen sind beide Enzyme runterreguliert. [JURKOWSKA et al, 2011] Eine starke Expression von Dnmt3b zeigt sich in verschiedenen Tumoren, während Dnmt3a in Tumoren nur wenig erhöht ist.

Folglich spielt Dnmt3b eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. [HERMANN et al, 2004]

Dnmt 3a und Dnmt 3b haben mehrere Isoformen. Dnmt3a2 ist die verkürzte Version von Dnmt3a. Beide Formen zeigen ähnliche biologische Aktivität, haben aber unterschiedliche Expressionsmuster: Dnmt3a ist im adulten Gewebe zu finden. Ihre Isoform, Dnmt3a2, findet man in den embryonalen Stammzellen, den Keimzellen und den embryonalen Karzinomzellen.

Dnmt3b hat sechs Isoformen, die durch alternatives Splicing entstanden sind: Dnmt3b1, Dnmt3b2, Dnmt3b3, Dnmt3b4, Dnmt3b5 und Dnmt3b6. Nur Dnmt3b1 und Dnmt3b2 sind katalytisch aktiv. [OKANO et al, 1998; XU et al, 2011]

Aufbau

Dnmt3a und Dnmt 3b bestehen, wie Dnmt1, aus zwei Domänen: C-terminaler und N-terminaler Domäne. Die C-terminale Domäne enthält die sechs hochkonservierten Motive und ist katalytisch aktiv. Der N-terminale Teil enthält zwei Domänen, die in Dnmt1 nicht vorkommen: eine PWWP Domäne und eine Cystein-reiche Region, die PHD (plant homeodomain) Domäne (siehe Abb. 11).

Die PWWP Domäne besteht aus 100-150 Aminosäuren und ist reich an Prolin und Tryptophan. Sie ist zuständig für die Chromatinbindung. Der genaue Mechanismus ist noch unklar. Die PWWP Domäne von Dnmt3a kann die H3K36 Trimethylierung als eine Markierung erkennen. Diese Interaktion verstärkt die Methylierungsaktivität von Dnmt3a.

Die PHD Domäne ist eine Cystein-reiche Domäne. Sie bindet Zink-Ionen und vermittelt bei verschiedenen Protein-Protein Interaktionen, wie zum Beispiel zwischen Dnmt3a und den Transkriptionsfaktoren Myc, RP58, Histondeacetylase 1, Heterochromatin Protein 1 (HP1), Histonmethyltransferasen SUV39H1, EZH2 und Methyl CG bindendem Protein. [HERMANN et al, 2004; JURKOWSKA et al, 2011]

Funktion

Die Dnmt3 Methyltransferasen methylieren vor allem Cytosin in den CG-Dinukleotiden. In vivo und in vitro Studien zeigen aber, dass Dnmt3 auch asymmetrische nicht-CG-Nukleotidabfolgen methylieren können (CA>>CT>CC). [GOWHER und JELTSCH, 2001] Die biologische Funktion von nicht-CG-Sequenzen ist noch ungeklärt. [JURKOWSKA et al, 2011] Dnmt 3a zeigt eine starke Präferenz für Methylierung der CG-Sequenzen, die von Pyrimidinen eingegrenzt sind. [LIN et al, 2002]

Trotz der biologischen Gemeinsamkeiten haben die Dnmt3a und Dnmt3b Enzyme unterschiedliche biologische Funktionen. [GOWHER et al, 2005] Die Gene für Dnmt3a und Dnmt3b liegen auf Chromosom 2 bzw. 20. [XU et al, 2011] Dnmt3b ist verantwortlich für die Methylierung des perizentromeren Heterochromatins. Die Knock-out-Mäuse, denen das Enzym fehlt, sterben im Embryonalstadium.

Der Verlust der Dnmt3b Aktivität führt bei Menschen zum ICF Syndrom (Immunschwäche, Centromer-Instabilität, faciale Dysmorphien), das durch eine Immunschwäche, eine Zentromerinstabilität und eine Gesichtsfehlbildung gekennzeichnet ist. Typisch für diese Mutation ist die Hypomethylierung von perizentromeren Regionen auf Chromosomen 1, 9 und 16. Transgene Mäuse ohne Dnmt3a sterben kurz nach ihrer Geburt. Dieses Enzym ist notwendig für die Methylierung einzelner Gene und Retrotransposons sowie für die genomische Prägung in Keimzellen.

Beide Proteine sind lebensnotwendig und keiner von den beiden kann den anderen gänzlich ersetzen. [HATA et al, 2002; GOWHER et al, 2005; JELTSCH, 2002]

Dnmt3L

Dnmt3L (DNA Methyltransferase 3-like) zeigt eine hohe Homologie zu Dnmt 3a und 3b, hat aber keine DNA Methylierungsaktivität, da sie keine aktive katalytische Domäne besitzt. Die PWWP Domäne in der N-terminalen Domäne, sowie die Sequenzmotive IX und X in der C-terminalen Domäne fehlen. [HERMANN et al, 2004; JURKOWSKA et al, 2011]

Dnmt 3L hat eine regulierende Funktion in den Keimzellen und ist ein wichtiger Kofaktor von Dnmt 3a und Dnmt 3b. Zusammen bilden sie die Heterotetramere. [JURKOWSKA et al, 2011] Die Arbeitsgruppe von Gowher zeigte in ihrer Studie, dass Dnmt3L die katalytische Aktivität von Dnmt3a und Dnmt3b um das 15-fache steigern kann. Sie interagiert mit den katalytischen Domänen von Dnmt 3a/3b. Sie kann keine Bindung mit dem Kofaktor SAM eingehen und bindet auch an die DNA nur sehr schwach. [GOWHER et al, 2005]

Die Expression von Dnmt3L ist besonders hoch in den Keimzellen während der Gametogenese und in Embryos. Knock-out Mäuse, denen Dnmt3L fehlt, sind lebensfähig. Die Männchen ohne Dnmt3 sind steril, weil sie kein reifes Spermatozoon produzieren können. Die Weibchen sind fruchtbar, können aber kein lebensfähiges Nachkommen zur Welt bringen. Der Verlust von Dnmt3L führt zu einer Störung der genomischen Prägung.

Dnmt3L ist essentiell für die genomische Prägung in den Eizellen und für die Stilllegung der Transposons in den männlichen Keimzellen. [HATA et al, 2002]

3 HISTONMODIFIKATION

Das Nukleosom stellt die kleinste Einheit des Chromatins dar und besteht aus einem Histonproteinkern, der von der DNA umwunden ist.

Histone sind Proteine, die zum größten Teil (ca. 25%) aus den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin bestehen. Diese Aminosäuren sind positiv geladen und interagieren gut mit der umgebenden DNA, die durch ihre Phosphatgruppen stark negativ geladenen ist.

Die Histone werden in fünf Haupttypen eingeteilt: Histon H1, Histon H2A, Histon H2B, Histon H3 und Histon H4. Der Histonkern ist ein Oktamer, das aus jeweils zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonproteinen besteht. (Abb. 12). Die DNA ist 1,67-mal um den Histonkern gewunden, das entspricht einer DNA-Länge von etwa 147 Basenpaaren. [KOUZARIDES und BERGER, 2007; LUGER et al, 1997]

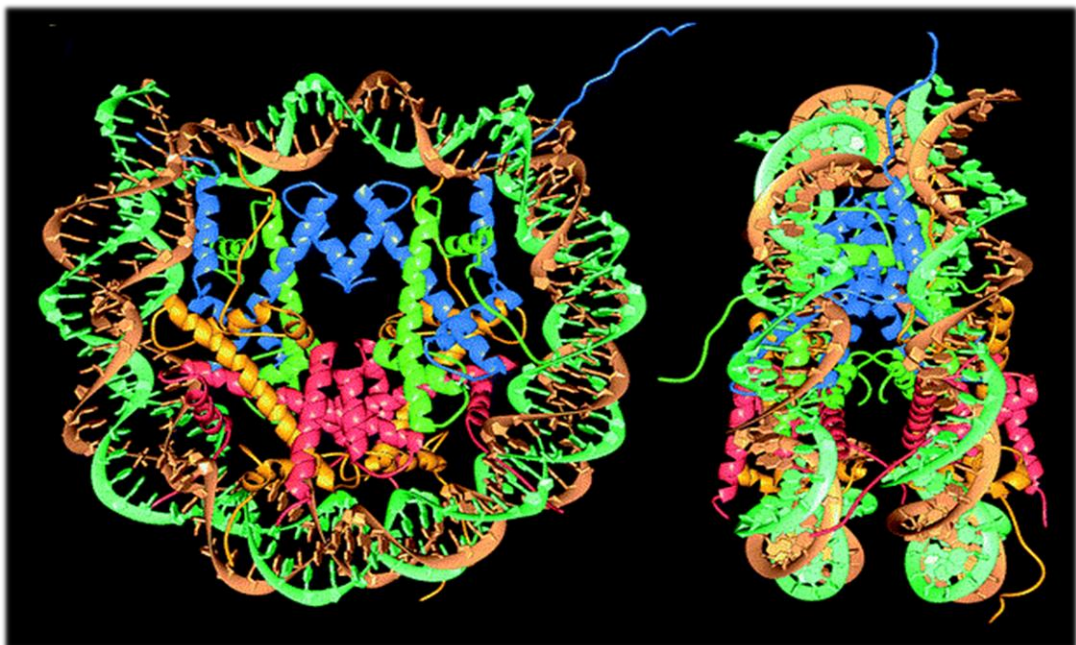


Abbildung 12: Aufbau des Nukleosoms. Histonproteine (blau:H3; grün:H4; orange:H2A; rot: H2B), DNA (braun und hellgrün) [LUGER et al, 1997]

Die benachbarten Histonkerne werden durch sogenannte *linker*-DNA (Verbindungs-DNA) miteinander verbunden. Das Histon H1 ist kein Bestandteil des Histonkerns, sondern ist zur Stabilisierung der 30nm Chromatin-Fiber zuständig. [KOUZARIDES und BERGER, 2007]

Die Histonproteine bestehen aus einem globulären Teil und einer N-terminalen Seitenkette, an denen die posttranslationalen Histonmodifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung, Ubiquitinylierung und Phosphorylierung von Aminosäuren stattfinden. Die epigenetischen Modifikationen können repressiv oder aktivierend auf die Genexpression wirken, abhängig von der Position der modifizierten Aminosäure und der Art der Modifikation (Tabelle 1).

Modifikation		Effekte
Acetylierung	H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8, K12, K16)	Aktivierung
Phosphorylierung	H3 (S10, S28)	Aktivierung
Methylierung	H3 (K4, K36, K79) H3 (K9, K27) H4 (K20)	Aktivierung Repression
Ubiquitierung	H2B (K123) H2A (K119)	Aktivierung Repression
Sumoylierung		Repression

Tabelle 1: Die epigenetischen Histonmodifikationen und ihre Auswirkungen auf die Genexpression. H=Histon, K=Lysin, S=Serin [KOUZARIDES und BERGER, 2007]

3.1 Acetylierung

Die Histonacetyltransferasen (HATs) sind Enzyme, die eine Acetylgruppe auf die Lysine der Histone übertragen. Die Folge ist eine Reduktion der Wechselwirkung zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA durch den Verlust der positiven Ladung der Aminogruppe. Die Chromatinstruktur wird dadurch aufgelockert und die Gene können transkribiert werden.

Die Histondeacetylasen (HDACs) können die Acetylgruppe von den Lysinresten wieder abspalten, was zu einer stärkeren Anlagerung der Nukleinsäure an die Histone und zu einer Unterdrückung der Transkription führt. Man unterscheidet zwischen vier verschiedenen Klassen von HDACs. Eine fehlerhafte oder gestörte Deacetylierung der Lysine kann zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Die HDAC-Inhibitoren werden in der Behandlung von Krebs angewendet.

3.2 Phosphorylierung

Die Histone können mittels Kinasen phosphoryliert werden (vor allem Serin und Threonin im Histon H3). Die Histonphosphorylierung führt zu einer Reduktion der Wechselwirkung von Histonen mit negativ geladener DNA durch zusätzliche negative Ladung an Histonen und dadurch zur Auflockerung der Chromatinstruktur. Die Phosphorylierung des Serinrests im Histon 3 (H3S10ph) ist zellzyklusabhängig und korreliert mit transkriptioneller Aktivierung während der Interphase. Die H3S10ph findet man am Großteil der Histon H3 Moleküle während der Mitose und der Meiose. [STRAHL und ALLIS, 2000]

3.3 Methylierung

Die Methylierung von Histonen erfolgt mittels des Enzyms Histonmethyltransferase (HMT). Lysin kann mono-, di-, oder trimethyliert werden, während Arginin mono- und dimethyliert werden kann. Je nach Position der epigenetischen Modifikation und nach der Zahl der Methylgruppen kann die

Methylierung zur Aktivierung oder zur Stilllegung des Gens führen (Tabelle 1). Bei dem Dimethyllysine 4 im Histon 3 (H3K4me₂) handelt es sich um ein globales Merkmal des euchromatischen Chromatins, während die Trimethylierung des Lysins 9 mit der aktiven Transkription korreliert. Das Methyllysine 9 im Histon 3 (H3K9me) ist typisch für das Heterochromatin. H3K27 Methylierung findet man im perizentrischen Heterochromatin sowie im Barr-Körperchen.

Die Argininmethylierung erfolgt durch die Protein-Arginin-Methyltransferase (z. Bsp. PRMT1 aktiviert die Transkription durch Methylierung von H4R3). Die Methylierung von Lysin ist relativ stabil und kann durch das Enzym Histondemethylase entfernt werden. [KOUZARIDES und BERGER, 2007; MARTIN und ZHANG, 2005] Demethylierung des methylierten Arginins erfolgt durch die Dioxygenase JMJD6 [CHANG et al, 2007] oder die Umwandlung des Methylarginins über das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) zu dem Citrullin. Die Umwandlung zum Citrullin ist keine Demethylierungsreaktion im eigentlichen Sinne, da statt Arginin Citrullin entsteht. Diese Reaktion wird als Demethyliminierung bezeichnet. Durch sie werden die Methylierung und die Transkription gehemmt, da das produzierte Citrullin kein Substrat für die Methylasen ist. [GYÖRGY et al, 2006]

3.4 Ubiquitynylierung

Die Ubiquitynylierung wirkt repressiv oder aktivierend abhängig von der modifizierten Aminosäure (Beispiele: H2AK119ub1 Repression; H2BK123ub1 H3K4me Aktivierung der Transkription). [KOUZARIDES und BERGER, 2007]

3.5 Histon-Code

Die Acetylierung, die Phosphorylierung, die Methylierung, die Ubiquitynylierung und die Sumoylierung der Histonketten bilden ein spezifisches Muster, den Histon-Code (Abb. 13), welcher die Genexpression reguliert. So ist beispielsweise

die Transkription eines Gens aktiviert, wenn am Promotor Lysin 9 und 14 im Histon 3 acetyliert bzw. Serin 10 im Histon 3 phosphoryliert und Lysin 4 methyliert werden. [JENUWEIN und ALLIS, 2001]

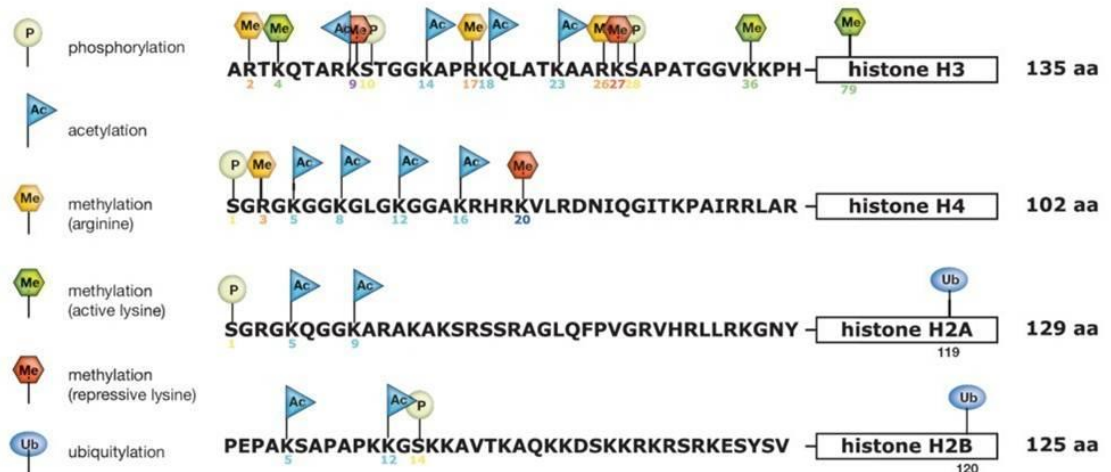


Abbildung 13: Der Histoncode. [KOUZARIDES und BERGER, 2007]

3.6 Der Zusammenhang zwischen der Histonmodifikation und der DNA Methylierung

Die Methyltransferasen können die Histonmodifikationen mit Hilfe ihrer N-terminalen Domänen lesen. Die Histonmodifikationen können als eine Anleitung zur *de novo* Methylierung während der Frühentwicklung fungieren. Vor Implantation liegen die meisten CG-Dinukleotide im embryonalen Genom unmethyliert vor, während manche H3K4 bereits methyliert sind. Zum Zeitpunkt der Implantation werden Dnmt3a und Dnmt3b exprimiert. Die DNA Methylierung wird durch Dnmt3L erleichtert, welches an Lysin 4 auf Histon 3 anbindet. Ist dieses methyliert, kann der Enzymkomplex Dnmt3/Dnmt3L nicht anbinden und die betroffene Region ist von der *de novo* Methylierung geschützt. [CEDAR und BERGMAN, 2009] Die PHD Domäne von Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L interagieren speziell mit den N-terminalen Enden von den H3 Histonseitenketten

mit dem unveränderten Lysin 4. Die PWWP Domäne von Dnmt3a kann die H3K36 Trimethylierung als eine Markierung erkennen. Diese Interaktion verstärkt die Methylierungsaktivität von Dnmt3a. [JURKOWSKA et al, 2011]

Es gibt auch Hinweise, dass die DNA Methylierung für die Erhaltung von Histonmodifikationen nach der Zellteilung wichtig ist. Eine große Rolle spielen dabei die Methylcytosin-bindenden Proteine, wie MECP2 und MBD2. Sie können die Histondeacetylasen zu den methylierten Sequenzen führen. Außerdem können die DNA Methyltransferasen selbst mit den Histonmethyltransferasen interagieren, und somit zu einer Histonmethylierung (vor allem H3K9) und zu einer Unterdrückung der Transkription beitragen. Es gibt auch Beweise, dass die DNA Methylierung die Methylierung von H3K4, einem Kennzeichen von Euchromatin, hemmt. [CEDAR und BERGMAN, 2009; FUKS et al, 2003 b] Die DNA Methylierung und die Histonmodifikationen interagieren miteinander und bestimmen den aktiven oder inaktiven Status eines Gens. [HERMANN et al, 2004]

4 FUNKTION DER DNA METHYLIERUNG

Die DNA Methylierung ist essentiell für die embryonale Zellentwicklung und die Zelldifferenzierung. Eine Fehlfunktion kann zu Entwicklungsstörungen, Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Rett-Syndrom, ICF- und Fragilem-X-Syndrom und im schlimmsten Fall zum Tode der Zelle oder des Organismus führen. [HERMANN et al, 2004]

Die Methylierung verändert die Interaktion zwischen den Proteinen und der DNA, was zu einer Veränderung der Chromatinstruktur und zu einer Zunahme oder einer Abnahme der Transkriptionsrate führt. [JONES und TAKAI, 2001]

Die Methylierung der DNA in den Eukaryoten hat mehrere wichtige Aufgaben in der Zelle:

- die Unterdrückung der Genexpression,
- die Regulation der zellulären Differenzierung und der Entwicklung,
- die X-Chromosom Inaktivierung,
- die genomische Prägung und
- die Abschaltung von Transposons. [BESTOR, 2000; HERMANN et al, 2004]

In den folgenden Kapiteln wird nun näher auf die einzelnen Funktionen der DNA Methylierung eingegangen.

4.1 Kontrolle der Genexpression

Die Methylierung vom Cytosin ist mit der Hemmung der Genexpression und dem Erhalt genomischer Stabilität assoziiert. Die durch Promotormethylierung hergestellte Stilllegung eines Gens ist stabil und vererbbar. [HERMANN et al, 2004]

Die genomweiten Studien haben gezeigt, dass der eigentliche Transkriptionseffekt einer Promotormethylierung im Zusammenhang mit der CG-Dichte steht. Zum Beispiel, die Promotoren mit einer geringen CG-Dichte sind meistens methyliert ungeachtet ihres Expressionsstatus. Die Methylierung von den Promotoren mittlerer und hoher CG-Dichte korreliert mit der Repression. Die Promotoren hoher CG-Dichte sind normalerweise hypomethyliert. Ihre Methylierung ist sehr stark mit Genstilllegung assoziiert, obwohl sie selten während der Entwicklung methyliert werden, außer der geprägten Gene und des inaktiven X-Chromosoms. [HACKETT und SURANI, 2013; MEISSNER et al, 2008]

Es gibt mehrere Mechanismen zur Transkriptionsunterdrückung durch die DNA Methylierung:

- I. Die Promotormethylierung blockiert die Anbindung von Transkriptionsfaktoren wie E2F an den Promotor (Abb. 14a). Dadurch kann die DNA Methylierung die Transkription direkt hemmen. [BIRD, 2002; KLOSE und BIRD, 2006]
- II. Methyl-CG-bindende Proteine (MBP) erkennen methylierte DNA Sequenzen und rekrutieren Co-Repressoren, die die Expression von Genen unterdrücken (Abb. 14b). Die Co-Repressoren können die Histonmethyltransferasen oder die Histondeacetylasen sein, die durch Histonmodifikationen zur Verdichtung des Chromatins beitragen. [FUKS et al, 2003 a]
- III. Die DNA Methyltransferasen interagieren selbst mit den Histondeacetylasen (HDAC) und den Histonmethyltransferasen (HMT)

(Abb. 14c), was zu einer Histonmodifikationen und einer Unterdrückung der Transkription führt. [FUKS et al, 2003 b]

- IV. Die DNA Methylierung innerhalb des Gens (Abb. 14d) kann auch den dämpfenden Effekt auf die Genexpression haben. Es gibt Hinweise, dass die Methylierung innerhalb des Gens die Funktion von der RNA Polymerase II stört. [KLOSE und BIRD, 2006] die intragenetische DNA Methylierung kann möglicherweise auch die störende Transkriptionsaktivierung kryptischer Promotoren verhindern. [SUZUKI und BIRD, 2008]

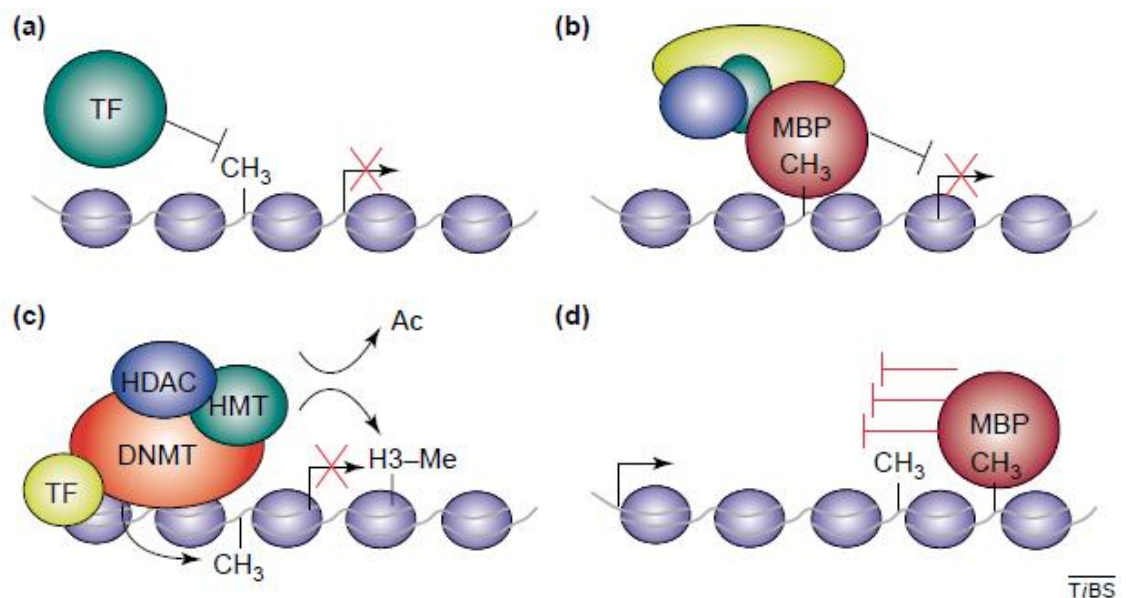


Abbildung 14: Die Auswirkung der Methylierung von Genpromotoren. (a) direkte Hemmung der Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung; (b) Unterdrückung der Transkription durch MBP; (c) Aktivierung von HMT und HDAC; (d) Hemmung von RNA Polymerase II durch die Methylierung innerhalb von Genen [KLOSE und BIRD, 2006]

Methyl-CG-bindende Proteine (MBP)

Man unterscheidet sechs verschiedene Methyl-CG-bindende Proteine: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2 und Kaiso. MBPs sind durch eine Methyl-bindende Domäne (MBD) gekennzeichnet, die für die Bindung an Methyl-CG-Sequenzen verantwortlich ist. Abgesehen von MBD3, erkennen alle MBPs die methylierte DNA.

Alle MBPs können an der Unterdrückung der Genexpression mitwirken. Das erreichen sie, indem sie die Chromatin-Co-Repressoren, wie die Histondeacetylasen und die Histonmethyltransferasen, zu den methylierten Sequenzen führen. MBD4 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der DNA Reparatur. Kaiso hat keine Methyl-bindende Domäne, es erkennt die Methyl-DNA mit Hilfe einer Zink-Domäne. [FUKS et al, 2003 a; KLOSE und BIRD, 2006]

4.2 Genomische Prägung

Diploide Organismen haben von jedem Gen zwei Kopien, eine von jedem Elternteil. In den meisten Fällen werden die zwei Kopien gleichermaßen entweder stillgelegt oder transkribiert. Davon ausgenommen sind die geprägten Gene. [BARROS und OFFENBACHER, 2009]

Die genomische Prägung ist als die epigenetische Modifikation bestimmter parenteralen Chromosomen in der Keimzelle definiert, die zu unterschiedlicher Expression mütterlicher (maternaler) oder väterlicher (paternaler) Allele in den somatischen Zellen führt. Die unterschiedliche Expression kann in allen Zellen oder aber im bestimmten Gewebe oder Entwicklungsstadium vorkommen. Bei Säugetieren gibt es etwa 100 Gene, die eine Prägung tragen. [ROBERTSON, 2005] Die ersten geprägten Gene wurden erst 1991 entdeckt. Das waren maternal geprägte Gene, *Igf2r* (*insulin-like growth factor-2 receptor*) und *H19*, und *Igf2* (*insulin-like growth factor-2*), wobei *Igf2* nur dann aktiv ist, wenn vom Vater vererbt. [BARROS und OFFENBACHER, 2009] Die geprägten Gene spielen wichtige Rollen bei der Wachstumskontrolle. [SEISENBERGER et al, 2013]

Die allel-spezifische DNA Methylierung ist das Kennzeichen geprägter Regionen und ist meistens in den sogenannten *differentially methylated regions* (DMRs) lokalisiert. Die DMRs beinhalten *imprinting control regions* (ICRs), die Genexpression innerhalb geprägter Domänen, oft über große Distanzen, regulieren. [ROBERTSON, 2005]

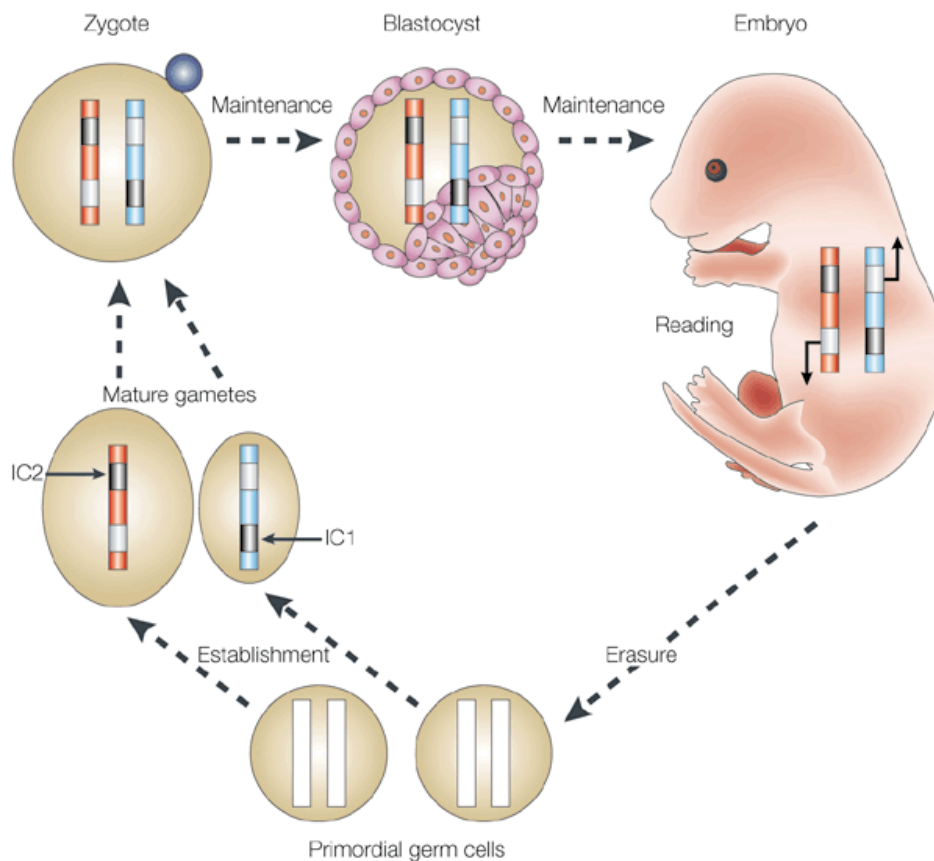


Abbildung 15: Lebenszyklus genomischer Prägungen. Löschung, Etablierung und Erhaltung geprägter Bereiche während der Gametogenese und der Embryogenese. IC1 und IC2 stellen die Beispiele dar. Die graue Verfärbung bedeutet Genmodifikation und die weiße Färbung keine Modifikation. Weiblich (rot), männlich (blau). [REIK und WALTER, 2001]

Während der Gametogenese kommt es zu einer Demethylierung des Genoms inklusive der geprägten Regionen (siehe Abb. 15). Es ist besonders wichtig, dass die parenteralen Prägungen in den Urkeimzellen ‚gelöscht‘ werden, um sie dem Geschlecht entsprechend später neu aufzusetzen. Im weiteren Verlauf der Keimzellentwicklung werden neue Methylierungsmuster mit neuen genomischen Prägungen etabliert. Nach der Befruchtung, während der zweiten Demethylierung, bleiben die Prägungen in somatischen Zellen erhalten. [HERMANN et al, 2004; JELTSCH, 2002; REIK und WALTER, 2001]

Wie wichtig die genomische Prägung für die Entwicklung von Säugetieren ist, zeigt folgendes Experiment mit Mauszellen: Aus zwei befruchteten Eizellen wurden männliche und weibliche Vorkerne ausgetauscht, um danach zwei neue Zygoten zu erstellen, eine nur mit väterlichen Genen und die andere nur mit mütterlichen Genen. In beiden Fällen starben die Embryos kurz vor oder nach der Implantation. Der Grund dafür war die fehlende Prägung. Die Zellen mit zwei mütterlichen Genomen bilden das Gewebe der inneren Zellmasse, aus der sich der eigentliche Embryo entwickelt. Aus den Zellen mit zwei paternalen Genomen entsteht die Plazenta. [SCHOELER, 2003]

4.3 Embryogenese

Im Leben von Säugetieren kommt es zweimal zu Reprogrammierung des Genoms, bei der die Methylierungsmuster zuerst gelöscht und anschließend neu erstellt zu werden: in der Frühphase der Embryogenese und während der Keimzellentwicklung. [HERMANN et al, 2004]

Vor der Befruchtung ist die DNA in Spermien und Eizellen methyliert (Abb. 16). Nach der Befruchtung, noch vor der ersten Teilung, kommt es zur ersten Demethylierung des Genoms. [JELTSCH, 2002] Dieser Prozess ist wichtig, um existierende epigenetische Informationen zu löschen und das System für einen neuen Entwicklungszyklus neu zu starten. [HERMANN et al, 2004] Das paternale und maternale Genom werden durch unterschiedliche Mechanismen

demethyliert. Dieser Unterschied hängt möglicherweise damit zusammen, dass die meisten geprägten Gene mütterlicher Abstammung sind und während der Demethylierung erhalten werden sollen. [HACKETT und SURANI, 2013] Die Spermien haben statt den Histonproteinen die Protamine, die nach Befruchtung durch acetylierte Histone ersetzt werden. Die paternale Methylcytosine werden rasch und aktiv [HERMANN et al, 2004] mit Hilfe vom TET3 Enzym zu 5hmC, 5fC und 5caC demethyliert, die dann mittels passiver Demethylierung entfernt werden. [HACKETT und SURANI, 2013] Die maternale DNA wird ebenso demethyliert, allerdings langsam durch die passive Demethylierung. Dnmt1 ist während den ersten Zellteilungen im Zytoplasma und kann die neusynthetisierte, hemimethylierte DNA nicht methylieren.

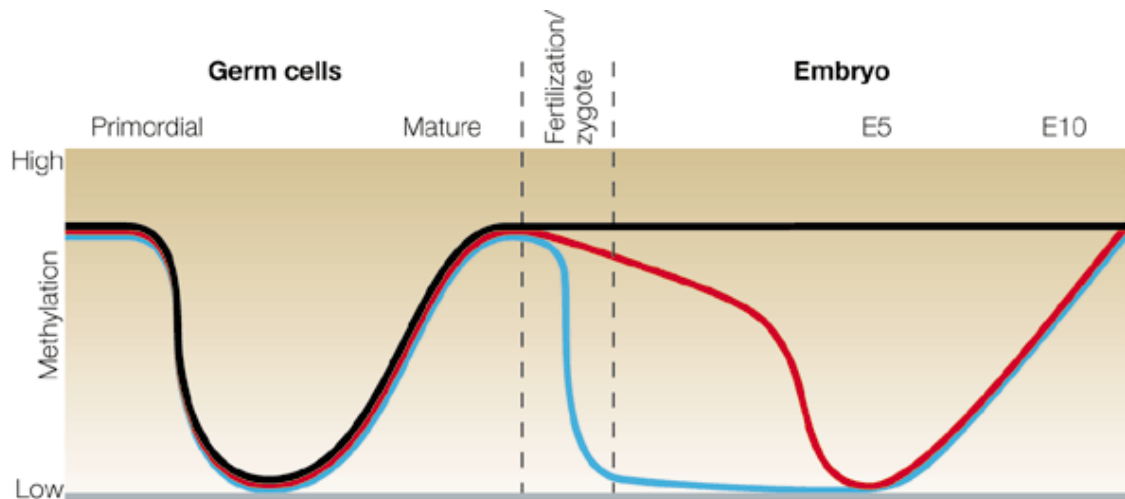


Abbildung 16: Reprogrammierung der DNA Methylierung in den Keimzellen und im Embryo. Die Abbildung zeigt den Grad der Methylierung in methylierten (schwarz) und nicht-methylierten (grau) geprägten Genen und nicht-geprägten Sequenzen (blau: paternal, rot: maternal) während der Keimzellentwicklung und der frühen Embryogenese. (E= Tag der embryonalen Entwicklung) [REIK und WALTER, 2001]

Trotz der fast kompletten Demethylierung des Genoms bleiben geprägte Gene, sowie Transposons während dieser Phase methyliert. [HERMANN et al, 2004; JURKOWSKA et al, 2011] Das erfordert die Anwesenheit von Dnmt1o, einer

Isoform der Dnmt1. Etwa zum Zeitpunkt der Nidation kommt es zur Etablierung neuer Methylierungsmuster mit Hilfe von Dnmt3a und Dnmt3b. [JELTSCH, 2002] Die CG Inseln bleiben von der Methylierung verschont. Sie beinhalten Transkriptionsstartpunkte, die durch H3K4me3 und viele Transkriptionsbindungsstellen gekennzeichnet sind. [CEDAR und BERGMAN, 2012] (Anmerkung: Die Trimethylierung des Lysins 4 auf Histon 3 korreliert mit aktiver Transkription.)

Die zweite Demethylierung des Genoms erfolgt ab dem E8.5 in Urkeimzellen (siehe Abb. 16) und ist am 12.-13. Tag der embryonalen Entwicklung abgeschlossen. Die Urkeimzellen sind die Vorläuferzellen der Spermien und der Eizellen. Es ist nicht bekannt, ob die Demethylierung aktiv oder passiv abläuft. In den Urkeimzellen des neuen Organismus werden die Prägungen ‚gelöscht‘, um sie dem Geschlecht entsprechend später neu aufzusetzen. Zusätzlich werden die meisten repetitiven Sequenzen ebenso gelöscht. Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L sind essentiell für die Etablierung neuer Prägungen. Nach der Demethylierung (E14-16) beginnt die *de novo* Methylierung in den männlichen Urkeimzellen [HACKETT und SURANI, 2013; REIK und WALTER, 2001] und dauert bis zum Prospermatogonien-Stadium an. In weiblichen Keimzellen findet die *de novo* Methylierung nach der Geburt in der Eizelle statt. [SEISENBERGER et al, 2013]

4.4 Inaktivierung des X-Chromosoms

Es ist wichtig zu erwähnen, dass kurz nach der Einnistung des weiblichen Embryos in der Uteruswand die Inaktivierung eines X-Chromosoms stattfindet. [CEDAR und BERGMAN, 2012] Die weiblichen Säugetiere besitzen zwei X-Chromosome, während die Männchen nur eines haben. Um die unterschiedlichen Gendosen kompensieren zu können, wird ein X-Chromosom inaktiviert. Die Auswahl im Embryonalgewebe verläuft rein zufällig und bleibt lebenslang in allen Tochterzellen erhalten. Im extraembryonalen Gewebe wird immer das paternale Chromosom stillgelegt. Somit ist die X-Chromosom Inaktivierung auch ein Beispiel für die Prägung. Für die Inaktivierung ist das XIST (Xi specific transcripts)

Gen erforderlich, das nur vom inaktiven X-Chromosom exprimiert wird. [JELTSCH, 2002; SUZUKI und BIRD, 2008] Das Genprodukt ist eine nicht-kodierende RNA, die mit dem inaktiven X-Chromosom assoziiert und für die Verdichtung der Chromatinstruktur zuständig ist. Weiter epigenetische Modifikationen, die das Barr-Körperchen kennzeichnen, sind: die DNA Hypermethylierung, die Deacetylierung der Histone, die Methylierung von Lysin 9 und 27 im Histon 3. [BIRD, 2002]

4.5 Stilllegung von Transposons

Die meisten methylierten Cytosine im Körper dienen dem Schutz gegen Transposons. Viele Transposons befinden sich innerhalb von Genen und können die Transkription von Wirtsgenen behindern. Sie destabilisieren auch das Genom durch die Insertionsmutagenese, die Antisense-RNA und die chimäre Transkripte. Die embryonalen Stammzellen ohne Dnmt1 zeigen eine erhöhte Transkriptionsrate von Transposons und eine erhöhte Mutationsrate. [BESTOR, 2000; JELTSCH, 2002]

Die Transposons und andere repetitive DNA Sequenzen sind reich an CG Sequenzen und kommen im Genom meist stark methyliert vor. Sie werden bereits in den Keimzellen methyliert: Eine Ausnahme sind Urkeimzellen. [GOLL und BESTOR, 2005]

Durch die Methylierung werden die Sequenzen stillgelegt. Das Methyl-Cytosin kann leicht zu Thymin deaminiert werden und dadurch werden die Transposons permanent deaktiviert. [BESTOR, 2000; JELTSCH, 2002]

5 DNA METHYLIERUNG und KRANKHEIT

Die embryonalen Stammzellen ohne DNA Methyltransferasen sind lebensfähig, sterben aber wenn sie zur Differenzierung angeregt werden. Die Knock-out Studien mit Mäusen haben gezeigt, dass Dnmt1 und Dnmt3b für die Embryogenese unerlässlich sind, und dass Mäuse, denen Dnmt3a fehlt, kurz nach ihrer Geburt sterben. Der Verlust von normalen DNA Methylierungsmustern in somatischen Zellen führt zum Verlust der Wachstumskontrolle. [ROBERTSON, 2005]

Die gestörte Methylierung oder die Demethylierung des Genoms kann zu verschiedenen Krankheiten und Entwicklungsstörungen führen. Durch bessere Kenntnisse der Epigenetik werden heute viele Krankheiten besser verstanden. Gesichtsfehlbildungen, Rett Syndrom, Autoimmunerkrankungen, Immunschwäche und Karzinome können ihre Ursache in einer gestörten DNA-Methylierung haben. [JONES und TAKAI, 2001]

Das Epigenom ist während der Schwangerschaft, des 1. Lebensjahres, der Pubertät und im hohen Alter besonders störanfällig. Während der Embryogenese ist es besonders anfällig für die Umwelteinflüsse, wenn die DNA Methylierungsmustern und der Histoncode neu etabliert werden. [DOLINOY et al, 2007]

5.1 Rett Syndrom

Das Rett Syndrom wird X-chromosomal dominant vererbt (Häufigkeit: 10000-15000 ♀). Männliche Embryos mit betroffenem X-Chromosom sind nicht überlebensfähig. Die Ursache für die Erkrankung ist eine Mutation von MeCP2, eines Methyl-CG-bindenden Proteins. [JELTSCH, 2002] Das Syndrom ist eine

progressive neurologische Erkrankung. Die betroffenen Kinder entwickeln sich bis zum 6.-18. Lebensmonat normal. Die typischen Symptome der Krankheit sind: zunehmender Sprachverlust, Entwicklung von Mikrozephalie, Ataxie, Krampfanfällen, Autismus und stereotischer Handbewegungen. Nach anfänglicher Regression stabilisiert sich der Zustand und die Patientinnen leben bis ins Erwachsenenalter. [AMIR et al, 1999]

5.2 Angelman Syndrom und Prader-Willi Syndrom

Die Krankheit ist durch mentale Retardierung, Sprachstörung und Verhaltensstörung gekennzeichnet. Die Häufigkeit liegt bei 1:15000 Geburten. Das Angelman Syndrom wird durch die fehlende Expression des mütterlich geprägten UBE3A-Gens verursacht. Das UBE3A Gen liegt auf dem Chromosom 15 (15q11-q13). Es kodiert für Ubiquitin Protein Ligase E3A und kommt nur in den Gehirnzellen geprägt vor.

Ist das väterliche UBE3A-Gen defekt, entsteht das Prader-Willi Syndrom. Die Symptome des Prader-Willi Syndroms sind: Hypogonadismus, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, Verhaltensstörung und Übergewicht. [ROBERTSON, 2005]

5.3 ICF Syndrom

Das Syndrom ist eine sehr seltene autosomal rezessive Erkrankung, die durch Punktmutation im menschlichen Dnmt3b Gen auf dem Chromosom 20 entsteht. [ROBERTSON, 2005] Die Krankheit ist durch Immunschwäche, Gesichtsfehlbildungen, Entwicklungsstörungen und geistige Retardierung gekennzeichnet. Weitere Kennzeichen sind die Zentromer-Instabilität und die Demethylierung des inaktiven X-Chromosoms. [GOPALAKRISHNAN et al, 2008] Die Zentromer-Instabilität ist am meisten in den T Lymphozyten ausgeprägt. Sie ist die Folge einer gestörten Methylierung der Satelliten-DNA auf den

Chromosomen 1,9 und 16. Die Krankheit ist selten und die meisten Patienten sterben früh an Infektionen. [GOLL und BESTOR, 2005]

5.4 DNA Methylierung und Krebs

Krebs entsteht, wenn eine Zelle spezifische Wachstumsvorteile durch die Akkumulation von Genveränderungen erlangt. Grundsätzlich wird dieser Prozess durch die Veränderungen von Expression der Tumorsuppressorgene (TSG) und der Protoonkogene eingeleitet. Die Tumorsuppressorgene hemmen das Zellwachstum und können Apoptose induzieren. Die Protoonkogene sind die Vorläufer von Onkogenen, die das Zellwachstum und eine unkontrollierte Zellteilung fördern. Normalerweise werden mehrere Genveränderungen benötigt, damit sich malignes Gewebe aus gesundem Gewebe entwickeln kann. [GROENBAEK et al, 2007] Die Änderungen im DNA Methylierungsmuster kommen häufig im Krebsgewebe vor. Die Krebszellen sind durch die globale genomische Hypomethylierung und die fokale Hypermethylierung der Cp-Inseln, die normalerweise nicht methyliert sind, gekennzeichnet. Beide Veränderungen finden in der Frühphase der Karzinogenese statt. [ROBERTSON, 2005]

PUNKTMUTATIONEN

Wie bereits beschrieben, können methylierte Cytosinbasen leichter als unmethylierte zu Thymin deaminiert werden. Die Folge ist eine TG Basenfehlpaarung. [JURKOWSKA et al, 2011] Wird die Basenfehlpaarung nicht repariert, wird die Mutation bei der nächsten Teilung fixiert, indem das Guanin durch eine Adeninbase ausgetauscht wird (siehe Abb. 1). Die Folge ist eine TA Punktmutation [JELTSCH, 2002], die wenn sie in kodierender Region liegt, zu einer Krankheit führen kann. In den Krebszellen findet man die Punktmutationen oft in den Tumorsuppressorgenen, die für die Regulation des Zellwachstums zuständig sind. Ein wichtiges Tumorsuppressorgen ist das TP53 Gen, das in vielen Krebsarten mutiert ist. [GROENBAEK et al, 2007]

HYPOMETHYLIERUNG

Ein Zusammenhang zwischen Krebs und der DNA Methylierung wurde zum ersten Mal 1983 erkannt. Es wurde beobachtet, dass das Krebszellengenom hypomethylierter als das Genom gesunder Zellen ist. [FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983] Die verminderte DNA Methylierung kann das ganze Genom oder die einzelnen Gene betreffen. [CHOI und MASON, 2000]

Die Folge von DNA Hypomethylierung kann eine Genaktivierung sein. Bestimmte Gene bzw. ihre Promotoren, die nur in der Embryogenese oder Gametogenese benötigt werden, sind normalerweise stark methyliert. Wenn diese Promotoren ihre Methylierung verlieren, werden zuvor inaktive Gene aktiv. [FEINBERG und TYCKO, 2004] Oft handelt es sich bei den betroffenen Genen um die Protoonkogene, die das Zellwachstum fordern, wie z.B. H-ras und MAPK in den Magenkrebszellen, S-100 im Kolonkarzinom oder MAGE im Melanom. [SHARMA et al, 2010]

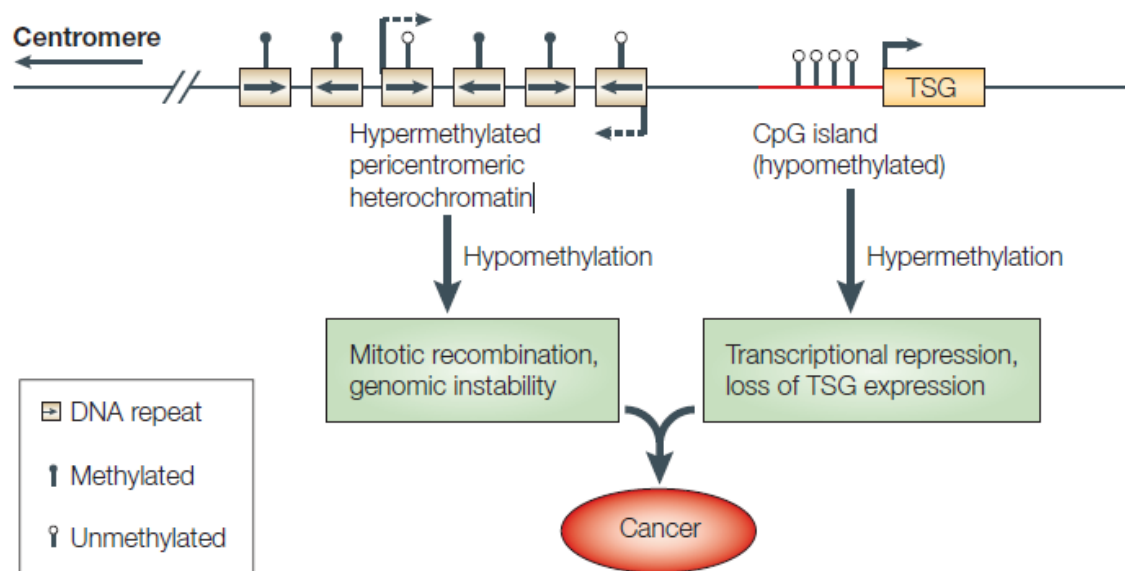


Abbildung 17: DNA Methylierung und Krebs.
TSG=Tumorsuppressorgen [ROBERTSON, 2005]

Zusätzlich kann eine genomweite Hypomethylierung zur Aktivierung von Retrotransposons und zur Instabilität des Genoms führen (siehe Abb. 17). Die Demethylierung von Satellitenregionen kann zu Brüchen, Rekombinationen und Allelverlusten prädisponieren. Besonders häufig sind die Chromosomenbrüche in perizentromeren Satellitensequenzen von den Chromosom 1 und 16 zu finden, die zu unbalancierten Translokationen zwischen den beiden Chromosomen führen. Die Folge davon ist der Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH), die mit der Anaplasie korreliert. [FEINBERG und TYCKO, 2004; GROENBAEK et al, 2007] Der Verlust der genomweiten Methylierung betrifft viele untersuchte Tumorarten, wie das Kolon-, Zervix-, Brust-, Prostata- und Magenkarzinom. [CHOI und MASON, 2000]

Die Hypomethylierung ist ein häufiges Vorkommnis in den Krebszellen und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Metastasierungspotential vieler Krebsarten. [ROBERTSON, 2005] Die globale DNA Demethylierung findet bereits in der Frühphase der Karzinogenese statt und induziert die genomische Instabilität. Die spätere, gen-spezifische Hypomethylierung ermöglicht den Krebszellen, sich an die Umgebung anzupassen und fördert die Metastasierung. [HAMID, 2012]

Bestimmte Toxine, Arzneimittel und Viren können Veränderungen der DNA Methylierung hervorrufen. Zum Beispiel Cadmium hemmt die Aktivität von Dnmt und führt zu einer akuten Hypomethylierung. Das Arsen induziert die Hypomethylierung von *Ras* Gen bei Mäusen. [FEINBERG und TYCKO, 2004]

LOSS OF IMPRINTING (LOI)

Die globale genomische Hypomethylierung kann auch zum Verlust von geprägten Regionen (LOI) und zur Aktivierung stillgelegter Allele führen. [ROBERTSON, 2005]

Die Studien mit Mäusen zeigten, dass dies die Entstehung von Krebs begünstigt. [GROENBAEK et al, 2007] Die Tiere mit LOI zeigten eine zweifache Erhöhung der

Darmtumorinzidenz und eine verminderte Differenzierung des Darmepithels. [ROBERTSON, 2005]

IGF2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der normalerweise paternal vererbt wird. Seine biallele Expression und Suppression von H19 im Rahmen von LOI begünstigen die Entstehung von Darm-, Leber-, Lungen- und Eierstockkrebs, sowie von Wilms Tumor, dem embryonalen Nierenkarzinom. [ROBERTSON, 2005; SANTOS et al, 2005; SHARMA et al, 2010]

HYPERMETHYLIERUNG

Die Hypermethylierung von CG Inseln in Genpromotoren ist eine der häufigsten epigenetischen Vorfälle in der Karzinogenese. Die Promotorhypermethylierung von Tumorsuppressorgenen führt zu deren Deaktivierung. Entsprechend der Knudson-Hypothese für TSG müssen beide Allele durch die Hypermethylierung oder durch eine Kombination aus der Methylierung und der Deletion inaktiviert sein. [GROENBAEK et al, 2007] Die Hypermethylierung ist meistens mit einer Erhöhung von DNA Methyltransferasen verbunden. Dnmt3b ist in den verschiedenen Tumorarten überexprimiert, während Dnmt3a in den gleichen Tumoren nur leicht erhöht ist. [HERMANN et al, 2004]

Die Tumorsuppressorgene (siehe Tabelle 2) sind für die Regulation des Zellwachstums und Zellteilung, der DNA Reparatur, der Umstrukturierung des Chromatins, der Transkription, der Signaltransduktion, der Differenzierung, der Angiogenese und der Apoptose verantwortlich. [HAMID, 2012; SHARMA et al, 2010] Durch die Inaktivierung dieser Gene können Tumorzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und metastasieren. Eine *de novo* Methylierung von CG Inseln ist bereits in frühen Vorläuferläsionen vorzufinden, und trägt dadurch direkt zu einer Transformation bei. Da die Methylierung von CG-Inseln in gesunden Zellen relativ selten vorkommt, stellt die methylierte DNA einen guten Biomarker in der Frühdiagnostik dar. [CEDAR und BERGMAN, 2009; ROBERTSON, 2005]

Die Liste der hypermethylierten Gene, die mit Krebsentstehung assoziiert sind, wächst stetig. In Tabelle 2 werden einige davon aufgelistet:

Funktion	Methyliertes Gen	Betroffene Organe
Apoptose	DAPK1	Lymphknoten
Genomische Instabilität	MGMT MLH1	Lymphsystem, Kolon Kolon
Kontrolle des Zellzyklus	Rb1 CDKN2A	Retina Kolon, Lunge u.a.
DNA Reparatur	MLH1 BRCA1 GSTP1	Darm, Magen Ovarien, Brust Leber, Niere, Brust u.a.
Metastasierung	CDH1 CDH13 VLH	Brust, Leber, Magen Lunge, Pankreas Niere

Tabelle 2: Beispiele für methylierte Tumorsuppressorgene in Krebszellen. [modifiziert nach KUCH, 2008]

Zusätzlich zu einer direkten Inaktivierung von TSG können mittels der DNA Hypermethylierung weitere Gene indirekt stillgelegt werden, indem die DNA Reparaturgenen und die Transkriptionsfaktoren deaktiviert werden. Eine Stilllegung von DNA Reparaturgenen, wie z.B. BRCA1, MLH1, ermöglicht den Zellen genetische Veränderungen anzuhäufen, die die Progression der Krebserkrankung beschleunigen. [SHARMA et al, 2010]

6 EINFLUSS DER UMWELT AUF DIE DNA METHYLIERUNG

Die epigenetischen Modifikationen sind mitotisch vererbare, reversible Veränderungen der DNA-Struktur ohne der Veränderung der DNA Sequenz. [ANDERSON et al, 2012] Das Epigenom stellt die Schnittstelle zwischen dem Genom und der Umwelt dar. [BARROS und OFFENBACHER, 2009] Die epigenetischen Modifikationen sind relativ stabil, können aber durch externe und/oder interne Faktoren beeinflusst werden. Zu den externen Faktoren, die einen langanhaltenden Einfluss auf die epigenetischen Modifikationen haben, zählen die Ernährung, das Rauchen und die körperliche Bewegung. Zu den internen Faktoren zählt der Alterungsprozess.

Um die Auswirkung der Umweltfaktoren auf den Phänotyp zu erkunden, wurde eine Studie mit 80 eineiigen Zwillingen im Alter von 3-74 Jahren durchgeführt. Dabei wurden die Unterschiede in der genomweiten DNA Methylierung, der genspezifischen DNA Methylierung sowie der Acetylierung der Histone H3 und H4 bei den Zwillingspaaren untersucht. Die Studie ergab, dass die jungen Zwillinge epigenetisch nicht zu unterscheiden sind. Im Alter nehmen die epigenetischen Unterschiede zu. Die epigenetischen Unterschiede zwischen den Zwillingsgeschwistern waren auch größer, je unterschiedlicher ihre Lebensweisen waren. [FRAGA et al, 2005]

In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass die Ernährung die epigenetischen Muster verändern kann. Die Agouti-Maus ist ein gutes Modell für die visuelle Darstellung epigenetischer Veränderungen. [ANDERSON et al, 2012] Die Fellfarbe der Maus korreliert mit dem Methylierungsstatus des Agouti-Gens, der von der Ernährung abhängt. Ist das Gen unmethyliert und damit aktiv, haben die Mäuse gelbe Fellfarbe, Übergewicht und Diabetes-ähnliche Symptome. [YEN et al, 1994]

Werden die gelben Agouti-Weibchen während der Schwangerschaft mit den Methylendonatoren (Folsäure, Vitamin B₁₂, Betain und Cholin) gefüttert, bekommen

sie meist gesunden, braungefärbten Nachwuchs. [WATERLAND et al, 2007] Dolinoy et al haben in ihrer Studie beobachtet, dass die Fütterung der Agouti-Weibchen mit Bisphenol A zu einer DNA Hypomethylierung und der Fellgelbfärbung beim Nachwuchs geführt hat. Bisphenol A ist eine Chemikalie mit schwacher Östrogenwirkung, die in Plastikproduktion benutzt wird. Eine durch Bisphenol A verursachte Hypomethylierung des Agouti-Gens konnte durch Methyl donor-angereicherte Ernährung beim Nachwuchs rückgängig gemacht werden. [DOLINOY et al, 2007]

Die Ernährung beeinflusst auch die DNA Methylierung bei Menschen. Wie die Ernährung die Genexpression und die Krankheitsentstehung bei den Menschen beeinflusst, ist noch recht unklar. [DUTHIE, 2011a]

Die Übertragung der Methylgruppe im Rahmen der DNA Methylierung hängt von mehreren Mikronährstoffen (Folat, Cholin, Betain und Vitamin B₁₂) ab. [ANDERSON et al, 2012] Die Metaboliten der Ein-Kohlenstoff(C1)-Einheiten-Übertragung, S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosyl-Homocystein (SAH), können die Methylierung von der DNA und den Histonen beeinflussen. SAM ist der Methyl donor in der Methylierungsreaktion. SAH ist der Abbauprodukt von SAM und ein starker Inhibitor von Methyltransferasen. Rein theoretisch kann jeder Nährstoff, der den SAM oder SAH Gehalt im Gewebe beeinflusst, die Methylierung der DNA und Histone verändern. [CHOI und FRISO, 2010]

Bestimmten bioaktiven Substanzen, wie z.B. dem Sulforaphan im Brokkoli, dem Resveratrol im Wein und dem Diallyldisulfid im Knoblauch, wurde experimentell nachgewiesen, die Histondeacetylasen zu inhibieren und somit den Grad der Histonacetylierung zu steigern. Das Kurkumin hemmt die Histonacetyltransferasen. [CHOI und FRISO, 2010; DUTHIE, 2011a] Das Genistein aus Sojabohnen und die Catechine aus dem Tee beeinflussen die DNA Methyltransferasen. [CHOI und FRISO, 2010] In einer Studie mit gesunden Probanden wurde durch eine langanhaltende, folatarme Diät die genomweite Hypomethylierung induziert, die durch eine Folatzufuhr umkehrbar war. [CHOI und MASON, 2000] Ein Mangel an Folat und Methionin kann zur Veränderung der IGF2-Prägung führen. [TURUNEN et al, 2009]

7 FOLSÄURE

7.1 Struktur

Unter Folaten werden mehrere Verbindungen zusammengefasst, die gleiche Grundstruktur aufweisen, aber unterschiedliche metabolische Eigenschaften haben. Folate bestehen aus einem Pteridingerüst, das über eine Methylenbrücke mit *para*-Aminobenzoessäure verbunden ist, und bis zu acht Glutamatresten (siehe Abb. 18). [STANGER, 2010; SUH et al, 2001] Die natürlichen Folate unterscheiden sich in der Länge der Glutaminsäurekette (bis zu 8 Glutaminsäurereste), in der Wasserstoffatomanzahl am Pteridinring und in der Bindung aktiver Kohlenstoffeinheiten. Je nach Anzahl der Glutamatreste unterscheidet man zwischen Pteroylmonoglutamaten und Pteroylpolyglutamaten. Folatverbindungen, die in der Nahrung vorkommen, werden auch Nahrungsfolate genannt.

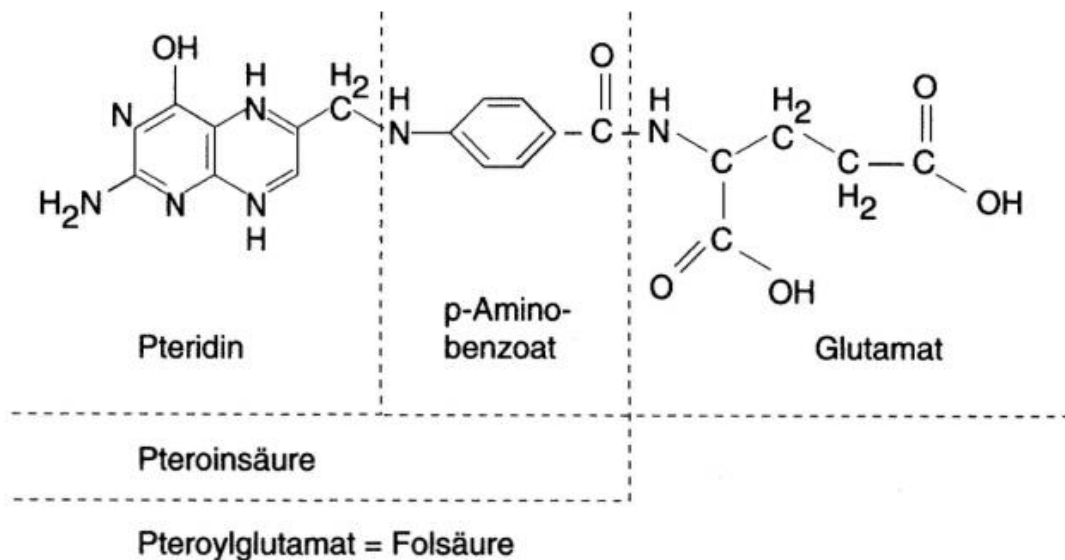


Abbildung 18: Chemische Strukturformel der Folsäure. Sie besteht aus Pteridin, p- Aminobenzoessäure und dem Glutamatrest. [BAESSLER et al, 1997]

Die Nahrungsfolate gehören zu den wasserlöslichen B Vitaminen, die licht-, oxidations- und hitzeempfindlich sind. [PIETRZIK et al, 2004] Durch Ernten, Lagerung, Verarbeitung und Zubereitung gehen 50-75% des ursprünglichen Nahrungsfolatgehalts verloren. Die Bioverfügbarkeit des Folats hängt von der Nahrungsquelle und der Zubereitungsmethode ab. [LY et al, 2012]

Unter dem Begriff Folsäure ist die stabile Form des Vitamins zu verstehen, die nicht in der Natur vorkommt. Sie enthält nur einen Glutamatrest (Pteroylmonoglutaminsäure, PGA). Die Folsäure wird synthetisch hergestellt und zur Herstellung von Vitaminpräparaten sowie zur Lebensmittelanreicherung verwendet. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004; SUH et al, 2001]

Durch die Reduktion der Folsäure entsteht ihre biologisch aktive Form, die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF). Im menschlichen Körper findet man Tetrahydrofolsäure vorwiegend als 5-Methyl- Tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-Tetrahydrofolsäure und 10-Formyl-Tetrahydrofolsäure. [STANGER, 2010]

Abgesehen von der *de novo* Folat-Synthese der Darmflora, das teilweise auch vom Gewebe aufgenommen wird, sind Säugetiere nicht im Stande Folate zu synthetisieren. Sie sind fähig die einzelnen Folatkomponenten zu synthetisieren, können sie aber nicht miteinander verbinden. Deswegen muss das Vitamin über die Nahrung aufgenommen werden. [KIM, 2007] Gute Quellen für Folat sind Milch und Milchprodukte, Eier, Leber, Vollkornprodukte, Hülsenfrüchte, Hefe, Blattgemüse (Spinat, Salat), Kohl, Zitrusfrüchte und Brokkoli. [ELMADFA et al, 2012; LY et al, 2012]

7.2 Stoffwechsel

Die Folate können von Darmepithelzellen nur in Form von Monoglutamaten resorbiert werden. Deswegen müssen die in der Nahrung enthaltenen Polyglutamate zuerst aufgespalten werden. Die Hydrolyse der Glutamatreste erfolgt im Duodenum und Jejunum [STANGER, 2010] mit Hilfe der γ -

Glutamylcarboxypeptidase II, die in der Bürstensaummembran verankert ist. [KIM, 2007] Die entstandenen Pteroylmonoglutamate werden vor allem aktiv im Jejunum resorbiert. Etwa 20-30% der Folate werden passiv von der Dünndarmmukosa aufgenommen. [STANGER, 2010] Die Resorption ist pH-abhängig (pH-Optimum 6,0). [HAMID, 2012; KOLETZKO und PIETRZIK, 2004]

Die Monoglutamatverbindungen gelangen über die Pfortader in die Leber, den Hauptspeicherorgan, wo sie methyliert werden. Im Blut wird vorwiegend 5-Methyl-Tetrahydrofolat transportiert, das an Albumin und α -Makroglobulin gebunden ist. In der Zelle aufgenommen, wird das 5-Methyl-Tetrahydrofolat demethyliert und zu Polyglutamaten konjugiert. In dieser Form können sie gespeichert oder im intrazellulären Stoffwechsel verstoffwechselt werden. [STANGER, 2010]

Die Folsäure wird vor allem in der Leber gespeichert. Es werden täglich 10-90 μ g Folat mit der Galle ausgeschieden. Der größte Teil davon wird über den enterohepatischen Kreislauf rückresorbiert.

Die Ausscheidung über Niere beträgt bei normaler Folatzufuhr 1-12 μ g pro Tag. Die Folate werden in Form von 5-Methyltetrahydrofolat, 10-Methyltetrahydrofolat oder inaktiver Verbindungen wie dem Pteridin ausgeschieden. Die Ausscheidung über Darm kann nicht berücksichtigt werden, da mit dem Stuhl auch von der Darmflora synthetisierte Folate ausgeschieden werden. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004]

7.3 Bioverfügbarkeit und Bedarf

Die synthetisch hergestellte Folsäure und die Nahrungsfolate werden vom Körper unterschiedlich stark resorbiert. Während die Monoglutamate fast vollständig (90%) im Darm resorbiert werden, liegt die Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolaten bei etwa 50%. [STANGER et al, 2003] Aus diesem Grund wird die Folataufnahme in Folatäquivalenten angegeben.

1µg Folatäquivalent (FÄ) entspricht 1µg Nahrungsfolat bzw. 0,5µg Folsäure.

Die von der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung (ÖGE) empfohlene Tagesdosis für Erwachsene beträgt 400µg Folat-Äquivalente bzw. 600µg FÄ für Schwangere und Stillende. Zur Senkung des Neuralrohrdefekt-Risikos sollen Frauen, die schwanger werden wollen, zusätzlich 400µg Folatäquivalente/Tag zu sich nehmen. Die erhöhte Folatezufuhr sollte mindestens einen Monat vor dem Schwangerschaftsbeginn erfolgen und bis zum Ende des ersten Trimenons beibehalten werden. [D-A-CH, 2012]

In der Tabelle 3 sind die empfohlenen Tagesdosen für verschiedene Altersklassen aufgelistet:

Alter	Folat µg Äquivalent/Tag
0-4 Monate	60
4-12 Monate	80
1-4 Jahre	200
4-7 Jahre	300
7-10 Jahre	300
10-15 Jahre	400
15-65 Jahre	400
Älter als 65 Jahre	400
Schwangere	600
Stillende	600

Tabelle 3: Empfohlene Tagesdosen für verschiedene Altersklassen [modifiziert nach D-A-CH, 2012]

Dem Österreichischen Ernährungsbericht 2012 zufolge erreichen nur eins bis zwei Prozent der erwachsenen Österreicher und Österreicherinnen die empfohlene Tagesdosis von 400 µg Folatäquivalenten pro Tag. Trotzdem ist der Folatstatus

für einen Großteil der Bevölkerung als zufriedenstellend zu bewerten. Es wird angenommen, dass die aktuellen Referenzwerte zu hoch sind, da auch mit einer niedrigen Folataufnahme ein guter Folatstatus zu erreichen ist. Bei etwa 5-20% der Bevölkerung liegt die Zufuhr an Nahrungsfolat deutlich unter der empfohlenen Tagesdosis. Zu den unterversorgten Gruppen gehören die Senioren sowie Männer im Jugend- und Erwachsenenalter. Nach dem letzten Österreichischen Ernährungsbericht 2012 ist der Großteil der österreichischen Bevölkerung ausreichend mit Folat versorgt. [ELMADFA et al, 2012]

7.4 Funktion

Die einzige biochemische Funktion der Folsäure ist die Übertragung von Ein-Kohlenstoff (C1)-Einheiten. [KIM, 2007] Zu den C1-Gruppen zählen Kohlenstoffreste wie z.B. Methyl, Formyl, Formiat, Methylen oder Hydroxymethyl. [STANGER, 2010]

Der Transfer von Ein-Kohlenstoff-Resten hat bei zahlreichen Stoffwechselreaktionen eine wichtige Funktion. Folate fungieren als Koenzyme bei der *de novo* Purin- und Pyrimidinbiosynthese und sind somit essentiell für die DNA und RNA-Synthese (Abb. 19).

Außerdem sind sie an der Methylierung von der DNA und der Histone beteiligt. Durch die Methylierung von Homocystein entsteht das Methionin und in weiterer Folge das S-Adenosylmethionin (SAM), ein wichtiger Kofaktor der biologischen Methylierung. [CHOI und MASON, 2000; CLARKE und BANFIELD, 2001]

Die Übertragung von Ein-Kohlenstoff-Einheiten ist auch für die Konversion von Serin zu Glycin und im Tryptophan- und Histidinstoffwechsel notwendig. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004]

Durch die Regulation der DNA Synthese, der Reparatur und der Methylierung sind die Folate für die Erhaltung der genomischen Stabilität notwendig. Bei einem Mangel an Nahrungsfolaten ist das Gleichgewicht zwischen den Purin- und

Pyrimidinvorstufen gestört und die DNA Reparatur gehemmt. Zusätzlich wird Uracil statt Thymin in die DNA eingebaut, was zu Strangbrüchen, Chromosomenschäden und maligner Entartung führen kann. [DUTHIE, 2011b]

Bei der unzureichenden Zufuhr von Methylendonoren entsteht ein Konkurrenzkampf zwischen der Methylierungsreaktion und der Nukleotidbiosynthese um die vorhandenen Ressourcen. Nimmt die SAM Konzentration ab, steigt die Konversion von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat zu 5-Methyl-Tetrahydrofolat an (siehe Abb. 19, Punkt 4). Diese Reaktion ist irreversibel. Dadurch ist die Folat-Verfügbarkeit für die Nukleotidbiosynthese vermindert. [CHOI und MASON, 2000; KIM, 2007]

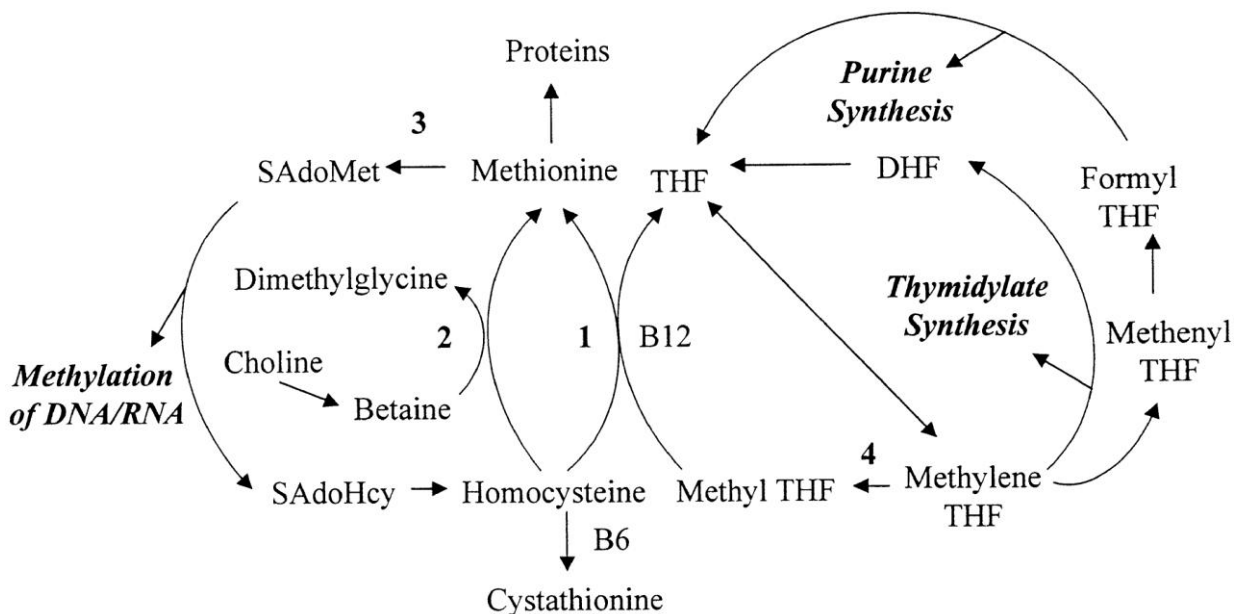


Abbildung 19: Folate im zellulären Stoffwechsel. THF=Tetrahydrofolat; DHF=Dihydrofolat; 1, Methioninsynthase; 2, Betain-Homocystein Methyltransferase; 3, Methionin-Adenosyltransferase; 4, Methylentetrahydrofolatreduktase. [CHOI und MASON, 2000]

Methioninsynthese und biologische Methylierungsreaktion

Das Methionin gehört zu den essentiellen Aminosäuren und muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Allerdings kann das Methionin im Körper aus dem Homocystein regeneriert werden. [CHOI und MASON, 2000]

Durch Übertragung einer Hydroxymethylgruppe von Serin auf Tetrahydrofolsäure entstehen Glycin und 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat. Die Reaktion wird durch die Serin-Hydroxymethyltransferase katalysiert. 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat fungiert als Kofaktor bei der Nukleotid- und Methioninsynthese. [KIM, 2007]

Bei der Methioninsynthese reduziert das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat zu 5-Methyl-THF. Diese Reaktion ist irreversibel. 5-Methyl-THF überträgt seine Methyleinheit auf Homocystein. Dabei entstehen Methionin und Tetrahydrofolat. Für den Methyltransfer werden das Vitamin B₁₂ und das Enzym Methioninsynthase benötigt. [STANGER et al, 2003]

Es existiert ein alternativer Mechanismus der Methioninsynthese, der kein Folat benötigt (siehe Abb. 19, Punkt 2). Durch die Methylierung von Homocystein mit Hilfe von Betain kann Methionin regeneriert werden. Diese Reaktion findet nur in den Leber- und Nierenzellen statt. [CHOI und MASON, 2000]

Das Methionin kann unter Mitwirkung der Methionin-Adenosyltransferase zu S-Adenosylmethionin (SAM) verstoffwechselt werden. SAM ist der wichtigste Methylgruppendonor in der Zelle. Durch seine Fähigkeit Cytosin zu methylieren, kontrolliert SAM die Gentranskription und die Proteinexpression. [DUTHIE, 2011b] Abgesehen von der DNA können auch Proteine, RNA und die Phospholipide methyliert werden. [CLARKE und BANFIELD, 2001] Nach dem Methyltransfer entsteht aus SAM S-Adenosylhomocystein (SAH), ein starker Inhibitor der SAM abhängigen Methyltransferasen. [KIM, 2004] SAH wird anschließend durch S-Adenosylhomocystein-Hydrolase hydrolysiert werden, wobei Homocystein und Adenosin entstehen. Der Homocystein kann remethyliert werden, wobei wieder Methionin entsteht, oder zu Cystein abgebaut und ausgeschieden wird. [CLARKE

und BANFIELD, 2001] Bei einem Folatmangel steigen Homocystein und SAH im Plasma und Zellen an. SAH hemmt die Aktivität der Methyltransferasen und damit auch die Methylierungsreaktion der DNA, der RNA und der Histone. [HAMID, 2012]

Der DNA-Methylierungsprozesses wurde ausführlich im Kapitel „DNA Methylierung“ beschrieben.

de novo Purin- und Thyminbiosynthese

Das Folat ist ein essentieller Kofaktor für die *de novo* Biosynthese vom Thymin, sowie Adenin und Guanin (Purine). [KIM, 2004]

Bei der Thyminsynthese wird die Methyleinheit vom 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat auf das Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) übertragen (siehe Abb. 17). Die Reaktion wird durch die Thymidylatsynthetase katalysiert. Es entstehen dabei das Thymidylat und die 7,8-Dihydrofolsäure. Die 7,8-Dihydrofolsäure wird unter Mitwirkung der Dihydrofolatreduktase zu THF regeneriert. [STANGER, 2010]

Die Kohlenstoffeinheiten für die Synthese von Purinen, Adenin und Guanin, stammen ebenfalls von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat, das zu 10-Formyltetrahydrofolat oxidiert wird. [KIM, 2004]

Die Purin- und Pyrimidinbiosynthese ist mit dem Folsäurestoffwechsel eng verbunden und unterstreicht dessen Wichtigkeit für den Organismus. Eine Fehlfunktion des Folsäuremetabolismus führt zur gestörten DNA Synthese und zu einer Störung der Zellteilung. [DUTHIE, 2011b; STANGER, 2010]

7.5 Folsäuremangel und die Folgen

Ursachen für den Mangel

Der Folatmangel gehört zu den häufig vorkommenden Vitaminmängeln in den Industrieländern. Eine der Ursachen ist die industrielle Verarbeitung des Getreides zum Weißmehl, die für einen hohen Verlust von Vitaminen und Mineralien verantwortlich ist. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Das Folat ist ein empfindliches Vitamin, das durch Licht, Sauerstoff und Hitze zerstört werden kann. Bei der Lagerung und der Zubereitung gehen durchschnittlich 35% des Vitamins verloren. [ELMADFA, 2009] Außerdem können Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme, Mangelernährung, Rauchen und entzündliche Darmerkrankungen zur Entstehung des Folatmangels beitragen (siehe Tabelle 4). [SUH et al, 2001]

<i>Erhöhter Bedarf</i>	<i>Ungenügende Zufuhr</i>	<i>Medikamenten-Interferenzen</i>
Frühgeborene Schwangere Stillende Infekte Hämodialyse Karzinome Hämolytische Anämie Wachstum	Fehlernährung Alkoholiker Lebererkrankungen Zubereitungsverluste Lagerungsverluste Unterernährung M. Crohn Zöliakie Kurzdarmsyndrom	Folatanaloga: ○ Methotrexat ○ Pentamidin ○ Aminopterin Pharmaka mit Einfluss auf Resorption: ○ Acetylsalicylsäure ○ Orale Kontrazeptiva ○ Barbiturate ○ Antiepileptika

Tabelle 4: Mögliche Ursachen für den Folsäuremangel [modifiziert nach SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Menschen, die besonders häufig von einem Folatmangel betroffen sind und somit zu den Risikogruppen zählen, sind: Frühgeborene, Jugendliche, Alkoholiker, Schwangere, Stillende, Raucher, alte Menschen, Patienten mit entzündlichen

Dünndarmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, Dialysepatienten und Krebspatienten. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008] Ein erhöhter Bedarf, eine ungenügende Zufuhr, die Malabsorption und ein erhöhter Stoffwechsel können bei den Risikogruppen zu einer Unterversorgung führen. [HAMID, 2012]

Die biochemischen Parameter zur Bestimmung des Folatstatus sind die Folatkonzentration im Serum und in den roten Blutkörperchen, sowie der Homocysteinspiegel. Die Folatkonzentration im Serum repräsentiert das zirkulierende Folat, das sich verändert und durch die Ernährung beeinflussbar ist, während der Erythrozytenfolatspiegel den intrazellulären Folatstatus repräsentiert. Der Erythrozytenfolatspiegel ist ein guter Indikator für die langfristige Folatversorgung. [SUH et al, 2001] Der Homocysteinspiegel ist ein sensibler Parameter des Folatstatus, wird aber auch durch Vitamine B₆ und B₁₂ beeinflusst. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008; SUH et al, 2001] Bei einem Folatmangel steigen die Homocysteinwerte an, noch bevor das Folat im Serum unter den Normwert sinkt. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Der Folatmangel beeinflusst die DNA Synthese, was sich in einer megaloblastäre Anämie und einer Hypersegmentierung neutrophiler Granulozyten äußert. [SUH et al, 2001] Bei einer Folatkonzentration unter 3,5 ng/ml im Serum und < 250 ng/ml in den Erythrozyten besteht ein Folatmangel. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Anämie

Da die Körperreserven an Folsäure gering sind, sollten mindestens 50µg Folat pro Tag eingenommen werden, um akute Mangelsymptome vorzubeugen. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008] Die frühen Symptome eines Mangels sind unter anderem Schlafstörung, Stimmungsschwankungen und Konzentrationsschwäche. Die klinischen Mangelsymptome wie megaloblastäre Anämie, Zungenbrennen, Durchfälle und Immunschwäche treten etwa sechs

Monaten nach verminderter oder unterbrochener Folatezufuhr auf. [ELMADFA, 2009; STANGER, 2010]

Beim Vorliegen einer megaloblastäre Anämie sollte vor Therapiebeginn abgeklärt werden, ob die Ursache dafür ein Folat- oder ein Vitamin B₁₂-Mangel sei. Durch hohe Folsäuregabe kann ein B₁₂ Mangel verschleiert werden, dadurch dass die Anämiesymptome verschwinden, die neurologischen Symptome (funikuläre Myelose) aber bestehen bleiben. Deswegen sollte eine Folatsupplementierung immer zusammen mit dem Vitamin B₁₂ ablaufen. [ELMADFA, 2009]

7.6 Supplementierung

Zur Senkung des Neuralrohrdefekt-Risikos sollen Frauen, die schwanger werden wollen, zu den empfohlenen 600µg FÄ zusätzlich 400µg Folatäquivalente/Tag einnehmen. [D-A-CH, 2012]

Um den Neuralrohrdefekte vorzubeugen wurde 1998 eine gesetzlich verpflichtende Folsäure-Anreicherung von Mehl und Cerealien in Kanada und in den USA eingeführt. Die Folsäure-Anreicherung führte zur signifikanten Verbesserung des Folatstatus [PFEIFFER et al, 2005] und senkte die Prävalenz der Neuralrohrdefekte um 15-50% in den Vereinigten Staaten und Kanada. [DUTHIE, 2011b] Außerdem konnte eine Verbesserung der Schlaganfall-Mortalität seit 1998 festgestellt werden. [YANG et al, 2006] Da 35-40% der Nordamerikaner regelmäßig Folsäuresupplemente konsumieren, kann die Folsäureaufnahme bei manchen Menschen die empfohlene Höchstgrenze (*tolerable upper level*) übersteigen. [RADIMER et al, 2004]

Die Höchstgrenze für Erwachsene beträgt 1mg Folsäure pro Tag (Tabelle 5). [ELMADFA, 2009] Welche Konsequenzen die erhöhte Folatezufuhr für die Gesundheit hat, ist derzeit noch unklar. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Alter	Mann	Frau	Schwangerschaft	Stillzeit
Geburt bis 12 Monate	nicht zu ermitteln	nicht zu ermitteln		
1-3 Jahre	300 µg	300 µg		
4-8 Jahre	400 µg	400 µg		
9-13 Jahre	600 µg	600 µg		
14-18 Jahre	800 µg	800 µg	800 µg	800 µg
19+ Jahre	1000 µg	1000 µg	1000 µg	1000 µg

Tabelle 5: Tolerable Upper Levels für Folsäure [modifiziert nach INSTITUT OF MEDICINE, 1998]

Zwei Studien aus den USA und Chile haben ergeben, dass die Kolonkrebsinzidenzrate seit dem Beginn der obligatorischen Folsäure-Anreicherung in diesen Ländern gestiegen ist, was dafür spricht, dass die übermäßige Folsäurezufuhr das Kolonkrebsrisiko erhöht. [HIRSCH et al, 2009; MASON et al, 2007] Eine kürzlich durchgeführte Kohortstudie konnte die schädigende Wirkung der Folsäure nicht bestätigen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass das Krebsrisiko seit der Anreicherungseinführung nicht gestiegen ist. [GIBSON et al, 2011] Weitere Bestätigung lieferte eine große Studie, die keine Beweise fand, dass eine hohe Folatzufuhr, inklusive den Supplementen, das Krebsrisiko erhöht. Die Studie ergab, dass die Nahrungsfolate die Entstehung von Adenomen verhindern. [LEE et al, 2011] Eine von Clarke et al. 2010 veröffentlichte

Metaanalyse von acht randomisierten klinischen Studien ergab, dass die Folsäureeinnahme (0,8-40 mg Folsäure pro Tag) über 5 Jahre keine Auswirkung auf Atherosklerose, Krebsinzidenz, Krebsmortalität oder Gesamtmortalität hatte. [CLARKE et al, 2010]

Allerdings warnt die zunehmende Anzahl der Beweise vor potentiell schädigenden Auswirkungen der Folsäure-Supplementierung, wie einer Maskierung eines Vitamin B₁₂ Mangels, einer Resistenz oder Toleranz gegenüber den Antirheumatika, einem erhöhten Risiko für Übergewicht, Insulinresistenz und Asthma bei Kindern, deren Mütter hochdosierte Folsäuresupplemente konsumierten, außerdem einer verminderten Aktivität der natürlichen Killerzellen und einem erhöhten Risiko für kognitive Beeinträchtigung der Älteren in Kombination mit niedrigem Vitamin B₁₂ Status. [LY et al, 2012] Zusätzlich können hohe Folsäuredosen die Entstehung von Kolonkarzinomen aus Adenomen und die Progression bereits bestehender Kanzerosen fördern. [KIM, 2007]

8 FOLAT, DNA METHYLIERUNG UND KRANKHEIT

Der Folatmangel spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese mehrerer menschlichen Erkrankungen, wie Anämie, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neuralrohrdefekte, Früh-/Fehlgeburten, neuropsychiatrische Störungen und Krebs. Mit Ausnahme von der Anämie und dem Neuralrohrdefekt ist der genaue Zusammenhang zwischen diesen Krankheiten und dem Folatstatus noch nicht geklärt. [LY et al, 2012]

8.1 Folate und Kolonkarzinomrisiko

Ein niedriger Folatstatus kann die Entstehung von verschiedenen Karzinomen begünstigen, wie des Lungen-, Brust-, Pankreas-, Zervix-, Prostata-, Gehirn-, Ösophagus-, Magen- und Kolonkarzinoms. Zahlreiche Studien lieferten starke Beweise für einen Zusammenhang zwischen dem niedrigen Folatstatus und einem erhöhten Risiko für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms. [DUTHIE, 2011b; LY et al, 2012] Ein hoher Folatstatus reduziert das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken um 20-40% verglichen mit einem niedrigen Folatstatus. Außerdem wird die Rolle des Folats in der kolorektalen Karzinogenese durch die Tatsache verstärkt, dass genetische Polymorphismen wie z.B. der MTHFR C677T Polymorphismus das Krebsrisiko senken.

Allerdings gibt es keine endgültigen Beweise für die Schutzwirkung der Folsäure-Supplementierung. [LY et al, 2012] Die Ergebnisse klinischer Studien sind unterschiedlich. Eine Analyse von zwei norwegischen, klinischen Studien, an denen 3411 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) teilnahmen, ergab, dass die Einnahme von 800 µg Folsäure und 400 µg Vitamin B₁₂ über einen Zeitraum von 39 Monate die Dickdarmkrebsinzidenz um 21% und die Krebsmortalität um 38%, verglichen mit der Kontrollgruppe erhöhte. [EBBING et al, 2009] Im Rahmen einer französischen Studie wurden 2501 Probanden mit kardiovaskulärer

Erkrankung 5 Jahre lang mit 560 µg Folsäure, 3 mg Vitamin B₆ und 20 µg Vitamin B₁₂ behandelt. Die Wissenschaftler fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Vitamin B- Supplementierung und der Krebsprognose. [ANDREEVA et al, 2012]

Mehrere epidemiologische Studien haben einen inversen Zusammenhang zwischen dem Folatstatus und dem Risiko für die Entstehung des Kolonkarzinoms und seiner Krebsvorstufe, dem Adenom, gefunden. [GIBSON et al, 2011; GIOVANNUCCI et al, 1998] In der Nurses' Health Study mit 88756 Teilnehmerinnen hatten die Personen mit der täglichen Folatzufuhr von mindestens 400 µg Folsäure über 15 Jahre 75% geringeres Risiko an Dickdarmkarzinom zu erkranken als die Menschen ohne Folsäureeinnahme. [GIOVANNUCCI et al, 1998] In der NIH-AARP Diet and Health Study, einer Kohortenstudie mit mehr als 525 000 Probanden im Alter von 50-71 Jahren, war die tägliche Einnahme von 900 µg Folat mit einer 30% Risikoreduktion für Kolonkarzinom assoziiert, verglichen mit der Einnahme von weniger als 200 µg Folat pro Tag. [GIBSON et al, 2011] Eine große, prospektive Studie ergab, dass die Einnahme von Multivitaminpräparaten über 15 Jahre das Dickdarmkrebsrisiko senkte (RR=0,69; 95% CI: 0,51; 0,94 >800µg verglichen mit <250µg Folate/Tag). Die Folatzufuhr war mit einer Risikosenkung für Adenome verbunden (OR=0,68; 95% CI: 0.60, 0.78; >800µg verglichen mit <250µg Folat/Tag). [LEE et al, 2011]

Mehrere klinische Studien prüften, ob die Folsäure-Supplemente das Risiko des kolorektalen Adenoms bei Personen mit/ohne Adenomvorerkrankung senken. [COLE et al, 2007; SONG et al, 2012b] In der Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study haben 1470 ältere Frauen mit einem erhöhten CVD-Risiko täglich 50 mg B₆, 1 mg B₁₂ und 2,5 mg Folsäure über 7,3 Jahre eingenommen. Die Supplementierung hatte keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Adenomentstehung. [SONG et al, 2012b] Eine Meta-Analyse von drei großen, klinischen Studien (aus Kanada, den USA, UK und Dänemark) hat ergeben, dass die Supplementierung mit 0,5 oder 1 mg/d Folsäure über 3,5 Jahre keinen Einfluss auf Entstehung von neuen Adenomen bei Patienten mit einer Adenomvorerkrankung hatte. [FIGUEIREDO et al, 2011] In einer dieser Studien war

die Folsäure-Supplementierung (1mg/d) über sechs Jahre mit einem erhöhten Risiko für multiple Adenome und für Prostatakarzinome verbunden. Die Supplementierung zeigte keine signifikante Auswirkung auf das Kolonkarzinomrisiko. [COLE et al, 2007]

MTHFR C677T Polymorphismus

Das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) reduziert 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat zu 5-Methyl-THF. Diese Reaktion ist irreversibel. [STANGER et al, 2003] Der MTHFR C677T Polymorphismus ist eine häufige Mutation bei der nordamerikanischen Bevölkerung, den Asiaten und den weißen Europäern. [KIM, 2007] Diese Mutation ist mit einer verminderten Enzymaktivität (bei Heterozygoten CT 35%, bei Homozygoten 70%) [DUTHIE, 2011b] und einer erhöhten Thermolabilität des Enzyms assoziiert. Die Folge ist eine Verminderung von 5-Methyl-THF und eine Ansammlung von 5,10-Methylen-THF in Erythrozyten sowie eine Steigerung der Homocysteinkonzentration im Plasma. Der MTHFR C677T Polymorphismus senkt das Risiko an Kolonkarzinom zu erkranken um 20%. Die Schutzwirkung gegen Dickdarmkrebs ist nur bei ausreichendem Folatstatus gewährleistet. Bei niedrigem Folatstatus ist diese nicht mehr gegeben, und in manchen Fällen kann das Krebsrisiko steigen. [KIM, 2007]

Mechanismen der Folat-assoziierten Kolonkrebsentstehung

Die genauen Mechanismen, die für die Folat-assoziierte Karzinogenese verantwortlich sein sollen, sind noch nicht endgültig geklärt. [LY et al, 2012]

Mögliche Mechanismen für die Folat-assoziierten Karzinogenese sind:

- die veränderte DNA Methylierung: Hypomethylierung, Hypermethylierung, Inaktivierung der TSG, Aktivierung der Protoonkogene, Aktivierung von Transposons
- genomische Instabilität: Uracil-Fehleinbau, Doppelstrangbrüche, Chromosomenbrüche
- gestörte DNA Reparatur. [CHOI und MASON, 2000; KIM, 2007]

Einfluss des Folatmangels und der Folatsupplementierung auf gesunde Zellen

Wie bereits erwähnt, ist das Folat ein essentieller Kofaktor für die *de novo* Purin- und Thyminbiosynthese und spielt damit eine große Rolle in der DNA Synthese und der Replikation. [KIM, 2007]

Durch die Regulation der DNA Synthese, der Reparatur und der Methylierung sind die Folate für die Erhaltung der genomischen Stabilität notwendig. [DUTHIE, 2011b] Bei einem niedrigen Folatstatus ist das Gleichgewicht zwischen den Purin- und Pyrimidinvorstufen gestört, und es kommt zu einer Ansammlung von dUMP. [HAMID, 2012] Folglich wird Uracil verstärkt statt Thymin in die DNA eingebaut, da die meisten DNA Polymerasen Thymidylat und dUMP schlecht voneinander unterscheiden. [CHOI und MASON, 2000] Unter normalen Umständen wird jedes Uracil mit Hilfe der DNA Reparaturenzyme schnell aus der DNA entfernt und der Schaden wird behoben. [HAMID, 2012] Bei Folatmangel ist die DNA Reparatur auch gestört, was zur Doppelstrangbrüchen, Chromosomenschäden und maligner Entartung führt. [DUTHIE, 2011b] Die Ergebnisse vieler in vitro, Human- und Tierstudien zeigen, dass der Mangel an Nahrungsfolaten mit DNA Brüchen, Chromosomenschäden, genomischer Instabilität, Fehleinbau von Uracil, gestörter DNA Reparatur und Mutationen assoziiert ist. Die Studien weisen auch darauf hin, dass durch die Folatsupplementierung manche dieser

mangelhervorgerufenen Defekte korrigiert werden können. Dadurch wird die Schutzfunktion der Folatsupplementierung in gesunden Zellen erklärt. [KIM, 2007]

Bei einem Folatmangel sinkt die SAM Konzentration und damit die Cytosinmethylierung. Zudem steigt SAH in Plasma und Zellen an. SAH hemmt die Aktivität der Methyltransferasen und dadurch auch die Methylierungsreaktion der DNA, der RNA und der Histone. [HAMID, 2012] Die veränderte Cytosinmethylierung führt zu einer genomweiten DNA Hypomethylierungen sowie zur Aktivierung von Protoonkogenen. Die globale Hypomethylierung kodierender und nicht-kodierender DNA Sequenzen und die Demethylierung repetitiver Regionen tragen durch folgende Mechanismen zur Krebsentstehung bei: erhöhte Mutationsrate, chromosomale Instabilität, Aneuploidie, Reaktivierung der Transposons, mitotische Rekombination sowie der Verlust der Heterozygotie, und der Prägung und die Aktivierung der Protoonkogene. [KIM, 2007]

Viele in vitro, Human- und Tierstudien haben ergeben, dass die Auswirkung des Folatmangels auf die DNA Methylierung sehr komplex und unterschiedlich ist. Die Auswirkung hängt von dem betroffenen Gen, der Spezies, dem Zelltyp, dem Zielorgan, dem Transformationsstadium sowie der Dauer und dem Grad des Folatmangels ab. [KIM, 2004; KIM, 2005]

Die Folatsupplementierung wirkt der DNA Hypomethylierung entgegen. [KIM, 2007] In zahlreichen Tier- und Humanstudien zeigte die Folatzufuhr eine signifikante Erhöhung der genomischen und der gen-spezifischen DNA Methylierung (siehe Tabelle 6). [KIM, 2004; KIM, 2005]

Die Supplementierung mit 5-10mg Folsäure pro Tag für 3-12 Monate führte zu einer signifikanten Erhöhung der DNA Methylierung in den Kolonepithelzellen. [CRAVO et al, 1994; CRAVO et al, 1998; KIM et al, 2001] Auch die Supplementierung mit einer physiologischen Folsäuredosis von 400µg/Tag führte zur erhöhten DNA Methylierung in Lymphozyten (um 31%) und in Kolonepithelzellen (um 25%). [PUFULETE et al, 2005]

Studie	Subjekte (n)	Dosis	Dauer	Resultat
Kim et al, 2001	Adenome (n=20)	5mg/d	6 Monate und 1 Jahr	57% Steigerung der DNA Methylierung nach 6 Monaten, keine Veränderung nach 1 Jahr
Cravo et al, 1994	Kolonkarzinome oder Adenome (n=22)	10mg/d	6 Monate	93% Steigerung der DNA Methylierung
Cravo et al, 1998	Adenome (n=20)	5mg/d	3 Monate	37% Steigerung bei Pat. mit einem Adenom
Khosraviani et al, 2002	Adenome (n=11)	2mg/d	3 Monate	20% Senkung der Proliferation der Epithelzellen
Nagothu et al, 2003	Adenome (n=20)	1mg/d	1 Jahr	16% Senkung der Proliferation der Epithelzellen
Pufulete et al, 2005	Adenome (n=31)	400µg/d	10 Wochen	25% Steigerung der DNA Methylierung
Bruce et al,	Kolonkarzinome oder Adenome	3mg/d	28 Tage	Keine Veränderung

2005	(n=98)							
Biasco et al, 1997	Colitis ulcerosa (n=24)	15mg/d	3 Monate	44%	Senkung der Proliferation der Epithelzellen			
Paspatis und Karamanolis, 1994	Adenome (n=60)	1mg/d	2 Jahre	40 bzw. 46%	Rezidivreduktion im 1. bzw. 2. Jahr			

Tabelle 6: Zusammenfassung der randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten, klinischen Studien über den Folateinfluss auf die DNA Methylierung und die Zellproliferation. [modifiziert nach KIM, 2007]

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nach dem heutigen Wissenstand die Folatsupplementierung im Stande ist, die bereits bestehende genomische Hypomethylierung rückgängig zu machen, sowie den Methylierungsgrad zu erhöhen. [KIM, 2004; KIM, 2005]

Die Hypermethylierung von den CG Inseln in Genpromotoren ist ein wichtiger Mechanismus der Genstilllegung in der Karzinogenese. [GROENBAEK et al, 2007] Viele der inaktivierten Gene sind die Tumorsuppressorgene oder die Gene, die wichtige Rollen in der Zellzykluskontrolle, der DNA Reparatur, der Transkription, der Signaltransduktion, der Differenzierung, der Angiogenese und der Apoptose spielen. [HAMID, 2012; SHARMA et al, 2010] Der Folatmangel ist auch mit der Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen assoziiert. [DUTHIE, 2011b]

Einfluss des Folatmangels und der Folatsupplementierung auf kolorektale Präkanzerosen und Kanzerosen

In den rasch proliferierenden Krebszellen führt ein Mangel an Nahrungsfolaten zu einer ineffektiven DNA Synthese und hemmt dadurch das Tumorwachstum. Das ist auch die Grundidee der Zytostatikatherapie mit Folatanaloga (z.B. Methotrexat).

Die Folsäurezufuhr liefert den transformierten Zellen die Nukleotidvorstufen, die für das schnelle Wachstum und die Teilung benötigt werden. Außerdem könnte die Folatsupplementierung die Tumorprogression durch die Induktion der *de novo* Methylierung von Tumorsuppressorgenen fördern. [KIM, 2007]

Zusammenfassung

Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen dem Folatstatus und dem Risiko für die Entstehung des Kolonkarzinoms. [LY et al, 2012] Die Ergebnisse der in vitro, Human- und Tierstudien, weisen darauf hin, dass das Folat eine Doppelrolle in der Kolonkarzinogenese haben könnte, abhängig von der Dosierung, der Dauer der Folat-Supplementierung bzw. des Folatmangels und dem Gewebszustand (gesund oder maligne). Während eine mäßige Folsäuresupplementierung die Entstehung von Krebs in gesundem Gewebe hemmt, können sehr hohe Folsäuredosen die Progression von Adenomen zu Karzinomen und das Tumorwachstum begünstigen. Im gesunden Gewebe kann ein niedriger Folatstatus die neoplastische Transformation begünstigen, und in den rasch proliferierenden Krebszellen führt ein Mangel zur ineffektiven DNA Synthese und hemmt dadurch das Tumorwachstum [KIM, 2007]

8.2 Folate und Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Die Atherosklerose ist eine chronische Krankheit großer und mittelgroßer Arterien. Sie ist durch die Akkumulation von Cholesterin in der Arterienwand, begleitet von der Entzündungsreaktion, der Migration und der Proliferation der glatten Muskelzellen und der Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten gekennzeichnet, die zu Gefäßverschlüssen, Herzinfarkten, Schlaganfällen und Aneurysmen führen. [HILTUNEN et al, 2002; LUND et al, 2004; TURUNEN et al, 2009]

Zu den Risikofaktoren der Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören Alter, Rauchen, Übergewicht, Stress, Bewegungsmangel, Hypertonie, erhöhte Blutfette und Cholesterin. Die Hyperhomocysteinämie ist auch mit erhöhtem Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004]

Die ersten Hinweise für einen Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinwerten im Plasma und erhöhtem Risiko für die Herz-Kreislauf-Erkrankungen wurden bei den Homocystinurie-Patienten entdeckt. Die angeborene Stoffwechselkrankheit ist durch Atherosklerose, Thrombosen und Schlaganfälle, die bereits in frühen Jahren auftreten, gekennzeichnet. [MCCULLY, 1969]

Inzwischen konnte der Zusammenhang zwischen den erhöhten Homocysteinwerten und dem erhöhten CVD-Risiko durch verschiedene Studien bestätigt werden. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004] In der Physicians' Health Study wurden bei 14916 untersuchten Männern im Laufe von 5 Jahren 271 Herzinfarkte diagnostiziert. Etwa 7% der Infarkte konnten auf die erhöhte Homocysteinwerte zurückgeführt werden. [STAMPFER et al, 1992] In der BUPA Studie wurden die Homocysteinwerte von mehr als 21000 Teilnehmern analysiert. Die Homocysteinwerte waren bei den Männern, die an Herzinfarkt verstorben sind, signifikant höher als bei den gesunden Männern. [WALD et al, 1998]

Da die Folate und andere B Vitamine in den Homocysteinstoffwechsel involviert sind, bestand die Annahme, dass sie das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen

durch Senkung des Homocysteinspiegels reduzieren können. [CLARKE et al, 2010; RIMM et al, 1998] In den Beobachtungsstudien konnte diese Annahme bestätigt werden.

In der Nurses' Health Study wurden über 80000 amerikanische Frauen 14 Jahre lang regelmäßig über ihre Ernährungsgewohnheiten und ihre Gesundheit befragt. Die Datenauswertung ergab, dass Frauen, die regelmäßig Multivitaminpräparate konsumierten oder sich folatreich ernährten, ein niedrigeres Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung aufwiesen. [RIMM et al, 1998] Yang et al. haben in ihrer Studie die Schlaganfall-Mortalität in den USA und Kanada mit der Schlaganfall-Mortalität in England und Wales, Ländern ohne vorgeschriebene Folatanreicherung, zwischen 1990 und 2002 verglichen. Die obligatorische Folatanreicherung hat zur Verbesserung der Schlaganfall-Mortalität in Nordamerika geführt. [YANG et al, 2006]

Trotz den Ergebnissen aus den Beobachtungsstudien, konnte in einigen großen Interventionsstudien durch die Einnahme von Folsäure, Vitamin B₆ und/oder B₁₂ der Homocysteinspiegel, nicht aber das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen gesenkt werden (siehe Tabelle 7). [ALBERT et al, 2008; CLARKE et al, 2010; HUANG et al, 2012; LONN et al, 2006]

In der Vitamin Intervention for Stroke Prevention Studie wurde den Schlaganfallpatienten ein Cocktail aus Folsäure und Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ verabreicht. In den nächsten 2 Jahren wurde eine Senkung des Homocysteinspiegels festgestellt, die Behandlung hatte aber keinen signifikanten Effekt auf das Gefäßsystem. [TOOLE et al, 2004]

Die NORVIT Studie, an der 3749 Patienten mit akutem Myokardinfarkt teilgenommen haben, untersuchte die Effizienz der homocysteinsenkenden Therapie mit B-Vitaminen im Rahmen der Sekundärprävention. Die Einnahme von Folsäure und Vitamin B₁₂ Supplementen senkte den Serumhomocysteinspiegel um 27%. Allerdings zeigte die Behandlung nach 40 Monaten keine signifikante Risikoreduktion für einen erneuten Infarkt oder Schlaganfall. Die Patienten, die Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ genommen haben, hatten 22% Steigerung

des relativen Risikos für ein weiteres Ereignis. [BONAA et al, 2006] Im Rahmen von der Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Studie wurden 5522 Patienten, die älter als 55 Jahre waren und an Diabetes oder an kardiovaskulären Erkrankungen gelitten haben, rekrutiert. Etwa 70% der Probanden stammten aus Ländern mit der Folsäureanreicherung von Lebensmitteln. Die Patienten bekamen entweder 2,5 mg Folsäure, 50 mg Vitamin B₆ und 1 mg Vitamin B₁₂ oder das Placebo fünf Jahre lang. Durch die Behandlung mit den B Vitaminen wurde der Homocysteinspiegel signifikant reduziert. Das Risiko für die Herz-Kreislauf-Erkrankung konnte dadurch nicht gesenkt werden. Allerdings hat die Supplementierung das Schlaganfall-Risiko signifikant reduziert. [LONN et al, 2006] An der Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Studie haben mehr als 5000 amerikanische Frauen, älter als 42 Jahre und mit vorbestehender Gefäßerkrankung, teilgenommen. Die Patientinnen haben entweder 2,5 mg Folsäure, 50 mg Vitamin B₆ und 1 mg Vitamin B₁₂ oder das Placebo über sieben Jahre eingenommen. Obwohl durch die Supplementierung die Homocystein-Konzentration im Plasma signifikant reduziert wurde, konnte keine Senkung des Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen festgestellt werden. [ALBERT et al, 2008] Der Western Norway B Vitamin Intervention Trial (WENBIT) untersuchte den Effekt von Folsäure und Vitamin B₁₂ bzw. den Effekt von Vitamin B₆ auf die Patienten mit KHK. Nach 38 Monaten zeigte die Behandlung mit Folsäure und Vitamin B₁₂ bzw. Vitamin B₆ keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtmortalität oder auf die kardiovaskuläre Erkrankung. [EBBING et al, 2008]

Die Meta-Analyse von Wang hat die Effizienz der Folsäuresupplemente in der Prävention von Schlaganfällen untersucht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Supplementierung mit Folsäure das Schlaganfallrisiko um 18% senkt. [WANG et al, 2007] Eine kürzlich erschienene Meta-Analyse mit 47921 Probanden hat ergeben, dass die B-Vitamin-Supplementation keinen Einfluss auf das Risiko für die kardiovaskulären Erkrankungen, den Myokardinfarkt oder die Gesamtmortalität hat. Das Schlaganfallrisiko konnte durch die Supplemente um 12% gesenkt werden. [HUANG et al, 2012]

Autoren, Versuch, Land	Versuchsteilnehmer	Behandlung (mg/d)	Resultat/ Zusammenfassung
Toole et al; VISP; Kanada, Schottland, USA	Patienten (3680) mit zerebralem Insult	2,5 FA, 0,6 B ₁₂ , 25 B ₆ oder 0,02 FA, 0,006 B ₁₂ , 0,2 B ₆ für 2 Jahre	RR 1,0 Kein Effekt auf Gefäßerkrankungen
Lonn et al; HOPE 2; Kanada, USA, Brazil, Westeuropa, Slowakei	Patienten (5522) mit Gefäßerkrankung oder Diabetes	2,5 FA, 50 B ₆ , 1 B ₁₂ oder Placebo für 5 Jahre	RR 0,95 Keine Risikoreduktion für Tod infolge von CVD
Bonaa et al; NORVIT; Norwegen	Patienten (3749) mit akutem Herzinfarkt	0,8 FA, 0,4 B ₁₂ , 40 B ₆ oder 0,8 FA, 0,4 B ₁₂ oder 40 B ₆ oder Placebo für 40 Monate	RR 1,22 für FA, B ₁₂ , B ₆ RR 1,08 für FA, B ₁₂ RR 1,14 für B ₆ Keine Risikoreduktion für Insult, Herzinfarkt oder plötzlichen Tod
Ebbing et al; WENBIT; Norwegen	Patienten (3096) mit KHK	0,8 FA, 0,4 B ₁₂ , 40 B ₆ oder 0,8 FA, 0,4 B ₁₂ oder 40 B ₆ oder Placebo für 38 Monate	HR 1,09 für FA, B ₁₂ HR 0,9 für B ₆ Kein Effekt auf Gesamtmortalität oder CVD
Albert et al; WAFACS; USA	Frauen mit CVD-Vorgeschichte (5442)	2,5 FA, 1 B ₁₂ , 50 B ₆ oder Placebo für 7,3 Jahre	RR 1,03 (95% CI 0,9; 1,19) Keine Reduktion von Insult, Herzinfarkt oder CVD Mortalität
Die VITATOPS Studiengruppe 2010; VITATOPS; 20 Länder	Patienten (8164) mit zerebralem Insult	2 FA, 0,5 B ₁₂ , 25 B ₆ oder Placebo für 3,4 Jahre	RR 0,91 (95% CI 0,82; 1,0) Keine signifikante Reduktion von Insult, Herzinfarkt oder Mortalität

Tabelle 7: Randomisierte klinische Studien über Homocysteinsenkung und kardiovaskuläre Erkrankungen. FA= Folsäure; RR= relative Risiko; HR= hazard ratio, CVD= kardiovaskuläre Erkrankung [MCNULTY et al, 2012]

Der MTHFR C677T Polymorphismus

Der häufigste genetische Defekt, der mit einer moderaten Hyperhomocysteinämie assoziiert ist, ist der MTHFR C677T Polymorphismus. Der Austausch von Cytosin durch Thymin ist mit einer verminderten Enzymaktivität und einer erhöhten Thermolabilität des Enzyms assoziiert. [CIACCIO und BELLIA, 2010] Bei ausreichender Versorgung mit Folat ist die verminderte Enzymaktivität jedoch bedeutungslos. Liegt ein Folatmangel vor, ist die Enzymaktivität bei den homozygoten Merkmalsträgern (TT Genotyp) um 25% vermindert und der Homocysteinspiegel um 20% erhöht. Die Prävalenz des TT Genotyps liegt bei 10%. [WALD et al, 2002]

Die Meta- Analyse von Wald et al. hat ergeben, dass der MTHFR 677 TT Genotyp ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (zwischen 16-25%) hat, verglichen mit Personen ohne den Polymorphismus. [WALD et al, 2002] Dieser Effekt war größer in Ländern mit einem niedrigen Folatstatus, nicht aber in Nordamerika. [MCNULTY et al, 2012]

Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit fast 60000 Probanden hat gezeigt, dass der Zusammenhang zwischen dem MTHFR 677 TT Genotyp und dem zerebralen Insult nur in Ländern mit niedrigem Folatstatus offensichtlich war. In den Ländern mit obligatorischer Folsäureanreicherung war dieser Effekt gleich null. [HOLMES et al, 2011]

Mechanismus

Die DNA Methylierungsmustern werden nach der Replikation durch die DNA Methyltransferasen erhalten. Als Methylgruppendonor fungiert das S-Adenosylmethionin (SAM). [JELTSCH, 2002] Nach der Übertragung der Methylgruppe entsteht aus SAM S-Adenosylhomocystein (SAH). [KIM, 2004] SAH wird anschließend zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert (siehe Abb. 20). [CLARKE und BANFIELD, 2001] Diese Reaktion ist reversibel, und das Reaktionsgleichgewicht liegt auf der Seite von SAH. Aus diesem Grund ist es

wichtig, dass Homocystein und Adenosin schnell verstoffwechselt werden. [CASTRO et al, 2003] Bei Folat- und B₁₂-Mangel steigen Homocystein und SAH im Plasma und in den Zellen an, während die SAM Konzentration sinkt. [ZAINA et al, 2005] SAH hat eine höhere Affinität zu Methyltransferasen als SAM und hemmt die Methylierungsreaktion der DNA, der Histone und anderer Proteine. [HAMID, 2012] Castro et al. haben gezeigt, dass die Konzentrationen von Homocystein und SAH im Plasma von Patienten mit Gefäßkrankheiten verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Zusätzlich korrelierte der Homocysteinspiegel mit der globalen DNA Hypomethylierung. [CASTRO et al, 2003]

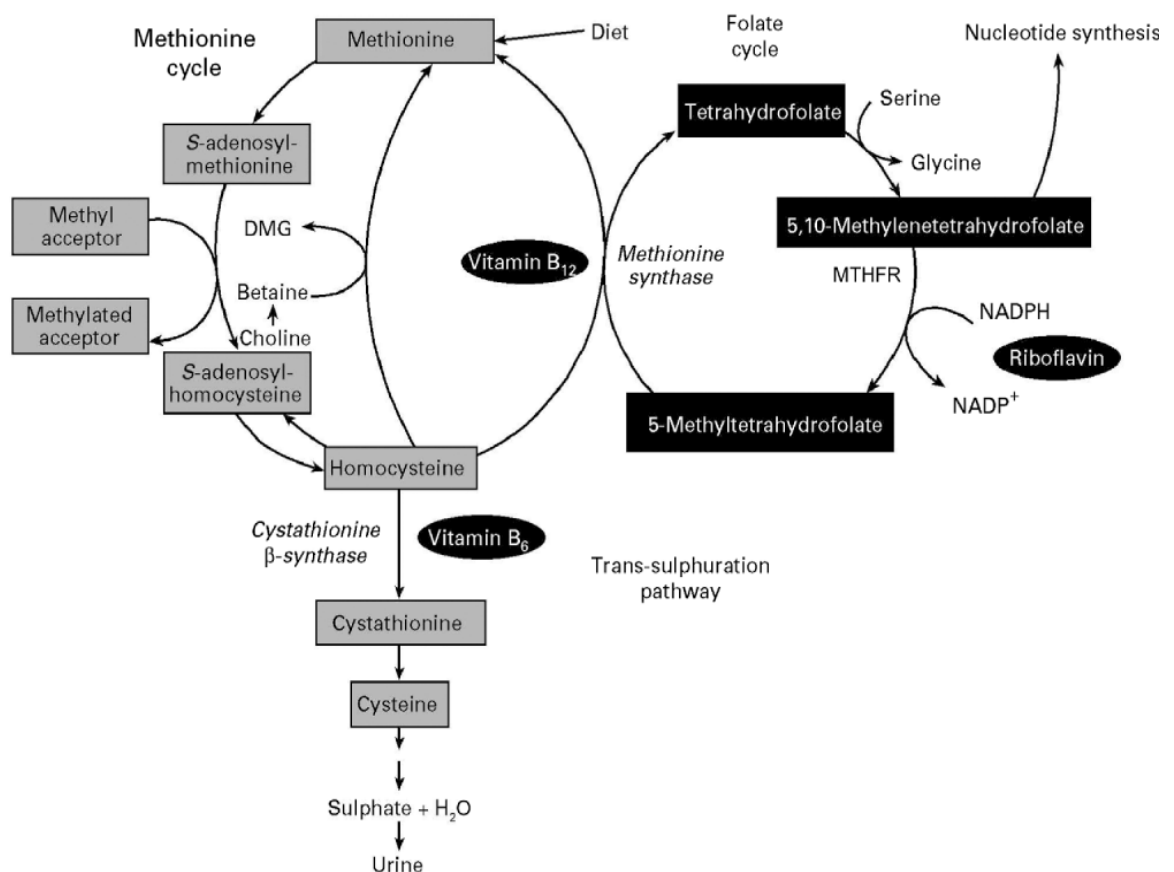


Abbildung 20: Homocysteinestoffwechsel. MTHFR=Methylenetetrahydrofolatreduktase, DMG=Dimethylglycin, [MCNULTY et al, 2012]

Die DNA Hypomethylierung ist mit der genomischen Instabilität, sowie der Aktivierung von Protoonkogenen assoziiert. [KIM, 2007] Dadurch wird die Entstehung von den Karzinomen und der Atherosklerose begünstigt. [ZAINA et al, 2005] Während der Atherogenese transformieren die glatten Muskelzellen (SMC) in der Gefäßwand von den kontraktile zu den proliferierenden Zellen. Bei der Proliferation wandern die transformierten Zellen in die Intima ein, wo sie sich teilen. [TURUNEN et al, 2009] Die Überexpression der Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) und der Onkogene wie etwa c-myc und p53 fördert die Proliferation glatter Muskelzellen und die Plaquebildung. [DUTHIE, 2011a]

In arteriosklerotischen Plaques und Leukozyten wurde eine signifikante Reduktion des methylierten Cytosins nachgewiesen. Die Hypomethylierung war mit der Überexpression des Wachstumsfaktors PDGF-B assoziiert. [HILTUNEN et al, 2002] Lund et al. konnten in einem Mausmodell nachweisen, dass die Änderung der DNA Methylierung (Hypo- und Hypermethylierung) bereits in dem Frühstadium der Atherogenese stattgefunden hat. Mit dem fortgeschrittenen Alter nahm die DNA Hypomethylierung in den Blutzellen und den Gefäßzellen zu. [LUND et al, 2004] Der Promotor des Östrogenrezeptors α (bremst die Zellproliferation) ist bei den Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose hypermethyliert. [POST et al, 1999] Die Hypermethylierung des Östrogenrezeptor α Promotors ist mit der Transformation der glatten Muskelzellen verbunden. [DUTHIE, 2011a] Kim et al. haben in ihrer Studie gezeigt, dass die Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit der DNA Hypermethylierung in den Leukozyten assoziiert war. [KIM et al, 2010]

Zusammenfassung

Aufgrund bisheriger Studienergebnisse sollte die Hyperhomocysteinämie nur als Marker und nicht als Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen betrachtet werden, da die molekularen Mechanismen noch unklar sind [CIACCIO und BELLIA, 2010] und da es kaum eindeutige Hinweise dafür gibt, dass die Folsäure alleine oder in Kombination mit anderen B-Vitaminen das Risiko für die Herz-

Kreislauf-Erkrankung signifikant senkt. [ALBERT et al, 2008; CLARKE et al, 2010; HUANG et al, 2012] Da in mehreren Studien eine signifikante Risikoreduktion für Schlaganfälle durch die Folsäure nachgewiesen wurde, könnte sie in der Primärprävention von Schlaganfällen angewendet werden. [HUANG et al, 2012; WANG et al, 2007]

8.3 Folsäure und Schwangerschaft

Das Folat ist essentiell für das fetale Wachstum und deren Entwicklung. [TAMURA und PICCIANO, 2006] Eine angemessene Folatzufuhr während der Schwangerschaft, der Stillzeit und der Kindheit ist wichtig für die Gesundheit sowohl der Mutter als auch des Kindes. Ein Folatmangel in der Schwangerschaft ist mit Neuralrohrdefekten, Plazentaablösung, Frühgeburten und niedrigem Geburtsgewicht des Kindes verbunden. Die Folate sind wichtige Kofaktoren der DNA Synthese und spielen dadurch eine wichtige Rolle für das schnelle Zellwachstum. [LAMERS, 2011] In der Schwangerschaft steigt der Folatbedarf aufgrund des Wachstums des Fötus und der Plazenta, der Uterusvergrößerung und der Expansion des maternalen Plasmavolumens an. [LAMERS, 2011; TAMURA und PICCIANO, 2006]

Neuralrohrdefekte (NRD)

Der Verschluss der Neuralplatte zu einem Neuralrohr erfolgt am Tag 21.-28. nach der Befruchtung. Bei Störungen des Verschlusses entstehen verschiedene Defekte des Zentralnervensystems, die man als Neuralrohrdefekte bezeichnet. Je nach Lage des Defekts (kranial oder kaudal) kann man zwei Hauptformen unterscheiden. Der wichtigste kraniale Neuralrohrdefekt ist die Anenzephalie, die mit Fehlbildung des Gehirns und der Schädeldecke einhergeht und immer letal endet. [PITKIN, 2007] Die Anenzephalie führt zum Abort oder zum Tod kurz nach der Geburt. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004] Der häufigste kaudale Defekt ist die Spina bifida (inklusive Meningocele und Meningomyelocele), ein Defekt in der

lumbosakralen Region mit offener Wirbelsäule. Sie ist meist mit Querschnittslähmung und anderen schweren körperlichen Behinderungen assoziiert.

Die Häufigkeit von Neuralrohrdefekten ist abhängig von der geografischen Lage, dem sozioökonomischen Status und der ethnischen Zugehörigkeit. [PITKIN, 2007] Die Inzidenz von Neuralrohrdefekten in Nordamerika liegt zwischen 0,5 und 4,0 pro 1000 Geburten. [WILSON et al, 2007] In Ländern mit Folsäureanreicherung von Grundnahrungsmitteln wurde eine deutliche Abnahme von Neuralrohrdefekten beobachtet. In den USA sank die NRD Inzidenz seit 1998 um 25-30%. [PITKIN, 2007] Die Inzidenz von Neuralrohrdefekten in Österreich ist nicht bekannt, da kein spezielles Erfassungssystem existiert. Für die Steiermark wird eine NRD-Gesamtprävalenz (1985-1999) von 7,95 auf 10000 Geburten angegeben. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Die genauen Ursachen für die Entstehung von Neuralrohrdefekten sind noch immer unbekannt. Es besteht die Vermutung, dass die genetischen und die Umweltfaktoren dabei eine große Rolle spielen könnten. [PITKIN, 2007] Die hohe Wiederholungswahrscheinlichkeit bei Frauen, die bereits ein krankes Kind hatten, spricht für eine genetische Ursache. Für die Umweltfaktoren sprechen geografische und zeitliche Unterschiede, sowie der Zusammenhang mit dem sozioökonomischen Status. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Der Zusammenhang zwischen den Folaten und den Neuralrohrdefekten wurde bereits vor 50 Jahren erkannt. [HIBBARD, 1964] Seitdem wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, die diesen Zusammenhang untersucht haben. [PITKIN, 2007]

In vier von fünf Fall-Kontroll-Studien konnte eine signifikante Risikoreduktion (35-75%) von NRD durch die perikonzeptionelle Folsäureeinnahme nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8). [BOWER und STANLEY, 1989; MULINARE et al, 1988; WERLER et al, 1993; SHAW et al, 1995] In einer Studie wurde kein Zusammenhang erkannt. [MILLS et al, 1989]

In der Tabelle 8 wurden mehrere Fall-Kontroll-Studien aufgelistet, die den Zusammenhang zwischen der Folsäureeinnahme und dem NRD-Risiko untersucht haben:

Autoren	Behandlung	NRD Reduktion (%)
Mulinare et al, 1988	MV + FA 0,8 mg	-60
Bower und Stanley, 1989	Nahrungsfolate + MV + FA 0,8 mg	-75
Mills et al, 1989	Nahrungsfolate + MV + FA 0,8 mg	Keine
Werler et al, 1993	MV + FA 0,4 mg	-40
Shaw et al, 1995	FA	-35

Tabelle 8: Zusammenfassung der Fall-Kontroll-Studien.
FA=Folsäure, MV=Multivitamine [modifiziert nach PITKIN, 2007]

In einer prospektiven, nicht randomisierten Studie wurden werdende Mütter befragt, ob sie folsäurehaltige Multivitaminpräparate eingenommen haben. Die Einnahme von Folsäure in den ersten sechs Schwangerschaftswochen war mit einer Risikoreduktion um 70% assoziiert. Die Folsäureeinnahme ab der 7. Schwangerschaftswoche zeigte keinen Effekt. [MILUNSKY et al, 1989]

An der Medical Research Council Study haben 1817 Frauen teilgenommen, die bereits ein Kind mit dem NRD gehabt haben. Die Probandinnen haben täglich 4mg Folsäure oder Placebo eingenommen. Von den 593 Frauen, die Folsäure erhalten haben, haben 6 ein Kind mit NRD geboren, verglichen mit 21 in der Kontrollgruppe (692 Frauen). Das Risiko erneut ein Kind mit Neuralrohrdefekt zu bekommen wurde durch die Folsäuresupplemente um 72% reduziert. Bei den Probandinnen, die mit der Folsäureeinnahme vor der Konzeption angefangen haben, war das Risiko um 82% niedriger. [MRC Vitamin Research Group, 1991]

Czeizel und Dudas haben 1992 haben im Rahmen des Ungarischen Familienplanungsprogramms eine große Studie mit fast 5000 Schwangeren durchgeführt. Keine der 2104 Frauen, die ein Multivitaminpräparat mit 0,8 mg Folsäure eingenommen haben, hat ein Kind mit Neuralrohrdefekt bekommen. Von den 2052 Frauen, die ein Präparat mit Spurenelementen und ohne Folsäure bekommen haben, haben sechs Frauen ein Kind mit NRD geboren. Damit konnte gezeigt werden, dass die perikonzeptionelle Folsäureeinnahme das Neuralrohrdefekt-Risiko senkt. [CZEIZEL und DUDAS, 1992]

In Nordchina, einer Region mit hoher NRD-Inzidenz, führte die Folsäuresupplementierung (0,4 mg/Tag) zur Risikoreduktion der Neuralrohrdefekte um 80%. In Südchina sank das Risiko um 40%. [BERRY et al, 1999]

Zur Senkung des Neuralrohrdefekt-Risikos sollen Frauen, die schwanger werden wollen, zu den empfohlenen 600µg FÄ zusätzlich 400µg Folatäquivalente/Tag einnehmen. [D-A-CH, 2012] Frauen, die bereits ein Kind mit Neuralrohrdefekt bekommen haben, sollten zusätzlich 4 mg Folsäure pro Tag einnehmen. [LAMERS, 2011] Mit der erhöhten Folatzufuhr sollte man mindestens einen Monat vor dem Schwangerschaftsbeginn beginnen und bis zum Ende des dritten Schwangerschaftsmonat fortsetzen. [D-A-CH, 2012] Nach wissenschaftlichen Schätzungen wurde eine ausreichende Folatzufuhr in der Schwangerschaft das Auftreten von Neuralrohrdefekten bei Säuglingen um 50-60% senken. [PITKIN, 2007]

Angeborene Herzfehler

Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass durch die Einnahme von folsäurehaltigen Multivitaminpräparaten das Risiko für angeborene Herzfehler minimiert werden kann. [KOLETZKO und PIETRZIK, 2004] In ihrer Studie fanden Czeizel und Dudas eine signifikante Reduktion der angeborenen Herzfehlern bei den Kindern dessen Mütter Folsäuresupplemente bekommen haben. [CZEIZEL

und DUDAS, 1992; CZEIZEL, 1996] Die Beobachtungsstudien aus den USA ergaben, dass die Einnahme von Multivitaminpräparaten oder eine erhöhte Folatezufuhr das Missbildungsrisiko um 30-60% senken konnte. [SHAW et al, 1995; BOTTO et al, 2000] In der Atlanta Birth Defects Case-Control Study, einer Fall-Kontroll-Studie, wurden Daten über Neugeborene (geboren zwischen 1968 und 1980) mit Geburtsfehlern gesammelt. Botto und Kollegen haben diese Daten analysiert und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass Frauen, die die perikonzeptionelle folsäurehaltige Multivitaminpräparate eingenommen haben, seltener Kinder mit Herzfehler (- 24 %) bekommen haben. [BOTTO et al, 2000]

Die bisherigen Studien hatten eine kleine Probandenanzahl und somit ist die statistische Aussagekraft über den Zusammenhang zwischen dem veränderten Folatmetabolismus und den angeborenen Herzfehlern schwach. [TAMURA und PICCIANO, 2006]

Weitere Fehlbildungen

Die Folsäure-Supplementierung scheint das mittlere Gestationsalter zu verlängern und das Risiko der Frühgeburt zu senken. [CZEIZEL et al, 2010] Es gibt auch Hinweise, dass die folsäurehaltigen Multivitaminpräparate mit einer Risikoreduktion für Fehlbildungen der ableitenden Harnwege, der Gliedmaßen, des Hydrozephalus und der Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten in Verbindung stehen. [CZEIZEL, 1996; KOLETZKO und PIETRZIK, 2004; WILSON et al, 2007] Allerdings sind die Untersuchungsergebnisse widersprüchlich. [INSTITUTE OF MEDICINE, 1998]

Es werden weitere Untersuchungen benötigt, um zu verstehen inwieweit der Folsäurekonsum der Mutter die kindliche Gesundheit beeinflusst. [PITKIN, 2007]

9 SCHLUSSBETRACHTUNG

Die DNA Methylierung gehört zu den wichtigsten epigenetischen Modifikationen. Sie ist essentiell für die Zellentwicklung und die Zelldifferenzierung. [HERMANN et al, 2004] Eine Störung der Methylierung oder der Demethylierung des Genoms kann zu verschiedenen Krankheiten und Entwicklungsstörungen führen. [JONES und TAKAI, 2001]

Die DNA Methylierung hat mehrere wichtige Aufgaben in der Eukaryotenzelle: die Unterdrückung der Genexpression, die Regulation der zellulären Differenzierung und der Entwicklung, die X-Chromosom Inaktivierung, die Erhaltung der chromosomalen Integrität, die genomische Prägung und die Inaktivierung der Transposons. [HERMANN et al, 2004]

Die Enzyme, die an der Methylierung beteiligt sind, werden DNA Methyltransferasen (Dnmt) genannt. Sie übertragen eine Methylgruppe von dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM oder AdoMet) auf das C5 Atom der Cytosinbase. Aus dem S-Adenosylmethionin entsteht S-Adenosyl-Homocystein (SAH). [JURKOWSKA et al, 2011]

Rein theoretisch kann jeder Nährstoff, der den SAM oder SAH Gehalt in der Zelle beeinflusst, die Methylierung der DNA und der Histone verändern. [CHOI und FRISO, 2010] In Tierversuchen mit den Agouti-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Ernährung die epigenetischen Muster verändert. [ANDERSON et al, 2012] Die Ernährung beeinflusst auch die DNA Methylierung bei Menschen. In einer Studie mit gesunden Probanden wurde durch eine langanhaltende, folatarme Diät die genomweite Hypomethylierung induziert, die durch eine Folatzufuhr umkehrbar war. [CHOI und MASON, 2000] Wie die Ernährung die Genexpression und die Krankheitsentstehung der Menschen beeinflusst, ist noch recht unklar. [DUTHIE, 2011a]

Die Synthese des S-Adenosylmethionin hängt von mehreren Mikronähstoffen (Folat, Cholin, Betain und Vitamin B₁₂) ab. [ANDERSON et al, 2012]

Die Folate sind essentielle Nährstoffe, die in höheren Konzentrationen im grünen Gemüse, Spargel, Bohnen, Leber, Milch, Vollkornprodukten und Zitrusfrüchten vorkommen. [LY et al, 2012] Die synthetisch hergestellte Folsäure und die Nahrungsfolate werden vom Körper unterschiedlich stark resorbiert [STANGER et al, 2003], und aus diesem Grund wird die Folataufnahme in Folatäquivalenten angegeben. 1µg Folatäquivalent (FÄ) entspricht 1µg Nahrungsfolat bzw. 0,5µg Folsäure. Die von der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung (ÖGE) empfohlene Tagesdosis für Erwachsene beträgt 400µg Folat-Äquivalente bzw. 600µg FÄ für Schwangere und Stillende. [D-A-CH, 2012]

Folate sind Kofaktoren bei der Methioninsynthese und beeinflussen dadurch die Synthese des Kofaktors der biologischen Methylierung, S-Adenosylmethionin. [CLARKE und BANFIELD, 2001] Zusätzlich fungieren Folate als Koenzyme bei der *de novo* Purin- und Pyrimidinbiosynthese und sind somit essentiell für die DNA und RNA-Synthese. [CHOI und MASON, 2000]

Der Folatmangel beeinflusst die DNA Synthese und die Zellteilung, was sich in einer megaloblastären Anämie und einer Hypersegmentierung neutrophiler Granulozyten äußert. [SUH et al, 2001] Ein Folatmangel in der Schwangerschaft ist mit Neuralrohrdefekten, Plazentaablösung, Frühgeburten und niedrigem Geburtsgewicht des Kindes verbunden. [LAMERS, 2011] Zur Senkung des Neuralrohrdefekt-Risikos sollen Frauen, die schwanger werden wollen, zu den empfohlenen 600µg FÄ zusätzlich 400µg Folatäquivalente pro Tag einnehmen. Die erhöhte Folatzufuhr sollte mindestens einen Monat vor dem Schwangerschaftsbeginn erfolgen und bis zum Ende des ersten Trimenons beibehalten werden. [D-A-CH, 2012]

Um Neuralrohrdefekte vorzubeugen wurde 1998 die gesetzlich verpflichtende Folsäure-Anreicherung von Mehl und Cerealien in Kanada und in den USA eingeführt. Die Folsäure-Anreicherung führte zu einer signifikanten Verbesserung des Folatstatus [PFEIFFER et al, 2005] und senkte die Prävalenz der

Neuralrohrdefekte um 15-50% in den Vereinigten Staaten und Kanada. [DUTHIE, 2011b] In Österreich hat es bis 2006 auch Pläne gegeben, die verpflichtende Folsäure-Anreicherung von Mehl einzuführen. Weil es Bedenken bezüglich der Sicherheit und Treffsicherheit der Maßnahme gibt, wurde die Entscheidung der österreichischen Regierung auf Eis gelegt. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008]

Der Folatmangel spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese mehrerer menschlichen Erkrankungen, wie Anämie, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neuralrohrdefekte, Frühgeburten, neuropsychiatrische Störungen und Krebs. Mit Ausnahme von Anämie und Neuralrohrdefekt ist der genaue Zusammenhang zwischen diesen Krankheiten und dem Folatstatus noch nicht geklärt. [LY et al, 2012]

Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen dem Folatstatus und dem Risiko für die Entstehung des Kolonkarzinoms. [LY et al, 2012] Während eine mäßige Folsäuresupplementierung die Entstehung von Krebs in gesundem Gewebe hemmt, können sehr hohe Folsäuredosen die Progression von Adenomen zu Karzinomen und das Tumorwachstum begünstigen. Im gesunden Gewebe kann ein niedriger Folatstatus die neoplastische Transformation begünstigen, und in den rasch proliferierenden Krebszellen führt ein Mangel zu einer ineffektiven DNA Synthese und hemmt dadurch das Tumorwachstum. Der genaue molekulare Mechanismus ist noch unklar und bedarf weiteren Untersuchungen. Außerdem müsste die effektive Folsäure-Dosierung zur Krebsprävention bei den Menschen noch ermittelt werden. Da die Folsäure die Progression von Präkanzerosen begünstigen kann, sollte eine routinemäßige Folsäureeinnahme zur Kolonkrebsprävention nicht empfohlen werden. [KIM, 2007]

Aufgrund bisheriger Studienergebnisse sollte die Hyperhomocysteinämie nicht als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen betrachtet werden, da die molekularen Mechanismen noch unklar sind [CIACCIO und BELLIA, 2010] und da es kaum Beweise gibt, dass die Folsäure alleine oder in Kombination mit anderen B-Vitaminen das Risiko für die Herz-Kreislauf-Erkrankung signifikant senkt. [ALBERT et al, 2008; CLARKE et al, 2010; HUANG et al, 2012] Da in mehreren

Studien eine signifikante Risikoreduktion für Schlaganfälle durch die Folsäure nachgewiesen wurde, könnte sie in der Primärprävention von Schlaganfällen angewendet werden. [HUANG et al, 2012; WANG et al, 2007]

Eine angemessene Folatzufuhr während der Schwangerschaft, der Stillzeit und der Kindheit ist wichtig für die Gesundheit sowohl der Mutter als auch des Kindes. [LAMERS, 2011] In zahlreichen Studien konnte eine signifikante Risikoreduktion von Neuralrohrdefekten durch die perikonzeptionelle Folsäureeinnahme nachgewiesen werden. Die genauen Ursachen für die Entstehung von Neuralrohrdefekten sind noch immer unbekannt. Es besteht die Vermutung, dass die genetischen und die Umweltfaktoren dabei eine große Rolle spielen könnten, wobei aber weitere Untersuchungen benötigt werden.

Der Mechanismus der Neuralrohrdefektentstehung und inwieweit das Folat diesen Mechanismus beeinflusst sind auch nicht ganz geklärt, und bedürfen weiterer Studien. Zusätzlich soll die Wirksamkeit der Nahrungsfolate, der folsäureangereicherten Lebensmittel und den Folsäuresupplemente untersucht werden. Bis jetzt haben die meisten Studien die Wirksamkeit von Folsäuresupplementen untersucht. [PITKIN, 2007]

Es gibt auch Hinweise, dass die folsäurehaltigen Multivitaminpräparate mit einer Risikoreduktion für Fehlbildungen der ableitenden Harnwege, der Gliedmaßen, des Herzens, des Hydrozephalus und der Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten in Verbindung stehen. [CZEIZEL, 1996; KOLETZKO und PIETRZIK, 2004; WILSON et al, 2007] Allerdings sind die Untersuchungsergebnisse widersprüchlich und die Anzahl der Studienteilnehmer war klein. [INSTITUTE OF MEDICINE, 1998]

Es werden weitere Untersuchungen benötigt, um zu verstehen inwieweit der Folsäurekonsum der Mutter die kindliche Gesundheit beeinflusst. [TAMURA und PICCIANO, 2006]

Derzeit besteht die Empfehlung nur für die Frauen, die planen schwanger zu werden, Folsäuresupplemente zur Prävention von Neuralrohrdefekten einzunehmen.

Da es keine eindeutigen Beweise gibt, dass eine erhöhte Folsäurezufuhr das Krebsrisiko und das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen senkt, sollte die Folsäure nicht zur Prävention dieser Erkrankungen empfohlen werden. [SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008] Es gibt zunehmende Hinweise zur potentiell schädigenden Auswirkungen der Folsäure-Supplementierung, wie einer Maskierung eines Vitamin B₁₂ Mangels und einem erhöhten Risiko für kognitive Beeinträchtigung der Älteren in Kombination mit niedrigem Vitamin B₁₂ Status. [LY et al, 2012]

10 ZUSAMMENFASSUNG

Die DNA Methylierung ist eine vererbare und reversible epigenetische Modifikation, die mit einer Genstilllegung assoziiert ist. In den Eukaryoten spielt die DNA Methylierung bei der X-Chromosom Inaktivierung, der Kontrolle der Genexpression, der genomischen Prägung, sowie der Zelldifferenzierung und der Zellentwicklung eine wichtige Rolle. Eine Fehlfunktion der DNA Methylierung kann zur Entwicklungsstörungen und zur Entstehung von Krankheiten wie Krebs führen.

An der Methylierungsreaktion der DNA sind spezifische Enzyme, die sogenannten DNA Methyltransferasen (Dnmts), und der Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) beteiligt. Die Enzyme katalysieren den Transfer der Methylgruppe vom Kofaktor auf die Cytosinbase. Es entstehen 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH).

Die Folate gehören zu den wasserlöslichen B Vitaminen, die in höheren Konzentrationen im grünen Gemüse, Spargel, Bohnen, Leber, Milch, Vollkornprodukten und Zitrusfrüchten vorkommen. Sie fungieren als Koenzyme bei der *de novo* Purin- und Pyrimidinbiosynthese und sind an der Methylierung von der DNA, der RNA und den Histonen beteiligt.

Der Folatmangel spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese mehrerer menschlichen Erkrankungen, wie Anämie, Herz-Kreislaufkrankungen, Neuralrohrdefekte, Früh-/Fehlgeburten, neuropsychiatrische Störungen und Krebs. Mit Ausnahme von Anämie und dem Neuralrohrdefekt ist der genaue Zusammenhang zwischen diesen Krankheiten und dem Folatstatus noch nicht aufgeklärt.

11 ABSTRACT

DNA methylation is a heritable and reversible epigenetic modification associated with gene silencing. It has many important functions in mammalian cells, such as repression of gene expression, X-chromosome inactivation in females, cellular differentiation and development, genomic imprinting and protection against repetitive DNA elements. Alterations in DNA methylation patterns are associated with developmental disorders, carcinogenesis and ageing.

The methylation of DNA requires specific enzymes called DNA methyltransferases and a methyl group donor, S-adenosyl-methionine (SAM or AdoMet). DNA methyltransferases catalyze the transfer of the methyl group from the methyl donor to the DNA bases.

Folate is an essential micronutrient and is found naturally in broccoli, citrus fruits, spinach, legumes, yeast, cereals, eggs, milk, meat and liver. Folate is involved in *de novo* nucleotide synthesis and in the synthesis of SAM, a methyl donor for biological methylation of DNA and histones.

Folate deficiency plays an important role in the development of several human diseases, including anemia, cardiovascular diseases, neural tube defects, preterm birth, cognitive disorders and cancer.

12 LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT et al, 2008

ALBERT CM, COOK NR, GAZIANO JM, ZAHARRIS E, MACFADYEN J, DANIELSON E, BURING JE, MANSON JE: Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. JAMA, 2008, 299(17), 2027-2036.

AMIR et al, 1999

AMIR RE, VAN DEN VEYVER IB, WAN M, TRAN CQ, FRANCKE U, ZOGHBI HY: Rett synrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2, Nature genetics, 1999, 23, 185-188.

ANDREEVA et al, 2012

ANDREEVA VA, TOUVIER M, KESSE-GUYOT E, JULIA C, GALAN P, HERCBERG S: B Vitamin and/or omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cancer: Ancillary Findings From the Supplementation With Folate, Vitamins B₆ and B₁₂, and/or Omega-3 Fatty Acids (SU.FOL.OM3) Randomized Trial, Archives of Internal Medicine, 2012, 172(7), 540-547.

ANDERSON et al, 2012

ANDERSON OS, SANT KE, DOLINOY DC: Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation, Journal of nutritional biochemistry, 2012, 23, 853-859.

BAESSLER et al, 1997

BÄSSLER KH, GOLLY T, LOEW D, PIETRZIK K: Vitamin-Lexikon, Gustav Fischer Verlag, Frankfurt am Main, 1997.

BARROS und OFFENBACHER, 2009

BARROS SP und OFFENBACHER S: Epigenetics: Connecting environment and genotype to phenotype and disease, Journal of dental research, 2009, 88, 400-408.

BERRY et al, 1999

BERRY RJ, LI Z, ERICKSON JD, LI S, MOORE CA, WANG H, MULINARE J, ZHAO P, WONG LY, GINDLER J, HONG SX, CORREA A: Prevention of neural tube defects with folic acid in China, The New England journal of medicine, 1999, 341, 1485-1490.

BESTOR, 2000

BESTOR TH: The DNA methyltransferases of mammals, Human Molecular Genetics, 2000, 9, 2395-2402.

BIRD, 2002

BIRD A: DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes and Development*, 2002, 16, 6-12.

BIASCO et al, 1997

BIASCO G, ZANNONI U, PAGANELLI GM, SANTUCCI R, GIONCHETTI P, RIVOLTA G, MINIERO R, PIRONI L, CALABRESE C, DI FEBO G, MIGLIOLI M: Folic acid supplementation and cell kinetics of rectal mucosa in patients with ulcerative colitis, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1997, 6, 469–471.

BONAA et al, 2006

BONAA KH, NJOLSTAD I, UELAND PM, SCHIRMER H, TVERDAL A, STEIGEN T, WANG H, NORDREHAUG JE, ARNESEN E, RASMUSSEN K: Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction, *The New England journal of medicine*, 2006, 354, 1578-1588.

BOTTO et al, 2000

BOTTO LD, MULINARE J und ERICKSON JD: Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use, *American journal of epidemiology*, 2000, 151, 878-884.

BOWER und STANLEY, 1989

BOWER C und STANLEY FJ: Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia, Medical Journal of Australia, 1989, 150, 613–9.

BRUCE et al, 2005

BRUCE WR, CIROCCO M, GIACCA A, KIM YI, MARCON N, MINKIN S: A pilot randomised controlled trial to reduce colorectal cancer risk markers associated with B-vitamin deficiency, insulin resistance and colonic inflammation, British Journal of Cancer, 2005, 93, 639–646.

CASTRO et al, 2003

CASTRO R, RIVERA I, STRUYS EA, JANSEN EEW, RAVASCO P, CAMILO ME, BLOM HJ, JAKOBS C, DE ALMEIDA IT: Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA Hypomethylation in vascular disease, Clinical chemistry, 2003, 49, 1292-1296.

CEDAR und BERGMAN, 2009

CEDAR H und BERGMAN Y: Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms, Nature reviews, 2009, 10, 295-304.

CEDAR und BERGMAN, 2012

CEDAR H und BERGMAN Y: Programming of DNA methylation patterns, Annual Review of Biochemistry, 2011, 81, 97-117.

CHANG et al, 2007

CHANG B, CHEN Y, ZHAO Y, BRUICK RK: JMJD6 is a histone arginine demethylase, Science, 2007, 318, 444-447.

CHEN et al, 2013

CHEN C-C, WANG K-Y, SHEN C-KJ: DNA 5-Methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases, Journal of biological chemistry, 2013.

CHENG, 1995

CHENG X: Structure and function of DNA Methyltransferases, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1995, 24, 193-318.

CHOI und FRISO, 2010

CHOI SW und FRISO S: Epigenetics: A new bridge between nutrition and health, Advanced nutrition, 2010, 1, 8-16.

CHOI und MASON, 2000

CHOI SW und MASON JB: Folate and carcinogenesis: an integrated scheme, Journal of nutrition, 2000, 130, 129-132.

CIACCIO und BELLIA, 2010

CIACCIO M und BELLIA C: Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: effect of vitamin supplementation in risk reduction, *Current clinical pharmacology*, 2010, 5, 30-36.

CLARKE und BANFIELD, 2001

CLARKE S und BANFIELD K: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases
In: *Homocysteine in health and disease*, (ed. by Carmel R, Jacobsen DW);
Cambridge University Press, 2001.

CLARKE et al, 2010

CLARKE R, HALSEY J, LEWINGTON S, LONN E, ARMITAGE J, MANSON JE, et al:
Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease,
cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials
involving 37485 individuals, *Archives of Internal Medicine*, 2010, 170, 1622-1631.

COLE et al, 2007

COLE BF, BARON JA, SANDLER RS, HAILE RW, AHNEN DJ, BRESAILER RS,
MCKEOWN-EYSEN G, SUMMERS RW, ROTHSTEIN RI, BURKE CA, SNOVER DC et
al: Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial,
JAMA, 2007, 297, 2351-2359.

CRAVO et al, 1994

CRAVO M, FIDALGO P, PEREIRA AD, GOUVEIA-OLIVEIRA A, CHAVES P, SELHUB J,
MASON JB, MIRA FC, LEITAO CN: DNA methylation as an intermediate biomarker

in colorectal cancer: Modulation by folic acid supplementation, *European Journal of Cancer Prevention*, 1994, 3, 473–479.

CRAVO et al, 1998

CRAVO ML, PINTO AG, CHAVEZ P, CRUZ JA, LAGE P, NOBRE LEITAO C, COSTA MIRA F: Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: Correlation with nutrient intake, *Clinical Nutrition*, 1998, 17, 45–49.

CZEIZEL, 1996

CZEIZEL AE: Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation, *American journal of medical genetics*, 1996, 62, 179-183.

CZEIZEL und DUDAS, 1992

CZEIZEL AE und DUDAS I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation, *New England Journal of Medicine*, 1992, 327, 1832–5.

CZEIZEL et al, 2010

CZEIZEL AE, PUHO EH, LANGMAR Z, ACS N, BANHIDY F: Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study, *European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*, 2010, 148, 135-140.

D-A-CH, 2012

D-A-CH (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Neuer Umschau-Buchverlag, Neustadt an der Weinstraße, 2012.

DOLINOY et al, 2007

DOLINOY DC, HUANG D, JIRTLE RL: Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA Hypomethylation in early development, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2007, 104, 13056-13061.

DONG et al, 2001

DONG A, YODER JA, ZHANG X, ZHOU L, BESTOR TH, CHENG X: Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. Nucleic Acids Res, 2001, 29, 439–448.

DUTHIE, 2011a

DUTHIE SJ: Nutrition and epigenetics, Epigenetic modifications and human pathologies: cancer and CVD, Proceedings of the nutrition society, 2010, 70, 47-56.

DUTHIE, 2011b

DUTHIE SJ: Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis, Journal of inherited metabolic disease, 2011, 34, 101-109.

EBBING et al, 2008

EBBING M, BLEIE O, UELAND PM, NORDREHAUG JE, NILSEN DW, VOLLSET SE, REFSUM H, PEDERSEN EK, NYGARD O: Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial, JAMA, 2008, 300, 795–804.

EBBING et al, 2009

EBBING M, BONAA KH, NYGARD O, ARNESEN E, UELAND PM, NORDREHAUG JE, RASMUSSEN K, NJOLSTAD I, REFSUM H, NILSEN DW, TVERDAL A, MEYER K, VOLLSET SE: Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B₁₂. JAMA, 2009, 302(19), 2119-2126.

ELMADFA, 2009

ELMADFA I: Folsäure in: Ernährungslehre. UTB, Stuttgart, 2009.

ELMADFA et al, 2012

ELMADFA I, HASENEGGER V, WAGNER K, PUTZ P, WEIDL NM, WOTTAWA D, KUEN T, SEIRINGER G, MEYER AL et al: Österreichischer Ernährungsbericht 2012. 1. Auflage, Wien, 2012.

FATEMI et al, 2001

FATEMI M, HERMANN A, PRADHAN S, JELTSCH A: The Activity of the Murine DNA Methyltransferase Dnmt1 is Controlled by Interaction of the Catalytic Domain with the N-terminal Part of the Enzyme Leading to an Allosteric Activation of the enzyme after binding to methylated DNA, Journal of molecular biology, 2001, 309, 1189-1199.

FATEMI et al, 2002

FATEMI M, HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A: Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA, European journal of biochemistry, 2002, 269, 4981-4984.

FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983

FEINBERG AP und VOGELSTEIN B: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, 1983, 301, 89–92.

FEINBERG und TYCKO, 2004

FEINBERG AP und TYCKO B: The history of cancer epigenetics, Nature reviews Cancer, 2004, 4, 1-11.

FIGUEIREDO et al, 2011

FIGUEIREDO JC, MOTT LA, GIOVANNUCCI E, WU K, COLE B, GRAINGE MJ, LOGAN RF, BARON JA: Folic acid and prevention of colorectal adenomas: a combined

analysis of randomized clinical trials, International Journal of Cancer, 2011, 129(1), 192-203.

FLYNN et al, 2003

FLYNN J, FANG JY, MIKOVITS JA, REICH NO: A Potent Cell-active Allosteric Inhibitor of Murine DNA Cytosine C5 Methyltransferase, Journal of biological chemistry, 2003, 278, 8238-8243.

FRAGA et al, 2005

FRAGA MF, BALLESTAR E, PAZ MF, ROPERO S, SETIEN F, BALLESTAR ML, HEINE-SUNER D, CIGUDOSA JC, URIOSTE M, BENITEZ J, BOIX-CHORNET M, SANCHEZ-AGUILERA A, LING C, CARLSSON E, POULSEN P, VAAG A, STEPHAN Z, SPECTOR TD, WU YZ, PLASS C, ESTELLER M: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005, 102, 10604–10609.

FUKS et al, 2003a

FUKS F, HURD PJ, DEPLUS R, KOUZARIDES T: The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase, Nucleic acids research, 2003, 31, 2305-2312.

FUKS et al, 2003b

FUKS F, HURD PJ, WOLF D, NAN X, BIRD AP, KOUZARIDES T: The Methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation, Journal of biological chemistry, 2003, 278, 4035-4040.

GIBSON et al, 2011

GIBSON TM, WEINSTEIN SJ, PFEIFFER RM, HOLLENBECK AR, SUBAR AF, SCHATZKIN A, MAYNE ST, STOLZENBER-SOLOMON R: Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 94(4), 1053-1062.

GIOVANNUCCI et al, 1998

GIOVANNUCCI E, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, HUNTER DJ, FUCHS C, ROSNER BA, SPEIZER FE, WILLETT WC: Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study, *Annals of Internal Medicine*, 1998, 129(7), 517-524.

GOLL und BESTOR, 2005

GOLL MG und BESTOR TH: Eukaryotic cytosine methyltransferases, *Annual review of biochemistry*, 2005, 74, 481-514.

GOLL et al, 2006

GOLL MG, KIRPEKAR F, MAGGERT KA, YODER JA, HSIEH CL, ZHANG X, GOLIC KG, JACOBSEN SE, BESTOR TH: Methylation of tRNA Asp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science*, 2006, 311, 395–398.

GOPALAKRISHNAN et al, 2008

GOPALAKRISHNAN S, VAN EMBURGH BO, ROBERTSON KD: DNA methylation in development and human disease, Mutation research, 2008, 647, 30-38.

GOWHER et al, 2005

GOWHER H, LIEBERT K, HERMANN A, XU G, JELTSCH A: Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L, Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(14), 13341-8.

GOWHER und JELTSCH, 2001

GOWHER H und JELTSCH A: Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG sites, Journal of Molecular Biology, 309, 1201–1208.

GOYAL et al, 2006

GOYAL R, REINHARDT R, JELTSCH A: Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase, Nucleic acids research, 2006, 34, 1182-1188.

GROENBAEK et al, 2007

GROENBAEK K, HOTHER C, JONES PA: Epigenetic changes in cancer, APMIS, 2007, 115, 1039-1059.

GYÖRGY et al, 2006

GYÖRGY B, TOTH E, TARCSA E, FALUS A, BUZAS EI: Citrullination: A posttranslational modification in health and disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38, 1662–1677.

HACKETT und SURANI, 2013

HACKETT JA und SURANI MA: DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle, *Philosophical transactions of the royal society b*, 2013, 368.

HAMID, 2012

HAMID A: Folate malabsorption and its influence on DNA methylation during cancer development, *DNA and cell biology*, 2012.

HATA et al, 2002

HATA K, OKANO M, LEI H, LI E: Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice, *Development*, 2002, 129, 1983–1993.

HERMANN et al, 2004

HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A: Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases, *Cellular and molecular life sciences*, 2004, 61, 2571–2587.

HIBBARD, 1964

HIBBARD BM: The role of folic acid in pregnancy, The Journal of obstetrics and gynecology of the British Commonwealth, 1964, 71, 529-542.

HILTUNEN et al, 2002

HILTUNEN MO, TURUNEN MP, HÄKKINEN TP, RUTANEN J, HEDMAN M, MÄKINEN K, TURUNEN AM, AALTO-SETÄLÄ K, YLÄ-HERTTUALA S: DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions, Vascular medicine, 2002, 7, 5-11.

HIRSCH et al, 2009

HIRSCH S, SANCHEZ H, ALBALA C, MAZA MP, BARRERA G, LEIVA L, BUNOUT D: Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid, European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2009, 21, 463-469.

HOLMES et al, 2011

HOLMES MV, NEWCOMBE P, HUBACEK JA, SOFAT R, RICKETTS SL, COOPER J, BRTELER MMB, BAUTISTA LE, SHARMA P, WHITTAKER JC, SMEETH L, FOWKES GR, ALGRA A et al: Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomized trials, Lancet, 2011, 378, 584-594.

HUANG et al, 2012

HUANG T, CHEN Y, YANG B, YANG J, WAHLQUIST ML, LI D: Meta-analysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality, *Clinical Nutrition*, 2012, 31(4), 448-454.

INSTITUTE OF MEDICINE, 1998

INSTITUTE OF MEDICINE; FOOD AND NUTRITION BOARD: Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Washington, DC, National Academy Press, 1998.

JABLONKA und LAMB, 2002

JABLONKA E und LAMB MJ: The changing concept of epigenetics, *Annals New York academy of sciences*, 2002, 981, 82-96.

JELTSCH, 2002

JELTSCH A: Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases, *Chembiochem*, 2002, 3, 274–293.

JELTSCH, 2010

JELTSCH A: Phylogeny of methylomes, *Science*, 2010, 328, 837–838.

JENUWEIN und ALLIS, 2001

JENUWEIN T und ALLIS CD: Translating the histone code, *Science*, 2001, 293, 1074-1080.

JONES und TAKAI, 2001

JONES PA und TAKAI D: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics, Science, 2001, 293, 1068-1070.

JURKOWSKA et al, 2011

JURKOWSKA RZ, JURKOWSKI TP, JELTSCH A: Structure and function of mammalian DNA methyltransferases, ChemBioChem, 2011, 12, 206-222.

JURKOWSKI et al, 2008

JURKOWSKI TP, MEUSBURGER M, PHALKE S, HELM M, NELLEN W, REUTER G, JELTSCH A: Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism, RNA, 2008, 14, 1663–1670.

JURKOWSKI und JELTSCH, 2011 a

JURKOWSKI TP und JELTSCH A: On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and Dnmt2, PlosOne, 2011, 6(11).

JURKOWSKI und JELTSCH, 2011 b

JURKOWSKI TP und JELTSCH A: Burning off DNA methylation: new evidence for oxygen-dependent DNA demethylation, ChemBioChem, 2011, 12, 2543-2545.

KHAVARI et al, 2010

KHAVARI DA, SEN GL, RINN JL: DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation, *Cell cycle*, 2010, 9, 3880-3883.

KHOSRAVIANI et al, 2002

KHOSRAVIANI K, WEIR HP, HAMILTON P, MOOREHEAD J, WILLIAMSON K: Effect of folate supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer, *Gut*, 2002, 51, 195 –199.

KIM et al, 2001

KIM YI, BAIK HW, FAWAZ K, KNOX T, LEE YM, NORTON R, LIBBY E, MASON JB: Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: A prospective, randomized trial, *American Journal of Gastroenterology*, 2001, 96, 184–195.

KIM, 2004

KIM YI: Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2004, 13, 511–519.

KIM, 2005

KIM YI: Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility, *The journal of nutrition*, 2005, 135, 2703-2709.

KIM, 2007

KIM YI: Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review, Molecular nutrition and food research, 2007, 51, 267-292.

KIM et al, 2010

KIM M, LONG TI, ARAKAWA K, WANG R, MIMI YC, LAIRD PW: DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk, Plos one, 2010, 5(3).

KLOSE und BIRD, 2006

KLOSE RJ und BIRD AP: Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, Trends in biochemical sciences, 2006, 31(2), 89-97.

KOLETZKO und PIETRZIK, 2004

KOLETZKO B und PIETRZIK K: Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr, Deutsches Ärzteblatt, 2004, 23, 1670-1681.

KOUZARIDES und BERGER, 2007

KOUZARIDES T und BERGER SL: Chromatin modification and their mechanism of action In: Epigenetics (Allis, Jenuwein, Reinberg, Hrsg). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2007.

KRIAUCIONIS und HEINTZ, 2009

KRIAUCIONIS S und HEINTZ N: The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain, *Science*, 2009, 324, 929–930.

KUCH, 2008

KUCH D: Synthese und Charakterisierung neuartiger Inhibitoren für die humane DNA Methyltransferase DNMT1, 2008.

LAMERS, 2011

LAMERS Y: Folate recommendations for pregnancy, lactation and infancy, *Annals of nutrition and metabolism*, 2011, 59, 32-37.

LEE et al, 2011

LEE JE, WILLETT WC, FUCHS CS, SMITH-WARNER SA, WU K, MA J, GIOVANNUCCI E: Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 93(4), 817-825.

LIN et al, 2002

LIN IG, HAN L, TAGHVA A, O'BRIEN LE, HSIEH CL: Murine *de novo* methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA *in vitro*, *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(3), 704–723.

LONN et al, 2006

LONN E, YUSUF S, ARNOLD MJ, SHERIDAN P, POGUE J, MICKS M, MCQUEEN MJ, PROBSTFIELD J, FODER G, HELD C, GENESE J JR: Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. New England Journal of Medicine, 2006, 354(15), 1567-1577.

LUGER et al, 1997

LUGER K, MAEDER AW, RICHMOND RK, SARGENT DF, RICHMOND TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, Nature, 1997, 389, 251-260.

LUND et al, 2004

LUND G, ANDERSSON L, LAURIA M, LINDHOLM M, FRAGA MF, VILLAR-GAREA A, BALLESTAR E, ESTELLER M, ZAINA S: DNA Methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E, The journal of biological chemistry, 2004, 279, 29147-29154.

LY et al, 2012

LY A, HOYT L, KIM YI: Folate and DNA methylation, Antioxidants and redox signaling, 2012, 17(2), 302-326.

MARGOT et al, 2003

MARGOT JB, EHRENHOFER-MURRAY AE, LEONHARDT H: Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family, BMC Molecular Biology, 2003, 4, 7.

MARTIN und ZHANG, 2005

MARTIN C und ZHANG Y: The diverse functions of histone lysine methylation, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6, 838-849.

MASON et al, 2007

MASON JB, DICKSTEIN A, JACQUES PF, HAGGARTY P, SELHUB J, DALLAL G, ROSENBERG IH: A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principals: a hypothesis, Cancer epidemiology, biomarkers and prevention, 2007, 16, 1325-1329.

MCCULLY, 1969

MCCULLY KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis, American Journal of Pathology, 1969, 56, 111–128.

MCNULTY et al, 2012

MCNULTY H, STRAIN JJ, PENTIEVA K, WARD M: Symposium 4: Vitamins, infectious and chronic disease during adulthood and aging: C1 metabolism and CVD outcomes in older adults, Proceedings of the Nutrition Society, 2012, 71, 213–221.

MEISSNER et al, 2008

MEISSNER A, MIKKELSEN TS, GU H, WERNIG M, HANNA J, SIVACHENKO A, ZHANG X, BERNSTEIN BE, NUSBAUM C, JAFFE DB, GNIRKE A, JAENISCH R, LANDER ES: Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells, *Nature*, 2008, 454, 766-770.

MILLS et al, 1989

MILLS JL, RHOADS GG, SIMPSON JL, et al: The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects, *New England Journal of Medicine*, 1989, 321, 430 – 435.

MILUNSKY et al, 1989

MILUNSKY A, JICK H, JICK SS, et al: Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects, *JAMA*, 1989, 262, 2847–2852.

MRC Vitamin Research Group, 1991

MRC Vitamin Research Group: Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study, *Lancet*, 1991, 338, 131–137.

MUELLER et al, 2010

MÜLLER S, JELTSCH A und NELLEN W: Struktur, Funktion und Evolution von Dnmt2, *BIOspektrum*, 2010, 16, 520-523.

MULINARE et al, 1988

MULINARE J, CORDERO JF, ERICKSON JD, BERRY RJ: Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects, JAMA 1988, 260, 3141–5.

NAGOTHU et al, 2003

NAGOTHU KK, JASZEWSKI R, MORAGODA L, RISHI AK, FINKEKAUER R, TOBI M, NAUMOFF JA, DHAR R, EHRINPREIS M, KUCUK O, MAJUMDAR AP: Folic acid mediated attenuation of loss of heterozygosity of DCC tumor suppressor gene in the colonic mucosa of patients with colorectal adenomas, Cancer Detection and Prevention, 2003, 27, 297–304.

OKANO et al, 1998

OKANO M, XIE S, LI E: Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, Nature Genetics, 1998, 19, 219–220.

PASPATIS und KARAMANOLIS, 1994

PASPATIS GA und KARAMANOLIS DG: Folate supplementation and adenomatous colonic polyps, Diseases of the Colon & Rectum, 1994, 37, 1340–1341.

PFEIFFER et al, 2005

PFEIFFER CM, CAUDILL SP, GUNTER EW, OSTERLOH J, SAMPSON EJ: Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortifikation: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000, The American journal of clinical nutrition, 2005, 82, 442-450.

PIETRZIK et al, 2008

PIETRZIK K, GOLLY I, LOEW D: Folsäure In: Handbuch Vitamine für Prophylaxe, Therapie und Beratung, Urban & Fischer Verlag, München, 2008.

PITKIN, 2007

PITKIN RM: Folate and neural tube defects, The American journal of clinical nutrition, 2007, 85, 285-288.

POST et al, 1999

POST WS, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, WILHIDE CC, HELDMAN AW, SUSSMAN MS, OUYANG P, MILLIKEN EE, ISSA JPJ: Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system, Cardiovascular research, 1999, 43, 985-991.

PUFULETE et al, 2005

PUFULETE M, AL-GHNANIEM R, KHUSHAL A, APPLEBY P, HARRIS N, GOUT S, EMERY PW, SANDERS TA: Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma, Gut; 2005, 54, 648-653.

QIN et al, 2011

QIN W, LEONHARDT H, PICHLER G: Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modification, *Nucleus*, 2011, 2, 392-402.

RAI et al, 2007

RAI K, CHIDESTER S, ZAVALA CV, MANOS EJ, JAMES SR, KARPf AR, JONES DA, CAIRNS BR: Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish, *Genes and Development*, 2007, 21, 261–266.

RADIMER et al, 2004

RADIMER K, BINDEWALD B, HUGHES J, ERVIN B, SWANSON C, PICCIANO MF: Dietary supplement use by US adults: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000, *American journal of epidemiology*, 2004, 160, 339-349.

REIK und WALTER, 2001

REIK W und WALTER J: Genomic imprinting: parental influence on the genome, *Nature reviews*, 2001, 2, 21-32.

RIMM et al, 1998

RIMM EB, WILLETT WC, HU FB, SAMPSON L, COLDITZ GA, MANSON JE, HENNEKENS C, STAMPFER MJ: Folate and Vitamin B6 From Diet and Supplements in Relation to Risk of Coronary Heart Disease Among Women, *JAMA*, 1998, 279, 359-364.

ROBERTSON, 2005

ROBERTSON KD: DNA methylation and human disease, Nature reviews, 2005, 6, 597-610.

RUSSO et al, 1996

RUSSO VEA, MARTIENSSEN RA, RIGGS AD: In: Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation (Russo, Martienssen, Riggs, Hsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1996.

SANTOS et al, 2005

SANTOS KF, MAZZOLA TN und CARVALHO HF: The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation, Brazilian journal of medical and biological research, 2005, 38, 1531-1541.

SCHAEFER und LYKO, 2009

SCHAEFER M und LYKO F: Solving the Dnmt2 enigma, Chromosoma, 2009, 119, 35–40.

SCHAEFER et al, 2010

SCHAEFER M, POLLEX T, HANNA K, TUORTO F, MEUSBURGER M, HELM M, LYKO F: RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage, Genes Development, 2010, 24, 1590–1595.

SCHILLER-FRUEHWIRT et al, 2008

SCHILLER-FRÜHWIRT I, JOHANSSON T, GÖBL M, REISELHUBER S, WILD C: Risiko und Nutzen von Folsäure-Anreicherung im Mehl in Österreich, HTA-Projektbericht 20, 2008.

SCHOELER, 2003

SCHOELER HR: Das Potential von Stammzellen, Naturwissenschaftliche Rundschau, 2003, 56, 525-539.

SEINSENBERGER et al, 2013

SEISENBERGER S, PEAT JR, HORE TA, SANTOS F, DEAN W, REIK W: Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers, Philosophical transactions of the royal society b, 2013, 368.

SHARMA et al, 2010

SHARMA S, KELLY TK, JONES PA: Epigenetics in cancer, Carcinogenesis, 2010, 31(1), 27-36.

SHAW et al, 1995

SHAW GM, SCHAFER D, VERLIE EM, MORLAND K, HARRIS JA: Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects, *Epidemiology*, 1995, 6, 219 –226.

SONG et al, 2012a

SONG J, TEPLOVA M, ISHIBE-MURAKAMI S, PATEL DJ: Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation, *Science*, 2012, 335, 709-712.

SONG et al, 2012b

SONG Y, MANSON JE, LEE IM, COOK NR, PAUL L, SELHUB J, GIOVANNUCCI E, ZHANG SM: Effect of combined folic Acid, vitamin B6, and vitamin B12 on colorectal adenoma. *Journal of National Cancer Institute*, 2012, 104(20), 1562-1575.

STAMPFER et al, 1992

STAMPFER MJ, MALINOW MR, WILLETT WC, NEWCOMER LM, UPSON B, ULLMANN D, TISHLER PV, HENNEKENS CH: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians, *JAMA*, 1992, 268(7), 877-81.

STANGER et al, 2003

STANGER O, HERMANN W, PIETRZIK K, FOWLER B, GEISEL J, DIERKES J, WEGER M: DACH-LIGA homocysteine (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-

vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2003, 41(11), 1392-403 2003

STANGER, 2010

STANGER O: Folsäure in: Klinische Ernährungsmedizin (Ledochowski, Hrsg.), Springer Verlag, Wien, 2010.

STRAHL und ALLIS, 2000

STRAHL BD und ALLIS CD: The language of covalent histone modifications, Nature, 2000, 403, 41-45.

SUH et al, 2001

SUH JR, HERBIG AK, STOVER PJ: New perspectives on folate catabolism, Annual review on nutrition, 2001, 21, 255-282.

SUZUKI und BIRD, 2008

SUZUKI MM und BIRD A: DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics, Nature reviews, 2008, 9, 465-476.

TAMURA und PICCIANO, 2006

TAMURA T und PICCIANO MF: Folate and human reproduction, American journal of clinical nutrition, 2006, 83, 993-1016.

TOOLE et al, 2004

TOOLE JF, MALINOW MR, CHAMBLESS LE, SPENCE JD, PETTIGREW LC, HOWARD VJ, SIDES EG, WANG CH, STAMPFER M: Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial, JAMA, 2004, 291, 565–575.

TURUNEN et al, 2009

TURUNEN MP, AAVIK E, YLA-HERTTULA S: Epigenetics and atherosclerosis. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790, 886–891.

VITATOPS Trial Study Group, 2010

VITATOPS Trial Study Group: B vitamins in patients with recent transient ischaemic attack or stroke in the VITamins TO Prevent Stroke (VITATOPS) trial: A randomised, double-blind, parallel, placebo-controlled trial, Lancet Neurology, 2010, 9, 855–865.

WADDINGTON, 1942

WADDINGTON CH: The epigenotype, Endeavour, 1942, 1, 18–20.

WALD et al, 1998

WALD NJ, WATT HC, LAW MR, WEIR DG, MCPARTLIN J, SCOTT JM: Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention, *Archives of internal medicine*, 1998, 158, 862-867.

WALD et al, 2002

WALD DS, LAW M, MORRIS JK: Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis, *BMJ*, 2002, 325, 1202–2022.

WANG et al, 2007

WANG X, QIN X, DEMIRTAS H, LI J, MAO G, HUO Y, SUN N, LIU L, XU X: Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis, *Lancet*, 2007, 369, 1876-1882.

WATERLAND et al, 2007

WATERLAND RA, TRAVISANO M, TAHILIANI KG: Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female, *The FASEB Journal*, 2007, 21, 3380-3385.

WERLER et al, 1993

WERLER MM, SHAPIRO S, MITCHELL AA: Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects; *JAMA*, 1993, 269, 1257–1261.

WILSON et al, 2007

WILSON RD, JOHNSON JA, WYATT P, ALLEN V, GAGNON A, LANGLOIS S, BLIGHT C, AUDIBERT F et al.: Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. Journal of Obstetrics and Gynecology Canada, 2007, 29(12), 1003-1026.

WU und ZHANG, 2011

WU H und ZHANG Y: Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation, Genes and Development, 2011, 25, 2436-2452.

XU et al, 2010

XU F, MAO C, DING Y, RUI C, WU L, SHI A, ZHANG H, ZHANG L, XU Z: Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs, Current medical chemistry, 2010, 17(33), 4052-4071.

YANG et al, 2006

YANG Q, BOTTO LD, ERICKSON JD, BERRY RJ, SAMBELL C, JOHANSEN H, FRIEDMAN JM: Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002, Circulation, 2006, 113, 1335-1343.

YEN et al, 1994

YEN TT, GILL AM, FRIGERI LG, BARSH GS, WOLFF GL: Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow $A^{vy}/-$ mice: ectopic expression of the *agouti* gene, The FASEB Journal, 1994, 8, 479-488.

ZAINA et al, 2005

ZAINA S, LINDHOLM MW, LUND G: Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis. More than just hyperhomocysteinemia?, The journal of nutrition, 2005, 135, 5-8.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Amra Sarajlić
amra.sara@gmail.com

Ausbildung:

- 2005- Diplomstudium der Biologie (Humangenetik) an der Uni Wien
- 2005-12 Diplomstudium der Ernährungswissenschaften; Abschluss im Sept 2012
- 1997-04 Doktoratsstudium der Medizin; Abschluss im Dez 2004
- 1993-97 BORG, Honauerstraße 24, Linz (Informatikzweig)
 Matura mit gutem Erfolg bestanden (13.06.97)
- 1992-93 Sprachklasse und 4. Klasse der HS 5, Linz
- 1991-92 Krankenschwesterschule, Doboj/ Bosnien-Herzegowina
- 1993-91 Volks-/Mittelschule, Doboj/Bosnien-Herzegowina