

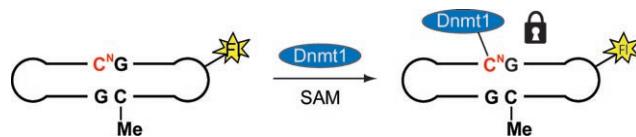
Synthese von hantelförmigen DNA-Inhibitoren für die humane DNA-Methyltransferase Dnmt1**

David Kuch, Lothar Schermelleh, Susanne Manetto, Heinrich Leonhardt und Thomas Carell*

DNA-Methyltransferasen überführen Desoxycytidinnucleobasen (dC) in DNA mithilfe des Cofactors S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonator in 5-Methyl-desoxycytidin (dC^{Me}). Die Methylierung des kanonischen DNA-Bausteins dC setzt, vor allem in Genpromotorregionen, komplexe Prozesse in Gang, die schließlich zur Inaktivierung des entsprechenden Gens führen.^[1–4] Diese epigenetische Genaktivierung ist von entscheidender Bedeutung für die Zelldifferenzierung. Außerdem zeigen praktisch alle Arten von Tumorzellen Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster und damit bei der Expression bestimmter Gene.^[5–7] Dnmt1, die wichtigste humane DNA-Methyltransferase, ist ein 183 kDa großes Protein, das bevorzugt dC-Basen in hemimethylierten d(CpG)-Sequenzen methyliert, die während der Replikation der genomischen DNA entstehen.^[8–11]

Dnmt1 ist maßgeblich für die Erhaltung der DNA-Methylierung in menschlichen wie auch in Mäusezellen verantwortlich.^[12–14] Über die Inhibierung dieses Enzyms ist es deshalb möglich, Einfluss auf zelluläre Methylierungsprozesse und damit die epigenetische (Re-)Programmierung der Zellen zu nehmen. Bislang ist allerdings erst eine sehr geringe Zahl an Molekülen bekannt, die eine Wirkung auf epigenetische Mechanismen ausüben.^[15–20] Zu den bekanntesten Substanzen zählen 5-AzadC (dC^N),^[21] 5-AzaC,^[22] Zebularin^[23] und 5-FluorodC,^[24] die in der Zelle zunächst gegebenenfalls 2'-desoxygeniert und dann von Kinasen in die entsprechenden Triphosphate überführt werden. Letztere werden von DNA-Polymerasen in das zelluläre Genom eingebaut, wo sie als Suizidinhibitoren für DNA-Methyltransferasen wie Dnmt1 fungieren, indem sie eine kovalente Bindung zwischen dem C6-Atom der Inhibitorbasis und einem katalytisch aktiven Cys-Rest bilden.^[22,23,25,26] Durch den Einbau der Inhibitoren in das Genom der Zellen zeigen alle diese Substanzen zytotoxische Effekte; unter anderem werden stabile

Nucleoproteinkomplexe gebildet.^[27,28] Alternative siRNA-Ansätze zum vollständigen Ausschalten der Dnmt1-Aktivität scheiterten bislang an einer unzureichenden Gen-Inaktivierung.^[29] Auf der Suche nach Molekülen, die Dnmt1 irreversibel binden und damit inaktivieren können, ohne dabei in das Genom integriert zu werden, haben wir hantelförmige, kleine DNA-Strukturen entwickelt (Schema 1). Diese tragen



Schema 1. Inaktivierung der humanen Methyltransferase Dnmt1 durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der hantelförmigen Inhibitor-DNA und dem Enzym in Gegenwart des Cofaktors SAM. C^N = 5-AzadC, C-Me = 5-MethyldC, Fl = Cy3-Fluoreszenzmarkierung.

den bekanntesten Suizidinhibitoren für Methyltransferasen: 5-AzadC. Dieses als freies Nucleosid sehr instabile Molekül wird durch den Einbau in doppelsträngige DNA erheblich stabilisiert.^[30] Da die DNA-Inhibitoren in lebenden Zellen eingesetzt werden sollen, synthetisierten wir hantelförmige DNA-Strukturen, die eine deutlich erhöhte Stabilität in Serum zeigen (siehe Hintergrundinformationen).^[31,32] Die Instabilität des Inhibitors dC^N erschwert dessen Einbau in DNA auf chemischem Wege allerdings immens.^[33] Wir entwickelten deshalb einen chemoenzymatischen Ansatz zur Herstellung der gewünschten hochfunktionalisierten DNA-Strukturen.

Schema 2 zeigt die Synthese und Charakterisierung der dC^N enthaltenden DNA-Hantel. Man geht dabei von einem synthetischen DNA-34mer (Legende Schema 2) mit einer zentralen d(GpC^{Me})₃-Sequenz (kursiv) und zwei dT₄-Haarnadelregionen an beiden Enden aus, die teilweise komplementär zu den der d(C^{Me}pG)₃-Einheit benachbarten Sequenzen sind. Die d(C^{Me}pG)₃-Einheit wurde als Zielsequenz für Dnmt1 gewählt, da diese Methyltransferase bevorzugt an hemimethylierte DNA bindet.^[8,11,34] Die gewählte Sequenz führt dazu, dass sich die Enden des DNA-Stranges zurückfalten und bereits eine Struktur bilden, die an eine Hantel erinnert. Ein 5'-Phosphatrest ermöglicht die spätere Ligation des Stranges. Mithilfe von Klenow-Fragment (*exo*), einer DNA-Polymerase ohne 3'-5'-Exonucleasefunktion, wird der Strang bei Zugabe von dGTP und dC^NTP um sechs Basen elongiert, und die Dnmt1-Erkennungssequenz wird vervollständigt. Durch den 5'-Phosphatrest kann die verbliebene Lücke schließlich mithilfe von T4-Ligase unter Bildung der hantelförmigen Struktur geschlossen werden. Schema 2b

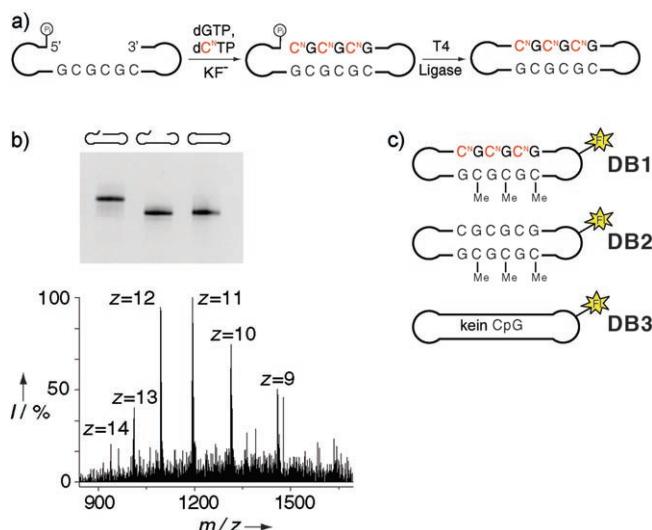
[*] D. Kuch, Dr. S. Manetto, Prof. Dr. T. Carell

Center for Integrated Protein Science (CiPSM) im Department für Chemie und Biochemie, LMU München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77755
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

Dr. L. Schermelleh, Prof. Dr. H. Leonhardt
Department für Biologie II, LMU München
Großhadernerstraße 2, 82152 Martinsried (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 646), Novartis und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit wurde vom Center for Integrated Protein Science gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 2. Synthese und Charakterisierung der hantelförmigen DNA-Inhibitoren. a) Elongation der vorgeformten DNA-Struktur durch die Polymerase Klenow-Fragment (*exo*-) und Ligation mit T4-Ligase. b) Polyacrylamid-gelektrophoretische Reaktionskontrolle (20%, 12 mA; oben) und Massenspektrum (ESI-FTICR; unten) des Inhibitors **DB1**. c) Die drei DNA-Hanteln. DNA-Sequenz von **DB1**: 5'-d(pAGA-GCTTTGCTCTC^{Me}GC^{Me}GC^{Me}GACTCCT^{Cy3}TTTGGAGT)-3'. P_i=Phosphatrest.

zeigt die gelektrophoretische und massenspektrometrische Analytik zu dieser Reaktionssequenz. Die elongierte DNA-Struktur zeigt auf dem Polyacrylamidgel eine zum Ausgangsstrang (links) verringerte Mobilität (Produkt 1, Mitte). Die Mobilität erhöht sich durch die Ligation jedoch wieder deutlich und liegt dann (Produkt 2, rechts) zwischen der Mobilität von Produkt 1 und Ausgangsstrang. Das Molekulargewicht des rund 13100 Da schweren Produktes konnte durch ESI-FTICR-Massenspektrometrie einwandfrei bestätigt werden. Die erfolgreiche Synthese der gewünschten hantelförmigen DNA-Strukturen wird belegt durch eine hervorragende Übereinstimmung des gefundenen Molekulargewichts für z.B. $m/z(z,12)=1093.1786$ mit dem berechneten Wert $m/z(z,12)=1093.1843$ (für **DB1**) zusammen mit einer sauberen Polyacrylamidgel-Analytik. Schema 2c zeigt die drei hergestellten DNA-Hanteln. Sowohl **DB1** wie auch **DB2** enthalten eine zentrale hemimethylierte Einheit, die Erkennungssequenz für Dnmt1, während aber nur **DB1** die Inhibitorbase dC^N enthält. **DB3** enthält überhaupt keine CpG-Sequenz und dient als reiner Kontrollstrang. Alle drei Konstrukte tragen eine Cy3-Fluoreszenzmarkierung, um eine einfache Detektion zu ermöglichen.

Um die Bindungseigenschaften der hantelförmigen Konstrukte zum Zielenzym Dnmt1 zu untersuchen, führten wir EMSA-Versuche durch (EMSA = Electrophoretic Mobility Shift Assay). 4 pmol der Stränge **DB1-DB3** wurden zu einer Lösung von 160 mM SAM und 4 pmol (5.5 U) Dnmt1 bei pH 7.8 gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionslösungen auf einem Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgel per Fluoreszenzdetection analysiert (Abbildung 1). Das Gel zeigt klar die Bildung eines kovalenten Komplexes zwischen **DB1** und Dnmt1 (Abbildung 1, Pfeil).

	1	2	3	4	5
Spur					
DB	1	1	2	3	3
SAM	-	+	+	+	+
Dnmt1	+	+	+	+	-

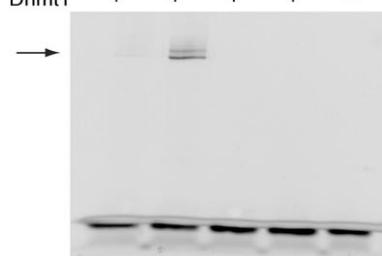


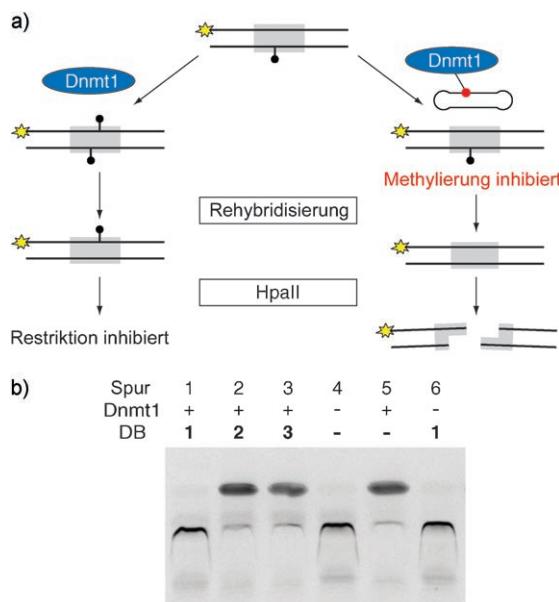
Abbildung 1. EMSA der DNA-Inhibitoren mit Dnmt1; der Pfeil markiert den kovalenten DNA-Protein-Komplex. 4 pmol DNA wurden mit 4 pmol (5.5 U) Dnmt1 2 h bei 37 °C in Gegenwart von 160 μM SAM in 50 mM Tris-HCl, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 5% Glycerin bei pH 7.8 inkubiert. Analytik durch SDS-PAGE (6%, 120 V). Tris=Tris-(hydroxymethyl)aminomethan.

Zwischen den Kontrollsträngen **DB2/DB3** und Dnmt1 kann keine derartige Komplexbildung beobachtet werden, was eine selektive Bindung des Enzyms zu hemimethylierten Zielsequenzen in Gegenwart der Inhibitorbase dC^N bestätigt. Das Auftreten zweier Banden bei der Komplexbildung kann unserer Ansicht nach nur mit der Komplexität der Struktur und des Bindungsverhaltens von Dnmt1 erklärt werden. Am wichtigsten ist jedoch die Beobachtung, dass in Abwesenheit von dC^N kein Komplex gebildet wird, auch wenn ein hemimethyliertes Zielsegment vorhanden ist. Eine sehr schwache Bande kann auch in Abwesenheit des Cofaktors (Spur 1) detektiert werden; dies ist in Übereinstimmung mit Literaturbeispielen, in denen Dnmt1 auch bei Fehlen von SAM von dC^N-haltiger DNA gebunden werden kann.^[35,36]

Ein Überschuss an hemimethylierter DNA im Reaktionsgemisch änderte nichts am Ergebnis dieser Bindungsstudie (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Weiterhin reduzierte die Zugabe von nicht fluoreszenzmarkiertem **DB1** (**DB4**) zum DNA-Enzym-Komplex das Fluoreszenzsignal des Komplexes in keiner Weise, was eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Protein bestätigt (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).

Um die inhibierende Wirkung unserer neuartigen DNA-Hanteln auf Dnmt1 weiter zu untersuchen, nutzten wir einen kürzlich von Sowers und Valinluck entwickelten Aktivitätsassay^[37] (Schema 3a). Ein normaler DNA-Doppelstrang mit einer Erkennungssequenz für das methylierungsempfindliche Restriktionsenzym HpaII und einer Fluoreszenzmarkierung wird mit Dnmt1 und dem Cofaktor SAM inkubiert. Aktives Enzym methyliert nun die hemimethylierte CpG-Zielsequenz; Dehybridisierung des Doppelstranges und Rehybridisierung mit einem unmethylierten Gegenstrang ergibt in diesem Fall einen hemimethylierten Duplex, der von HpaII nicht mehr geschnitten werden kann. Inaktives Dnmt1 hingegen kann den Ausgangsstrang nicht methylieren, was schließlich zu einer gänzlich unmethylierten Restriktionssequenz führt, die vom Restriktionsenzym geschnitten wird.

Das Experiment zeigt, dass in Gegenwart von aktivem Enzym der Doppelstrang methyliert und gegen Restriktion geschützt wird (Schema 3b, Spur 5). In vollständiger Abwe-



Schema 3. a) Restriktions-Aktivitäts-Assay für Dnmt1. Nach Inkubation mit dem Inhibitor kann Dnmt1 einen hemimethylierten 30mer-DNA-Strang (**DS1**, Sequenz siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen) nicht mehr methylieren und so vor einem Restriktionsverdau durch HpaII schützen. ●: 5-Methyl-dC; grau hinterlegt: HpaII-Erkennungssequenz (C'CGG); gelb: Fluoresceinmarkierung. b) Denaturierende PAGE (20%, 12 mA).

senheit von Dnmt1 kommt es dagegen infolge der unmethylierten Erkennungssequenz zur Restriktion des Stranges (Spur 4). Bei Vorinkubation von Dnmt1 mit **DB2** und **DB3**, die keine Bindung zum Protein eingehen sollten, bleibt das Enzym aktiv und bewirkt eine Blockierung von HpaII (Spuren 2 und 3; analog zu Spur 5: keine Inhibitor-DNA). Im Unterschied hierzu inhibiert **DB1** das Enzym und damit die Methylierung vollständig, was zur kompletten Restriktion des Teststranges durch HpaII und damit zum gleichen Bild wie bei gänzlicher Abwesenheit des Enzyms führt (Spuren 1, 4). Im Ergebnis bindet und inhibiert somit nur der hemimethylierte, dC^N enthaltende DNA-Inhibitor **DB1** die humane Methyltransferase Dnmt1. Hierbei genügen etwa stöchiometrische Mengen Inhibitor, um das Enzym vollständig zu blockieren, was belegt, dass **DB1** als Suizidinhibitör fungiert. Außer Dnmt1 untersuchten wir auch einige bakterielle Methyltransferasen wie M.SssI und fanden, dass **DB1** auch diese Enzyme hocheffizient bindet und inhibiert (Abbildungen S5 und 6 in den Hintergrundinformationen). Dies war zu erwarten, da die bakteriellen Enzyme nicht zwischen unmethylierten und hemimethylierten Zielsequenzen unterscheiden.^[32]

Um die synthetisierten Konstrukte in Säugetierzellen zu testen, transfizierten wir humane HTC116-Darmtumorzellen und, als ein Modell, C2C12-Mäusemyoblasten mit der Inhibitor-DNA und Transfectin oder HiPerFect als Transfektionsmittel. Fluoreszenzmikroskopisch konnten wir die DNA-Hanteln im Zellkern lokalisieren. Bemerkenswerterweise konnte in den Mäusezellen auch nach längerer Behandlung keine offensichtliche Toxizität festgestellt werden. 16 h nach der Transfektion von **DB1*** (eine Variante von **DB1**

mit zwei Cy3-Markierungen, Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen) konnte endogenes Dnmt1 in C2C12-Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und beobachtet werden. Es zeigte sich, dass der Inhibitorstrang in den Kernen von S-Phasenzellen mit Dnmt1 an Stellen aktiver Replikation co-lokalisiert ist (Abbildung 2a). Wurden die DNA-Hanteln

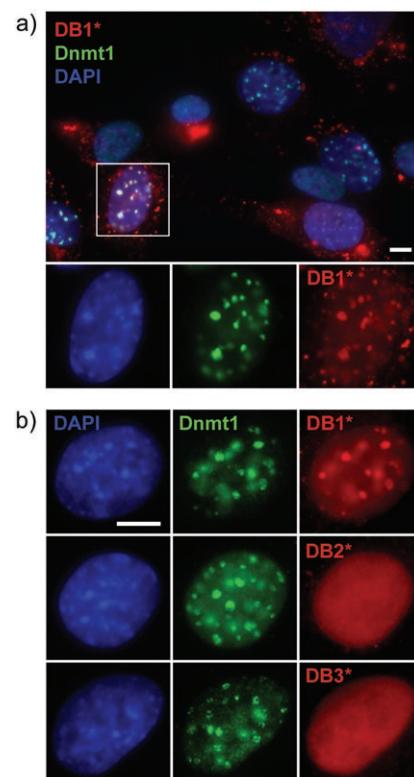


Abbildung 2. Behandlung von C2C12-Myoblasten mit den hantelförmigen DNA-Inhibitoren (rot). Nach Fixieren der Zellen mit Formaldehyd wurde endogenes Dnmt1 mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (grün) und DNA mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. Weiße Balken: 5 µm. a) Transfektion von **DB1*** mit HiPerFect als Transfektionsmittel. Der Zellkern im Kasten ist unten vergrößert dargestellt. b) C2C12-Zellkerne 1 h nach der Mikroinjektion der DNA-Inhibitoren. **DB1*** colokalisiert mit Dnmt1 an Stellen, an denen auch DNA-Replikation stattfindet, während **DB2*** und **DB3*** diffus im Zellkern verteilt bleiben.

direkt in Zellkerne mikroinjiziert, wurde eine Colokalisation mit Dnmt1 in Zellen in der S-Phase schon nach einer Stunde festgestellt (Abbildung 2b). Die Kontrollstränge ohne dC^N, **DB2*** und **DB3*** zeigten hingegen kein solches Verhalten.

Die Transfektion von **DB1** in HCT116-Tumorzellen bewirkte eine signifikante Reduktion der Zellproliferation (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Diese Beobachtungen zeigen, dass Dnmt1 in lebenden Zellen mit unserem hantelförmigen DNA-Inhibitor wechselwirkt und es offensichtlich stabil bindet.

Unsere Inhibitor-DNA-Stränge gehören somit zu den ersten chemischen Konstrukten, die Dnmt1, eines der wichtigsten Enzyme für die epigenetische Kontrolle der Genexpression, inhibieren können. Die Möglichkeit, direkt in den Zellkern einzudringen und dort direkt mit Dnmt1 zu inter-

ferieren, eröffnet neue Perspektiven zur Regulierung der zellulären DNA-Methylierung. Diese Konstrukte könnten es ermöglichen, an der Reprogrammierung differenzierter Zellen mitzuwirken oder die epigenetische Gen-Inaktivierung in Tumorzellen rückgängig zu machen.

Eingegangen am 9. Mai 2007,
veränderte Fassung am 24. Oktober 2007
Online veröffentlicht am 18. Januar 2008

Stichwörter: DNA-Methylierung · Enzyme · Epigenetik · Inhibitoren · Transferasen

- [1] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415–428.
- [2] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457–463.
- [3] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 274–293.
- [4] L. Lopez-Serra, E. Ballestar, M. F. Fraga, M. Alaminos, F. Setien, M. Esteller, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8342–8346.
- [5] J. G. Herman, S. B. Baylin, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2042–2054.
- [6] M. Esteller, *Oncogene* **2002**, *21*, 5427–5440.
- [7] M. Ehrlich, *Oncogene* **2002**, *21*, 5400–5413.
- [8] S. Pradhan, A. Bacolla, R. D. Wells, R. J. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33002–33010.
- [9] H. Leonhardt, A. W. Page, H. U. Weier, T. H. Bestor, *Cell* **1992**, *71*, 865–873.
- [10] T. H. Bestor, V. M. Ingram, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 5559–5563.
- [11] M. Fatemi, A. Hermann, S. Pradhan, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1189–1199.
- [12] A. Eden, F. Gaudet, A. Waghmare, R. Jaenisch, *Science* **2003**, *300*, 455.
- [13] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* **1992**, *69*, 915–926.
- [14] F. Spada, A. Haemmer, D. Kuch, U. Rothbauer, L. Schermelleh, E. Kremmer, T. Carell, G. Langst, H. Leonhardt, *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 565–571.
- [15] C. Strehemann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, F. Lyko, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2794–2800.
- [16] P. A. Jones, S. M. Taylor, *Cell* **1980**, *20*, 85–93.
- [17] D. Neureiter, S. Zopf, T. Leu, O. Dietze, C. Hauser-Kronberger, E. G. Hahn, C. Herold, M. Ocker, *Scand. J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 103–116.
- [18] P. A. Jones, *Pharmacol. Ther.* **1985**, *28*, 17–27.
- [19] M. Esteller, *Curr. Opin. Oncol.* **2005**, *17*, 55–60.
- [20] B. Brueckner, F. Lyko, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 551–554.
- [21] R. L. Momparler, L. F. Momparler, J. Samson, *Leuk. Res.* **1984**, *8*, 1043–1049.
- [22] D. V. Santi, A. Norment, C. E. Garrett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6993–6997.
- [23] L. Zhou, X. Cheng, B. A. Connolly, M. J. Dickman, P. J. Hurd, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 591–599.
- [24] L. Chen, A. M. MacMillan, W. Chang, K. Ezaz-Nikpay, W. S. Lane, G. L. Verdine, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11018–11025.
- [25] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, *76*, 357–369.
- [26] L. Schermelleh, F. Spada, H. P. Easwaran, K. Zolghadr, J. B. Margot, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 751–756.
- [27] R. Juttermann, E. Li, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11797–11801.
- [28] L. Jackson-Grusby, P. W. Laird, S. N. Magge, B. J. Moeller, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4681–4685.
- [29] G. Egger, S. Jeong, S. G. Escobar, C. C. Cortez, T. W. Li, Y. Saito, C. B. Yoo, P. A. Jones, G. Liang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14080–14085.
- [30] M. Vives, R. Eritja, R. Taufer, V. E. Marquez, R. Gargallo, *Biopolymers* **2004**, *73*, 27–43.
- [31] C. S. Lim, N. Jabrane-Ferrat, J. D. Fontes, H. Okamoto, M. R. Garovoy, B. M. Peterlin, C. A. Hunt, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 575–581.
- [32] B. C. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5857–5858.
- [33] R. Guimil Garcia, A. S. Brank, J. K. Christman, V. E. Marquez, R. Eritja, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 369–378.
- [34] R. Goyal, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1182–1188.
- [35] D. V. Santi, C. E. Garrett, P. J. Barr, *Cell* **1983**, *33*, 9–10.
- [36] J. K. Christman, N. Schneiderman, G. Acs, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4059–4068.
- [37] V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 946–950.