

Oxidierte Cytosin-Derivate – der Schlüssel zur aktiven DNA-Demethylierung?

Kathrin I. Ladwein und Manfred Jung*

5-Carboxycytosin · 5-Formylcytosin · DNA-Methylierung · Epigenetische Modifikationen · Nucleobasen

Bereits 1948, schon fünf Jahre, bevor Watson und Crick ihr Modell der DNA-Struktur postulierten, beschrieb Hotchkiss, dass Cytosin (C) in DNA an der 5-Position methyliert werden kann.^[1] Heute sieht man 5-Methylcytosin (5mC) als fünfte Nucleobase an. Die Cytosin-Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (Dnmts) katalysiert und tritt häufig an so genannten CpG-reichen DNA-Abschnitten auf. Viele dieser CpG-Dinucleotide liegen im Bereich von Genpromotoren, und ihre Hypermethylierung führt in der Regel zur Stilllegung der entsprechenden Gene. Die DNA-Methylierung spielt eine zentrale physiologische Rolle bei der epigenetischen Regulation der Genexpression, der X-Chromosomen-inaktivierung sowie der genomischen Prägung (genetic imprinting).^[2] Als erste DNA-Methyltransferase wurde 1988 Dnmt1 identifiziert.^[3] Es folgten die Entdeckung von Dnmt2, Dnmt3A/B und Dnmt3L (ein inaktives Homologes). Der embryonale Knockout beispielsweise von Dnmt3B ist letal,^[4,5] was die Wichtigkeit einer korrekten DNA-Methylierung für die Embryonalentwicklung zeigt. Weiterhin findet sich ein Zusammenhang zwischen fehlerhafter DNA-Methylierung und diversen Krankheiten wie Krebs.^[6]

Im Unterschied z.B. zur Histon-Acetylierung, einer weiteren entscheidenden epigenetischen Modifikation, ist die DNA-Methylierung sehr stabil, sodass Mechanismen einer aktiven Demethylierung kontrovers diskutiert werden.^[5,7] Die Diskussion zeigt Parallelen zu derjenigen um die Lysin-Methylierung in Proteinen. Hier nahm man lange Zeit an, dass es sich um eine irreversible Modifikation handele. Um eine relativ stabile Kohlenstoff-Stickstoff- oder Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zu schwächen, ist eine Oxidation eine offensichtliche Lösung. So wurden schließlich im Fall der Lysin-Methylierung sogar zwei solcher Mechanismen beschrieben, die über Dehydrierung oder Oxygenierung vermittelt werden.^[8]

Mit der Entdeckung der Familie der TET-Proteine (TET=ten-eleven translocation) wurde ein Modell zur aktiven oxidativen DNA-Demethylierung vorgeschlagen.^[9] TET-Proteine sind 2-Oxoglutarat- und Eisen(II)-abhängig und katalysieren die Umsetzung von 5mC in DNA zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC). Entsprechend dem Modell könnte 5hmC weiter zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxycytosin (5caC) oxidiert werden (Abbildung 1).^[10] Allerdings wurde bis dato kein Beweis dafür erbracht, dass diese postulierten Metaboliten tatsächlich existieren. Im Juni 2011 konnten Carell und Mitarbeiter als Erste demonstrieren, dass 5fC in hydrolysierten DNA-Proben aus murinen embryonalen Stammzellen (mES) nachweisbar ist. Sie konnten zeigen, dass im Durchschnitt 5–15 % der 5hmC-Basen zu 5fC oxidiert sind. 5caC konnten die Autoren nicht detektieren, postulierten aber seine Existenz.^[11] Mithilfe eines biotinylierten Hydrazids konnten sie 5fC aus oxidiertener DNA anreichern. Diese Methode ist nützlich für weitere Untersuchungen. Kürzlich wurde schließlich die Entdeckung von 5fC und 5caC beschrieben.^[12] Diese Studien belegten die Bedeutung der TET-Enzyme für die Bildung von weiter oxidierten Cytosin-Derivaten in der DNA.

Die Gruppe von Zhang^[12a] zeigte, dass die Inkubation von TET1 mit 5mC-haltiger DNA als Substrat zu einer Abnahme des 5mC-Niveaus und dem gleichzeitigen Erscheinen von 5hmC und zwei unbekannten Verbindungen führt. Ähnliche Befunde wurden mit den Subtypen TET2 und TET3 erhalten. Dass es sich bei den neuen Verbindungen um 5fC und 5caC handelt, konnte anhand von unabhängigen Kontrollen im chromatographischen Vergleich bestätigt werden. MS-Analysen lieferten den endgültigen Beleg. Die Behandlung des TET2-katalysierten Reaktionsansatzes mit NaBH₄ führte zu verminderter Bildung von höher oxidierten Cytosin-Metaboliten und einem Anstieg von 5hmC. Dies lässt darauf schließen, dass beide durch die Oxidation von 5hmC generiert werden. Weiterhin resultierte die gezielte Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 als GFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen in einem Anstieg der 5hmC-Niveaus. Dies wurde mit FACS- und 2D-DC-Analyse von DNA-Fragmenten nachgewiesen (FACS = fluorescence activated cell sorting, 2D-DC = zweidimensionale Dünnschichtchromatographie). Es konnten wiederum zwei neue Produkte beobachtet werden, die sich in der Tat als 5fC und 5caC herausstellten. Weiterhin konnten sowohl 5fC als auch 5caC unter physio-

[*] Dr. K. I. Ladwein, Prof. Dr. M. Jung
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 25, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: manfred.jung@pharmazie.uni-freiburg.de
Prof. Dr. M. Jung
Freiburg Institute for Advanced Studies (FRIAS)
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Deutschland)

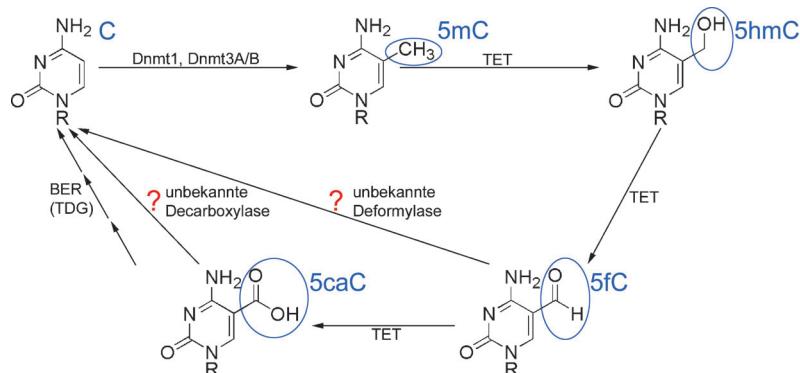


Abbildung 1. Cytosin (C) wird durch DNA-Methyltransferasen (Dnmts) zu 5-Methylcytosin (5mC) umgesetzt. TET-Oxygenasen oxidieren 5mC schrittweise über 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und 5-Formylcytosin (5fC) zu 5-Carboxycytosin (5caC). Der Schritt zu C könnte über eine Basenexzision (BER) verlaufen, z. B. durch Thymin-DNA-Glycosylase (TDG). R = DNA-Rückgrat.

logischen Bedingungen in 14 Tage alten Mauseembryonen detektiert werden.

Ähnliche Befunde wurden von He und Mitarbeitern publiziert.^[12b] Hier führte die Inkubation von Volllängen-TET2 (erhalten durch Überexpression in HEK293T-Zellen) aus Kernextrakten nur im Fall von 5mC- oder 5hmC-haltigen DNA-Substraten zur Bildung eines unbekannten Produkts. Für TET1 und TET3 wurden analoge enzymatische Aktivitäten gezeigt. Vergleichende hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC-)Experimente der unbekannten Verbindung mit einem chemisch synthetisierten 5caC-Standard ergaben, dass beide Proben zur selben Zeit eluieren. Dieses Ergebnis konnte wiederum durch MS-Untersuchungen bestätigt werden. Die Autoren konnten weiterhin unter der Verwendung von ¹⁴C-markiertem S-Adenosylmethionin belegen, dass 5caC tatsächlich durch die Oxidation von 5mC entsteht und nicht z. B. durch eine unabhängige Carboxylierung. Im Unterschied zu Zhang und Mitarbeitern waren sie jedoch nicht in der Lage, die Existenz von 5fC zu belegen.

Der letzte Schritt der Demethylierung von 5caC zu C ist noch nicht völlig aufgeklärt, aber He et al. schlagen ein Modell basierend auf dem Mechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER) mit 5caC als Erkennungsmotiv vor. Zur Überprüfung dieser Hypothese untersuchten sie das Enzym TDG (Thymin-DNA-Glycosylase), das eine Rolle im BER-Prozess spielt. Es schneidet modifizierte Basen aus dem DNA-Strang heraus, wobei es zur Bildung einer AP-Stelle (AP = abasische Position) und nachfolgend zum Einbau eines nicht modifizierten Cytosins kommt.^[5,13] In Experimenten, in denen die Forscher gereinigte TDG mit einem DNA-Substrat inkubierten, das 5caC enthielt, konnten sie in der Tat eine Exzision von 5caC nachweisen.

Insgesamt konnten diese drei Publikationen bestätigen, dass außer 5mC und 5hmC noch weitere oxidierte Cytosin-Derivate sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auftreten und dass die TET-Enzyme nicht nur 5mC als Substrat umsetzen – sie können weiterhin 5hmC zu 5fC und dieses schließlich zu 5caC oxidieren. Eine Möglichkeit für den letzten Schritt im Prozess der aktiven DNA-Demethylierung könnte der BER-Mechanismus sein.^[5,12b] Ein weiterer denkbarer Weg könnte eine direkte Decarboxylierung sein, jedoch wurde ein entspre-

chendes Enzym noch nicht entdeckt. Des Weiteren wurde von Pfaffeneder et al. eine Deformylierung von 5fC über ein Vinylcarbanion-Intermediat vorgeschlagen.^[11] Auch hier stellt sich die Frage nach einem Enzym, das diese Reaktion katalysieren kann. Es werden also verschiedene potenzielle DNA-Demethylierungsmechanismen intensiv diskutiert.^[5] Vorstellbar ist auch, dass mehrere dieser Signalwege für die Anpassung an sich verändernde Umgebungsbedingungen zusammenwirken. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Arbeiten nötig, die Aufschluss über die aktive DNA-Demethylierung geben können.

Ein detailliertes Wissen in diesem Bereich ist wichtig, da eine DNA-Hypermethylierung zu einer fehlerhaften Stilllegung von bestimmten Genen, z. B. von Tumorsuppressoren in gewissen Krebsarten, führt.^[14] Ebenso ist es wichtig für das Verständnis der Reprogrammierung von somatischen Zellen zurück zu pluripotenten Vorläufern. Während der Entwicklung wird die Expression bestimmter Gene durch DNA-Methylierung herunterreguliert, wohingegen andere Gene, die eine wichtige Rolle bei der Differenzierung spielen, aktiviert werden. Diese Erkenntnisse würden also auch für den Bereich der Stammzellforschung wichtig sein. Man möchte dabei insbesondere wissen, ob es sich bei der sechsten (5hmC), siebten (5fC) und achten Base (5caC) lediglich um Intermediate der schrittweisen Demethylierung von 5mC zu C handelt oder ob jede einzelne von ihnen eine epigenetische Modifikation mit eigener regulatorischer Funktion darstellt.

Proteine, die 5mC in der DNA erkennen, so genannte Methylbindedomänen (MBD)-Proteine, können als „Leser“ des epigenetischen Codes verstanden werden, und ihre Aktivität ist mit verschiedenen humanen Krankheiten assoziiert.^[15] Das Vorhandensein der drei oxidierten Methylcytosin-Derivate wirft die Frage auf, ob es ähnliche Lese-Proteine für diese Modifikationen gibt und was ihre biologische Funktion sein wird.

Demzufolge könnte mit der stufenweisen Oxidation die Antwort auf die Frage gefunden werden sein, wie DNA demethyliert wird – die Auswirkungen dieses Oxidationsprozesses sind dagegen noch lange nicht geklärt.

Eingegangen am 20. September 2011
Online veröffentlicht am 23. November 2011

-
- [1] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, *175*, 315–332.
- [2] a) T. B. Miranda, P. A. Jones, *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 384–390; b) J. C. Chow, Z. Yen, S. M. Ziesche, C. J. Brown, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2005**, *6*, 69–92; c) I. M. Morison, J. P. Ramsay, H. G. Spencer, *Trends Genet.* **2005**, *21*, 457–465.
- [3] T. H. Bestor, *Gene* **1988**, *74*, 9–12.
- [4] M. G. Goll, T. H. Bestor, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 481–514.
- [5] S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607–620.
- [6] A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Nature* **1983**, *301*, 89–92.
- [7] S. K. Ooi, T. H. Bestor, *Cell* **2008**, *133*, 1145–1148.
- [8] a) Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, *Cell* **2004**, *119*, 941–953; b) Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, Y. Zhang, *Nature* **2006**, *439*, 811–816.
- [9] a) S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930; b) M. Tahiliani et al., *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [10] a) D. Globisch, M. Munzel, M. Muller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel, T. Carell, *PLoS One* **2010**, *5*, e15367; b) M. Münzel, D. Globisch, T. Carell, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6588–6596; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6460–6468.
- [11] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Munzel, M. Muller, C. A. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012.
- [12] a) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303; b) Y. F. He et al., *Science* **2011**, *333*, 1303–1307.
- [13] a) T. Lindahl, R. D. Wood, *Science* **1999**, *286*, 1897–1905; b) M. T. Bennett, M. T. Rodgers, A. S. Hebert, L. E. Ruslander, L. Eisele, A. C. Drohat, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12510–12519.
- [14] a) Y. Kanai, *Pathol. Int.* **2008**, *58*, 544–558; b) J. G. Herman, S. B. Baylin, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2042–2054.
- [15] a) M. Chahrour, S. Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S. T. Wong, J. Qin, H. Y. Zoghbi, *Science* **2008**, *320*, 1224–1229; b) T. Clouaire, I. Stancheva, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1509–1522.