

Enzymatische Derivatisierung von 5-Hydroxymethylcytosin in DNA**

Claudia Höbartner*

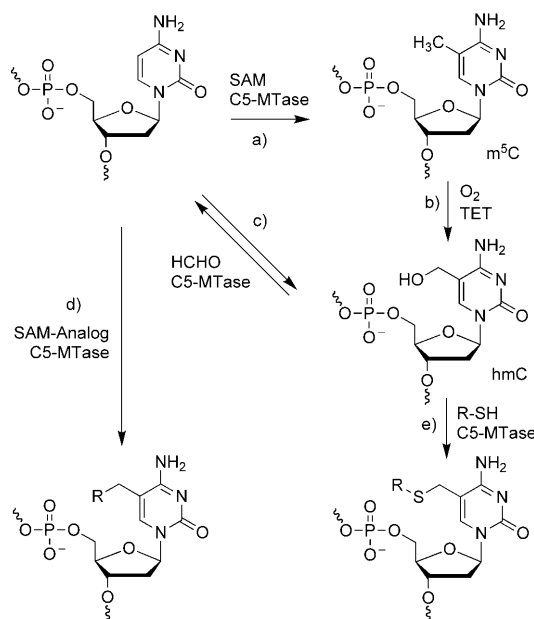
DNA-Methylierung · Epigenetik · Markierung ·
Nucleobasen · Transferasen

Die Methylierung von DNA ist eine wichtige epigenetische Modifikation, die an der Regulation der Genexpression beteiligt ist. In Wirbeltieren ist die DNA am häufigsten an Position C5 von Cytosin methyliert (m^5C). Die Methylgruppe wird durch Methyltransferasen (C5-MTasen) übertragen, die *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM oder AdoMet) als Methylgruppendonor verwenden (Schema 1 a). Eine fehlgesteuerte Regulation der DNA-Methylierung hat schwerwiegende Auswirkungen, darunter neurologische Entwicklungsstörungen und die Entstehung von Krebs.^[1] Aktuelle Berichte über 5-Hydroxymethylcytosin (hmC) als eine zusätzliche Cytosinmodifikation in der DNA von Säugetieren förderten das In-

teresse an epigenetischen Mechanismen. Die Existenz von hmC in tierischer DNA war bereits vor langer Zeit vermutet worden,^[2] allerdings hatte dieser Bericht wenig Beachtung gefunden. 2009 konnten Kriaucionis und Heintz hmC in Purkinje-Neuronen des Kleinhirns eindeutig nachweisen.^[3] Tahiliani und Mitarbeiter fanden hmC in murinen embryonalen Stammzellen und menschlichen embryonalen Nierenzellen und zeigten, dass Enzyme der TET-Familie (Ten-Eleven-Translocation-Gen) m^5C zu hmC oxidieren können (Schema 1 b).^[4] Diese 2-Ketoglutarat- und Fe^{II} -abhängigen Oxygenasen können m^5C -haltige DNA auch *in vitro* oxidieren. Darüber hinaus wurde vor kurzem festgestellt, dass auch C5-MTasen *in vitro* hmC generieren können, indem sie Formaldehyd reversibel an unmodifizierte Cytosine addieren (Schema 1 c).^[5] Die funktionelle Bedeutung von hmC als zusätzliche Ebene in der epigenetischen Regulation und/oder als ein Intermediat der oxidativen Demethylierung wird derzeit intensiv untersucht.^[6]

Zur Aufklärung der biologischen Funktion von hmC ist es notwendig, diese Modifikation im Genom zu lokalisieren und zu quantifizieren. Dies ist jedoch technisch anspruchsvoll, da m^5C und hmC durch gängige biochemische Methoden nur schwer zu unterscheiden sind. Die häufigste Methode zur Analyse von Methylierungsmustern, die Bisulfitsequenzierung,^[7] führt zu identischen Ergebnissen für m^5C und hmC.^[8] Methylierungs-abhängige Restriktionsenzyme eignen sich ebenfalls nur unzureichend zur Unterscheidung von m^5C und hmC. Deshalb ist die Entwicklung von Methoden zum gezielten Nachweis von hmC von großer Bedeutung.

In den neuen Berichten über hmC in DNA von Säugetieren^[3,4] wurde das modifizierte Nucleosid in DC- und HPLC-Experimenten nachgewiesen und mithilfe von ESI-MS/MS charakterisiert. Die Häufigkeit von hmC in verschiedenen Regionen des Mäusegehirns wurde mit einer quantitativen MS-Methode untersucht, die von Carell und Mitarbeitern entwickelt wurde und auf der Verwendung von synthetischen, isotonenmarkierten Referenzverbindungen beruht.^[9] Die gute Empfindlichkeit dieser Methode ermöglichte die genaue Quantifizierung modifizierter Cytosine in verschiedenen Gewebearten. Die Häufigkeit von hmC liegt in verschiedenen Zelltypen zwischen 0.03 und 0.7% bezogen auf Guanin, während m^5C in allen Zellen einheitlich zu 4–5% vorkommt.^[6] Zum visuellen Nachweis der modifizierten Nucleoside m^5C , hmC und des Bisulfitaddukts von hmC wurden spezifische Antikörper entwickelt. Quantitative Dot-Blot-



Schema 1. a, b) Natürliche und c–e) artifizielle Wege der enzymatischen Modifizierung von Cytosin in DNA an Position C5.

[*] Dr. C. Höbartner
Forschungsgruppe Nukleinsäurechemie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-1680
E-Mail: claudia.hoebartner@mpibpc.mpg.de

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft für die großzügige Unterstützung unserer Arbeit.

Analysen ermöglichten damit die Bestimmung der Häufigkeit von hmC in genomischer DNA aus menschlichen Knochenmarksproben.^[10] Massenspektrometrie und Antikörperfärbemethoden können allerdings die Positionen der Modifikation in der DNA-Sequenz nicht genau lokalisieren. Aktuelle Techniken der Einzelmolekülsequenzierung könnten hier Abhilfe schaffen; mit ihnen lassen sich m⁵C und hmC, basierend auf der unterschiedlichen Extensionskinetik der DNA-Polymerase beim Lesen der Modifikationen, unterscheiden.^[11] Auch mit amperometrischen Messungen beim Durchtritt modifizierter DNA durch Nanoporen konnten Cytosin, m⁵C und hmC unterschieden werden.^[12] Diese neuen Methoden wurden bis jetzt allerdings nur an synthetischer DNA mit bekannten Modifikationen demonstriert und können noch nicht zur direkten Sequenzierung natürlicher DNA angewendet werden. Hierfür ist die selektive Anreicherung von hmC-haltiger DNA notwendig. In diesem Zusammenhang wurden kürzlich neue chemoenzymatische Methoden zur selektiven Markierung von hmC beschrieben, in denen Enzyme aus Bakterien und Bakteriophagen zum Einsatz kommen.

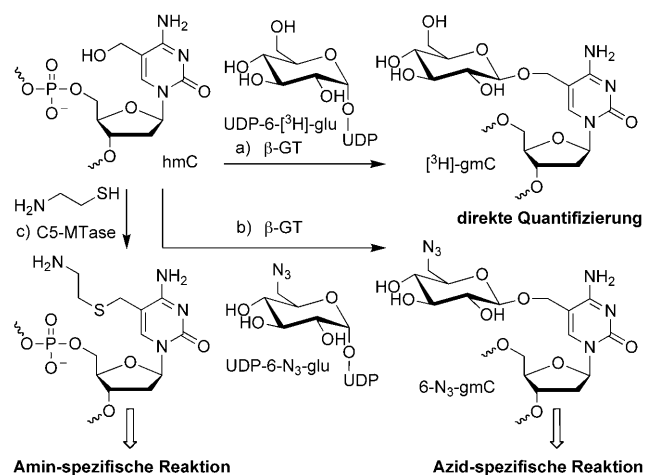
In T4 und ähnlichen Bakteriophagen werden hmC-Nucleoside durch α - und β -Glycosyltransferasen (GTs) modifiziert, denen UDP-Glucose als Glycosyldonor dient. Zwei Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander die β -GT des T4-Phagen verwendet, um Methoden zur Quantifizierung von hmC in DNA zu entwickeln. Der erste Bericht, von Leonhardt und Mitarbeitern, beschrieb die Verwendung von UDP-[³H]-Glucose zur radioaktiven Markierung von hmC (Schema 2a).^[13] Mithilfe von Kalibrierkurven wurde die Häufigkeit von hmC in unterschiedlichen Geweben der Maus bestimmt. Dabei wurden höhere Anteile der Modifikation gefunden, als durch quantitative MS nachgewiesen wurden.^[6] In einer zweiten Arbeit berichteten He und Mitarbeiter über die

Anwendung von T4- β -GT zur Anbringung einer chemisch modifizierten, Azid-haltigen Glucose-Einheit an der Hydroxygruppe von hmC (Schema 2b).^[14] Dies führte zur Bildung von 6-N₃-gmC, das anschließend in einer kupferfreien 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem biotinylierten Dibenzo-cyclooctin konjugiert wurde. Sowohl die Glycosylierung als auch die Klick-Reaktion wurden als sehr effiziente Reaktionen beschrieben, welche die selektive Anreicherung von hmC-haltiger DNA aus verschiedenen Zell-Linien ermöglichten. Streptavidin-gebundene biotinylierte DNA blockierte außerdem die Polymerase bei der Primer-Verlängerung, was zur Bestimmung der hmC-Positionen genutzt werden kann.

Eine zweite Klasse von Enzymen zur gezielten Derivatisierung von hmC sind DNA-Methyltransferasen, wie Klimašauskas und Mitarbeiter kürzlich berichteten.^[15] Es war bekannt, dass Methyltransferasen synthetische SAM-Analoga als Substrate akzeptieren und DNA dadurch mit artifiziellen funktionellen Gruppen bestückt werden kann (Schema 1d).^[16] Bei mechanistischen Untersuchungen dieser Enzyme wurde festgestellt, dass C5-MTasen auch Substrate verwenden können, die nicht von SAM abgeleitet sind. Dies führte zur Erkenntnis, dass hmC aus Cytosin durch MTase-katalysierte Addition von Formaldehyd hergestellt werden kann.^[5]

Vor kurzem wurde nun eine weitere, unerwartete Aktivität dieser Enzyme beschrieben: Bakterielle MTasen (M.HhaI und M.SssI) können Schwefel- und Selen-haltige Nucleophile selektiv mit hmC zur Reaktion bringen. Dabei wird formal die Hydroxygruppe von hmC substituiert und eine neue Thio-/Selenoetherfunktion gebildet (Schema 1e).^[15] Für diese enzymatische Aktivität ist ein konserviertes Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms essenziell. Man vermutet deshalb, dass die Reaktion ähnlich wie die Addition von Methylgruppen über ein kovalentes Protein-DNA-Intermediat verläuft. Diese Aktivität ist von mechanistischem Interesse und könnte auch zur spezifischen Derivatisierung von hmC in natürlicher DNA verwendet werden. Um das Prinzip zu demonstrieren, wurde hmC-haltige Plasmid-DNA mit Cysteamin derivatisiert (Schema 2c). Die so eingeführte primäre Aminogruppe wurde mit Biotin-NHS-Ester (NHS = *N*-Hydrosuccinimid) konjugiert und das Produkt an eine Streptavidinmatrix gebunden, um die selektive Anreicherung von hmC-DNA zu belegen. Zukünftige Arbeiten werden zeigen, wie sich die Sequenzspezifität der MTasen und die potenzielle Reversibilität der hmC-Modifikation in Abwesenheit des natürlichen Cofaktors auf die allgemeine Anwendbarkeit und die Genauigkeit der hmC-Analyse in natürlichen DNA-Proben auswirken. Diese neue enzymatische Aktivität von C5-MTase ist aber auch aus einem anderen Blickwinkel interessant, nämlich für die sequenzspezifische Funktionalisierung von DNA, die auch für die Herstellung funktioneller DNA-Architekturen von Bedeutung ist.

Die hier vorgestellten Methoden zur enzymatischen Markierung von hmC in DNA erweitern die Möglichkeiten zur gezielten Manipulation von DNA und werden verstärkt zur Analyse epigenetischer Modifikationen in genomischer DNA zum Einsatz kommen. Derzeit ist die quantitative



Schema 2. Enzymatische Markierung von hmC in DNA. T4- β -GT überträgt radioaktive [³H]-Glucose (a) oder Azid-modifizierte Glucose (b) auf die Hydroxymethylgruppe von hmC. Die glycosylierte gmC-DNA kann direkt detektiert werden^[13] oder mithilfe Azid-spezifischer Reaktionen weiter derivatisiert werden.^[14] Bakterielle C5-MTasen können hmC mit Schwefelnucleophilen derivatisieren, z. B. mit Cysteamin (c), wodurch eine primäre Aminogruppe eingeführt wird, die zur weiteren Modifikation zur Verfügung steht.^[15]

Massenspektrometrie eine der genauesten Methoden zur Quantifizierung von DNA-Modifikationen. Die neuen, chemoenzymatischen Ansätze können darüber hinaus wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Dies wird experimentell auch durch die Verfügbarkeit eines Epigenetik-Analyse-Kits erleichtert, das T4- β -GT und modifikationsspezifische Restriktionsenzyme kombiniert.^[17] Innovative Methoden sind außerdem notwendig, um die Dynamik des hmC-Gehalts in genomischer DNA besser zu verstehen, die auch im Zusammenhang mit Stammzellerhaltung und Differenzierung diskutiert wird^[18] und in den frühen Phasen der Embryonalentwicklung bei der Reprogrammierung des paternalen Genoms eine wichtige Rolle spielt.^[19] Angesichts aktueller Berichte über Mutationen in TET-Proteinen und die damit einhergehende Fehlregulation der hmC-Synthese im Knochenmark von Krebspatienten^[10] werden neue Methoden zur Quantifizierung von hmC zusätzliche Bedeutung erlangen und in Zukunft auch die Diagnose bestimmter, epigenetisch bedingter Krankheiten unterstützen.

Eingegangen am 14. Januar 2011,
veränderte Fassung am 22. Februar 2011
Online veröffentlicht am 11. April 2011

- [1] a) E. N. Gal-Yam, Y. Saito, G. Egger, P. A. Jones, *Annu. Rev. Med.* **2008**, 59, 267; b) S. Kriaucionis, A. Bird, *Hum. Mol. Genet.* **2003**, 12 Suppl. 2, 221R.
- [2] N. W. Penn, R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski, R. Yura, *Biochem. J.* **1972**, 126, 781.
- [3] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, 324, 929.
- [4] 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.
- [5] Z. Liutkevičiūtė, G. Lukinavicius, V. Masevičius, D. Daujotytė, S. Klimašauskas, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 400.
- [6] D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel, T. Carell, *PLoS One* **2010**, 5, e15367.
- [7] Die Bisulfidsequenzierung beruht auf der chemischen Desaminierung von unmodifiziertem Cytosin zu Uridin durch Natriumbisulfid. 5-Methylcytosin hingegen bleibt unverändert und wird beim Sequenzieren als Cytosin gelesen. HmC reagiert mit Bisulfid zu Cytosin-5-methylensulfonat, das auch nicht spontan desaminiert wird und ebenso als Cytosin kodiert.
- [8] a) S. G. Jin, S. Kadam, G. P. Pfeifer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, e125; b) Y. Huang, W. A. Pastor, Y. Shen, M. Tahiliani, D. R. Liu, A. Rao, *PLoS One* **2010**, 5, e8888.
- [9] M. Münzel, D. Globisch, T. Bruckl, M. Wagner, V. Welzmler, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5503; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5375.
- [10] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, 468, 839.
- [11] B. A. Flusberg, D. R. Webster, J. H. Lee, K. J. Travers, E. C. Olivares, T. A. Clark, J. Korlach, S. W. Turner, *Nat. Methods* **2010**, 7, 461.
- [12] a) E. V. Wallace, D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, T. J. Donohoe, H. Bayley, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8195; b) M. Wanunu, D. Cohen-Karni, R. R. Johnson, L. Fields, J. Benner, N. Peterman, Y. Zheng, M. L. Klein, M. Drndic, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 486.
- [13] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, e181.
- [14] C. X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C. H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T. Lahn, P. Jin, C. He, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 29, 68.
- [15] Z. Liutkevičiūtė, E. Kriukienė, I. Grigaitytė, V. Masevičius, S. Klimašauskas, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2138; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2090.
- [16] a) C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimašauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 31; b) G. Lukinavicius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimašauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2758.
- [17] EpiMark-hmC/m⁵C-Analyse-Kit von New England Biolabs (NEB E3317).
- [18] S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, 466, 1129.
- [19] K. Iqbal, S. G. Jin, G. P. Pfeifer, P. E. Szabó, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 3642.