

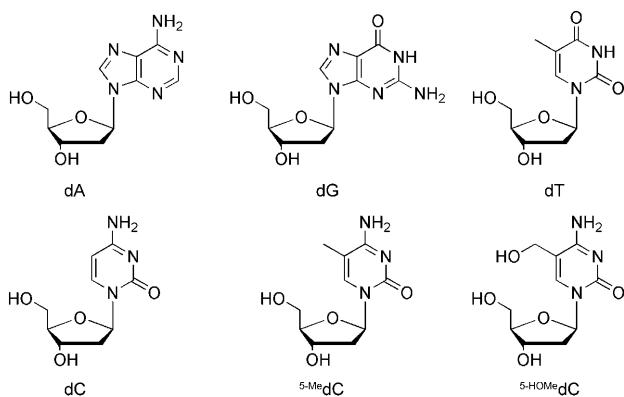
# Quantitative Bestimmung der sechsten DNA-Base Hydroxymethylcytosin im Gehirn\*\*

Martin Münzel, Daniel Globisch, Tobias Brückl, Mirko Wagner, Veronika Welzmiller, Stylianos Michalakis, Markus Müller, Martin Biel und Thomas Carell\*

Der genetische Code wird durch die Sequenz der vier kanonischen DNA-Nucleoside dA, dC, dG und dT bestimmt.<sup>[1]</sup> In Zellen höherer Organismen wird von diesen nur dC chemisch modifiziert, um die Transkriptionsaktivität zu kontrollieren.<sup>[2]</sup> Spezifische Methyltransferasen ersetzen das H-Atom an Position 5 von dC durch eine Methylgruppe, wodurch Methylcytosin (<sup>5-Me</sup>dC) gebildet wird.<sup>[3]</sup> Diese Methylierung tritt nur in CpG-Sequenzen auf und ist hauptsächlich für die epigenetische Stummschaltung von Genen verantwortlich.<sup>[4]</sup> Kürzlich wurde in zwei Publikationen Hydroxymethylcytosin (<sup>5-HOMe</sup>dC) als weitere postreplikative DNA-Modifikation vorgestellt (Schema 1). Kriaucionis und Heintz entdeckten <sup>5-HOMe</sup>dC in Purkinje-Neuronen des Kleinhirns.<sup>[5]</sup> Tahiliani et al. berichteten von Spuren von <sup>5-HOMe</sup>dC (ca. 0.032 % aller

Nucleoside) in embryonalen Stammzellen von Mäusen und konnten das neue Nucleosid auch in HEK-Zellen (HEK: human embryonic kidney) detektieren, wenn sie dort das hydroxylierende 2-Oxoglutarat- und Eisen(II)-abhängige Enzym TET1 überexprimierten.<sup>[6]</sup> Zusätzlich konnten die Forscher zeigen, dass die TET-Enzymfamilie die 5-Methylgruppe von <sup>5-Me</sup>dC in vitro hydroxylieren kann. Zur Detektion des neuen DNA-Nucleosids wurde Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Nucleotiden verwendet. Die Funktion von <sup>5-HOMe</sup>dC ist momentan unbekannt, aber es wird spekuliert, dass es ein weiteres Instrument zur Transkriptionskontrolle oder ein Intermediat eines möglichen oxidativen Demethylierungsmechanismus darstellt.<sup>[7]</sup>

Wir haben eine quantitative LC-MS-Methode entwickelt, um die Verteilung von <sup>5-HOMe</sup>dC im Säugetiergehirn zu untersuchen und die relativen Mengen von <sup>5-HOMe</sup>dC und <sup>5-Me</sup>dC zu bestimmen. Zu diesem Zweck haben wir beide Nucleoside in natürlicher und isotopenmarkierter Form synthetisiert<sup>[8]</sup> (Schema 2) und ihre Menge in verschiedenen Bereichen des Gehirns von Mäusen untersucht.



**Schema 1.** Struktur der vier kanonischen Nucleoside und der postreplikativen Modifikationen <sup>5-Me</sup>dC und <sup>5-HOMe</sup>dC.

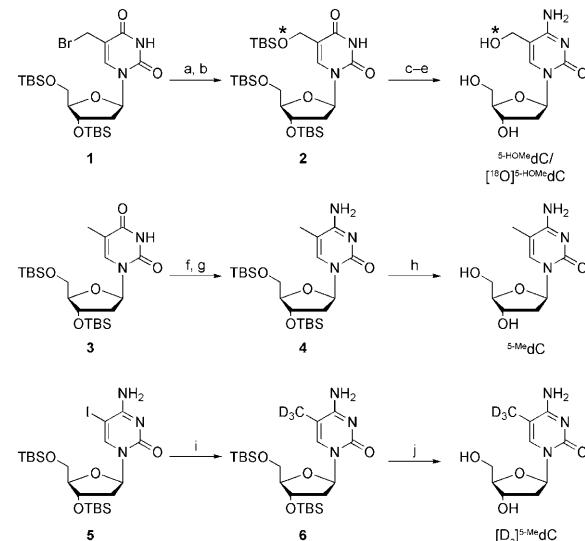
[\*] Dipl.-Chem. M. Münzel,<sup>[+]</sup> Dipl.-Chem. D. Globisch,<sup>[+]</sup> Dipl.-Chem. T. Brückl, Dipl.-Chem. M. Wagner, Dipl.-Chem. V. Welzmiller, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell Center for Integrated Protein Science (CiPS<sup>M</sup>) am Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland) E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

Dr. S. Michalakis, Prof. Dr. M. Biel Center for Integrated Protein Science (CiPS<sup>M</sup>) am Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken dem Exzellenzcluster CiPS<sup>M</sup>, SFB 646 und SFB 749 für großzügige Unterstützung. M. Münzel dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium. Wir danken V. Hammelmann für ihre Hilfe.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002033> zu finden.

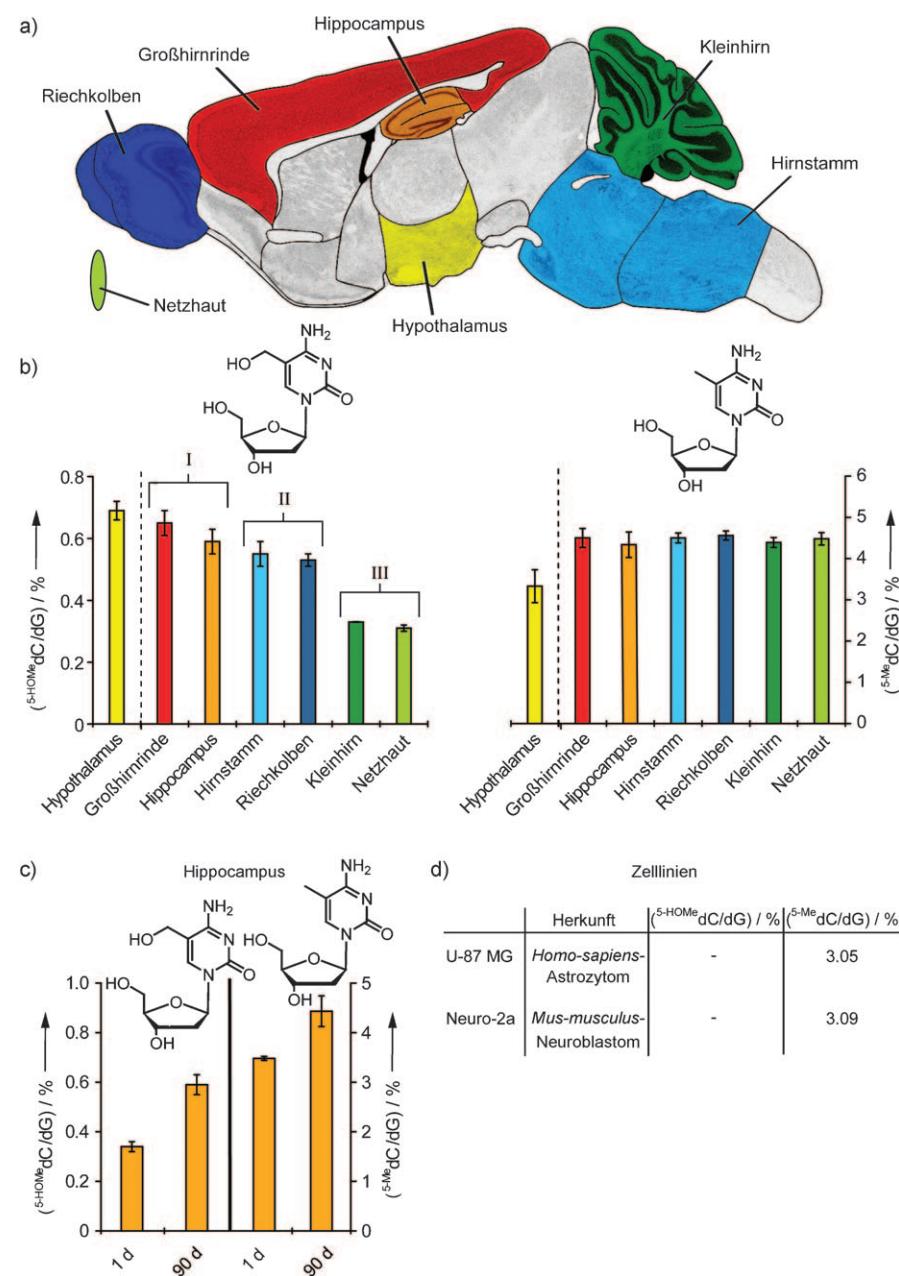


**Schema 2.** Synthese der natürlichen und isotopenmarkierten Nucleoside <sup>5-HOMe</sup>dC, <sup>[18O]</sup><sup>5-HOMe</sup>dC, <sup>5-Me</sup>dC und <sup>[D<sub>3</sub>]</sup><sup>5-Me</sup>dC. a) H<sub>2</sub>O, DIPEA, 72%; b) TBSCl, Imidazol, 46%; c) NaH, TPSCl; d) NH<sub>3</sub>/MeOH, 76% über zwei Stufen; e) 3 HF-NEt<sub>3</sub>, 52%; f) NaH, TPSCl; g) NH<sub>3</sub>/MeOH, 81% über zwei Stufen; h) HF-pyr, 88%; i) CD<sub>3</sub>MgI, CuCl, [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], 90% untrennbares Gemisch aus **6** und TBScdC; j) HF-pyr, 84% (basierend auf **6**). <sup>[18O]</sup><sup>5-HOMe</sup>dC wurde analog zu <sup>5-HOMe</sup>dC synthetisiert. Der Stern zeigt die Position der <sup>18</sup>O-Markierung an. DIPEA: N,N-Diisopropylethylamin, pyr: Pyridin, TBS: *tert*-Butyldimethylsilyl, TPS: 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl.

$^5\text{-HOMe}$ dC und  $^5\text{-Me}$ dC wurden als  $^{18}\text{O}$ - bzw. als CD<sub>3</sub>-Derivate markiert. Für die Synthese von  $^5\text{-HOMe}$ dC wurde vom TBS-geschützten und bromierten dT-Derivat **1** ausgegangen.<sup>[9]</sup> S<sub>N</sub>2-Substitution mit H<sub>2</sub>O und nachfolgende TBS-Schützung führten zu Produkt **2**. Für die isotopenmarkierte Verbindung wurde H<sub>2</sub> $^{18}\text{O}$  verwendet. Anschließende Aktivierung als Sulfonat<sup>[10]</sup> und nucleophile aromatische Substitution mit NH<sub>3</sub> ergaben nach Entschützung  $^5\text{-HOMe}$ dC. Für die Synthese von  $^5\text{-Me}$ dC überführten wir unter Verwendung der oben beschriebenen Strategie TBS-geschütztes dT in dC. Eine Palladium-katalysierte sp<sup>2</sup>-sp<sup>3</sup>-Kupplung ermöglichte die Synthese von **6** aus TBS-geschütztem Iodcytidin **5**.<sup>[11]</sup> Abschließende Entschützung lieferte [D<sub>3</sub>] $^5\text{-Me}$ dC. Die synthetisierten Nucleoside ermöglichen uns die Bestimmung von Kalibriergeraden für die Massenspektrometrie (siehe Hintergrundinformationen), die für eine sehr präzise Quantifizierung notwendig sind.<sup>[12]</sup> Die Integrale der Ionenströme für die exakte Masse jedes Nucleosids wurden gegen verschiedene Konzentrationsverhältnisse an natürlichem und isotopenmarkiertem Nucleosid aufgetragen. In beiden Fällen wurden R<sup>2</sup>-Werte von 0.999 erhalten.

Die Ergebnisse der Kalibermessungen ermöglichen uns nun, die Quantifizierungsmethode für verschiedene Bereiche des Mäusegehirns anzuwenden und dort die absoluten und relativen Werte an  $^5\text{-Me}$ dC und  $^5\text{-HOMe}$ dC zu bestimmen (Abbildung 1a). Zu diesem Zweck präparierten wir Hypothalamus, Großhirnrinde, Hippocampus, Hirnstamm, Riechkolben, Kleinhirn und Netzhaut von jeweils vier ausgewachsenen (90 Tage alten) Mäusen. Die Gewebe wurden anschließend homogenisiert, und die DNA wurde per Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert (siehe Hintergrundinformationen). Für eine Messung wurden jeweils 4–10 µg DNA einem zweistufigen enzymatischen Totalverdau unterzogen. Zunächst wurde mit Nuclease S1 3 h bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit Phosphodiesterase I und alkalischer Phosphatase unter gleichen Bedingungen. Anschließend wurde eine definierte Menge der isotopenmarkierten Nucleoside zugegeben und die Probe an einer HPLC-Apparatur mit einem hochauflösenden Massenspektrometer als Detektor (Thermo Finnigan

LTQ Orbitrap XL) untersucht. In allen Messungen eluierten die Substanzen bei 12.3 ( $^5\text{-HOMe}$ dC) bzw. 18.5 min ( $^5\text{-Me}$ dC). Bei jedem Experiment konnten ein Signal für das natürliche (leichte) und ein Signal für das isotopenmarkierte (schwere) Nucleosid detektiert werden. Die Menge der untersuchten Nucleoside wurde durch Vergleich der Integrale der Ionenströme des natürlichen (zu untersuchende Menge) und des isotopenmarkierten (bekannte Menge) Signals unter Berücksichtigung der Kalibriergeraden bestimmt. Bei allen Messungen erhielten wir Werte mit einem durchschnittlichen



**Abbildung 1:** a) Sagittale Sektion eines Mäusegehirns. Die untersuchten Gehirnareale sind farbig hervorgehoben. b) Verhältnis von  $^5\text{-HOMe}$ dC und  $^5\text{-Me}$ dC zu dG in verschiedenen Gehirnbereichen in Prozent. dG wurde als Referenz verwendet, da es Basenpaare mit dC,  $^5\text{-Me}$ dC und  $^5\text{-HOMe}$ dC bildet. I–III: siehe Text. c) Verhältnis von  $^5\text{-HOMe}$ dC und  $^5\text{-Me}$ dC zu dG im Hippocampus von einen und 90 Tage alten Mäusen in Prozent. d) Verhältnis von  $^5\text{-HOMe}$ dC und  $^5\text{-Me}$ dC zu dG in einer neuronalen (Neuro-2a) und einer Gliazelllinie (U-87 MG) in Prozent.

Fehler von  $\pm 5\%$  sowohl für  ${}^5\text{HOMe}dC$  als auch für  ${}^5\text{Me}dC$ . Alle Messwerte für jede einzelne Maus sind in den Hintergrundinformationen aufgelistet. Abbildung 1 zeigt den gemittelten Wert.

Als erstes Ergebnis (Abbildung 1b) konnten wir das neue Nucleosid  ${}^5\text{HOMe}dC$  deutlich in jedem Gehirnbereich detektieren. Zwischen 0.3 und 0.7% aller dC-Nucleoside sind an Position 5 hydroxymethyliert, was deutlich zeigt, dass  ${}^5\text{HOMe}dC$  ein postreplikativ gebildetes Nucleosid im gesamten Gehirn ist. Der zweite überraschende Befund ist, dass der Gehalt an  ${}^5\text{HOMe}dC$  zwischen den Gehirnarealen deutlich schwankt. In der Originalpublikation wurde  ${}^5\text{HOMe}dC$  in Purkinje-Neuronen, die ausschließlich im Kleinhirn vorkommen, gefunden. Wir konnten nun feststellen, dass die Menge des Nucleosids in der Großhirnrinde und im Hippocampus deutlich größer ist, obwohl dort keine Purkinje-Neuronen vorkommen. Eine Analyse von Gehirnkrebszelllinien zeigte, dass in Neuroblasten und Gliazellen kein  ${}^5\text{HOMe}dC$  vorkommt (Abbildung 1d). In Übereinstimmung mit der Literatur haben wir in diesen Krebszelllinien jedoch einen reduzierten Gehalt an  ${}^5\text{Me}dC$  (von normal 4.5 auf 3.0%) gefunden.<sup>[13]</sup>

Unsere Daten lassen eine grobe Unterteilung des Mausgehirns in drei Bereiche zu (Abbildung 1b): Der größte Anteil an  ${}^5\text{HOMe}dC$  ist in der Großhirnrinde und im Hippocampus zu finden (I). Dies sind interessanterweise die Gehirnareale, die mit den höchsten kognitiven Funktionen assoziiert sind. Der Riechkolben und der Hirnstamm bilden eine zweite Gruppe mit mittlerem  ${}^5\text{HOMe}dC$ -Gehalt (II). Das Kleinhirn und die Netzhaut enthalten eindeutig am wenigsten  ${}^5\text{HOMe}dC$  (III). Erste Daten zeigen zudem sehr hohe Werte des neuen Nucleosids im Hypothalamus, der Teil des endokrinen Systems ist, das hormonbasierte Prozesse kontrolliert. Die Verteilung von  ${}^5\text{HOMe}dC$  wurde durch Immunlokalisierung bestätigt (siehe Hintergrundinformationen).

Von Interesse ist auch die Analyse des relativen Gehalts an  ${}^5\text{HOMe}dC$  und  ${}^5\text{Me}dC$ . In den untersuchten Gehirnbereichen korrelierten die Mengen an  ${}^5\text{HOMe}dC$  und  ${}^5\text{Me}dC$  nicht, was zu erwarten wäre, wenn  ${}^5\text{HOMe}dC$  ausschließlich aus  ${}^5\text{Me}dC$  gebildet würde. Im Hypothalamus war der Wert für  ${}^5\text{Me}dC$  deutlich reduziert, und hier fanden wir tatsächlich einen hohen  ${}^5\text{HOMe}dC$ -Gehalt. In allen anderen Geweben beobachteten wir hingegen einen stabilen  ${}^5\text{Me}dC$ -Wert von ca. 4.5% (in Übereinstimmung mit der Literatur),<sup>[14]</sup> während die Messwerte für  ${}^5\text{HOMe}dC$  deutlich schwankten. Dies lässt darauf schließen, dass  ${}^5\text{HOMe}dC$  eine Funktion hat, die nicht direkt mit  ${}^5\text{Me}dC$  zusammenhängt.

Wir stellten uns zusätzlich die Frage, ob das Alter des Tieres die Menge an  ${}^5\text{HOMe}dC$  beeinflusst. Hierzu analysierten wir die Hippocampi von einem Tag alten Mäusen (Abbildung 1c). Tatsächlich konnten wir bei diesen eine deutlich reduzierte Menge an  ${}^5\text{Me}dC$  und  ${}^5\text{HOMe}dC$  feststellen. Der Gehalt an  ${}^5\text{Me}dC$  nimmt im ausgewachsenen Tier von (3.5  $\pm$  0.1)% auf (4.3  $\pm$  0.3)% zu. Weit eindeutiger jedoch steigt die Menge an  ${}^5\text{HOMe}dC$ : Der Gehalt in 90 Tage alten Tieren ist um 75% höher (von (0.34  $\pm$  0.02) auf (0.59  $\pm$  0.04)%) als in einem Tag alten Tieren. Um auszuschließen, dass sich  ${}^5\text{HOMe}dC$  aufgrund von oxidativem Stress anreichert, untersuchten wir die Werte an 8-Oxo-dG, einem typischen Marker für oxida-

tiven Stress. Hier konnten wir jedoch keine Unterschiede feststellen, was eindeutig belegt, dass  ${}^5\text{HOMe}dC$  im Gehirn kein Resultat oxidativen Stresses,<sup>[15]</sup> sondern eine postreplikative Modifikation ist.

Wir haben die Menge an  ${}^5\text{HOMe}dC$  und  ${}^5\text{Me}dC$  in verschiedenen Gehirnarealen mit sehr hoher Genauigkeit bestimmt und konnten  ${}^5\text{HOMe}dC$  als postreplikative Modifikation bestätigen. Wir haben gezeigt, dass das Nucleosid im Gehirn weit verbreitet ist und besonders häufig in den Gehirnbereichen auftritt, die für höhere kognitive Funktionen verantwortlich sind. Weiterhin erhielten wir erste Hinweise darauf, dass  ${}^5\text{HOMe}dC$  in neugeborenen Tieren in geringeren Mengen vorkommt als in ausgewachsenen.

Eingegangen am 6. April 2010,  
veränderte Fassung am 3. Mai 2010  
Online veröffentlicht am 25. Juni 2010

**Stichwörter:** Demethylierungen · DNA-Methylierung · DNA-Modifikation · Epigenetik · Hydroxymethylcytosin

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] a) A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396–398; b) P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068–1070.
- [3] M. G. Goll, T. H. Bestor, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 481–514.
- [4] a) A. P. Feinberg, *Nature* **2007**, *447*, 433–440; b) W. Reik, *Nature* **2007**, *447*, 425–432.
- [5] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930.
- [6] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [7] a) C. Loenarz, C. J. Schofield, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 580–583; b) Z. Liutkevičiūtė, G. Lukinavičius, V. Masevičius, D. Daujotytė, S. Klimašauskas, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 400–402; c) J.-K. Zhu, *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 143–166.
- [8] Eine alternative Synthese: C. J. LaFrancois, J. Fujimoto, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 75–83.
- [9] a) R. K. Grover, S. J. K. Pond, Q. Cui, P. Subramaniam, D. A. Case, D. P. Millar, P. Wentworth, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2897–2901; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2839–2843.
- [10] N. Bischofberger, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3041–3046.
- [11] a) C. H. Hwang, J. S. Park, J. H. Won, J. N. Kim, E. K. Ryu, *Arch. Pharmacal Res.* **1992**, *15*, 69–72; b) M. Kuwahara, J.-I. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, K. Hanawa, S.-I. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5383–5394.
- [12] a) T. Brückl, D. Globisch, M. Wagner, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8074–8077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7932–7934; b) E. P. Quinlivan, J. F. Gregory, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e119; c) Y. Yang, D. Nikolic, S. M. Swanson, R. B. van Breemen, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5376–5382.
- [13] M. Esteller, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1148–1159.
- [14] a) M. A. Gama-Sosa, R. M. Midgett, V. A. Slagel, S. Githens, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, M. Ehrlich, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* **1983**, *740*, 212–219; b) B. F. Vanyushin, N. G. Lopatina, C. K. Wise, F. R. Fullerton, L. A. Poirier, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 518–527.
- [15] C. Bienvenu, J. R. Wagner, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11406–11411.