

5-Hydroxymethylcytosin, die sechste Base des Genoms

Martin Münzel, Daniel Globisch und Thomas Carell*

DNA-Modifikationen · Epigenetik · 5-Hydroxymethylcytosin · Nukleobasen · TET-Enzyme

5-Hydroxymethylcytosin (*hmC*) wurde kürzlich als neuer Bestandteil der DNA von Säugetieren entdeckt. Es ist neben 5-Methylcytosin (*mC*) die zweite modifizierte DNA-Base in höheren Organismen. Diese Entdeckung ist von großer Bedeutung für die Epigenetik, da sie zeigt, dass Methylierung von Cytosin kein finaler Schritt zur Stummschaltung von Genen ist, sondern dass weitere Funktionalisierungen an der Methylgruppe stattfinden, welche regulatorischen Funktionen haben können. Aktuelle Fortschritte in der *hmC*-Detektion – vor allem Methoden basierend auf LC-MS und Glucosyltransferase-Assays – halfen, die präzise Verteilung von *hmC* im Körper zu entschlüsseln. Dies führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass der *hmC*-Gehalt im Gegensatz zu einem konstanten *mC*-Gehalt stark gewebespezifisch ist. Die höchsten Werte für *hmC* wurden im zentralen Nervensystem gefunden. Es wurde darüber hinaus aufgeklärt, dass *hmC* an der Regulierung der Pluripotenz von Stammzellen beteiligt ist. Die Nukleobase wurde weiterhin mit der Entwicklung von Zellen und mit Karzinogenese in Verbindung gebracht. Momentan verdichten sich die Beweise, dass *hmC* nicht ausschließlich ein Intermediat eines aktiven Demethylierungsprozesses, sondern ein wichtiger epigenetischer Marker ist.

1. Die Geschichte von 5-Hydroxymethylcytosin

Das genetische Material ist aus den vier DNA-Nukleosiden 2'-Desoxyadenosin (dA oder dAdo), 2'-Desoxyguanosin (dG oder dGua), Thymidin (Thd oder dT) und 2'-Desoxycytidin (dC oder dCyt) aufgebaut (Schema 1). Diese vier Bausteine sind in einer DNA-Doppelhelix aneinandergefügt, deren Struktur durch Watson und Crick im Jahr 1953 aufgeklärt wurde.^[1] Alle Zellen multizellulärer Organismen besitzen die gleiche genetische Zusammensetzung, obwohl sie erheblich unterschiedliche Aufgaben ausführen. Neuronen z. B. leiten elektrische Signale entlang Axonen, während eine Muskelzelle an kontrahierenden Bewegungen beteiligt ist.

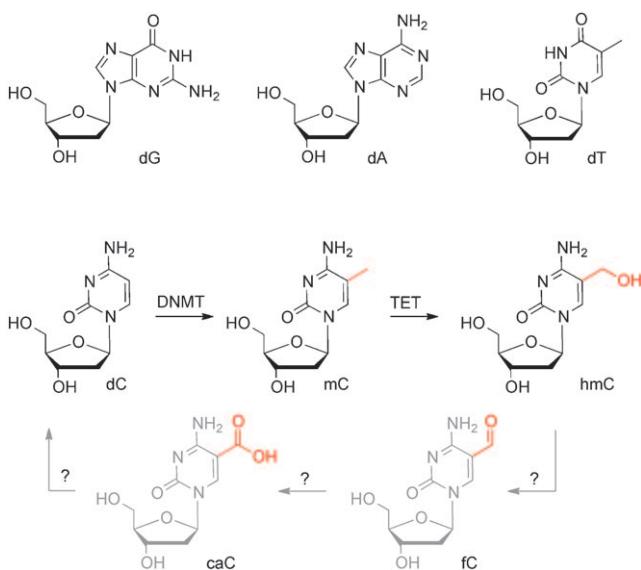
Das gleiche genetische Material löst in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Funktionen aus, was nur möglich ist, weil sich Zellen in der Art und Anzahl von aktiven Genen unterscheiden. Während der zellulären Entwicklung schalten Zellen nicht benötigte Gene auf dem Weg zur Spezialisierung aus. Stummschaltung von Genen wird chemisch durch Methylierung der Base Cytosin (dC) in der Position C5 in CpG-Inseln erreicht.^[2]

Das Methylierungsmuster ist ein außerordentlich wichtiger Bestandteil der epigenetischen Information und ein spezifischer Marker zur Unterscheidung von Zellen. Die grundlegende Base 5-Methyl-2'-desoxycytidin (*mC* oder ^{5-Me}dC oder M oder 5mC) wird oft als die fünfte Base des Genoms bezeichnet. Nach der Befruchtung und an bestimmten Punkten der embryonalen Entwicklung werden große Teile des Methylierungsmusters entfernt.^[3] Als Konsequenz ermöglicht dieser Prozess embryonalen Stammzellen, sich in jede mögliche spezialisierte Zelle zu differenzieren. Diese genomweite Demethylierung erfolgt in bestimmten Fällen ohne Zellteilung und demnach ohne Synthese von neuer DNA. Die Methylgruppe muss deshalb durch Enzyme aktiv entfernt werden. Der hierfür zuständige Mechanismus für diese aktive Demethylierung ist von höchstem Interesse, weil spekuliert wird, dass manche Zellen die Möglichkeit haben, ihr genetisches Material aktiv zu demethylieren um sich zu dedifferenzieren.^[4] Mit anderen Worten: Es wäre möglich, differenzierte Zellen durch den Prozess der aktiven Demethylierung in einen weniger differenzierten Status zu

[*] Dipl.-Chem. M. Münzel,^[+] Dipl.-Chem. D. Globisch,^[+] Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science, Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

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

5-Hydroxymethylcytosin



Schema 1. Die kanonischen DNA-Nukleoside dG, dA, dT und dC. Cytosin kann zu mC und hmC modifiziert werden. hmC könnte weiter zu den möglichen Demethylierungsintermediaten fC und caC oxidiert werden, diese wurden jedoch noch nie *in vivo* nachgewiesen.

bringen, was ein großes Potential für die Forschung und therapeutische Anwendungen hätte.

Vor kurzem wurde die Suche nach dem Prozess der aktiven Demethylierung in eine neue Richtung gelenkt. Im Jahr 2009 zeigten zwei unabhängig erschienene Publikationen in *Science*, dass DNA von Säugetieren neben 5-Methylcytosin zusätzlich 5-Hydroxymethylcytosin (hmC oder ^{5-HOMe}dC oder ShmC) enthält. Diese Modifikation wird als die sechste Base des Genoms in höheren Organismen betrachtet.^[5] Interessanterweise wurde hmC bereits vor 40 Jahren in der DNA von Säugetieren gefunden.^[6] Die damals beschriebenen Ergebnisse werden jedoch bezweifelt, da andere Gruppen diese Daten nicht reproduzieren konnten und auch in den neuen Publikationen viel geringere Werte von hmC gefunden wurden.^[7]

1.1. 5-Hydroxymethylcytosin als Nukleobase in Bakteriophagen-DNA

Die Entdeckung von hmC in Säugetieren war ein Meilenstein in der epigenetischen Forschung. Die Base selbst ist allerdings seit langem als Bestandteil der DNA von speziellen Bakteriophagen bekannt. Dies wurde im Jahr 1952 entdeckt – und somit bevor die 3D-Struktur der DNA entschlüsselt wurde.^[8] Bestimmte Phagen bauen hmC mithilfe des entsprechenden Triphosphats in ihr genetisches Material ein. Anschließend transferiert eine Glucosyltransferase einen Glucose-Rest auf die Base, um hochgradig α - oder β -glucosyierte Phagen-DNA zu generieren.^[9] Diese Glucosylation ist ein Teil der Strategie zum Schutz der eigenen DNA, um der Aktivität von bakteriellen Restriktionsenzymen zu entkommen. Diese bauen eindringende Doppelstrang-DNA in einem bakteriellen Verteidigungsprozess ab. Zusätzlich reprogrammiert der Phage das Bakterium so, dass es Nu-



Daniel Globisch studierte Chemie an der Technischen Universität Kaiserslautern. Seine Diplomarbeit fertigte er am Nukleinsäurezentrum der Universität von Süd-Dänemark in Odense in der Gruppe von Prof. Erik B. Pedersen an, wo er an HIV-1-Inhibitoren und Triplex-bildenden Nukleinäuren forschte. 2007 begann er seine Doktorarbeit in der Gruppe von Prof. Thomas Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Seine Forschungsinteressen gelten der Synthese und Quantifizierung von natürlichen tRNA- und DNA-Modifikationen.



Martin Münzel studierte Chemie an den Universitäten in Marburg und Stockholm. In seiner Diplomarbeit bei Prof. Gerhard Klebe arbeitete er an der Synthese von Thrombin-Inhibitoren. Anschließend wechselte er an die University of California in Berkeley zur Gruppe von Prof. Dirk Trauner, wo er an der Totalsynthese von komplexen Naturstoffen arbeitete. Seit 2008 ist er Doktorand in der Gruppe von Prof. Thomas Carell an der LMU München. Seine Forschung beschäftigt sich mit der Detektion und Synthese von DNA-Modifikationen und neuartigen Photoschäden.

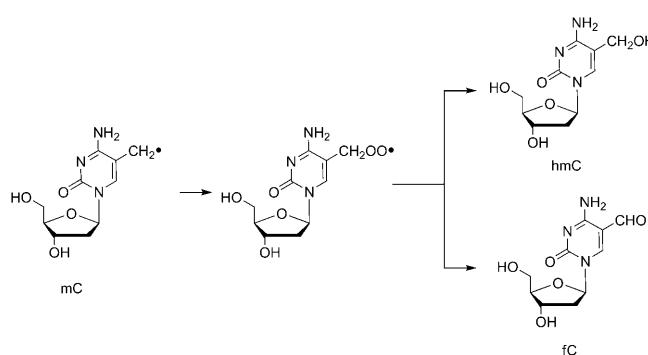


Thomas Carell studierte Chemie an den Universitäten in Münster und Heidelberg und promovierte bei Prof. H. A. Staab am Max-Planck Institut für Medizinische Forschung. Nach einem Postdoktorat bei Prof. J. Rebek am MIT habilitierte er sich an der ETH Zürich in der Gruppe von Prof. F. Diederich. 2000 nahm er einen Ruf auf eine C4-Professur an der Universität Marburg an, und seit 2004 ist er in seiner jetzigen Position an der LMU München. Er erhielt 2003 den Gottfried Wilhelm Leibniz-Preis und ist Mitglied der Deutschen Akademie der Wissenschaften Leopoldina und der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften.

kleasen produziert, welche DNA, die kein hmC enthält, abbaut. Somit baut das infizierte Bakterium sein eigenes genetischen Material ab und produziert nur noch Genprodukte des Phagen.^[10]

1.2. 5-Hydroxymethylcytosin als oxidative geschädigte Nukleobase

5-Hydroxymethylcytosin wurde zusätzlich als Folge von oxidativem Stress in normaler DNA vermutet, wobei es aus mC gebildet wird. In-vitro-Studien zeigten, dass Ein-Elektronen-Oxidation von mC in wässriger Lösung unter Sauerstoffeinfluss und UV-A-Bestrahlung zur Bildung von hmC führt.^[11] Dies ist auch in der Anwesenheit des Typ-I-Photosensibilisators Menadion möglich, welcher die instabilen Peroxyradikal- oder Hydroperoxid-Intermediate erzeugt. Diese zerfallen zu hmC.^[11,12] Eine andere Studie zeigt, dass Behandlung von mC unter Fenton-Bedingungen ($\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$



Schema 2. Ein-Elektronen-Oxidation von mC führt zu hmC und fC.

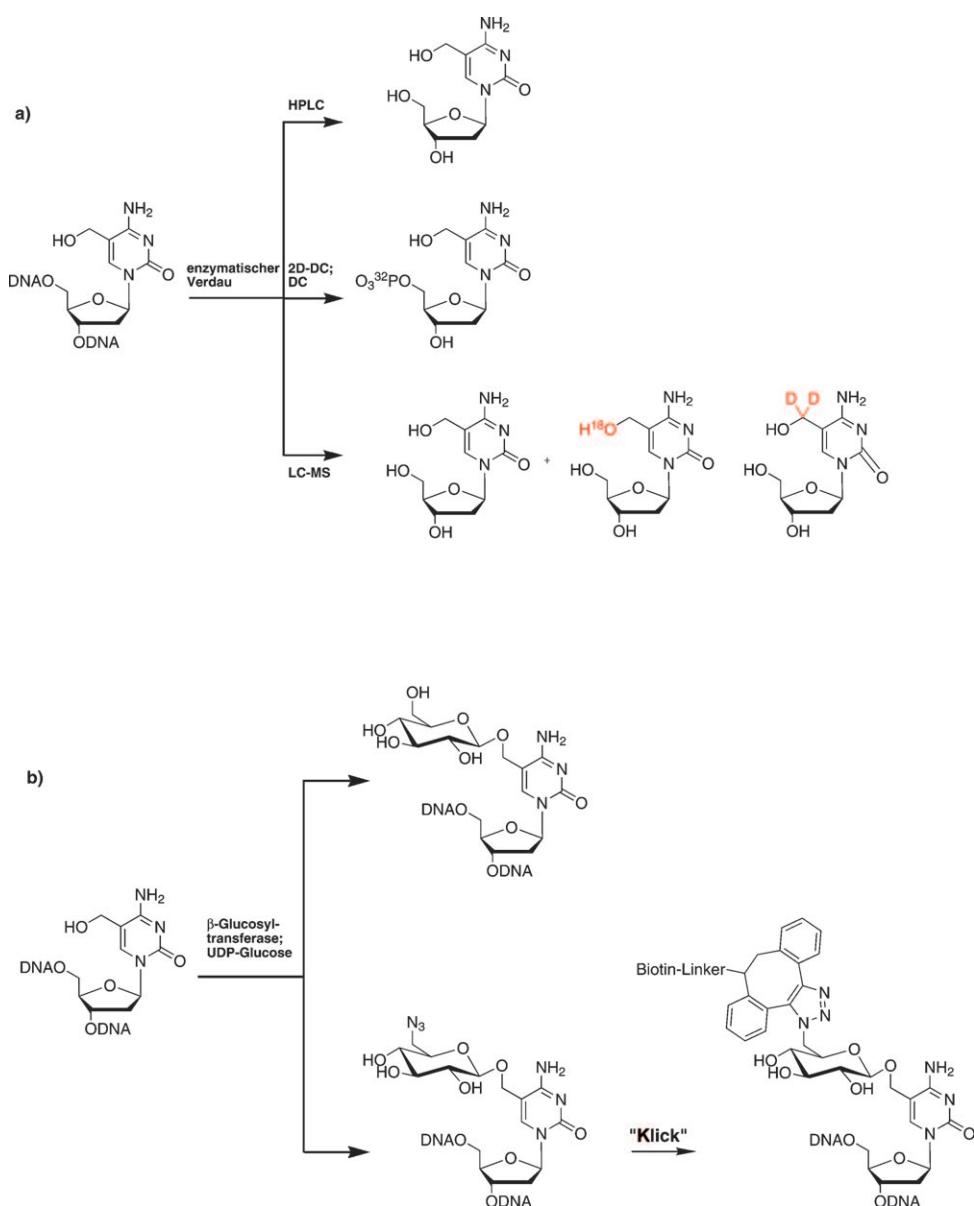
und H₂O₂) oder mit Benzooylperoxid in CBrCl₃ auch zu hmC führt.^[13] Seit dieser Entdeckung wurde spekuliert, dass hmC eines der Hauptprodukte des oxidativen Abbaus von mC sein könnte (Schema 2).

Basierend auf gemessenen Daten für dT wurde vorgeschlagen, dass 20 Moleküle hmC pro Zelle pro Tag als oxidativer Schaden aus mC erhalten werden.^[14] Interessanterweise kann hmC photochemisch durch Eliminierung von Formaldehyd zu dC umgewandelt werden.^[12b] Allerdings konnte die oxidative Bildung unter In-vivo-Bedingungen noch nicht bestätigt werden. Wichtig ist die Entdeckung, dass unter oxidativen Bedingungen neben hmC auch 5-Formyldesoxycytidin (fC oder ^{5-CHO}dC oder 5fC) und 5-Carboxyldesoxycytidin (caC oder ^{5-COOH}dC oder 5caC) gebildet werden.^[11,12] Während fC über das Hydrat deformyliert werden kann, kann caC decarboxyliert werden, was zur Regeneration von Cytosin führt. Dies ist genau die Reaktivität, welche die derzeitige Spekulationen nährt, dass hmC ein Intermediat des gesuchten Reaktionspfads sein könnte, der die aktive Demethylierung ermöglicht.

2. Detektionsmethoden

2.1. Globale Quantifizierung von 5-Hydroxymethylcytosin

In den beiden Publikationen, die 2009 in *Science* erschienen sind, isolierten Heintz und Rao mit ihren Mitarbeitern DNA aus Purkinje-Neuronen und embryonalen Stammzellen.^[5] Die DNA wurde enzymatisch zu ihren Nukleosiden hydrolysiert. Anschließend wurden diese Nukleoside mit einer Kinase und ³²P-ATP behandelt, um eine radioaktive Phosphatgruppe auf den primären 5'-Alkohol zu transferieren. Danach wurden 2D-Chromatographie, HPLC und MS-Analyse der Nukleotide durchgeführt. Dies ermöglichte beiden Arbeitsgruppen, hmC als neuen Bestandteil der genomischen DNA zu finden (Schema 3a). Kriaucionis und



Schema 3. Methoden zur Detektion und Quantifizierung von hmC. a) Quantifizierung der DNA-Nukleoside oder Nukleotide nach enzymatischem Verdau. b) Enzymatische Glucosylierung von hmC und anschließende Detektion durch Radioaktivität oder Klick-Reaktion mit Biotin.

Heintz entdeckten durch Zufall, dass 0.6% von allen Nukleosiden in Purkinje-Neuronen und ungefähr 0.2% von allen Nukleosiden in Körnerzellen hydroxymethyliert sind. Des Weiteren fanden sie hmC in einigen Gewebearten, obwohl die Nachweisgrenze (ca. 0.08%) ihrer Technik keine detaillierte Untersuchung ermöglichte.^[5a] Die von Rao et al. untersuchte Menge an hmC in embryonalen Stammzellen war mit nur 0.1% von allen Cytosinen mit einer 5-Hydroxymethylgruppe sogar noch geringer.^[5b]

Mithilfe von isotopenmarkiertem hmC als internem Standard untersuchten Carell und Mitarbeiter die Verteilung von hmC in Mausgeweben (Schema 3a) mit einer präzisen LC-MS-Methode.^[15] Es wurde entdeckt, dass die Menge an 5-Hydroxymethylcytosin in unterschiedlichen Gewebearten stark variiert. Während die Menge von 5-Methylcytosin konstant bei ungefähr 4.5% in allen Geweben liegt (Werte sind immer in % von allen Cytosinderivaten angegeben), wurde gefunden, dass Organe wie Leber und Hoden sehr geringe Mengen, Herz und Niere mittlere Mengen und Gewebe des zentralen Nervensystems hohe Mengen an hmC aufweisen (Abbildung 1a).^[15a] Eine detaillierte Betrachtung

während der Gehirnentwicklung steigen. Im Hippocampus von 90 Tage alten erwachsenen Mäusen ist der hmC-Wert fast doppelt so hoch als bei 1 Tag alten Mäusen (Abbildung 1c).^[15b] Eine ähnliche Korrelation wurde später für das Kleinhirn gezeigt (Abbildung 1c).^[17] Zusammen deuten diese Hinweise auf eine Aufgabe von hmC während der neuronalen Entwicklung und Ausdifferenzierung des Gehirns hin.

In einem alternativen Ansatz zur Detektion von hmC verwendeten Leonhardt und Mitarbeiter die β -Glucosyltransferase aus Phagen, um radioaktiv markierte UDP-[³H]Glucose auf die Hydroxygruppe der Base hmC innerhalb der DNA zu laden (Schema 3b).^[18] Sie bestimmten die Menge an hmC durch Szintillation. Mithilfe dieser Methode bestimmte diese Arbeitsgruppe die Verteilung von hmC im Gewebe und konnte ermitteln, dass mC für die Bildung von hmC notwendig ist. Dies konnte durch das Messen der hmC-Werte in DNMT-Dreifachknockout-Zellen erreicht werden, welche die Fähigkeit zur Methylierung von Cytosin verloren haben.

Jin, He und Mitarbeiter erweiterten die von Leonhardt etablierte Methode, indem sie UDP-6-Azidoglucose und die gleiche β -Glucosyltransferase aus Phagen verwendeten, um hmC enthaltende DNA mit einem Azidrest zu beladen.^[17] Unter Verwendung der Klick-Chemie konnten sie eine Biotineeinheit an jedem hmC anbringen, was ihnen ermöglichte, hmC enthaltende DNA zur anschließenden Sequenzanalyse zu isolieren. Darüber hinaus konnten sie die Menge an hmC in DNA mit einem Biotin-spezifischen Antikörper quantifizieren. Mit dieser Methode konnten Jin, He und ihre Mitarbeiter nicht nur den Alterseffekt bestätigen, sondern auch zeigen, dass Hydroxymethylierung in intragenischen Regionen angereichert ist. Demgegenüber ist mC hauptsächlich in CpG-Inseln vorhanden, welche in Promoterbereichen vorkommen. Interessanterweise kann hmC angehäuft in Genen gefunden werden, welche mit Angiogenese und Hypoxie in Verbindung gebracht werden. HIF-Prolyl-Hydroxylasen sind eine bekannte Sauerstoff-detektierende Enzymklasse, die mit den TET-Enzymen verwandt ist, die hmC bilden (siehe unten).^[19] Dies ließ Jin, He und Mitarbeiter spekulieren, dass hmC möglicherweise an einem Regulierungsprozess beteiligt sein könnte.

Die Autoren bestätigten des Weiteren, dass hmC nur in geringen Mengen in kultivierten Zellen vorhanden ist (Abbildung 1b).^[17] Aktuelle Färbeexperimente mit polyklonalen Antikörpern gegen hmC zeigten, dass hmC in allen Zellkernen vorkommt, und bestätigten die ungleiche Verteilung der Quantifizierungsexperimente.^[15a] Hohe Mengen wurden in differenzierten Neuronen des Gyrus dentatus detektiert (Abbildung 1d). Gebiete, die viele neuronale Stammzellen enthalten, zeigten dagegen eine schwächere Färbung, was auf eine geringere Menge an hmC in den entsprechenden Zellkernen hinweist.

Weitere Detektionsmethoden für die Isolierung von DNA-Strangfragmenten mit hmC beruhen auf der Verwendung von J-bindendem Protein-1 (JB1), welches an einer magnetischen Festphase immobilisiert ist.^[20] Diese Proteine binden glucosyliertes 5-Hydroxymethyluracil, die sogenannte Base J, die in Trypanosomen und verwandten Kinetoplastea vorkommt.^[21] Robertson et al. konnten zeigen, dass JB1

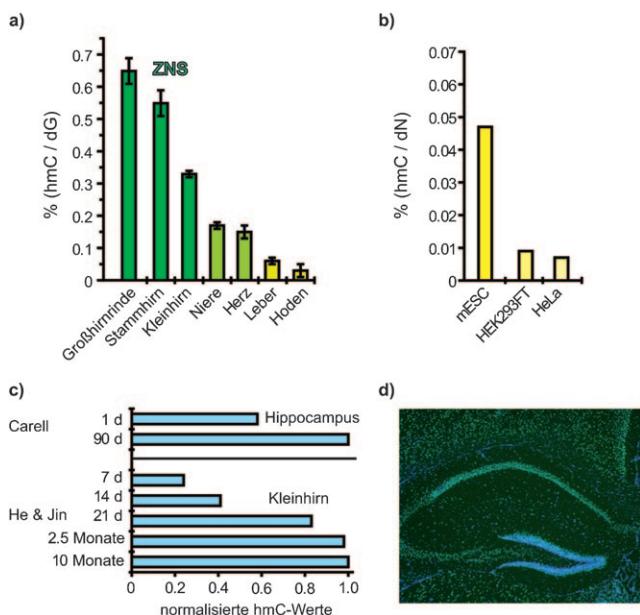


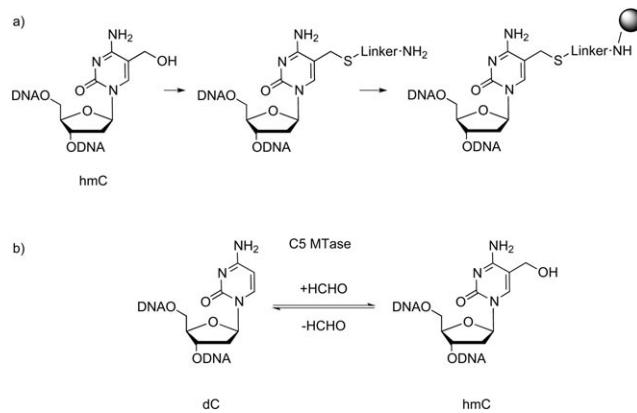
Abbildung 1. Verteilung von hmC im Körper von Säugetieren:
a,b) Quantifizierung von hmC in verschiedenen Geweben und Zelllinien. c) hmC-Werte steigen während der Entwicklung des Gehirns (normalisierte Werte) d) Immunolokalisation von hmC im Hippocampus einer Maus. Anti-hmC (grün), Hoechst 33342 (blau), mESC: embryonale Stammzellen (Maus).

von verschiedenen Gehirnarealen zeigte, dass erneut die Mengen an 5-Hydroxymethylcytosin von 0.3% in der Netzhaut und im Kleinhirn bis zu 0.7% in der Großhirnrinde und im Hippocampus variieren.^[15b] Die letzten beiden sind Gehirnregionen, die an höheren kognitiven Funktionen beteiligt sind. Diese Ergebnisse sind hochinteressant, besonders im Hinblick auf neueste Erkenntnisse, dass aktive Demethylierungen in ausdifferenzierten Neuronen als Folge von Lern- und Gedächtnisprozessen auftreten.^[4,16] Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die Entdeckung, dass die hmC-Werte

auch glucosyliertes hmC stark binden kann, was die Isolierung von DNA mit hmC durch einfache Inkubation der DNA mit der magnetischen Festphase erlaubt.^[20] Durch Verwendung dieser Methode wurde entdeckt, dass der hmC-Gehalt in Promoterbereichen der Gene *NANOG* und *OCT4*, die mit Pluripotenz verbunden werden, erhöht ist.

Weitere Quantifizierungen von hmC auf der Basis von LC-MS/MS wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt.^[22] In *Dnmt1*- und *Dnmt3a*-Doppelknockout-Mäusen (DKO) wurden sowohl geringere hmC- als auch mC-Werte als in den Kontrollexperimenten gefunden, während keine Unterschiede in den hmC-Werten für jedes Einfach-knockout-Experiment (SKO) gefunden wurden.^[22a] Diese Ergebnisse bestätigen zusätzlich, dass hmC aus mC gebildet wird. Mit der Entwicklung von spezifischen Antikörpern wurde es auch möglich, die Menge von hmC durch die klassische Dot-Blot-Technik zu ermitteln.^[23]

Interessant ist die Entdeckung von Klimasauskas und Mitarbeitern, die zeigten, dass Methyltransferasen hmC-haltige DNA binden können und dass die OH-Gruppe durch Moleküle, die Schwefel- oder Selen-Reste enthalten, ausgetauscht werden kann. Dies erlaubt die chemische Modifizierung von DNA-Strängen mit hmC (Schema 4a).^[24] In einer früheren Studie konnten die gleichen Autoren zeigen, dass bakterielle Methyltransferasen zudem fähig sind, Formaldehyd an Cytosin anzufügen, um hmC zu erhalten.^[25] Interesanterweise war auch die reversible Reaktion möglich, in der die Hydroxymethylgruppe entfernt wurde. Dies könnte ein denkbarer Mechanismus zur aktiven Demethylierung sein (Schema 4b). Die Formaldehyd-Entwicklung in vivo sollte unproblematisch für Zellen sein, weil Formaldehyd ein bekanntes Nebenprodukt im Stoffwechsel ist und z.B. durch Histondemethylasen oder bestimmte DNA-Reparaturenzyme entsteht.^[26]



Schema 4. a) Methyltransferase-vermittelte Derivatisierung von hmC mit Cysteaminen oder Selenocysteaminen und weitere Funktionalisierung mit fluoreszierenden Gruppen. b) Reversible Umwandlung von dC in hmC mit Formaldehyd und Methyltransferasen.

2.2. Positionsspezifische Detektion von 5-Hydroxymethylcytosin

Die Methode der Wahl zur Sequenzierung der epigenetischen Information, Bisulfit-Sequenzierung, kann unglücklicherweise hmC nicht spezifisch detektieren, was es zurzeit

ungemein erschwert, die Position von hmC-Basen im Genom zu identifizieren.^[27] Bisulfit desaminiert Cytosine zu Uracil, während es mC nicht umsetzt.^[28] Zusätzlich reagiert Bisulfit mit der Hydroxymethylgruppe von hmC zu 5-Methylensulfonat.^[29] Weil dieses Reaktionsprodukt nicht zur Desaminierung führt und möglicherweise Polymerasen blockiert, ist die Unterscheidung von hmC und mC momentan unmöglich. Gegen 5-Methylensulfonat, das hocheffizient aus hmC entsteht, wurde ein Antikörper entwickelt, der es erlaubt, hmC über das Sulfonat zu detektieren und zu quantifizieren.^[30] Alternative Sequenzierungsmethoden können ebenfalls nicht zwischen mC und hmC unterscheiden oder wurden bisher noch nicht getestet.^[31] Auch Sequenzierungsmethoden, die auf Restriktionsenzymen basieren, erlauben keine Differenzierung von mC und hmC. Allerdings wurden aktuell Fortschritte in diese Richtung mit Glucosyltransferasen in Kombination mit den Restriktionsenzymen MspI, HpaII und GlaI beschrieben, welche jedoch in ihrer Sequenzspezifität beschränkt sind.^[32] Zusätzlich wurde die Endonuklease PvuRts11 identifiziert, die spezifisch auf hmC wirkt.^[33] In Zukunft könnte Nanopore-Sequenzierung eine Lösung für dieses Problem sein. Erste Untersuchungen zeigten, dass diese Sequenzierungsmethode zwischen mC und hmC in Einzel- und Doppelstrang-DNA unterscheiden kann.^[34] Letztendlich könnten moderne „Sequencing-by-Synthesis“-Methoden sequenzspezifische Informationen über hmC basierend auf der Kinetik des Triphosphat-Einbaus liefern.^[35]

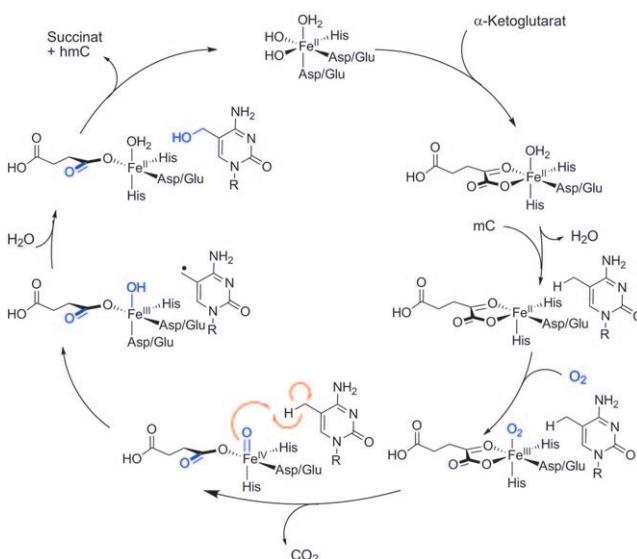
3. Enzymologie von 5-Hydroxymethylcytosin

Parallel zur Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung und spezifischen Detektion von hmC wurden auch die enzymatischen Reaktionen, die zur Bildung von hmC führen, untersucht. In ihrer Originalpublikation benutzten Rao und Mitarbeiter bioinformatische Methoden für die Identifizierung der Methylcytosin-Oxidasen.^[5b,36] Sie beschrieben, dass TET1-Enzyme (ten-eleven translocation) hmC postreplikativ aus mC bilden können. Laut jetzigem Stand sind drei TET-Enzyme bekannt (TET1–3). Sie sind Fe^{II}- und α-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen, die mC sowohl in vitro als auch in vivo in hmC umwandeln.^[5b,37] Neben der katalytischen Domäne enthalten sie weiterhin eine zweikernige Zn-bindende CX₂C-Domäne, die man in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen findet.^[5b,38] Der allgemeine Reaktionmechanismus von α-Ketoglutarat-abhängigen Enzymen ist in Schema 5 dargestellt.^[39]

3.1. Die Rolle von hmC und TET-Enzymen während der Entwicklung von Zellen

Die Menge an 5-Hydroxymethylcytosin wird in Stammzellen und während der Differenzierung dynamisch reguliert.^[40] In Eizellen und Zygoten wird ausschließlich TET3 exprimiert, und kürzlich konnten zwei Studien zeigen, dass mC nach der Befruchtung nur im männlichen, nicht aber im weiblichen Pronukleus in hmC umgewandelt wird.^[23,41] Die Ergebnisse legen nahe, dass die bisher angenommene De-

5-Hydroxymethylcytosin



Schema 5. Reaktionsmechanismus von α -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen. Die Reaktion verläuft über ein Eisen(IV)-Intermediat. Während der Reaktion wird der Cofaktor α -Ketoglutarat zu Succinat decarboxyliert.

methylierung des männlichen Genoms in Wirklichkeit eine TET3-vermittelte Hydroxymethylierung ist. Nach der Umprogrammierung des männlichen Genoms sinken die TET3-Level schnell bis zum 2-Zellen-Stadium. Im Gegensatz zur Zygote sind in embryonalen Stammzellen TET1 und TET2 stark exprimiert, während die TET3-Level niedrig sind.^[42] Wenn Stammzellen differenzieren, steigen hingegen die TET3-Werte wieder an, während TET1 und TET2 sinken. Wenn adulte Zellen in pluripotente Stammzellen zurückentwickelt werden, kann man den umgekehrten Verlauf beobachten: TET3 sinkt, während TET1 und TET2 wieder zunehmen. Zusammenfassend kann man sagen, dass TET1 und TET2 somit sowohl mit dem Pluripotenznetzwerk als auch dem Differenzierungspotential von Stammzellen assoziiert sind.

Ein siRNA-vermittelter Rückgang von TET1 in Stammzellen führte zu morphologischen Veränderungen.^[37] Diese Resultate konnten jedoch in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden.^[42a] Zusätzlich differenzieren Stammzellen in der Abwesenheit von TET1 aus, was zeigt, dass TET1 und damit hmC wichtig für die Erhaltung und Selbsterneuerung von Stammzellen ist.^[37] In einer weiteren Studie konnten Koh et al. zeigen, dass die Abwesenheit von TET1 tendenziell zu einer Differenzierung in Mesoderm und Endoderm führt, während TET2 die Differenzierung in Neuroektoderm beeinflusst.^[42a] Auf der genetischen Ebene könnte ein Defekt in TET1 zur verstärkten Methylierung des NANOG-Promoters führen, was einen Verlust der Pluripotenz zur

Folge hat.^[37] Die Verbindung zwischen dem NANOG-Promoter und TET1 wird jedoch kontrovers diskutiert.^[37, 42a, 43] Alternativ könnten die NANOG- und OCT4-Genprodukte an der Regulation von TET1 und TET2 beteiligt sein.^[42a] Chromatin-Immunfärbung zeigte, dass OCT4 an die nicht-kodierenden Sequenzen der TET1- und TET2-Gene bindet, was nahelegt, dass die DNA-Hydroxylasen durch den Pluripotenzfaktor OCT4 reguliert werden.^[42a] Ein Überblick über die publizierten hmC-, mC- und TET-Werte ist in Abbildung 2 dargestellt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass TET1 und TET2 für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wichtig sind, während TET3 mit Differenzierungsprozessen assoziiert ist. hmC ist somit an der Ausbildung von pluripotenten Zellen, der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und an der Differenzierung in die Keimblätter beteiligt.

3.2. Die Rolle von hmC und der TET-Enzyme bei Krebs

Viele myeloide Krebsarten (z.B. Leukämie) zeigen eine Mutation in TET2, was dazu führt, dass die Zelle mC nicht mehr korrekt zu hmC hydroxylieren kann. Weiterhin wurde festgestellt, dass TET2 eine wichtige Rolle in der normalen Myelopoiese spielt und dass die reduzierte Bildung von hmC der Grund für die Tumorigenese ist.^[30] Interessanterweise wurde gefunden, dass Patienten mit nicht-funktionalem TET2 auch reduzierte mC-Werte zeigten. Dies ist überraschend, da hmC aus mC gebildet wird und reduzierte hmC-Werte somit erhöhte mC-Werte bedingen sollten. Es wurde vorgeschlagen, dass ein Verlust der TET2-Funktion einen stammzellenartigen Zustand der Zelle reaktiviert, der durch generelle genomische Instabilität und Hypomethylierung charakterisiert ist.

Ein weiteres Enzym, dass in vielen Krebsarten mutiert ist, ist Isocitratdehydrogenase (IDH).^[44] Eine Mutation von IDH führt zur Akkumulation von 2-Hydroxyglutarat in der Zelle.^[45] Diese Substanz ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor von α -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen.^[46a] Die Inhibition der TET-Enzyme durch 2-Hydroxyglutarat wird nun als weiterer Mechanismus der Tumorigenese angenommen.^[46b] Weitere Bestätigung für die Inhibition der TET-Enzyme bei

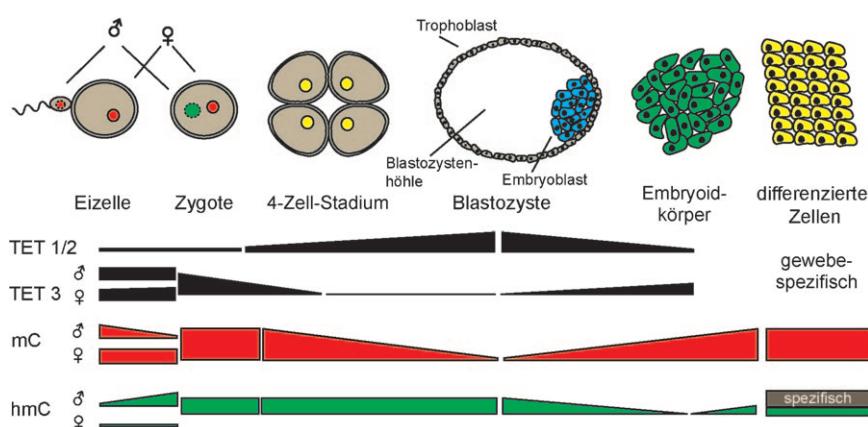


Abbildung 2. Werte von mC, hmC und den TET-Enzymen während der Zellentwicklung.

Krebs kommt durch die Beobachtung, dass alle bislang untersuchten (Krebs-)Zelllinien nur sehr geringe Mengen an hmC vorweisen.^[17] Die Messung der hmC-Werte eines Gewebes könnte somit eine Früherkennung von Krebserkrankungen ermöglichen.

Um weitere Beweise zu erhalten, dass reduzierte hmC-Werte nicht nur eine Folge von, sondern der Grund für die Tumogenese sind, injizierten Koh et al. normale Stammzellen und Stammzellen mit inhibierten TET-Enzymen in Mäuse.^[42a] Während die Wildtyp-Stammzellen nur gutartige Teratome auslösten, führten die TET-defizienten Stammzellen zu bösartigen Tumoren mit hoher Zellproliferation. Dieses elegante Experiment zeigte, dass korrekte hmC-Mengen von äußerster Bedeutung für die korrekte Funktion von Zellen sind und dass Defekte in der Hydroxymethylierung von DNA zu ernsten Defekten führen kann.

4. Regulatorische Funktion

Trotz großer Forschungsanstrengungen in den letzten zwei Jahren ist die exakte biochemische Funktion von hmC weiterhin unbekannt. Obwohl bekannt ist, dass die Base an der Genregulation während der Zellentwicklung und Tumogenese beteiligt ist und sich Hinweise verdichten, dass Hydroxymethylierung mit aktiv transkribierten Genen zusammenhängt, sind die exakten Mechanismen, die hinter diesen Beobachtungen stehen, weitgehend unklar.^[37,40,47] Besonders wie die Information auf der DNA in zelluläre Signale umgewandelt wird, muss noch aufgeklärt werden. Im Falle von mC gibt es spezielle Methyl-CpG-bindende Domänen (MDB), die die Kommunikation zwischen Epigenom und Proteom ermöglichen. hmC-bindende Domänen wurden jedoch noch nicht gefunden (Abbildung 3). mC-bindende

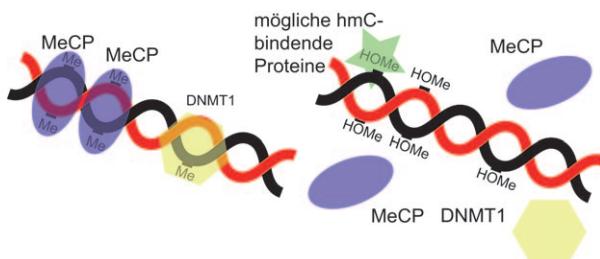


Abbildung 3. Effekt der Hydroxymethylierung auf 5-Methylcytosin bindende Proteine.

Proteine wie Methyl-CpG-bindendes Protein 2 (MeCP2) oder DNA-Methyltransferase (DNMT) binden nicht an hydroxymethylierte DNA, was eine komplementäre Rolle der zwei epigenetischen Modifikationen nahelegt.^[48]

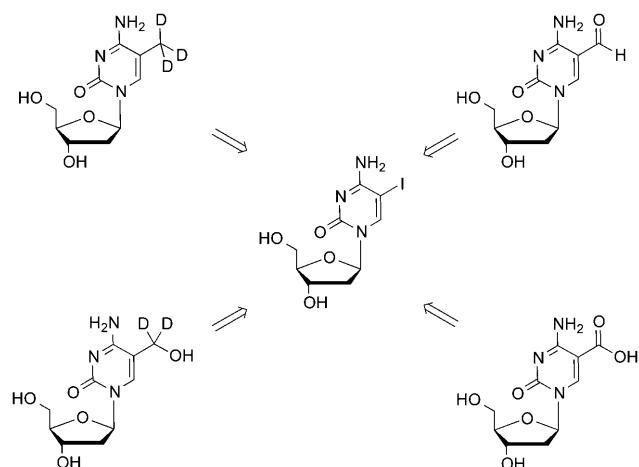
Eine weitere Möglichkeit ist, dass hmC ein Intermediat eines oxidativen Demethylierungsmechanismus ist. Carell und Mitarbeiter konnten in somatischen Zellen jedoch weder 5-Formylcytosin noch 5-Carboxycytosin finden, selbst wenn große Mengen an DNA untersucht wurden.^[15a] Dies zeigt, dass wenn hmC an aktiver Demethylierung beteiligt ist, die Intermediate nicht zu großen Mengen in der Zelle akkumulieren.

Weiterhin konnten keine Intermediate eines Demethylierungsmechanismus gefunden werden, der über eine Desaminierung zu hmU und anschließende Basenexzisions-reparatur verläuft. Dies wird durch Studien von Iqbal et al. gestützt, die zeigen, dass die Demethylierung in Zygoten tatsächlich eine globale Hydroxymethylierung ist.^[23] Guo et al. berichteten kürzlich über Hinweise, die zeigen, dass eine aktive Demethylierung in Neuronen stattfindet, wenn man sowohl die TET-Enzyme als auch die Desaminase Apobec in den Zellen überexprimiert.^[16c]

5. Chemische Synthese von 5-Hydroxymethylcytosin enthaltender DNA und biophysikalische Untersuchungen

In der chemischen Forschung sind zwei Gebiete entstanden. Erstens war es wichtig, Phosphoramidite zu entwickeln, die den effizienten Einbau von hmC in DNA erlaubt. Zweitens wurden isotopenmarkierte Verbindungen synthetisiert, die als interner Standard für die massenspektrometrische Quantifizierung oder zur metabolischen Markierung verwendet werden können.^[13b,15a,b,49]

Für die Synthese wurden zwei Strategien entwickelt. hmC kann über hmU^[14,15b,50] oder durch metallkatalysierte Funktionalisierung von 5-Ioddesoxycytidin^[15a,51] hergestellt werden (Schema 6). Die erste Strategie wurde von Sowers und



Schema 6. Retrosynthese von [D₃]mC, [D₂]hmC, fC und caC jeweils aus 5-Ioddesoxycytidin.^[15,51]

Mitarbeitern verwendet, um den ersten Phosphoramidit-Baustein, in dem die 5-Hydroxymethylgruppe mit einem Cyanoethylrest geschützt ist, zu entwickeln.^[14] Die Synthese dieses Bausteins wurde kürzlich von Hansen et al. auf elegante Weise verbessert.^[50b] Der Baustein wird routinemäßig für die Synthese von hmC enthaltender DNA verwendet. Für die Entschützung sind jedoch harsche Bedingungen (60 h, 60°C, konz. NH₄OH) notwendig, was die Synthese von funktionalisierter DNA, die z.B. Biotingruppen trägt, verhindert. Ein weiteres Phosphoramidit wurde von de Kort et al. beschrieben.^[50a] Diese Verbindung trägt Acetatgruppen

zur Schützung der exocyclischen Aminogruppe und der Hydroxygruppe und kann in einer zweistufigen Sequenz (NaOH , NH_4OH) unter milden Bedingungen entschützt werden. Carell und Mitarbeiter haben einen Phosphoramidit-Baustein entworfen, in dem die beiden reaktiven Gruppen gleichzeitig als cyclisches Carbamat geschützt sind.^[51] Nach der DNA-Synthese kann er mit verdünnter NaOH bei Raumtemperatur entschützt werden und ermöglicht nun die Synthese von hochfunktionalisierter DNA. Weiterhin wurden zwei miteinander verwandte Bausteine von Dai et al. veröffentlicht, die die Hydroxygruppe als *tert*-Butylsilyl(TBS)-Ether schützen.^[52] Dieser Rest kann entweder durch Base (65°C , konz. NH_4OH) oder in einer zweistufigen Sequenz unter Verwendung von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) zu hmC umgewandelt werden.

Drndic und Mitarbeiter führten hmC mithilfe einer Polymerase und eines hmC-Triphosphats in DNA ein.^[34a] Auf diese Weise stellten sie Stränge her, die entweder dC oder mC oder hmC enthielten. Mit diesen wurden Fluoreszenz-Annealingkurven aufgenommen. Die niedrigste Schmelztemperatur wurde für hmC gemessen, eine mittlere für dC und die höchste für mC. Diese Beobachtungen wurden durch Moleküldynamiksimulationen bestätigt. Die Autoren schlussfolgern, dass die Organisation der Wassermoleküle um die Helix deren Stabilität beeinflusst. Das unpolare Nukleosid mC führt zu erhöhter Rigidität und stabilisiert damit den DNA-Doppelstrang. Diese Ergebnisse wurden in ausführlichen Studien mit isothermer Titrationskalorimetrie bestätigt.^[47] Es zeigte sich, dass Hydroxymethylierung den stabilisierenden Effekt, der für mC beobachtet wird, wieder umkehrt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In den zwei Jahren nach ihrer Entdeckung hat die neue sechste DNA-Base 5-Hydroxymethylcytosin große Aufmerksamkeit in verschiedenen Forschungsgebieten erfahren. Es wurde gezeigt, dass sie ein wichtiger Bestandteil des genetischen Systems von Säugetieren ist und dass sie durch TET-Enzym-vermittelte Reaktion aus 5-Methylcytosin gebildet wird. Eine Oxidation von 5-Methylcytosin verändert somit die epigenetische Information auf der DNA. hmC ist an Prozessen zur Zellentwicklung beteiligt und mit Pluripotenz von Stammzellen assoziiert. Weiterhin verdichten sich die Anzeichen, dass fehlerhafte Hydroxymethylierung eine Ursache für Tumorgenese sein kann. Die größten Werte von hmC werden im Gehirn und speziell in den Regionen, die mit hohen kognitiven Funktionen assoziiert sind, gefunden.

Interessanterweise steigen die globalen hmC-Werte während der Entwicklung von Säugetieren, um im Erwachsenenalter schließlich stabil zu bleiben. Die molekularen Gründe für diese Beobachtungen sind momentan weitgehend unklar, aber man kann spekulieren, dass Hydroxymethylierung Zellen in ihrem endgültigen Entwicklungsstadium fixiert. Zukünftige Forschung wird die exakten biochemischen Folgen der Hydroxymethylierung aufklären müssen. hmC-bindende Proteine müssen gefunden werden, und eine Methodik zur sequenzspezifischen Detektion von hmC muss entwickelt werden. Dies wird zu einem detaillierteren Ver-

ständnis der Hydroxymethylierung führen und helfen, das Wissen über epigenetische Regulation zu vervollständigen.

Anmerkung: Während dieses Manuscript begutachtet wurde, erschienen vier Publikationen, die die Verteilung von hmC im Genom von Stammzellen zeigen.^[40, 53]

M.M. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium. Die Autoren danken dem Exzellenzcluster CiPS^M, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 646 und 749 und Normalverfahren) und der COST Action „Free Radicals in Biology“ für die Unterstützung ihrer Forschungen. Wie danken Dr. Markus Müller für das sorgfältige Lesen des Manuskripts.

Eingegangen am 2. März 2011
Online veröffentlicht am 17. Juni 2011

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] a) J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204–220;
b) R. Bonasio, S. J. Tu, D. Reinberg, *Science* **2010**, *330*, 612–616;
c) P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068–1070.
- [3] a) A. Meissner, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1079–1088; b) S. H. Feng, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Science* **2010**, *330*, 622–627.
- [4] S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607–620.
- [5] a) S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930; b) M. Tahiliani et al., *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [6] N. W. Penn, R. Suwalski, C. O’Riley, K. Bojanowski, R. Yura, *Biochem. J.* **1972**, *126*, 781–790.
- [7] R. M. Kothari, V. Shankar, *J. Mol. Evol.* **1976**, *7*, 325–329.
- [8] a) G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Nature* **1952**, *170*, 1072–1073;
b) G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 774–782.
- [9] a) R. L. Sinsheimer, *Science* **1954**, *120*, 551–553; b) E. Volkin, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5892–5893.
- [10] a) R. A. J. Warren, *Annu. Rev. Microbiol.* **1980**, *34*, 137–158;
b) J. H. Gommersampt, P. Borst, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1034–1042.
- [11] C. Bienvenu, J. R. Wagner, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11406–11411.
- [12] a) J. R. Wagner, J. Cadet, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 564–571;
b) E. Privat, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 745–750.
- [13] a) G. D. Castro, C. J. Stamato, J. A. Castro, *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *17*, 419–428; b) H. Cao, Y. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4833–4844.
- [14] S. Tardy-Planechaud, J. Fujimoto, S. S. Lin, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 553–558.
- [15] a) D. Globisch, M. Müntzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS One* **2010**, *5*, e15367;
b) M. Müntzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmiller, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5503–5505; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5375–5377.
- [16] a) J. J. Day, J. D. Sweatt, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1319–1323;
b) C. A. Miller, J. D. Sweatt, *Neuron* **2007**, *53*, 857–869; c) J. U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G.-l. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, *145*, 423–434. Carell und Mitarbeiter entdeckten kürzlich 5-Formyl-2'-desoxycytidin als neue Base in der DNA embryonalen Stammzellen, was die Existenz eines oxidativen Demethylierungsweges nach Lit. [15a] wahrscheinlich macht (T. Carell, mündliche Mitteilung, 9.5.2011, ISIS, Straßburg).
- [17] C.-X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. 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.* **2011**, *29*, 68–72.
- [18] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada, H. Leонhardt, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e181.

- [19] C. J. Schofield, P. J. Ratcliffe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 343–354.
- [20] A. B. Robertson, J. A. Dahl, C. B. Vågbø, P. Tripathi, H. E. Krokan, A. Klungland, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e55.
- [21] M. Cross, R. Kieft, R. Sabatini, M. Wilm, M. de Kort, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, F. van Leeuwen, P. Borst, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6573–6581.
- [22] a) J. Feng, Y. Zhou, S. L. Campbell, T. Le, E. Li, J. D. Sweatt, A. J. Silva, G. Fan, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 423–430; b) H. Cao, Y. Wang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1335–1341; c) A. Burdzy, K. T. Noyes, V. Valinluck, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4068–4074; d) T. Le, K.-P. Kim, G. Fan, K. F. Faull, *Anal. Biochem.* **2011**, *412*, 203–209.
- [23] K. Iqbal, S.-G. Jin, G. P. Pfeifer, P. E. Szabó, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3642–3647.
- [24] a) Z. Liutkevičiūtė, E. Kriukienė, I. Grigaitytė, V. Masevičius, S. Klimašauskas, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2138–2141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2090–2093.
- [25] Z. Liutkevičiūtė, G. Lukinavicius, V. Masevičius, D. Daujotyte, S. Klimašauskas, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 400–402.
- [26] a) P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178–182; b) R. J. Hopkinson, R. B. Hamed, N. R. Rose, T. D. W. Claridge, C. J. Schofield, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 506–510; c) Y. Shi, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 829–833; d) S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174–178; e) C.-G. Yang, C. Yi, E. M. Duguid, C. T. Sullivan, X. Jian, P. A. Rice, C. He, *Nature* **2008**, *452*, 961–965.
- [27] a) Y. Huang, W. A. Pastor, Y. H. Shen, M. Tahiliani, D. R. Liu, A. Rao, *PLoS One* **2010**, *5*, e8888; b) S.-G. Jin, S. Kadam, G. P. Pfeifer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e125; c) C. Nestor, A. Ruzov, R. Meehan, D. Dunican, *BioTechniques* **2010**, *48*, 317–319.
- [28] a) H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kai, S. Iida, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2858–2865; b) R. Shapiro, R. E. Servis, M. Welcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 422–424; c) M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1827–1831.
- [29] M. Shiragami, H. Hayatsu, *Nucleic Acids Res.* **1976**, S31–S32.
- [30] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganeztzy, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, *468*, 839–843.
- [31] a) S. Bareyt, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 187–190; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 181–184; b) M. Müntzel, L. Lercher, M. Müller, T. Carell, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e192; c) A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 21–26.
- [32] a) T. Davis, R. Vaisvila, *J. Vis. Exp.* **2011**, e2661; b) L. S. Shock, P. V. Thakkar, E. J. Peterson, R. G. Moran, S. M. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3630–3635.
- [33] A. Szwagierczak, A. Brachmann, C. S. Schmidt, S. Bultmann, H. Leonhardt, F. Spada, *Nucleic Acids Res.* **2011**, DOI: 10.1093/nar/gkr118.
- [34] a) 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*, 486–492; b) E. V. B. Wallace, D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, T. J. Donohoe, H. Bayley, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8195–8197.
- [35] a) 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*, 461–465; b) D. Summerer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2499–2501.
- [36] L. M. Iyer, M. Tahiliani, A. Rao, L. Aravind, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1698–1710.
- [37] S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, *466*, 1129–1133.
- [38] C. Loenarz, C. J. Schofield, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 580–583.
- [39] N. R. Rose, M. A. McDonough, O. N. F. King, A. Kawamura, C. J. Schofield, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, DOI: 10.1039/C0CS00203H.
- [40] G. Ficz, M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews, W. Reik, *Nature* **2011**, *473*, 398–402.
- [41] M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 241.
- [42] a) K. P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, K. Cunniff, A. Laiho, M. Tahiliani, Y. Huang, E. Thompson, J. Nardone, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley, A. Rao, *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 200–213; b) J. Walter, *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 121–122.
- [43] H. Wu, A. C. D'Alessio, S. Ito, K. Xia, Z. Wang, K. Cui, K. Zhao, Y. E. Sun, Y. Zhang, *Nature* **2011**, *473*, 389–393.
- [44] L. Dang, S. Jin, S. M. Su, *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 387–397.
- [45] L. Dang, D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, K. M. Marks, R. M. Prins, P. S. Ward, K. E. Yen, L. M. Liau, J. D. Rabinowitz, L. C. Cantley, C. B. Thompson, M. G. Vander Heiden, S. M. Su, *Nature* **2009**, *462*, 739–744.
- [46] a) W. Xu, H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.-H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M.-T. Xiao, L. Liu, W. Jiang, J. Liu, J. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y. Xu, Q. Lei, K.-L. Guan, S. Zhao, Y. Xiong, *Cancer Cell* **2011**, *19*, 17–30; b) R. Chowdhury, K. K. Yeoh, Y.-M. Tian, L. Hillringhaus, E. A. Bagg, N. R. Rose, I. K. H. Leung, X. S. Li, E. C. Y. Woon, M. Yang, M. A. McDonough, O. N. King, I. J. Clifton, R. J. Klose, T. D. W. Claridge, P. J. Ratcliffe, C. J. Schofield, A. Kawamura, *EMBO Rep.* **2011**, *12*, 463–469.
- [47] A. Thalhammer, A. S. Hansen, A. H. El-Sagheer, T. Brown, C. J. Schofield, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5325–5327.
- [48] a) V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 946–950; b) V. Valinluck, H. H. Tsai, D. K. Rogstad, A. Burdzy, A. Bird, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4100–4108.
- [49] C. J. LaFrancois, J. Fujimoto, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 75–83.
- [50] a) M. de Kort, P. C. de Visser, J. Kurzeck, N. J. Meeuwenoord, G. van der Marel, W. Rüger, J. H. van Boom, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2075–2082; b) A. S. Hansen, A. Thalhammer, A. H. El-Sagheer, T. Brown, C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1181–1184.
- [51] M. Müntzel, D. Globisch, C. Trindler, T. Carell, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5671–5673.
- [52] Q. Dai, C.-X. Song, T. Pan, C. He, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4182–4188.
- [53] a) W. A. Pastor et al., *Nature* **2011**, *473*, 394–397; b) K. Williams, J. Christensen, M. T. Pedersen, J. V. Johansen, P. A. Cloos, J. Rappaport, K. Helin, *Nature* **2011**, *473*, 343–348; c) H. Wu, A. C. D'Alessio, S. Ito, K. Xia, Z. Wang, K. Cui, K. Zhao, Y. Eve Sun, Y. Zhang, *Nature* **2011**, *473*, 389–393.