

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Synthese und Charakterisierung neuartiger Inhibitoren
für die humane DNA Methyltransferase DNMT1**

David Kuch

aus

Weinheim

2008

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung für die Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 21.04.2008



David Kuch

Dissertation eingereicht am 24.04.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Heuschmann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2008

Gewidmet meiner Mutter und meinem Vater

Is life just a game where we make up the rules,
While we're searching for something to say -
Or are we just simply spiralling coils
Of self-replicating DNA?

Monthy Python, The Meaning of Life.

Publikationen

1. J. C. Pieck, D. Kuch, F. Grolle, U. Linne, C. Haas, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1404 - 1405. „PNA-Based Reagents for the Direct and Site-Specific Synthesis of Thymine Dimer Lesions in Genomic DNA.”
2. U. Hennecke, D. Kuch, T. Carell, *Synthesis* **2007**, *6*, 929 - 935. “A General Route to 4-C-Substituted Pyrimidine Nucleosides.”
3. F. Spada, A. Haemmer, D. Kuch, U. Rothbauer, L. Schermelleh, E. Kremmer, T. Carell, G. Längst, H. Leonhardt, *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 565 - 571. „DNMT1 but not its Interaction with the Replication Machinery is required for Maintenance of DNA Methylation in Human Cells.”
4. A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J. C. Pieck, D. Kuch, K.-P. Hopfner, T. Carell, *Science* **2007**, *318*, 967 - 970. “Bypass of DNA Lesions Generated During Anticancer Treatment with Cisplatin by DNA Polymerase η .”
5. D. Kuch, L. Schermelleh, S. Manetto, H. Leonhardt, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1515 - 1518. „Synthesis of DNA Dumbbell Based Inhibitors for the Human DNA Methyltransferase Dnmt1.”
6. Posterpräsentation “New Inhibitors for the Human DNA Methyltransferase DNMT1”, *112th BASF International Summer Course*, Ludwigshafen, September **2006**.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	11
2	Summary	15
3	Einführung: Epigenetik und DNA Methylierung	19
3.1	Die Regulation der Genexpression	20
3.1.1	Struktur und Aufgaben der DNA.....	20
3.1.2	Die Kontrolle der genetischen Aktivität	23
3.2	Was bedeutet <i>Epigenetik</i>?	26
3.2.1	Histonmodifikation und Chromatinstruktur	27
3.2.2	<i>Polycomb group</i> (PcG) Proteine.....	32
3.3	DNA Methylierung	34
3.3.1	CpG Inseln	34
3.3.2	Methyltransferasen und Methylierungsmechanismus	36
3.3.3	Aufgaben und Funktionen der DNA Methylierung.....	41
3.3.4	Demethylierung der DNA	51
3.3.5	Detektion von 5-Me-dC und Analyse von DNA Methylierungsmustern	52
3.4	Epigenetik und Krankheitsentstehung	53
3.4.1	Epigenetik und Krebs	54
3.4.2	Ursache der fehlerhaften Methylierungsmuster	58
3.5	Methyltransferaseinhibitoren	59
3.5.1	Wirkungsmechanismus der Nukleosidinhibitoren	60
3.5.2	Eigenschaften und Anwendung der Nukleosidinhibitoren 4 und 5	62
3.5.3	Grenzen der Behandlung mit Methyltransferaseinhibitoren	63
3.6	Aufgabenstellung und Inhalt der Arbeit	64
4	Dumbbell Inhibitoren	65
4.1	Einleitung und Aufgabenstellung	65

4.2	Synthese der Dumbbell DNA Inhibitoren	71
4.2.1	Synthese von 2'-Desoxy-5-azacytidintriphosphat (5-Aza-dCTP, 67).....	71
4.2.2	Elongation einfacher Doppelstränge mit 5-Aza-dCTP (67)	72
4.2.3	Einbau von 5-Aza-dCTP (67) in DNA Dumbbellstrukturen.....	76
4.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen I: Aktivitätsassays.....	88
4.3.1	EMSA Studien (<i>electrophoretic mobility shift assays</i>).....	88
4.3.2	Restriktions-Schutzassays	95
4.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen II: Zellassays.....	101
4.4.1	Kolokalisation von DB7 und DNMT1 in Säugetierzellen	101
4.4.2	Transfektion der Dumbbells in HCT116 Zellen	102
4.4.3	Auswirkungen der Dumbbells auf die Proliferation von HCT116 Zellen.....	103
4.4.4	Auswirkungen der Dumbbells auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen	106
4.5	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	115
5	Neue Nukleosidinhibitoren	119
5.1	Einleitung und Aufgabenstellung	119
5.2	Synthese von C6-substituierten 2'-Desoxycytidinderivaten.....	120
5.2.1	Versuche zur Synthese von 6-Halogen-dC Derivaten	121
5.2.2	Synthese von 2'-Desoxy-6-cyanocytidin (29).....	127
5.3	Synthese von 2'-Desoxyzebularinderivaten.....	131
5.3.1	Synthese von 2'-Desoxyzebularin (32) und 2'-Desoxy-5-methyl- zebularin (33)	135
5.3.2	Synthesen der 2'-Desoxyzebularinderivate 34 - 37	137
5.4	Triphosphatsynthesen	142
5.5	<i>In vitro</i> Untersuchungen.....	144
5.5.1	Einbau der Triphosphate in DNA.....	144
5.5.2	EMSA Studien.....	148
5.5.3	Auswirkungen der neuen Nukleoside auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen	152

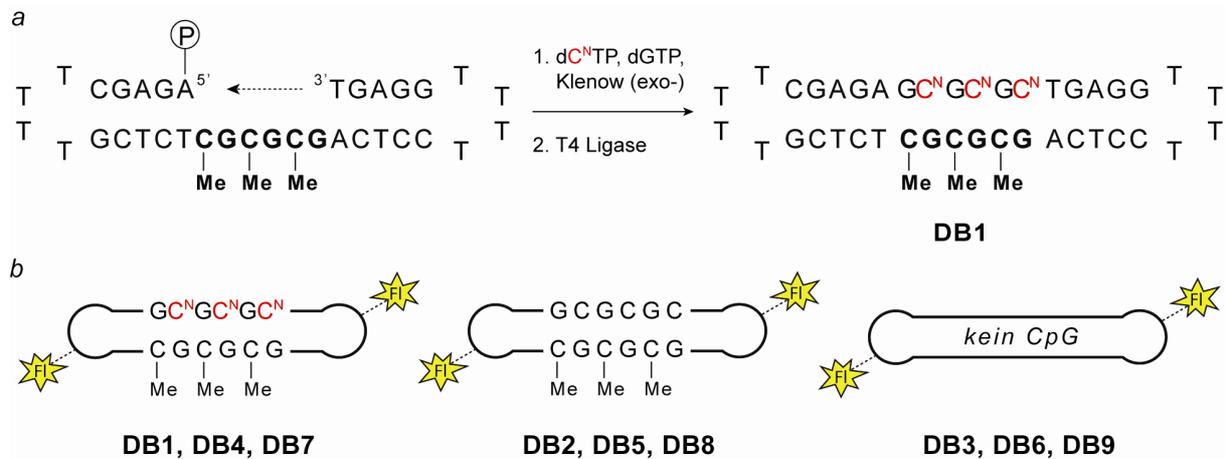
5.5.4	Auswirkungen der neuen Nukleoside auf die Zellproliferation von HCT116 Zellen	155
5.6	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	157
6	Experimenteller Teil	160
6.1	Organisch –chemische Synthese	160
6.1.1	Material und Methoden.....	160
6.1.2	Synthesevorschriften.....	164
6.2	Biochemische Arbeiten	190
6.2.1	Material und Methoden.....	190
6.2.2	Synthese der zirkularen, hantelförmigen DNA Konstrukte (<i>Dumbbells</i>).	193
6.2.3	Stabilitätstests.....	194
6.2.4	EMSA Studien (<i>electrophoretic mobility shift assays</i>).....	195
6.2.5	<i>In vitro</i> Aktivitätsassays	196
6.2.6	Zellkultur; Transfektion von DNA.....	197
6.2.7	Inkubation von HCT116 Zellen mit Nukleosiden.....	197
6.2.8	DNA Extraktion aus humanen HCT116 Krebszellen.....	198
6.2.9	Enzymatischer DNA Totalverdau; Bestimmung des globalen dC ^{Me} Gehalts. ...	198
6.2.10	Zellproliferationsassay.....	199
6.2.11	Kolokalisationsstudien.....	200
7	Anhang	201
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	201
7.2	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	203
7.3	Wertetabellen mit den Ergebnissen der Zellassays	204
7.3.1	Zellproliferations Assays	204
7.3.2	Bestimmung des globalen Methylierungsgrads	206
8	Literaturverzeichnis	207
9	Danksagung.....	233

1 Zusammenfassung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger des genetischen Codes und somit des Bauplans eines jeden lebenden Organismus' auf der Erde. Eine Vielzahl entscheidender Prozesse in den Zellen von einfachen Prokaryoten bis hin zum Menschen wird jedoch von Informationen bestimmt, die der Basensequenz der DNA übergeordnet sind und deshalb als *epigenetisch* bezeichnet werden. In Säugetierzellen sind die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der Histonmodifikation und der Cytosin-C5 Methylierung der DNA maßgeblich an der Regulation der Genexpression beteiligt und spielen eine essentielle Rolle bei der Zelldifferenzierung und der embryonalen Entwicklung. Störungen insbesondere des genomischen DNA Methylierungsmusters sind an der Entstehung schwerer Krankheiten beteiligt. Das Genom von Krebszellen weist neben einem erniedrigten globalen Methylierungsgrad vor allem eine lokale Hypermethylierung von Promotorregionen auf, wodurch Tumorsuppressorgene nicht mehr exprimiert und die natürlichen Kontrollmechanismen der Zelle ausgeschaltet werden. Sowohl um die molekularbiologischen Zusammenhänge aufzuklären, wie auch unter dem Gesichtspunkt möglicher therapeutischer Eingriffe erscheint es deshalb als vielversprechend, Instrumente zur Manipulation der wichtigsten DNA Methyltransferase DNMT1 zu entwickeln, um so Einfluss auf die zelluläre Methylierungsmaschinerie nehmen zu können. Die vorliegende Arbeit befasst sich deshalb mit neuen Wegen zur Inhibierung von DNMT1 und gliedert sich in zwei Teile, die beide auf den Unzulänglichkeiten des bislang effektivsten Nukleosidinhibitors 2'-Desoxy-5-azacytidin (5-Aza-dC, dC^N) gründen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde 5-Aza-dC im Kontext der DNMT1 Erkennungssequenz $d(C^NpG):d(GpC^{Me})$ in zirkulare, hantelförmige DNA Stränge (Dumbbells) eingebaut, an die das Enzym irreversibel gebunden und damit deaktiviert werden sollte. Durch die Integration in doppelsträngige DNA Konstrukte wird dabei zum einen die geringe Stabilität der Inhibitorbase gegen Hydrolyse deutlich erhöht, zum anderen kann sie auf diesem Wege nicht in die genomische DNA der behandelten Zelle eingebaut werden, was zu schwerwiegenden Problemen durch kovalente Protein-DNA-Addukte führt. Die Haarnadelstrukturen an den Enden dienen als Schutz gegen den Abbau durch Endonukleasen bei der Verwendung in

Zellen. Schema 1.1 zeigt die Synthese am Beispiel von **DB1** sowie eine Übersicht der hergestellten Konstrukte.



Schema 1.1: Synthese der Konstrukte und hergestellte Dumbbells. *a* Ein teilweise selbstkomplementärer DNA Einzelstrang wurde durch Klenow Fragment (exo-) mit dC^N und dG verlängert und anschließend durch T4 Ligase zur geschlossenen, hantelförmigen Struktur ligiert; P = Phosphat. *b* Die aktiven Inhibitor Dumbbells (*links*) und die zugehörigen Referenzstränge (*mitte* und *rechts*). Die Konstrukte wurden ohne, mit einem sowie mit zwei Fluoreszenzmarkierungen hergestellt (**DB1 - 3**, **DB7 - 9** sowie **DB4 - 6**); FI = Cy3-Markierung.

Die synthetisierten Dumbbells wurden durch gelelektrophoretische Verfahren (PAGE, CE) sowie durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF, ESI-FTICR) analysiert und charakterisiert. Im Rahmen von EMSA Bindungsstudien und durch sogenannte Restriktions-Schutzassays konnte gezeigt werden, dass die aktiven Inhibitor Dumbbells sowohl die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI wie auch das humane Enzym DNMT1 irreversibel binden und jegliche Methylierungsaktivität vollständig unterbinden können (Abbildung 1.1).

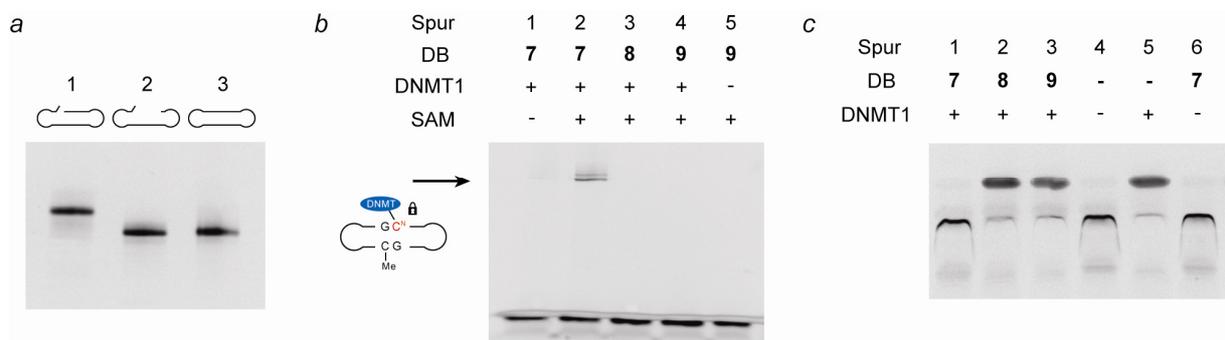


Abbildung 1.1: *In vitro* Assays der Dumbbells **DB7 - 9** mit DNMT1. *a* Das ligierte Konstrukt **DB7** (*Spur 3*) läuft auf dem Gel deutlich schneller als der lediglich elongierte Strang, **OL7'** (*Spur 1*), und fast auf gleicher Höhe mit dem Edukt **OL7** (*Spur 2*). *b* EMS Assay; nur der aktive Inhibitor **DB7** bildet einen stabilen Enzym-DNA Komplex (*Pfeil*), die Referenzstränge zeigen keine Reaktion; *Spur 1*: Rkt. ohne Kofaktor (SAM), *Spur 2*: Rkt. mit SAM. *c* Restriktions-Schutzassay; ein hemimethylierter 30mer Doppelstrang kann von DNMT1 nicht mehr methyliert und so vor einer Restriktion geschützt werden, wenn das Enzym zuvor mit **DB7** inkubiert wurde (*Spur 1*), und das Bild auf dem Gel gleicht dem bei vollständiger Abwesenheit der Methylase (*Spur 4*).

Um die Wirkung der Dumbbells auf lebende Zellen zu untersuchen, wurden die fluoreszenzmarkierten Konstrukte sowohl in Mäusezellen (C2C12) wie auch in humane Tumorzellen (HCT116) transfiziert. *Schermelleh* aus der Arbeitsgruppe *Leonhardt* konnte durch Fluoreszenzmikroskopie und *Immunostaining* an C2C12 Myoblasten zeigen, dass der Inhibitor Dumbbell **DB4** in S-Phasen Zellen mit DNMT1 kolokalisiert, während die Referenzstränge **DB5** und **DB6** diffus im Kern verteilt blieben. Transfiziert in HCT116 Zellen konnte **DB7** die Zellproliferation der Tumorzellen signifikant herabsetzen und eine Senkung des globalen genomischen Methylierungsgrads von knapp vier auf 2.7 % bewirken (Abbildung 1.2). Die vorgestellten Dumbbell Konstrukte könnten es somit ermöglichen, an der Reprogrammierung differenzierter Zellen mitzuwirken oder die epigenetische Gen-Inaktivierung in Tumorzellen rückgängig zu machen.

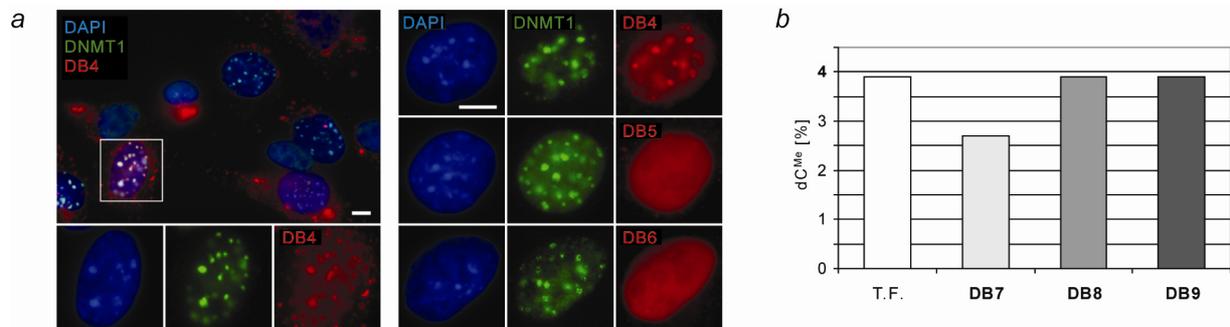


Abbildung 1.2: Effekte der Dumbbell Konstrukte in lebenden Zellen. *a* **DB4** kolokalisiert mit DNMT1 in C2C12 Mäuse-Myoblasten an Stellen, an denen auch DNA Replikation stattfindet, während **DB5** und **DB6** diffus im Zellkern verteilt bleiben. *b* Methylierungsgrad von humanen HCT116 Darmtumorzellen nach dreimaliger Transfektion der Dumbbells **DB7 - 9**. T.F. = Kontrolle (nur mit Transfektionsmittel behandelte Zellen).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde versucht, neue Nukleosidinhibitoren herzustellen, die bessere medizinisch-chemische Eigenschaften aufweisen als 5-Aza-dC. Hierbei wurde einerseits 6-Cyano-dC (**29**) synthetisiert, das die irreversible kovalente Bindung zu DNMT1 durch eine potenzielle Abgangsgruppe in C6-Position über einen bislang nicht beschriebenen Mechanismus herstellen sollte (Abbildung 1.3). Weiterhin gelang unter anderem die Synthese neuer 2'-Desoxy-Derivate des bekannten Inhibitors Zebularin (**6**), welcher eine größere Stabilität und weniger Nebenwirkungen als 5-Aza-dC aufweist, gleichzeitig aber auch nur einen sehr schwachen demethylierenden Effekt zeigt. Die Nukleoside **34 - 37** wurden über Palladium-katalysierte *Negishi*-Kreuzkupplungsreaktionen aus den entsprechenden 4-Arylsulfonaten dargestellt. Außerdem konnten die 5'-Triphosphate **58 - 60** synthetisiert, in DNA eingebaut und in ersten *in vitro* Versuchen eingesetzt werden.

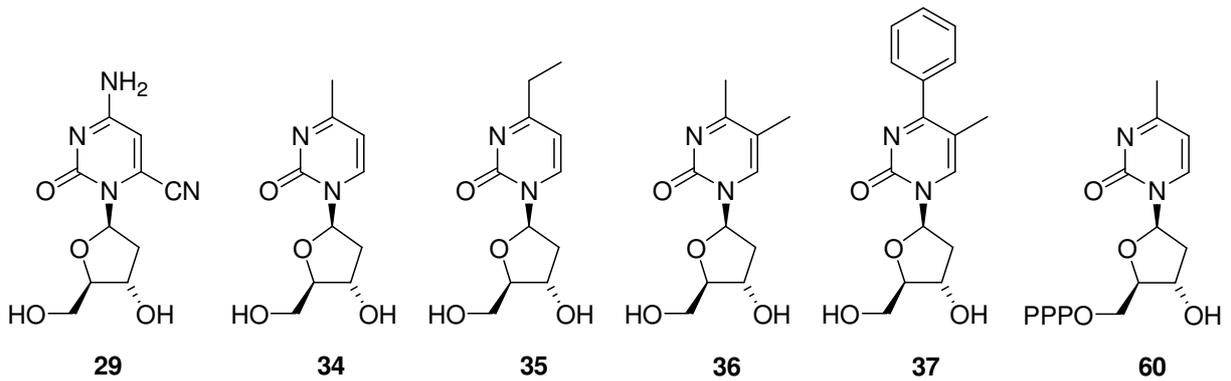


Abbildung 1.3: Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten neuen Nucleoside, bis auf **29** allesamt Analoga des bereits bekannten Inhibitors Zebularin. Das 5'-Triphosphat **60** konnte in synthetische DNA Stränge eingebaut und für erste *in vitro* Versuche verwendet werden.

Um die Wirkung der Substanzen auf lebende Zellen zu untersuchen, wurde der Effekt von **29** und **34** - **36** sowie von entsprechenden Referenzsubstanzen auf die Zellproliferation und den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen ermittelt. Während auch millimolare Konzentrationen keinen messbaren Einfluss auf den 5-Me-dC Gehalt der Zellen zeigten, konnte die Verbindung **34** zumindest das Zellwachstum der Tumorzellen auf etwa 60 % des Wachstums der Kontrollzellen reduzieren. Das Cytidinderivat **29** zeigte ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Zellproliferation (Abbildung 1.4).

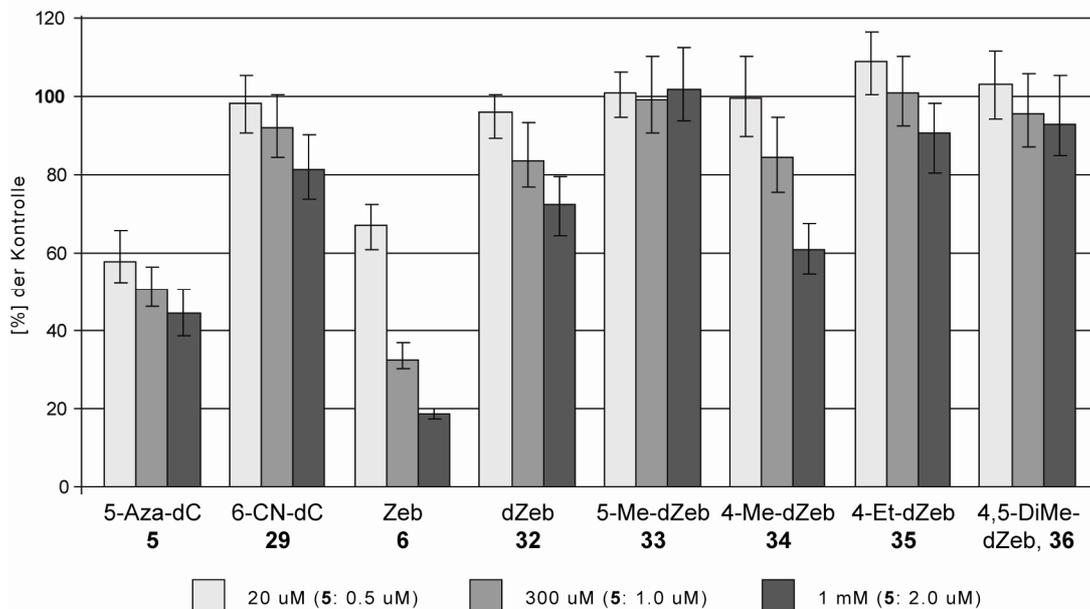


Abbildung 1.4: Effekt der neuen Nucleoside **29** und **34** - **36** auf die Proliferation von HCT116 Darmtumorzellen. Als Referenzen wurden die bekannten Inhibitoren 5-Aza-dC (**5**) und Zebularin (**6**) sowie die Zebularinderivate 2'-Desoxyzebularin (**32**) und 2'-Desoxy-5-methylzebularin (**33**) verwendet. Das Wachstum unbehandelter Zellen (Kontrolle) wurde auf 100 % gesetzt. 4-Me-dZeb und zu einem geringeren Maße 6-CN-dC können bei Konzentrationen im millimolaren Bereich das Wachstum der Krebszellen reduzieren.

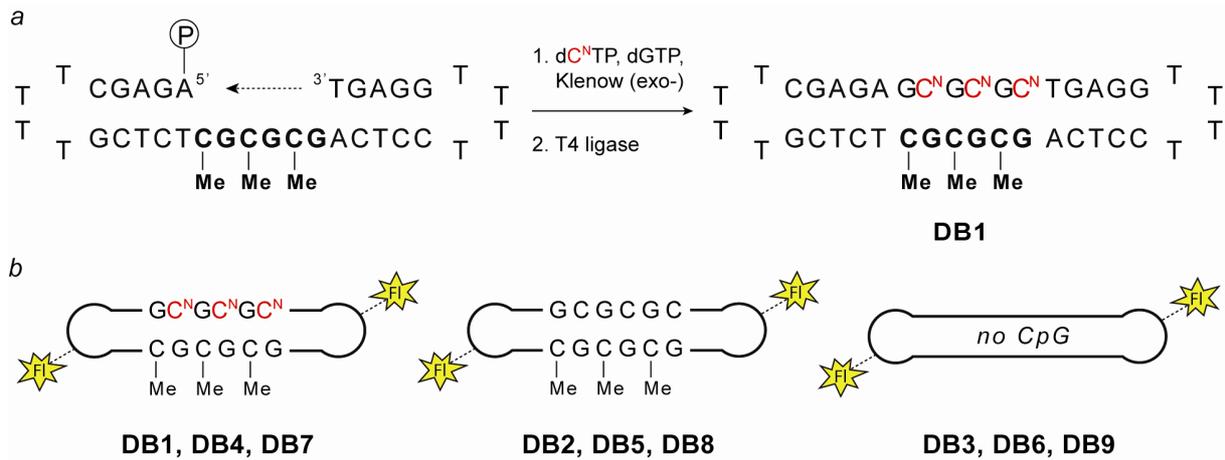
2 Summary

The macromolecule deoxyribonucleic acid (DNA) carries the genetic instructions used for the development and functioning of all known living organisms. However, a series of fundamental cellular processes from simple procaryotes to humans is controlled by information beyond the genetic code of the nucleobases, which is therefore termed *epigenetic*. In mammals, the underlying mechanisms of histone modification and cytosine-C5 methylation are substantially involved in the regulation of gene expression and play a key role in cell differentiation and embryonic development. Thus, disorders of the genomic methylation patterns can cause severe human disease. In tumor cells, in addition to a reduced over-all genomic methylation level, local hypermethylation of gene promoters can be observed. This process leads to repression of tumor suppressor genes and subsequently to the malfunctioning of cellular control mechanisms. In order to elucidate the molecular biological background as well as with regard to possible therapeutic interventions it appears promising to develop new instruments for manipulating the important DNA methyltransferase DNMT1, thus being able to interfere with the cellular methylation machinery.

The presented work deals with new possibilities to inhibit DNMT1 and is subdivided into two parts, both based on the shortcomings of the most well-known nucleoside inhibitor 2'-deoxy-5-azacytidine (5-aza-dC, dC^N).

In the first part of the work, 5-aza-dC was integrated into the DNMT1 target motif d(C^NpG):d(GpC^{Me}) of circular, dumbbell-shaped DNA strands, designated to irreversibly bind and hence inactivate the enzyme. Firstly, integration into double-stranded DNA increases the hydrolytic stability of the inhibitor base significantly. Secondly, this approach does not allow the base to be incorporated into the genomic DNA of the treated cell, avoiding severe problems by formation of covalent protein-DNA-adducts. The hairpin structures at the ends of the double-strand protects the constructs against degradation by endonucleases when used in living cells. The synthesis using the example of **DB1** and an overview of the prepared dumbbells are depicted in Scheme 2.1.

2 Summary



Scheme 2.1: Synthesis of the constructs and overview of the prepared dumbbells. *a* A partly self-complementary DNA single-strand was elongated with d^{CN} and dG by Klenow fragment (exo-) and subsequently ligated by T4 ligase to yield a closed, dumbbell-shaped structure; P = phosphate. *b* The active inhibitor dumbbells (*left*) and corresponding reference-strands (*center* and *right*). The constructs were prepared with zero, one and two fluorescence labels, respectively (DB1-3, DB7-9 and DB4-6); FI = Cy3-label.

The synthesized DNA dumbbells were analyzed and characterized by gel electrophoretic methods (PAGE, CE) and mass spectrometry (MALDI-TOF, ESI-FTICR). By means of EMSA binding studies and restriction-protection-assays it was proved that the active inhibitor dumbbells are able to irreversibly bind not only to the bacterial methyltransferases M.HhaI and M.SssI but also to the human DNMT1. They suppress any methylation activity completely (Figure 2.1).

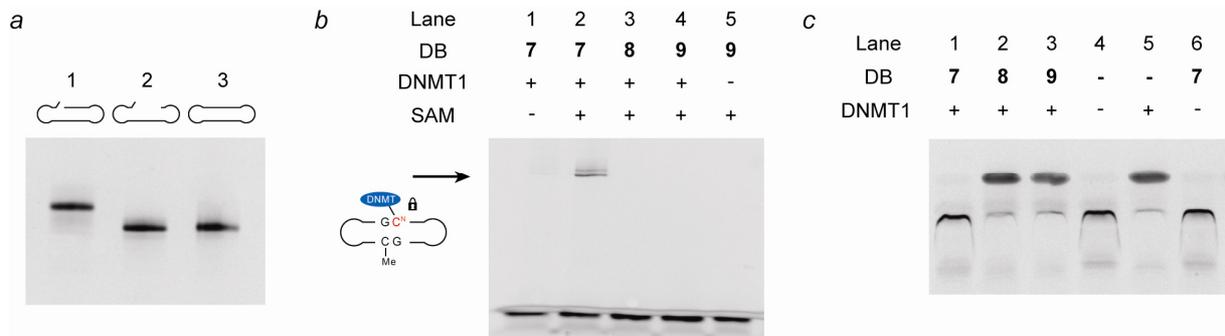


Figure 2.1: *In vitro* assays of the dumbbells DB7-9 with DNMT1. *a* Simple PAGE analysis; on the gel, the ligated construct DB7 (*lane 3*) runs significantly faster than the simply elongated strand, OL7' (*lane 1*), and almost as fast as the educt OL7 (*lane 2*). *b* EMS assay; only the active inhibitor DB7 is able to form a stable protein-DNA-adduct (*arrow*), whereas the control strands show no reaction at all; *lane 1*: reaction without cofactor (SAM), *lane 2*: reaction with SAM. *c* restriction-protection-assay; a hemimethylated 30mer is not methylated by DNMT1 and thereby protected against restriction-digestion, if the enzyme was incubated with DB7 before (*lane 1*), and the picture on the gel is identically equal to that of complete absence of the methylase (*lane 4*).

In order to study the effects of the dumbbells on living cells, the fluorescence-labeled constructs were transfected both into murine C2C12 cells and in human HCT116 colon cancer cells. Using fluorescence microscopy and immunostaining techniques,

Schermelleh of the Leonhardt group found that the inhibitor dumbbell **DB4** colocalizes with DNMT1 in S-phase C2C12 myoblast cells, whereas the control strands **DB5** and **DB6** showed a diffuse nuclear distribution. Transfected into HCT116 cells, **DB7** was able to significantly inhibit cell proliferation and to reduce the global methylation level from nearly 4.0 to 2.7 % (equals a reduction of 30.7 %; Figure 2.2). The ability of these compounds to enter the nucleus of living cells and to bind DNMT1 offers exciting new possibilities to interfere with the methylation maintenance reaction. These compounds may thus allow epigenetic reprogramming of differentiated cells and the reversal of epigenetic gene silencing in tumor cells.

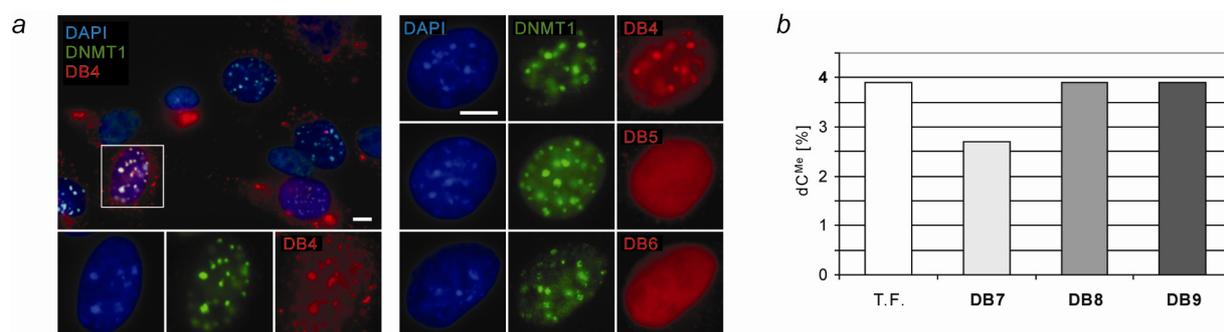


Figure 2.2: Effects of the dumbbell constructs on living cells. *a* **DB4** colocalizes with DNMT1 at sites of DNA replication in S-phase C2C12 myoblast cells, whereas **DB5** and **DB6** show a diffuse nuclear distribution. *b* Global methylation level of human HCT116 colon cancer cells after triple transfection of **DB7 - 9**. T.F. = control (cells treated only with transfection reagent).

In the second part of the presented work, it was attempted to prepare new nucleoside inhibitors with medicinal chemical properties superior to 5-aza-dC. To this end, compound 6-CN-dC (**29**) was synthesized, which should establish an irreversible covalent bond to DNMT1 by means of a potential leaving group in C6 position by a not yet described mechanism (Figure 2.3). Furthermore, the synthesis of new 2'-deoxy derivatives of the known inhibitor zebularin (**6**) was accomplished, a nucleoside showing higher hydrolytic stability and less cytotoxicity than 5-aza-dC, but at the same time only weak demethylating effects. Nucleosides **34 - 37** were prepared from the corresponding 4-arylsulfonates by Palladium-catalyzed *Negishi*-cross-coupling reactions. Additionally, 5'-triphosphates **58 - 60** were synthesized, incorporated into DNA strands and used in preliminary *in vitro* experiments.

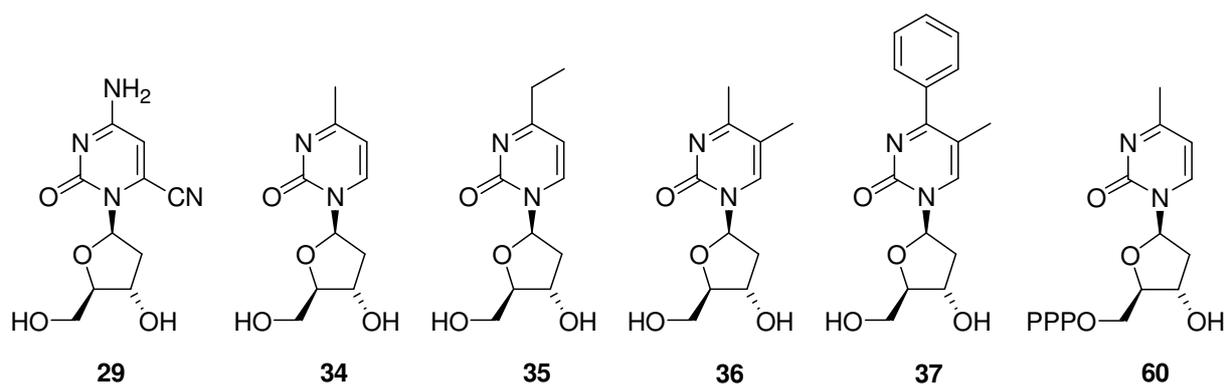


Figure 2.3: New nucleosides that were synthesized in the context of this work. All but **29** are analogs of the known nucleoside inhibitor zebularin. The 5'-triphosphate **60** could be incorporated in synthetic DNA strands and used in preliminary *in vitro* experiments.

In order to investigate the effect of the substances on living cells, HCT116 colon cancer cells were treated with **29**, **34** - **36** and the corresponding reference compounds, and the impact on cell proliferation and global genomic methylation levels were determined. While millimolar concentrations had no detectable effect on the genomic 5-methyl-dC content, compound **34** was able to reduce tumor cell growth to around 60 % of the growth of the control cells. The cytidin derivative **29** showed an inhibitory effect on cell proliferation as well (Figure 2.4).

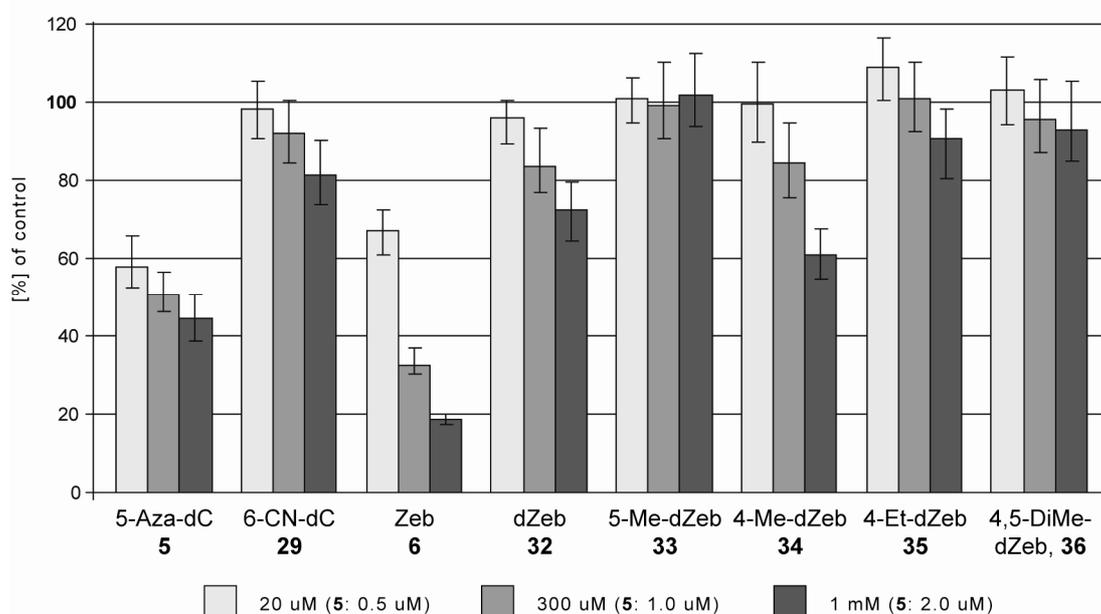


Figure 2.4: Effects of the new nucleosides **29** and **34** - **36** on the proliferation of HCT116 colon cancer cells. As reference compounds, the known nucleoside inhibitors 5-aza-dC (**5**) and zebularin (**6**) as well as the zebularin derivatives 2'-deoxyzebularin (**32**) and 2'-deoxy-5-methylzebularin (**33**) were used. The growth of untreated control cells was set to 100 %. At millimolar concentrations, the compounds 4-Me-dZeb (**34**) and, to a certain extent, 6-CN-dC (**29**) were able to reduce tumor cell proliferation.

3 Einführung: Epigenetik und DNA Methylierung

„Alle Organismen auf der Erde enthalten Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information“.^[1] Dieses fundamentale Prinzip der Biologie verbindet auf molekularer Ebene so grundverschiedene Lebensformen wie Viren, Bakterien, Pilze und höhere Eukaryoten wie etwa Säugetiere. Der offenkundige Unterschied zwischen dem Menschen und einfachsten Organismen wie dem Simian-Virus oder dem Fadenwurm erklärt sich noch leicht bei einem Blick auf die weitreichenden Unterschiede bezüglich der Komplexität der Genome und der schieren Anzahl an Genen. Während das Genom des oben erwähnten Virus' SV 40 gerade einmal 5.243 Basenpaare und 6 Gene enthält, zählt das des Fadenwurms schon 97 Millionen bzw. 18.240. Das menschliche Genom besteht jedoch aus über 3 Milliarden (!) Basenpaaren und geschätzten 40.000 Genen (für das haploide Genom). Dass eine umfangreichere genetische Information auch den Aufbau komplexerer Organismen erlaubt, liegt auf der Hand. Was den Menschen von der Maus (*Mus musculus*) abhebt, welche über ein dem menschlichen, bezüglich Länge und Anzahl der Gene, durchaus vergleichbares Genom besitzt, oder was die Ursache für die immense phänotypische Vielfalt der Menschen untereinander ist, bedarf bereits einer ausführlicheren Erklärung. Detailliertes Wissen über den molekularen Aufbau der Nukleinsäuren und den Einfluss der Basensequenz ist vonnöten, um die Bedeutung und die Konsequenzen des für jedes Lebewesen einzigartigen Genotyps zu verstehen. Unweigerlich kompliziert wird es aber, wenn man sich die Frage stellt, wie aus einer humanen Ei- und einer Samenzelle, die beide im Prinzip die gleiche DNA tragen, ein hochkomplexer, aus rund 200 grundverschiedenen Zelltypen bestehender Organismus, wie der menschliche entstehen kann. Die Art der in der Basensequenz codierten Proteine der Gameten ist identisch, das Erbgut unterscheidet sich auf den ersten Blick lediglich durch die paternale bzw. maternale Herkunft. Trotzdem können aus einer befruchteten Eizelle nicht nur viele verschiedene Zellarten hervorgehen, im Fall von eineiigen Zwillingen können sich bei identischer DNA Sequenz zwei phänotypisch völlig unterschiedliche Menschen entwickeln.

Die erste Zellteilung der befruchteten Eizelle ergibt zunächst zwei vollkommen identische Zellen, deren Tochterzellen sich aber im weiteren Verlauf der frühen embryonalen Entwicklung schon bald anfangen zu spezialisieren. Woher „wissen“ nun diese ersten Zellen eines neuen menschlichen Organismus, die alle exakt

dasselbe Genom, denselben „Bauplan“, besitzen, ob sie einmal die Funktionen einer Leberzelle oder einer Nervenzelle übernehmen werden? Woher wissen sie, *wann* und *wo* sie zu einer bestimmten, gewebespezifischen Zellsorte differenzieren sollen?

An der Entwicklung eines Organismus' im Allgemeinen und an diesen frühen Prozessen im Besonderen ist in einem komplizierten Zusammenspiel eine Unzahl an Proteinen beteiligt. Hierbei ist aber bei weitem nicht jedes Protein zu jeder Zeit in jeder Zelle vorhanden. Das ist von grundlegender Bedeutung, und doch nicht ganz selbstverständlich: Die vollständige Erbinformation in Form der DNA liegt ja zu jeder Zeit in einer jeden Zelle vor - sie wird aber größtenteils nur zu bestimmten Zeitpunkten, nämlich im Bedarfsfall, auch wirklich abgelesen und in Form der Proteinbiosynthese umgesetzt. Die ständige Präsenz sämtlicher codierter Proteine wäre auch aus energiewirtschaftlichen und nicht zuletzt räumlichen Gründen für eine Zelle keineswegs sinnvoll. Welche Mechanismen veranlassen nun die Zelle bzw. machen es ihr möglich, derart selektiv auf das Genom und seine Proteinbibliothek zuzugreifen? Und wie kann es sein, dass offensichtlich in der Basensequenz festgelegte und für gesundes Zellwachstum essentielle Gene, die z.B. für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich sind, in Krebszellen plötzlich nicht mehr „funktionieren“ - so, als wären sie gar nicht vorhanden?

Die diesen Fragen zugrundeliegenden Zusammenhänge sind nicht mehr allein durch die Abfolge der Basen in der DNA zu erklären. Nicht nur die *Art* der durch die Basensequenz festgelegten Proteine, auch die zeitliche sowie räumliche Steuerung ihrer Synthese ist von großer Bedeutung. Um diesen und ähnlichen Fragestellungen näher zu kommen, soll zunächst kurz auf die Grundlagen der Regulation der Genexpression eingegangen werden.

3.1 Die Regulation der Genexpression

3.1.1 Struktur und Aufgaben der DNA

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, ist die DNA der Träger der genetischen Information und gibt somit die Baupläne der Proteine vor. Diese sind über die Abfolge der 4 Nucleoside 2'-Desoxycytidin (dC), -adenin (dA), -guanidin (dG) sowie Thymin (T) in der DNA codiert. Verknüpft über ein Phosphodiesterückgrat bilden diese vier Grundbausteine die zwei zu einer rechtsläufigen, antiparallelen Helix

verwundenen Stränge der Desoxyribonukleinsäure, wobei stets eine Purin- mit einer Pyrimidinbase über Wasserstoffbrücken verbunden ist (dA mit T und dC mit dG, Prinzip der Basenpaarung; Abbildung 3.1).

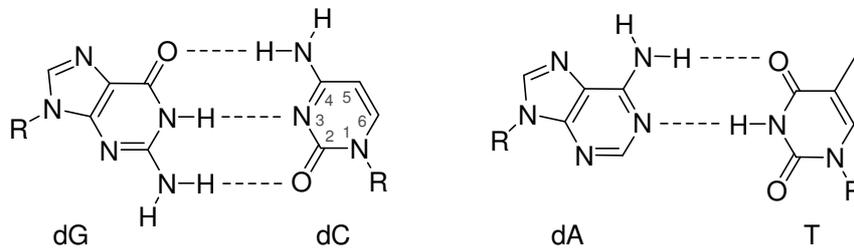
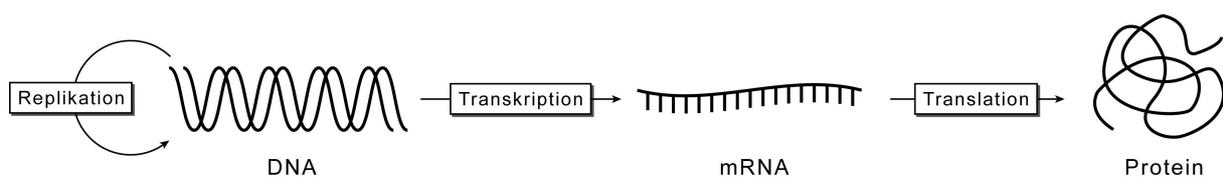


Abbildung 3.1: Die Watson-Crick Basenpaarung der DNA Bausteine. Für den Cytosin-Heterocyclus ist außerdem die Nummerierung der C-Atome angegeben.

Die dreidimensionale Helixstruktur wurde 1953 von *Watson* und *Crick* in Zusammenarbeit mit *Franklin* aufgeklärt.^[2-4] Zum einen bildet sie die Grundlage, um die Fähigkeit der Nukleinsäuren zur Selbstinstruktion zu erklären, denn jede Base determiniert automatisch die ihr korrespondierende Base im Gegenstrang - damit besteht die Möglichkeit der Replikation der gesamten DNA anhand eines einzelnen Stranges. Zum anderen hilft sie, den Informationsfluss ausgehend von der DNA hin zum fertigen Protein zu erklären. Der Übertragung des 4 Basen DNA Codes in den 4 Basen RNA Code (Transkription) folgt die Übersetzung der mRNA Nukleotid Triplets in den 20 Aminosäuren Code der Proteine (Translation); diese Zusammenhänge stellen das Zentrale Dogma der Molekularbiologie dar (Schema 3.1).^[1, 5]



Schema 3.1: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie. Die DNA wird durch semikonservative Replikation dupliziert. Der Transkription der Basensequenz der DNA in die mRNA folgt die Übersetzung der Nukleotidtriplets in den 20-Aminosäurencode der Proteine.

Die genomische DNA von Eukaryoten, auf die diese Betrachtungen beschränkt werden sollen, besteht nicht aus einem einzigen langen, über den gesamten Zellraum ausgebreitetem Molekül, sondern ist in Einzelabschnitte gegliedert, die sich sämtlich im Zellkern befinden und während der Mitose als Chromosomen in Erscheinung treten. Weiterhin ist die DNA in sogenannten Chromatinfasern organisiert, die durch definierte Bindung der Doppelhelix an eine bestimmte Gruppe

basischer Proteine, die Histone, entstehen. Je zwei Exemplare der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Histon Oktamer, um welches der DNA Faden in zwei linksgerichteten superhelikalen Windungen geschlungen ist. Das Histon H1 liegt auf dem Partikel, der im Ganzen als Nukleosom bezeichnet wird, auf und bedeckt Eintritts- und Austrittsstelle der DNA. Derart strukturierte nukleosomale DNA, die selbst einen Durchmesser von etwa 10 nm zeigt („beads on a string“), ist wiederum zu einer Überstruktur gefaltet, einer Chromatinfaser von nunmehr 30 nm Durchmesser (Abbildung 3.2). Diese Fasern bilden schließlich Schleifen, die an der Innenseite der Kernmembran haften. Insgesamt wird durch die beschriebene Strukturierung ein sehr hohes Verpackungsverhältnis der DNA Helix erreicht, die pro Zelle immerhin eine Länge von etwa 10 mm aufweist. Das Chromatin füllt den größten Teil des Zellkerns aus.^[1, 5]

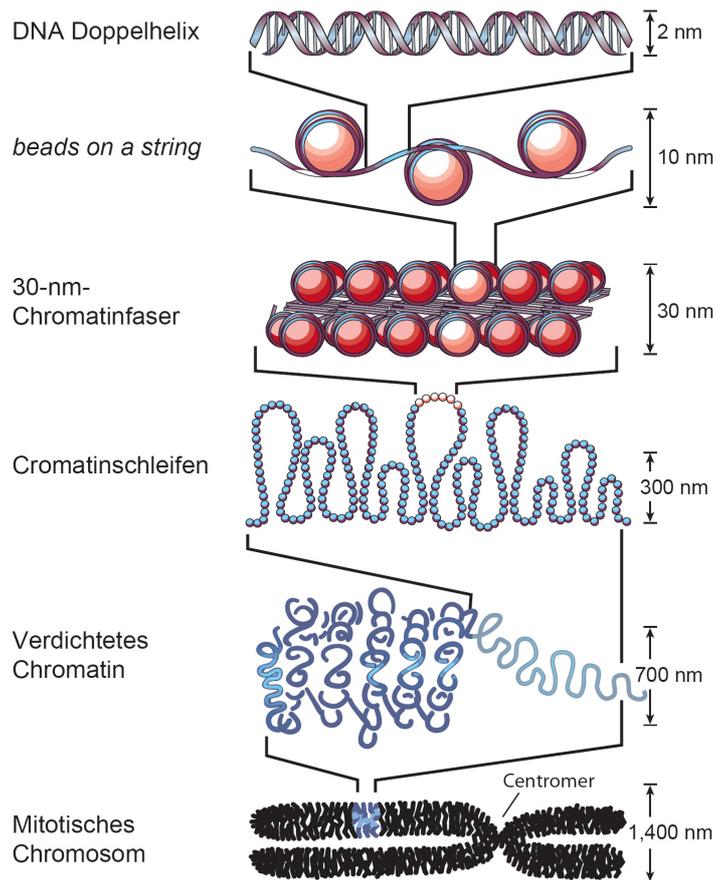


Abbildung 3.2: Die zelluläre Organisation der genomischen DNA in Chromatinfasern und Chromosomen.

Der überwiegende Teil der DNA von Tieren und Pflanzen trägt keine Informationen für die Proteinsynthese und besteht oft aus vielfach vorkommenden, repetitiven Abschnitten, deren genetische Funktion noch weitgehend unbekannt ist.

Beispiele solcher repetitiver DNA sind die regelmäßig vorkommenden, weit über das Genom verteilten SINE (*short interspersed repetitive elements*) und LINE (*long interspersed repetitive elements*) Elemente oder die Satelliten DNA in den Centromer- und Telomerbereichen der Chromosomen. 5 – 10 % der DNA bestehen hingegen aus proteincodierenden Sequenzen von 600 bis 1500 Basenpaaren Länge, den Genen. Sie tragen in der Abfolge ihrer Nukleosidbausteine die Baupläne der Proteine, sozusagen die zur Synthese notwendigen Rohdaten. Für die Funktionsfähigkeit eines Organismus ist nun aber nicht nur die verschlüsselte Information selbst von großer Bedeutung, sondern auch die Möglichkeit, sie selektiv zu nutzen und umzusetzen. Über die *Regulation* der genetischen Aktivität und damit der Proteinsynthese ist die Steuerung und Koordination zellulärer Prozesse, wie beispielsweise des Stoffwechsels, der Entwicklung oder des Zellaufbaus, überhaupt erst möglich.^[1, 5]

3.1.2 Die Kontrolle der genetischen Aktivität

Als genetische Aktivität oder Genexpression wird der gesamte Prozess der Umsetzung der im Gen enthaltenen Information in das entsprechende Genprodukt bezeichnet. Dieser Prozess erfolgt in mehreren Schritten, und auf jeden dieser Schritte können regulatorische Faktoren einwirken.

In einigen Fällen wird die Proteinsynthese unmittelbar auf der Ebene der Translation gesteuert, indem die Bildung des Initiationskomplexes ermöglicht oder unterbunden wird. Die Regulation kann aber auch einen Schritt vorher stattfinden, auf RNA-Ebene, indem beispielsweise die mRNA durch RNA-Interferenz (RNAi) abgebaut oder blockiert wird.^[6] Am weitaus wichtigsten jedoch ist in eukaryotischen Zellen die Kontrolle der genetischen Aktivität auf der untersten Ebene, der Transkription. Hierbei entscheiden verschiedene miteinander vernetzte Mechanismen darüber, ob die RNA Polymerase II mit dem Ablesen eines bestimmten Gens und der Synthese der korrespondierenden mRNA beginnt oder nicht. Zum besseren Verständnis der Ereignisse um den Transkriptionsstart soll zunächst kurz der Aufbau eukaryotischer Gene erläutert werden.

Die Gene von Eukaryoten sind charakteristischerweise in codierende und nicht-codierende Abschnitte unterteilt, die sogenannten Exons (*expressed regions*) und Introns (*intervening regions*; Abbildung 3.3). Introns werden zwar auch transkribiert, aber dann aus der prä-mRNA herausgespleißt, bevor diese zur Translation aus dem Zellkern ausgeschleust wird. Allein die Exons verbleiben in der reifen mRNA. Jedes Gen wird über spezifische regulatorische Elemente in Form bestimmter Basensequenzen kontrolliert, die in unterschiedlicher Entfernung stromauf- und stromabwärts des Transkriptionsstarts liegen. Ein essentieller Bestandteil eines Gens ist die Promotorregion, die in der Regel am 5'-Ende und somit vor der RNA-codierenden Region zu finden ist.

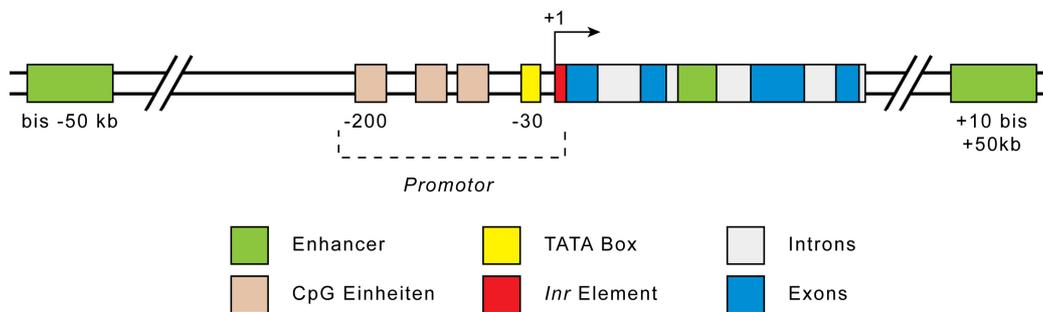


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau eukaryotischer Gene und ihrer Regulationselemente. TATA-Box, CpG Einheiten und Inr-Element sind optional und nicht in allen Genen vorhanden. *Pfeil:* Transkriptionsstart.

Die Promotoren sind in Eukaryoten stark genspezifisch aufgebaut und beherbergen den Startpunkt der Transkription, also die Stelle, an der die RNA Polymerase II mit der Synthese der prä-mRNA beginnt. Ihre Sequenzmotive sind Bindestellen für zahlreiche regulatorischen Proteine. Sie zeigen untereinander wenige Gemeinsamkeiten, gewisse Grundelemente wie die TATA-Box oder das Inr-Element am Transkriptionsstart sind häufig, aber bei weitem nicht in jedem Promotor zu finden. Recht verbreitet sind sogenannte CpG Inseln, CG reiche Abschnitte im Stromaufwärtsbereich mit Längen von bis zu 1000 Basenpaaren, die in etwa 50 % der Promotorregionen vorkommen. Die CpG Einheiten dieser Bereiche können mit 5-Methyl-2'-desoxycytidin eine besondere Modifikation der DNA enthalten, die weitreichende mechanistische Konsequenzen hat und über die Expression oder Stilllegung des zugeordneten Gens entscheiden kann. Näheres zu diesem Thema folgt ausführlich in Kapitel 3.3. Darüber hinaus kommen zu diesen Promotorgrundelementen noch weitere zelltyp- und entwicklungspezifische Regulationselemente, die bis zu einige tausend Basenpaare vom Transkriptionsstart

entfernt liegen können (sogenannte *enhancer*). Ihr Vorkommen und ihre Anordnung sind jeweils charakteristisch für ein gegebenes Gen (Abbildung 3.3).^[1, 5]

Eine Schlüsselrolle für die Aktivierung der Genexpression spielen die Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren), die die RNA Polymerase zum richtigen Zeitpunkt und hochspezifisch an den Transkriptionsstart im Promotor des Gens vermitteln und gleichzeitig die Struktur des umgebenden Chromatins in geeigneter Weise verändern. Grundsätzlich wird jedes Gen auf seine eigene Art reguliert, doch die Grundlage bilden stets die Wechselwirkungen zwischen den Promotorbereichen und diesen speziellen Proteinen, von denen mehrere hundert bekannt sind. Die Transkriptionsfaktoren verschaffen sich dabei Zugang zu ihren Zielmotiven auf der DNA, indem sie die Nukleosomen verschieben oder ablösen und so die entsprechenden Sequenzen freilegen. Sie sind Empfänger von Signalen etwa von der Zelloberfläche oder aus dem Cytoplasma und in hochkomplexe Signaltransduktionswege eingebunden. Sie nehmen direkt oder im Verbund mit Koaktivatoren Einfluss auf die Geschehnisse am Transkriptionsstart. Dabei ist meist ein ganzer Satz von Aktivatoren für die Aktivierung eines Gens notwendig, und oft kann ein und derselbe Transkriptionsfaktor durch verschiedene Signalwege aktiviert werden.

Wie bereits angedeutet kommt der Chromatinstruktur, in die die betreffende Gensequenz eingebettet ist, bei der Initiierung der Transkription eine große Bedeutung zu. Grundsätzlich unterscheidet man hier zwischen Euchromatin und Heterochromatin. Euchromatin zeigt eine aufgelockerte, für Transkriptionsfaktoren gut zugängliche Struktur und ist genetisch aktiv, die hier vorgefundenen Gene können also transkribiert werden. Die stark erhöhte Zugänglichkeit der DNA in dieser Art Chromatin zeigt sich experimentell in Form von DNase-I-hypersensitiven Stellen (DHS): solche Abschnitte sind verglichen mit der DNA im dicht gepackten, genetisch stummen Heterochromatin bis zu tausendmal empfindlicher gegen DNase I Restriktion. Der Grund hierfür liegt schlicht in der Tatsache, dass das Restriktionsenzym die in Euchromatin verpackte DNA besser erreichen kann. Allein die Art der räumlichen Organisation der genomischen DNA scheint also einen Einfluss auf den Expressionsstatus der einzelnen Gene zu haben. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die CpG Inseln von Promotoren genetisch stummer, nicht-transkribierter Gene im inaktiven Heterochromatin in den meisten Fällen die

erwähnte Cytosin-C5 Methylierungsmarkierung aufweisen, während sich im aktiven Euchromatin vor allem exprimierte Gene mit unmethylierten Promotorsequenzen finden. Interessanterweise ist diese DNA Modifikation und damit der Expressionsstatus des assoziierten Gens von Zelle zu Zelle vererbbar^[1, 5]

Wie nun die Packungsdichte des Chromatins von der Zelle reguliert wird, welche mechanistischen Auswirkungen auf die Genexpression sich daraus ableiten lassen und welche Rolle die DNA Methylierung bei diesen Prozessen spielt, mit diesen Fragen befasst sich eine eigene molekularbiologische Disziplin, die *Epigenetik*.

3.2 Was bedeutet *Epigenetik*?

Die Epigenetik befasst sich mit molekularbiologischen Mechanismen, die sich *jenseits* (griech. *epi-*) der genetischen Grundprinzipien bewegen, d.h. sie beschreibt genetische Auswirkungen, die nicht durch die Nukleotidsequenz (allein) bestimmt werden, sondern durch bestimmte ihr übergeordnete Vorgänge. Epigenetische Prozesse haben dabei weitreichende und vor allem vererbare Konsequenzen für die genetische Aktivität und damit das Schicksal nicht nur der einzelnen Zelle, sondern des ganzen Organismus. Diesem schnell wachsenden Forschungsfeld wurden allein im Jahr 2006 über 2500 wissenschaftliche Publikationen gewidmet.^[7] Die Epigenetik kann im Wesentlichen in zwei große Bereiche gegliedert werden, die gleichwohl in enger Beziehung zueinander stehen und sich in weiten Teilen überschneiden: Die DNA Methylierung und die Modifizierung der Histone. In einem komplexen Zusammenspiel greifen diese Mechanismen in die Kontrolle der Genexpression ein, sie treten mit Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung und bestimmen maßgeblich die Konformation des Chromatins. In welchem Ausmaß sie einander dabei bedingen, welche epigenetische Modifikation der anderen vorausgeht und welche folgt, oder inwieweit sie auch jeweils unabhängig voneinander wirken können, ist noch vielfach ungeklärt und Bestandteil intensiver Forschung.^[8-12]

Eine weitere, dritte Möglichkeit, auf epigenetische Prozesse Einfluss zu nehmen, scheint über einen Zusammenhang zwischen Chromatinstruktur und bestimmte nicht-kodierende RNA gegeben zu sein. Über diese Mechanismen ist

bislang allerdings nur sehr wenig bekannt, weshalb hier nicht näher auf sie eingegangen werden soll.^[13]

Im Folgenden werden kurz die verschiedenen Arten der Histonmodifizierung und ihre Auswirkungen erläutert, um anschließend ausführlich die DNA Methylierung zu behandeln, die den eigentlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit darstellt.

3.2.1 Histonmodifikation und Chromatinstruktur

Hatte man die Funktion der Histone früher noch ausschließlich in der Verpackung der DNA zu Nukleosomen gesehen, erkennt man nun mehr und mehr ihre Bedeutung als dynamische Regulatoren der Genexpression. Jedes der *Core*-Histonproteine hat eine flexible aminoterminal Domäne, die aus dem Nukleosom herausragt und verschiedenste posttranslationale chemische Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung oder Sumoylierung erfahren kann (Abbildung 3.4 und Schema 3.2).^[11, 12, 14]

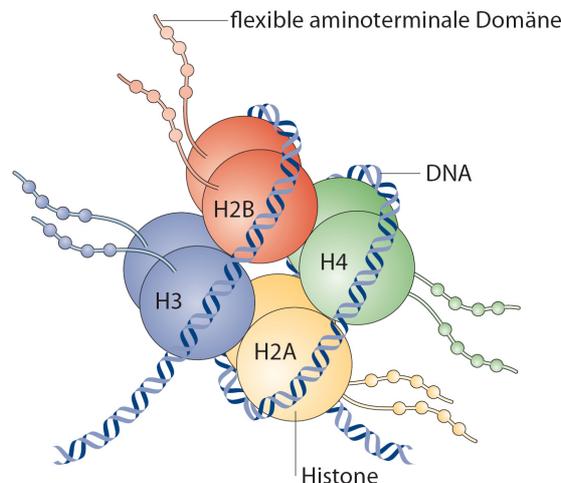
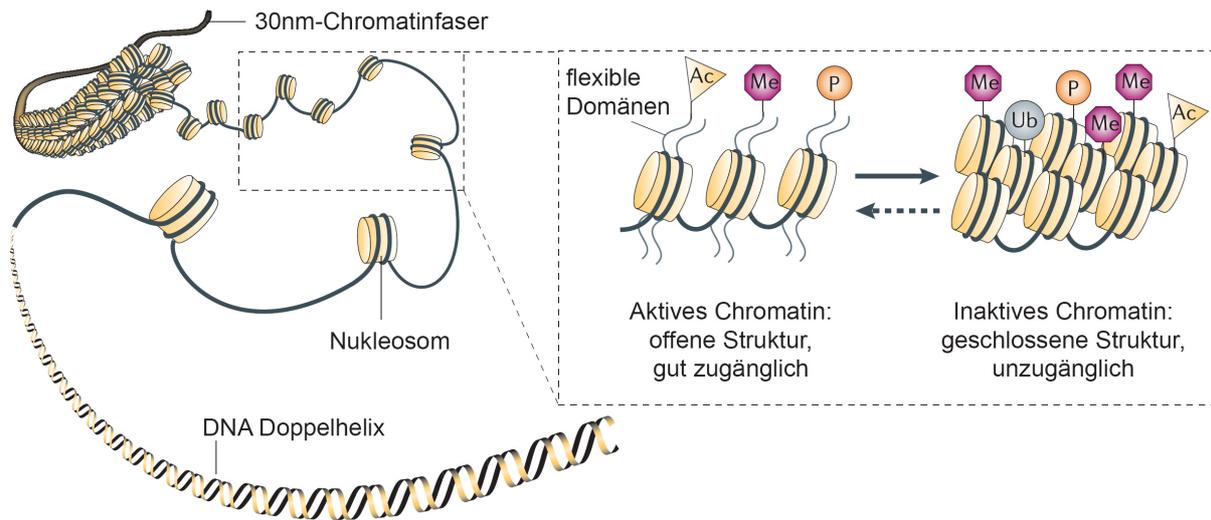


Abbildung 3.4: Aufbau der Nukleosome aus den acht Kernhistonen, umwunden von der DNA Helix.^[14]

Bei der Regulierung der Chromatinstruktur und damit der Genaktivität spielen in erster Linie die spezifische Acetylierung und Methylierung der flexiblen N-terminalen Domänen der Histone eine entscheidende Rolle. Über diese Peptidketten können die einzelnen Nukleosomen mit ihren Nachbarn interagieren und so den Übergang von der einfachen *beads-on-a-string* Struktur mit 10 nm Durchmesser zur 30 nm-Chromatinfaser und eventuell zu noch höher geordneten Überstrukturen bewirken. Ermöglicht wird dies auf molekularer Ebene durch die Wechselwirkung

positiv geladener Lysinseitenketten in den flexiblen nukleosomalen Domänen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der umgebenden DNA – durch die Anziehungskräfte zwischen den entgegengesetzten Ladungen verdichten sich die Strukturen, das Chromatin „kondensiert“. Im Gegenzug neutralisiert eine Acetylierung der Lysinreste deren positive Ladungen und schwächt damit die Histon-DNA Wechselwirkung, was zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur führt.



Schema 3.2: Der Histoncode (1). Die flexiblen aminoterminalen Enden der Histone können posttranslational durch Methyl-, Acetyl-, Phosphat- und Ubiquitinreste modifiziert werden.^[12]

In Übereinstimmung mit diesen Annahmen korreliert der Acetylierungsgrad des Chromatins direkt mit der Empfindlichkeit gegen den bereits angesprochenen Restriktionsverdau mit DNase I (je lockerer das Chromatingerüst, desto leichter ist die DNA für die Nuklease zugänglich). Neben der Acetylierung ist auch eine bis zu dreifache Methylierung von Lysinresten möglich, die zu einer Beibehaltung der positiven Ladung führt; das gleiche gilt für Argininreste. Über die Phosphorylierung von Serin- oder Threoninseitenketten werden hingegen negative Ladungen eingeführt.^[1, 5]

Die genannten Modifikationen können nun in vielfältiger Weise miteinander kombiniert werden. Je nach Kombination ergeben sich unterschiedliche Konsequenzen für die Chromatinstruktur und die Aktivität des betreffenden Gens, so dass man von einem regelrechten *Histoncode* sprechen kann (Abbildung 3.5).^[11, 15]

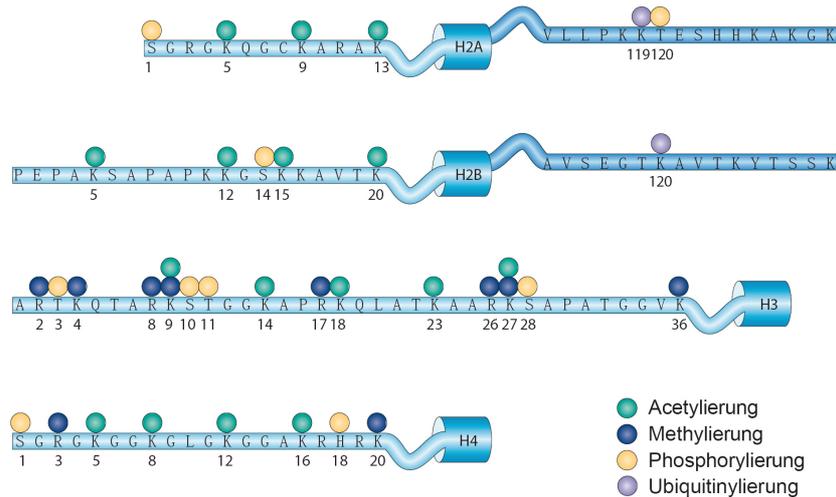


Abbildung 3.5: Der Histoncode (2). Die Modifikationsmöglichkeiten der einzelnen Aminosäuren der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Aminosäuren wie H3K9 oder H3K27 können sowohl methyliert wie auch acetyliert werden.^[11]

Abbildung 3.5 zeigt die verschiedenen Modifikationsmöglichkeiten an den Kernhistonen, wobei den Histonen H3 und H4 eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint. Eine Änderung der physiologischen Umgebungsvariablen ruft Änderungen im Histoncode hervor, wobei auch mehrere Markierungen auf einmal gelöst und/oder neu angebracht werden können. Einige Positionen wie der Lysinrest 9 im Histon 3 (H3K9) können sowohl methyliert (me) als auch acetyliert (ac) vorliegen. Bestimmte Kombinationen dieser Modifikationen werden schließlich mit einem aktiven (z. B. H3K9ac, H3K14ac, H3K4me²) oder aber einem inaktiven (z. B. H3K9me, H3K27me²) Zustand des Chromatins in Verbindung gebracht.^[11]

Zusätzlich zu ihrem Einfluss auf die direkten Wechselwirkungen der Histone mit der DNA und der Nukleosome untereinander können die erwähnten Histonmodifikationen die Bindung von Nicht-Histon Proteinen bewirken, die in Prozesse wie die Transkription und die Replikation eingebunden sind (siehe unten).

Für die Modifizierung der flexiblen Domänen der Histone sind vor allem Histonacetyltransferasen (HAT) und -deacetylasen (HDAC) sowie Histonmethyltransferasen und -demethylasen verantwortlich. Sie werden durch bestimmte an den Genpromotor gebundene Transkriptionsfaktoren rekrutiert und nehmen über die Änderung des Histoncodes Einfluss auf die Ereignisse am Transkriptionsstart. Diese Zusammenhänge sollen anhand zweier wichtiger Signalwege näher erläutert werden.

Ein Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der histonmodifizierende Enzyme heranziehen kann, ist der Koaktivator CBP im cAMP Signaltransduktionsweg. Der *second messenger* cAMP initiiert die Aktivierung verschiedener physiologisch wichtiger Gene, indem er zunächst die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) an die entsprechende DNA Sequenz stromaufwärts des betreffenden Genpromotors bewirkt. CREB wird dabei zweifach phosphoryliert und zieht den Koaktivator CBP (*CREB binding protein*) heran, der nicht nur in Kontakt zum allgemeinen Transkriptionskomplex TFIIB und zur RNA Polymerase Pol II tritt, sondern vor allem als Histonacetyltransferase wirkt und so die Chromatinstruktur auflockern kann. Letzteres ist, wie oben beschrieben, maßgeblich für eine aktive Genexpression. Darüber hinaus kann CBP ein weiteres Enzym (PCAF) rekrutieren, das ebenfalls HAT Aktivität besitzt (Abbildung 3.6).^[1, 16, 17]

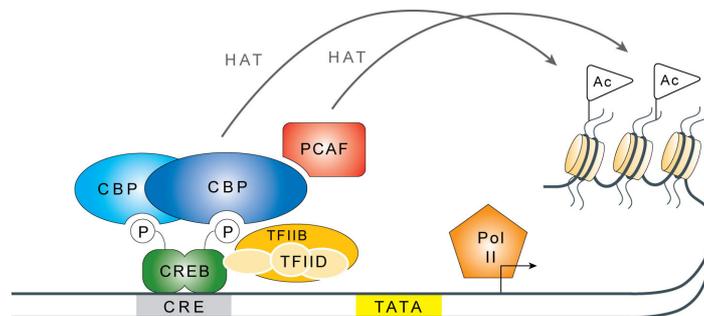
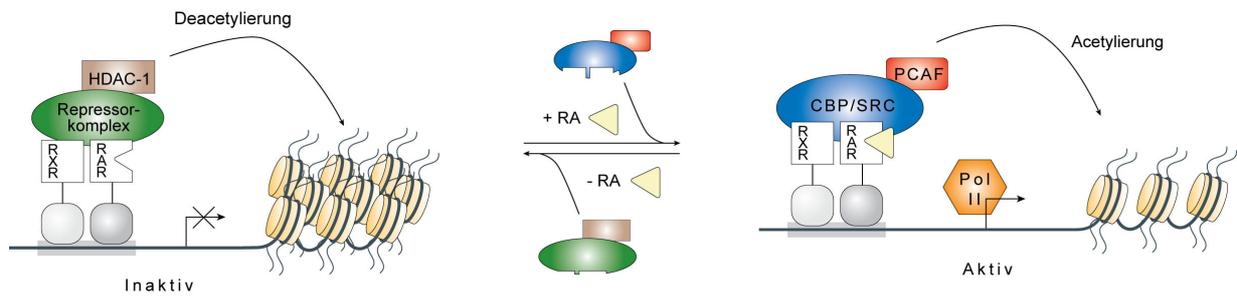


Abbildung 3.6: Die Rekrutierung von Histonacetyltransferasen (HAT) durch Transkriptionsfaktoren am Beispiel des cAMP Signaltransduktionsweges. P = Phosphat; CBP = CREB *binding protein*; Ac = Acetylmodifikation der Histone.^[1]

Auf eine andere Art und Weise wirkt die Familie der sogenannten nuklearen Rezeptoren. Hierbei handelt es sich um strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren, die zugleich Erstempfänger eines Signals *und* Aktivator genetischer Aktivität sind. Die Rezeptoren einer bestimmten Untergruppe dieser Proteinfamilie binden auch bei Abwesenheit des für sie spezifischen Liganden in Form von Heterodimeren an ihre Zielmotive stromaufwärts des Transkriptionsstarts, und wirken so als nukleare Repressoren des nachgeschalteten Gens. Schema 3.3 zeigt dies am Beispiel der Retinsäurerezeptoren RXR/RAR. In Abwesenheit des Liganden Retinsäure ziehen sie Faktoren heran, welche die Genexpression blockieren. Der gebildete Repressorkomplex enthält unter anderem eine Histondeacetylase (HDAC-1), die Acetyl-Gruppen von Histonen entfernt und damit eine Verdichtung des Chromatins bewirkt. Die kompaktere Chromatinstruktur ist für Transkriptionsfaktoren nur noch schwer zugänglich.^[1]



Schema 3.3: Die Rolle histonmodifizierender Enzyme bei der Transkriptionskontrolle durch nukleare Rezeptoren. RAR/RXR = Retinsäurerezeptoren; RA = Retinsäure; HDAC = Histondeacetylase.^[1]

Bei Anwesenheit von Retinsäure verändern die Rezeptoren durch die Bindung des Liganden drastisch ihre dreidimensionale Struktur, woraufhin die Repressorproteine abdissoziieren und durch Koaktivatoren ersetzt werden. Zu diesen Faktoren zählen im vorliegenden Fall wieder die Proteine CBP und PCAF, die nun, wie bereits erwähnt, unter anderem über die Acetylierung von Histonen die Transkription initiieren und damit die Expression des Gens bewirken können.

Die Histon-Acetyltransferasen gelangen also vermittelt durch Aktivatoren an das Chromatin. Damit letztere aber überhaupt zu ihren spezifischen *enhancer*- oder Promotorbereichen finden, müssen die entsprechenden DNA Bereiche zunächst durch bestimmte Proteine aufbereitet werden. Da die DNA dicht in Nukleosomen verpackt vorliegt und somit keinen Raum für Bindungsvorgänge läßt, sind sogenannte *chromatin remodeling complexes* vonnöten, die den Transkriptionsfaktoren den Zugang zum Chromatin ermöglichen. Proteinkomplexe wie SWI/SNF oder NURF verändern dabei entweder z. B. durch Bildung von freien DNA-Schleifen die Struktur der Nukleosomen, so dass Transkriptionsfaktoren wie TFIID in geeigneter Form binden können, oder sie verdrängen die Nukleosomen und „schieben“ sie beiseite.^[1]

Trotz ihres Namens („*chromatin remodeling*“) sind diese Proteinkomplexe aber nicht in die Etablierung von Eu- bzw. Heterochromatin involviert und dürfen nicht mit den für diese Vorgänge verantwortlichen Faktoren verwechselt werden.

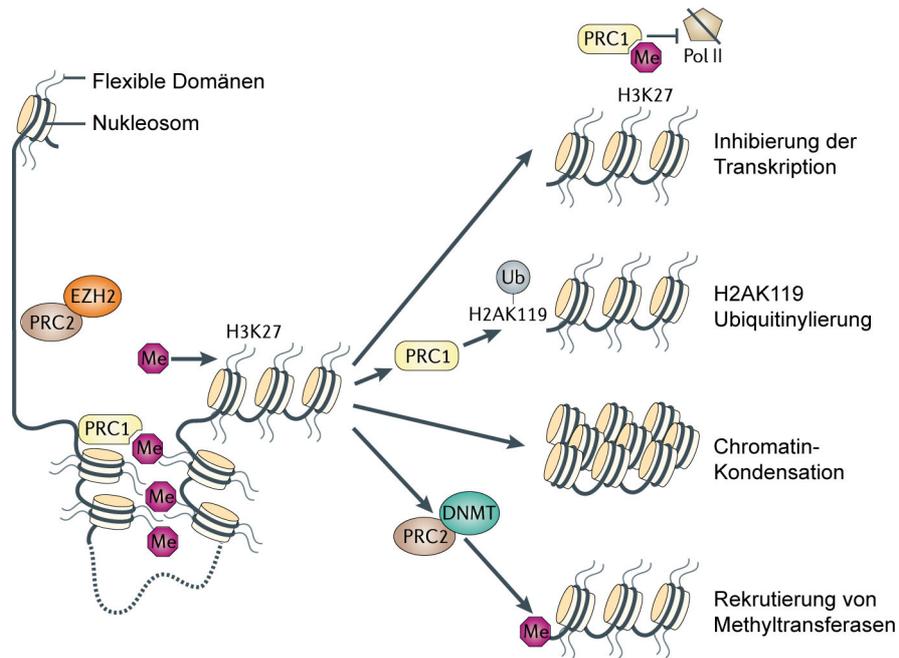
3.2.2 *Polycomb group (PcG) Proteine*

Eine wichtige Klasse epigenetischer Regulatoren sind die *Polycomb group (PcG)* Proteine, die als transkriptionelle Repressoren fungieren und über die Änderung der Chromatinstruktur bestimmte Gene abschalten können. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von embryonalen und adulten Stammzellen in ihrem undifferenzierten und selbsterneuernden Zustand. Darüber hinaus sind sie in wichtige Tumorsuppressor Signalwege eingebunden und greifen so in die Kontrolle der Zellproliferation und in neoplastische Mechanismen ein. Diesen Proteinen kommen damit Schlüsselfunktionen sowohl bei der gesunden zellulären Entwicklung, wie auch bei der Krebsentstehung zu.^[11, 18] Eine sehr gute Übersicht über die PcG Proteine und ihre Funktionen gibt *Sparmann*.^[12]

Die Mitglieder der in *Drosophila melanogaster* entdeckten Proteinfamilie können in zwei Klassen unterteilt werden, je nachdem ob sie an der Bildung des multimeren Polycomb Repressorkomplexes (PRC) PRC1 oder PRC2 beteiligt sind (Schema 3.4). Die Genrepression wird durch den Komplex PRC2 initiiert, der an die Zielsequenz bindet und dessen katalytisch aktiver Bestandteil EZH2 hieraufhin Histon 3 Lysinreste trimethyliert (H3K27me³, H3K9me³). Diese epigenetischen Markierungen, die meist mit transkriptionell inaktivem Chromatin in Verbindung gebracht werden, können unter anderem den PRC1 Komplex rekrutieren, der wiederum weitere regulatorische Prozesse initiieren kann.^[11, 12]

Über die genauen molekularen Mechanismen der Polycomb-vermittelten Repression ist bislang noch wenig bekannt. In Schema 3.4 sind einige der vorgeschlagenen bzw. bereits aufgeklärten Reaktionswege zusammengefasst. PRC Komplexe könnten beispielsweise die Transkription inhibieren, indem sie den angesprochenen *chromatin remodelling* Komplex SWI/SNF am Modifizieren der Nukleosome hindern und somit das Binden von RNA Polymerase und Transkriptionsfaktoren unterbinden. PRC1 könnte aber auch direkt mit Pol II wechselwirken.^[19-21] Darüber hinaus kann dieser Komplex H2AK119 ubiquitinylieren, eine mit einem inaktiven Expressionsstatus assoziierte Histonmodifikation.^[22, 23] PRC2 hingegen zeigt eine Methyltransferaseaktivität für H1K26. Liegt dieser Lysinrest im Histon 1 methyliert vor, kann er durch das Heterochromatin-Bindeprotein HP-1 erkannt werden, welches die Bildung einer höhergeordneten Chromatinkonformation bewirkt.^[24] Von besonderer Bedeutung im Kontext der vorliegenden Arbeit ist jedoch die Beobachtung, dass das Protein EZH2, ein

Bestandteil des PRC2 Komplexes, die DNA Methyltransferase DNMT1 rekrutieren kann. Wie im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben werden wird, induziert DNMT1 durch die Methylierung von CpG Einheiten in Promotorsequenzen eine stabile Repression der betreffenden Gene.^[25] Dieser Mechanismus schafft eine direkte Verbindung zwischen den zwei großen epigenetischen Teilbereichen der Histonmodifikation und der DNA Methylierung, ein Zusammenhang, über den die Wissenschaft noch immer sehr wenig weiß.^[12]

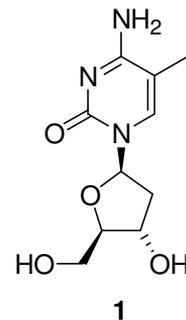


Schema 3.4: Die Funktionen der *Polycomb Group* (PcG) Proteine bei der Regulation der Genexpression. PRC = *Polycomb Repressor Complex*; DNMT = DNA Methyltransferase. ^[12]

3.3 DNA Methylierung

Während Histonmodifikationen auf Eukaryoten beschränkt sind, findet man DNA Methylierung, genauer die C5-Methylierung von Cytosin-Resten, in Organismen vom Bacteriophagen über Pflanzen bis zum Menschen, wo sie für eine große Bandbreite genetischer Regulationen verantwortlich ist.^[11, 18, 26-37]

2'-Desoxy-5-methylcytidin (**1**) ist dabei, sozusagen als „fünfte Base“, die einzige kovalente DNA Modifikation in Vertebraten (siehe nebenstehende Abbildung).^[33] Zu den breit



gefächerten Aufgaben der DNA Methylierung gehören so wichtige Prozesse wie die stabile Repression von Genen auf dem inaktiven X-Chromosom,^[38, 39] das Phänomen der genetischen Prägung (*genomic imprinting*),^[40] die

Inaktivierung von repetitiven Elementen (Satelliten DNA, LINE/SINE) und somit auch das Unterdrücken schädlicher Effekte durch Transposons,^[41, 42] die Kontrolle der Länge der Telomere^[43] sowie die Regulation zell- oder gewebsspezifischer Genexpression.^[33] Wie bereits mehrfach erwähnt, bestehen hier meist enge Zusammenhänge mit der Histonmodifikation und der Kontrolle der Chromatinstruktur. In Prokaryoten können neben der C5-Position von Cytosin (Dcm Methylierung) außerdem die Cytosin-N-4 sowie die Adenin-N-6 Position (Dam Methylierung) methyliert werden. Hier ist die DNA Methylierung u. a. in Restriktions-Schutzsysteme eingebunden, die zum Erkennen und zur Abwehr viraler Fremd-DNA dienen. Die Wirts-DNA wird dabei durch Methylierung bestimmter Sequenzen vor dem Restriktionsverdau durch zelleigene, methylierungssensitive Restriktionsenzyme geschützt, während unmethylierte Fremd-DNA als solche erkannt und abgebaut wird.^[44, 45]

3.3.1 CpG Inseln

Die menschliche DNA wird ausschließlich am C5 von Cytidin in CpG-Dinukleotidsequenzen methyliert. Das Humangenom enthält dabei nur ca. 10 % der CpG-Folgen, die man aus statistischen Gründen erwarten würde. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass methylierte Cytosin-Reste wesentlich leichter als

unmethylierte hydrolytisch deaminiert werden können, wodurch ein T:G *mismatch* entsteht. Wird dieses nicht repariert, wird die Mutation bei der nächsten Replikationsrunde fixiert, indem an Stelle des ursprünglichen CG-Basenpaares ein AT-Basenpaar erscheint (siehe Schema 3.5).^[1] Allerdings existieren Reparaturmechanismen wie z. B. *base excision repair* (BER), die diesen Defekt beheben und T:G *mismatches* reparieren können; unter anderem ist beispielsweise das Enzym Thymin-DNA-Glykosylase in diese Prozesse involviert. Insgesamt verläuft die Reparatur der G:T *mismatches* aber nur langsam. Die Reparaturenzyme können dabei offensichtlich parallel die *de novo* Methyltransferase DNMT3a rekrutieren, um die Methylierungsmarkierung nach erfolgter Reparatur wieder herzustellen.

Die Deaminierung von unmethyliertem dC zu dU kommt seltener vor, und die resultierenden U:G Fehlpaarungen werden leicht durch Uracil-DNA-Glykosylase repariert.^[28, 41, 46-53]



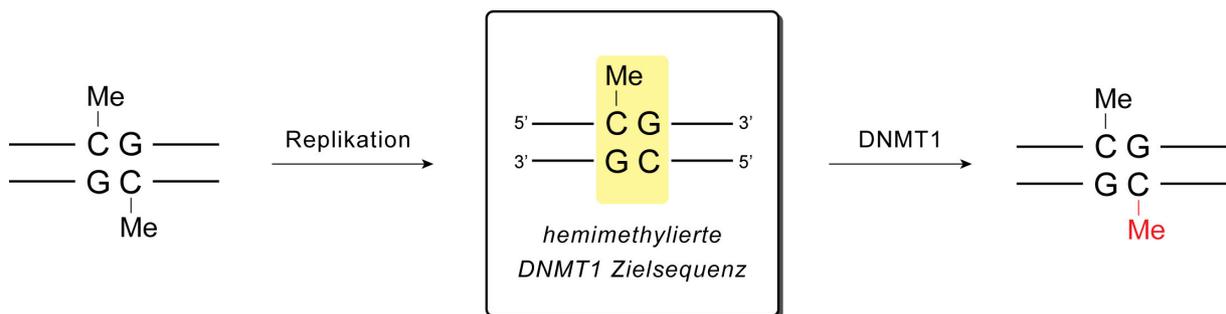
Schema 3.5: Deaminierung von 5-Me-dC. Wird der entstehende T:G *mismatch* nicht repariert, kommt es nach der folgenden Replikation zu einer T:A Punktmutation.

Rund 1 - 6 % der menschlichen DNA bestehen aus sogenannten *CpG-Inseln*, DNA Sequenzen von 500 - 5000 bp Länge, in denen der CG Gehalt mit rund 60 - 70 % den erwarteten Werten entspricht oder sie übertrifft.^[50, 51, 54] Solche CpG-Inseln werden in etwa der Hälfte der Promotorregionen aller Gene gefunden, wo sie in den meisten Fällen unmethyliert vorliegen, weshalb sie auch die Evolution „überleben“ konnten (siehe oben).^[36, 47, 55] Ein nicht oder nur geringfügig methylierter Promotor ist in der Regel mit einem aktiven Expressionsstatus assoziiert, wohingegen in den Promotorregionen von inaktiven Genen die CpG-Sequenzen fast immer methyliert vorliegen.^[55, 56] Es gibt auch CpG-Inseln außerhalb von Promotorregionen, deren Bedeutung allerdings noch ungeklärt ist. Insgesamt tragen etwa 3 - 8 % aller im Genom vorhandenen Cytosinreste eine C5 Methylgruppe.^[33]

3.3.2 Methyltransferasen und Methylierungsmechanismus

In der menschlichen Zelle sind mindestens drei **DNA-Methyltransferasen** für die Cytosin-Methylierung verantwortlich: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Die drei Enzyme scheinen teilweise zu kooperieren und in einer gewissen Abhängigkeit voneinander zu stehen (s. weiter unten).^[18, 33, 57] Sehr gute Übersichtsartikel zu Cytosin-C5 DNA Methyltransferasen finden sich unter anderem bei *Hermann*,^[58] *Jeltsch*,^[33] *Goll*,^[59] und *Kumar*.^[60]

Hervorzuheben ist DNMT1, welche bevorzugt hemimethylierte DNA methyliert, d. h. CpG Sequenzen, in denen der Cytosinrest eines Stranges bereits C5-methyliert vorliegt. Diese Situation tritt in erster Linie im Rahmen der Replikation der genomischen DNA auf, da der Zelle bei der Synthese des neuen (Tochter-)Strangs nur dC, aber kein 5-Me-dC zur Verfügung steht (siehe Schema 3.6).^[61, 62]



Schema 3.6: Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters durch DNMT1 während der Replikation. Da der neu synthetisierte Tochterstrang keine 5-Me-dC Bausteine enthält, entstehen nach der Replikation hemimethylierte CpG Sequenzen. Diese werden von der Methyltransferase erkannt und zur vollständig methylierten CpG Einheit umgesetzt.

Die Angaben in der Literatur darüber, wie stark das Enzym eine bereits hemimethylierte CpG Zielsequenz der gänzlich unmethylierten bevorzugt, sind sehr uneinheitlich und reichen von einer 7- bis zu einer 40-fachen Präferenz.^[61, 63] Da DNMT1 offenbar für den Erhalt des Methylierungsmusters während der DNA-Replikation^[64] sowie bei bestimmten DNA-Reparaturprozessen^[29, 41] verantwortlich ist, wird das Enzym auch oft als *maintenance methyltransferase* bezeichnet. DNMT1 ist somit während der S-Phase des Zellzyklus durchgehend in der Nähe der Replikationsgabeln lokalisiert, vermittelt u. a. durch eine Wechselwirkung mit dem Protein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*).^[64, 65] Während der G1- und der G2-Phase liegt das Enzym diffus im Nukleoplasma verteilt

vor.^[64] Des Weiteren konnte anhand von S-Phase- wie auch Nicht-S-Phase-Zellen *in vivo* gezeigt werden, dass DNMT1 vermittelt durch PCNA an UV-induzierten DNA-Schäden rekrutiert wird.^[29]

DNMT1 ist ein 190 kDa großes Multidomänen-Protein, das aus 1620 Aminosäuren besteht und hinsichtlich Struktur wie Funktion die komplexeste aller bekannten DNA Methyltransferasen ist (Abbildung 3.7).^[61, 66-71] Die Struktur von DNMT1 ist, wie die der übrigen eukaryotischen Methylasen, noch nicht bekannt, doch Sequenzhomologien in der katalytisch aktiven C-terminalen Domäne sowie die Möglichkeit der Inhibierung durch bestimmte Nukleosidinhibitoren wie 5-Fluoro-dC legen einen prinzipiell gleichen Mechanismus der prokaryotischen und eukaryotischen Proteine nahe.^[33, 59-62, 72-75] Unabhängig von ihrer Herkunft zeigen alle DNA Methyltransferasen zehn teils hochkonservierte Sequenzmotive (I - X), die auch als wichtigste Merkmale bei der Identifizierung neuer Methyltransferasen dienen. Die Funktionen dieser Motive sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei den eukaryotischen Enzymen liegen acht der zehn Motive im C-terminalen Teil der Proteine. Während das Motiv I offensichtlich für die Bindung des Kofaktors (SAM, siehe Abbildung 3.7) verantwortlich ist, befindet sich im Motiv IV der katalytisch aktive Cystein-Rest, über den während der Methylierungsreaktion eine kovalente Bindung zur Zielbase hergestellt wird (siehe Abbildung 3.8). Die Position der sechs hochkonservierten Motive I, IV, VI, VIII, IX und X in den eukaryotischen Enzymen sowie im prokaryotischen Protein M.HhaI ist in Abbildung 3.7 zu sehen.^[60, 73, 76]

Die größere N-terminale Domäne von DNMT1, die über einen Abschnitt sich wiederholender Glycin-Lysin Einheiten (*GK repeats*) mit dem C-Terminus verbunden ist, weist zahlreiche regulatorische Motive auf, u. a. ein *nuclear localization signal* (NLS), eine PCNA- sowie eine allosterische DNA-Bindungsstelle.^[62, 67, 77] Letztere enthält eine Zink-Bindedomäne vom CXXC Zinkfinger-Typ mit acht konservierten Cystein-Resten und soll für die Präferenz des Enzyms gegenüber hemimethylierter DNA verantwortlich sein; unmethylierte Substrate hingegen inhibieren das Enzym allosterisch. Das katalytische Zentrum steht prinzipiell unter einer starken allosterischen Kontrolle der N-terminalen Domäne des Enzyms. Das Enzym ohne den N-Terminus zeigte *in vitro* wie *in vivo* keinerlei Methylierungsaktivität mehr.^[33, 62, 68, 78-82] DNMT1 bildet ternäre Protein/DNA/DNA-Komplexe, wobei verschiedene DNA-Sequenzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zeigen, und allgemein scheint das Protein über ein komplexes Zusammenspiel seiner

verschiedenen DNA-Bindungsstellen reguliert zu werden.^[67-69, 83] Neben der Bindestelle für PCNA wurden Wechselwirkungen mit vielen weiteren Proteinen wie HDAc's, SUV39H1, HP1, MeCP2, DMAP1, E2F1, pRb und p53 nachgewiesen, die ihrerseits wiederum in die unterschiedlichsten zellulären Signaltransduktionswege eingebunden sind.^[77, 84-87] DNMT1 zeigt einen *footprint* von etwa 30 bp,^[66] wobei eine einzelne 5-Methyl-dC Base pro an das Enzym gebundenen DNA Abschnitt für eine maximale katalytische Aktivität ausreichend zu sein scheint.^[62] Bei der Methylierung bewegt sich das Enzym in einem *random walk* entlang der DNA und zeigt eine hohe Prozessivität (im Mittel werden >50 CpG Einheiten pro Bindungsvorgang des Proteins an die DNA geprüft, was etwa 6000 bp entspricht). CGCTC Sequenzen scheinen als Stopp-Signal zu fungieren.^[63]

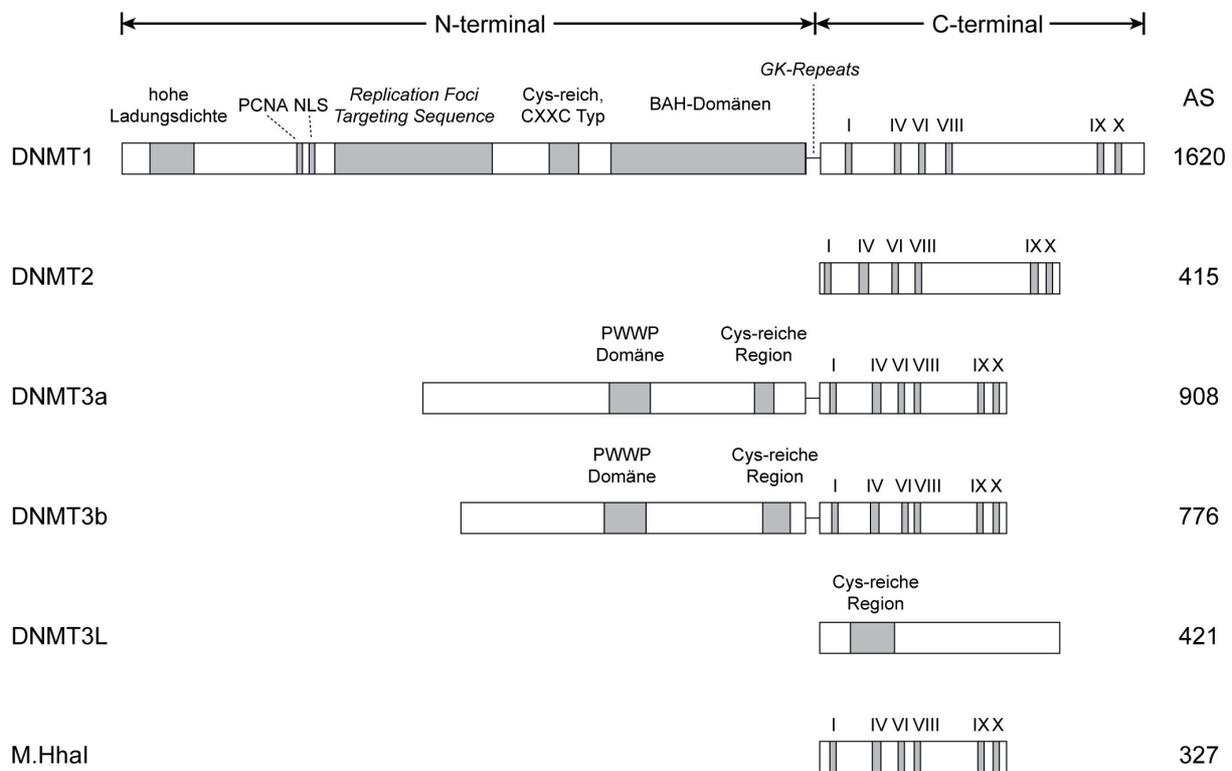
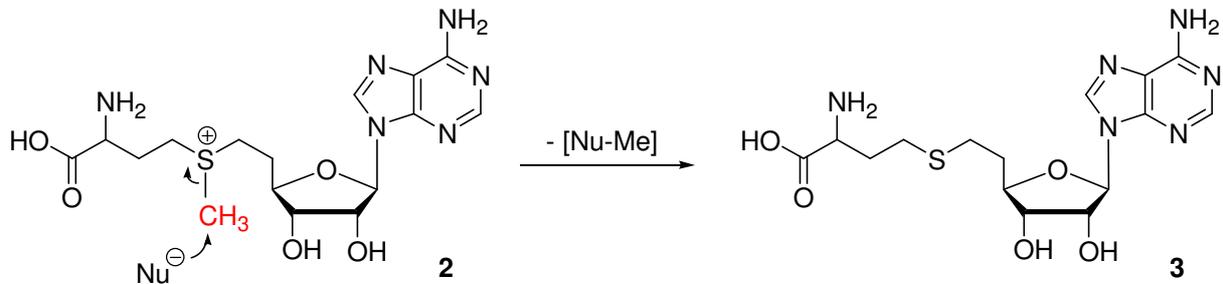


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der eukaryotischen DNA Methyltransferasen sowie einer prokaryotischen Methylase, M.HhaI. DNMT1 ist mit seinen 1620 Aminosäuren nicht nur größer, sondern auch weitaus komplexer aufgebaut als seine funktionellen Homologe. Die Abbildung zeigt unter anderem die Positionen der sechs hochkonservierten Sequenzmotive I, IV, VI, VIII, IX und X. Der katalytisch aktive Cysteinrest befindet sich in Motiv IV. Die Wechselwirkung mit der DNA findet u. a. über die Cystein-reichen Regionen statt. Die BAH-Domänen (*bromo-adjacent homology*) von DNMT1 stellen den Kontakt zu weiteren Proteinen her,^[88] die PWWP-Domänen der DNMT3-Familie sind für die Bindung zur DNA zuständig.^[89] NLS = *nuclear localization signal*; AS = Aminosäuren; *GK repeats* = Abfolge von Glycin-Lysin Einheiten, die C- und N-terminale Domäne miteinander verbinden; PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*.

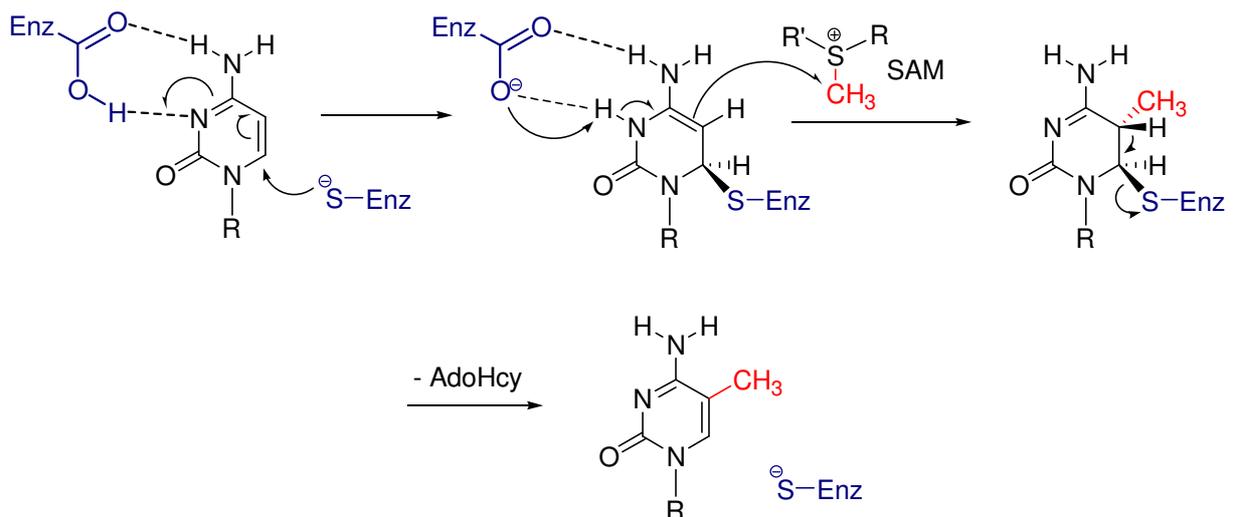
Die Vorstellungen vom mechanistischen Ablauf der Methylierungsreaktion beruhen bislang größtenteils auf Experimenten mit bakteriellen Methyltransferasen,

sollten aber aufgrund der Sequenzhomologien in den katalytischen Domänen auf die humanen Enzyme übertragbar sein. Die prokaryotischen wie eukaryotischen Enzyme nutzen, wie alle bekannten Methyltransferasen, S-Adenosylmethionin (**2**, SAM; auch AdoMet) als Quelle für die zu übertragende Methylgruppe, welches aus der Reaktion als S-Adosylhomocystein (**3**, AdoHcy) hervorgeht (Schema 3.7).^[33, 61, 90, 91]



Schema 3.7: Die von den DNA Methyltransferasen verwendete CH₃-Quelle, der Kofaktor S-Adosylmethionin (SAM, **2**; auch AdoMet). Durch die Übertragung der gegen einen nukleophilen Angriff aktivierten Methylgruppe geht SAM (**2**) in S-Adosylhomocystein (**3**, AdoHcy) über.

Die Methylase verschafft sich zunächst einen Zugang zur Zielbase, indem sie diese aus der Doppelhelix herausdreht (*base flipping*, siehe auch Abbildung 5.1).^[92-94] Anschließend greift das Enzym dann über einen Cystein-Rest nukleophil am C6 des Pyrimidin-Systems an, erleichtert durch einen enzymatisch vermittelten Protonentransfer auf das Stickstoffatom N3, was zu einer kovalenten S-C6-Bindung führt (Schema 3.8).



Schema 3.8: Mechanismus der C5-Methylierung von Cytosin durch DNA Methyltransferasen. SAM = S-Adosylmethionin (**2**); AdoHcy = S-Adosylhomocystein (**3**); Enz = Enzym (Methyltransferase).

Durch nukleophilen Angriff des C5-Atoms an der Methylgruppe des Kofaktors S-Adenosylmethionin erfolgt die eigentliche Methylierung. Während die *base flipping* Rate bei etwa 200 s^{-1} liegt, findet ein Methyltransfer mit einer Rate von 100 h^{-1} dabei vergleichsweise selten statt.^[62] Die Eliminierung des Protons am C5 unter Rückbildung der C5-C6-Doppelbindung sowie der gleichzeitigen Trennung der kovalenten Bindung zum Enzym führt zum Produkt, 5-Methyl-dC, und setzt das Protein wieder frei. Der Mechanismus konnte durch entsprechende Kristallstrukturen von Enzym-DNA Komplexen bestätigt werden (siehe auch Abschnitt 3.5.1).^[33, 92, 94-100] In Einklang mit den mechanistischen Annahmen beseitigen Mutationen des betreffenden Cystein-Restes die katalytische Aktivität des Enzyms vollständig.^[101, 102]

DNMT3a und DNMT3b zeigen im Gegensatz zu DNMT1 keine Präferenz gegenüber hemimethylierter DNA und werden deshalb auch als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet.^[18, 89, 103-106] Sie sind maßgeblich an der *de novo* Methylierung und somit der Etablierung neuer epigenetischer Muster im Verlauf der Embryogenese beteiligt.^[107, 108] Auf welche Weise diese Enzyme die zu methylierenden DNA Sequenzen erkennen, ist weitgehend unbekannt. Offensichtlich sind u. a. Repressorproteine wie etwa der Transkriptionsfaktor Myc beteiligt, der DNMT3a als Korepressor rekrutiert und so die Inaktivierung des *p21Cip1* Gens bewirken kann.^[103, 109]

DNMT1, DNMT3a und DNMT3b scheinen aber nicht gänzlich unabhängig voneinander zu agieren, weshalb man keine klare Grenze zwischen *Maintenance* und *de novo* Methyltransferasen ziehen kann. Beispielsweise konnten DNMT1-defiziente Darmkrebs Zellen etwa 80 % ihres Methylierungsmusters während der Replikation aufrechterhalten, was auf eine Aktivität von DNMT3a oder DNMT3b als *maintenance methyltransferase* zurückgeführt wurde.^[110] Andererseits führte die Überexpression von DNMT1 in bestimmten Krebszelllinien zu einer *de novo* Methylierung.^[111] Ebenso konnte exogenes DNMT1 Säugetier-CpG Inseln methylieren, die in die DNA von *Drosophila melanogaster* Zellen integriert worden waren, also bei völliger Abwesenheit von DNMT3a und DNMT3b.^[112] Erst das Ausschalten von *Dnmt1* und *Dnmt3b* reduzierte die DNA Methylierung um nahezu 95 % und bewirkte die Demethylierung repetitiver Sequenzen, die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *p16^{INK4a}*, den Verlust der *Igf2* Prägung etc.^[113, 114]

Weiterhin wird der kooperativen Tätigkeit von DNMT1 und DNMT3b die Verantwortung für die Aufrechterhaltung fehlerhafter Methylierungsmuster in Krebszellen zugeschrieben.^[57] Diese Beobachtungen zeigen, dass DNMT1 und die DNMT3-Methyltransferasen zumindest teilweise funktionelle Homologe sind und sich gegenseitig ersetzen können.

Des Weiteren wurden diverse Sequenzhomologe der Methyltransferasen-Familie identifiziert, die offensichtlich keine enzymatische Aktivität aufweisen: So zeigt das Protein DNMT2 keine detektierbare DNA Methylierungsaktivität *in vivo*, obwohl das Protein sowohl hinsichtlich seiner Sequenz wie seiner Struktur eindeutig eine Methyltransferase sein sollte.^[31, 59, 115, 116] Das gleiche gilt für DNMT3L (DNMT3-*like*), welches andererseits mit DNMT3a und DNMT3b interagiert und an der *de novo* Methylierung während der Keimzellentwicklung beteiligt ist.^[108, 117-119] Außerdem scheint DNMT3L eine Schnittstelle zwischen Methylierungsmechanismen und Histoncode darzustellen, da es in der Lage ist, unmethylierte H3K4 Reste zu erkennen und über die Rekrutierung von DNMT3a2 die *de novo* Methylierung der DNA zu initiieren.^[120]

3.3.3 Aufgaben und Funktionen der DNA Methylierung

Die Methylierung der DNA hat mehrere verschiedene Funktionen in der Zelle und übernimmt Aufgaben, die für eine normale zelluläre Entwicklung unabdingbar sind. Im Gegenzug können Störungen dieser fein aufeinander abgestimmten epigenetischen Mechanismen verheerende Auswirkungen für die Überlebensfähigkeit der einzelnen Zelle und des gesamten Organismus haben. Ihre Bedeutung ist deshalb kaum zu überschätzen. Im folgenden Abschnitt soll zunächst die mechanistische Wirkungsweise der Cytosin-C5 Methylierung erläutert werden, um anschließend die Rolle der DNA Methylierung bei verschiedenen zellulären Prozessen näher zu beleuchten. Hierbei wird auch auf die Methoden zur Detektion von Methylierungsmustern eingegangen werden.

3.3.3.1 Mechanistische Auswirkungen der Cytosin-C5 Methylierung

Ihre grundlegendste und bedeutungsvollste Rolle spielt die DNA Methylierung bei der Regulation der Genexpression, meist im Zusammenspiel mit Histonmodifikationen und mit Auswirkungen auf die Chromatinstruktur. Während die Promotoren von aktiven, transkribierten Genen in der Regel unmethyliert vorliegen und im Euchromatin zu finden sind, zeichnen sich stillgelegte durch einen hohen Methylierungsgrad in den regulatorischen Sequenzen aus; entsprechend liegen solche Gene eher im inaktiven Heterochromatin vor. Oft ist ein gegebenes Methylierungsmuster mit einem bestimmten Muster von Histonmodifikationen assoziiert (siehe unten).^[9, 18, 27, 30, 35]

Die Methylierung von Promotorregionen kann sich in verschiedener Weise auf die Initiierung der Transkription und somit auf die Genexpression auswirken (Abbildung 3.8).^[27, 36, 103] Diese kann zum einen dadurch unterdrückt werden, dass Transkriptionsfaktoren wie AP-2 oder E2F unmittelbar mit den methylierten Sequenzen wechselwirken und dadurch nicht an den Promotor binden können (Abbildung 3.8 b).^[121, 122] Andererseits können zunächst sogenannte Methyl-CpG Bindeproteine (MBP, bzw. auch *methyl-CpG binding domain proteins*, MBD) an die methylierten Sequenzen binden, um dann ihrerseits mit den Proteinkomplexen am Transkriptionsstart zu interagieren.^[18, 36, 123] Die Methyl-CpG-bindenden Proteine bilden neben den Methyltransferasen die zweite Komponente des DNA Methylierungssystems: Während erstere die Etablierung bzw. den Erhalt der Methylierungsmuster übernehmen, sind diese Faktoren für das „Lesen“ dieser Markierungen zuständig.^[18, 27, 35, 56, 124, 125] Eine detaillierte aktuelle Übersicht über die MBD Proteine und ihre Funktionen findet sich bei *Klose*.^[103] Ein wichtiger Vertreter dieser Proteinfamilie ist MeCP1, welches eine Methyl-CpG Bindedomäne sowie eine Transkriptions-Repressor Domäne (TRD) besitzt. Letztere kann, an die DNA gebunden, die Transkription von einem entfernten Promotor inhibieren (Abbildung 3.8 c).^[36] Weiterhin kann das MBD Protein MeCP-2 Histon Deacetylasen (HDAC) rekrutieren, welche die Enden von Histonen deacetylieren und so zu einer dichteren Packung der DNA in Heterochromatin führen. MeCP-2 wechselwirkt außerdem direkt mit DNMT1 und initiiert die Methylierung von H3K9 (Abbildung 3.8 d).^[35, 87, 103, 126] Die Markierung H3K9me ist ein typisches Merkmal inaktivierter Gene und stellt wiederum eine Bindestelle für das chromatin-modifizierende Protein HP-1 dar.^[85, 86] Bislang wenig untersucht wurde die

Methylierung von CpG Einheiten *innerhalb* von Gensequenzen, die ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der RNA Polymerase Pol II zu haben scheint (Abbildung 3.8 e).^[127] Nicht zuletzt können auch die Methyltransferasen selbst Histondeacetylasen, Histonmethyltransferasen und andere chromatin-modifizierenden Proteine rekrutieren und so zu einer unmittelbaren Verdichtung der Chromatinstruktur beitragen (Abbildung 3.8 f).^[85, 86, 128, 129]

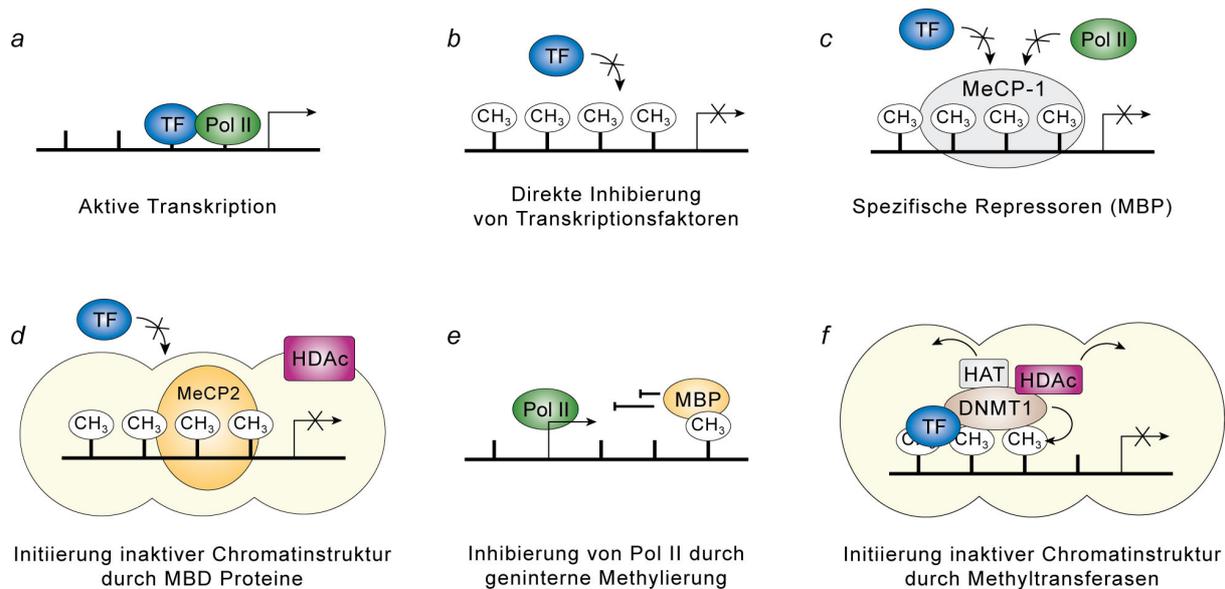


Abbildung 3.8: Mechanistische Auswirkungen der Methylierung von Genpromotoren. *a* Aktive Transkription bei Abwesenheit von 5-Me-dC; *b* Direkte Inhibition des Bindens von Transkriptionsfaktoren durch 5-Me-dC; *c* Rekrutierung von spezifischen Repressoren; *d* MBD Proteine rekrutieren Histondeacetylasen die zur Bildung einer inaktiven Chromatinstruktur führen; *e* Methylierung von Cytidinbasen innerhalb von Genen inhibiert die Transkription durch die RNA Polymerase Pol II; *f* DNA Methyltransferasen rekrutieren histonmodifizierende Enzyme, die eine inaktive Chromatinstruktur hervorrufen. TF = Transkriptionsfaktor; HAT = Histonacetyltransferase; HDAC = Histondeacetylase; MBP = Methyl-CpG bindende Proteine.

Die einmal durch die Promotormethylierung etablierte Repression eines Gens ist stabil und damit vererbbar.^[56] Auch starke Transkriptionsaktivatoren wie GAL4-VP16 können diese inaktivierenden Effekte nicht aufheben.^[130]

Neben der Transkriptionskontrolle scheint die DNA-Methylierung die homologe Rekombination der großen Anzahl an repetitiven Sequenzen in Säugetiergenomen zu verhindern. Dieser Prozess ist u. a. an der Entstehung verschiedener Krankheiten beteiligt (siehe unten).^[131-134]

3.3.3.2 Zum Zusammenhang von DNA Methylierung und Histonmodifikationen

Die im vorigen Abschnitt erläuterten Zusammenhänge stellen nur einen Teil der bekannten Schnittstellen zwischen DNA Methylierung und Histonmodifikationen dar.^[25, 120, 135-138] Trotz dieser Erkenntnisse und Beobachtungen bleibt aber meist unklar, ob beide Mechanismen einander bedingen, ob der eine dem anderen vorausgeht oder ob sie unabhängig voneinander reguliert werden. Fest steht, dass ein bestimmtes Methylierungsmuster in Kombination mit spezifischen Histonmodifikationen den aktiven oder inaktiven Status eines Gens bestimmen kann.^[15, 18, 30, 35] Welche dieser beiden epigenetischen Markierungen aber zuerst etabliert wird bzw. ausschlaggebend für die Änderung der jeweils anderen ist, muss in den meisten Fällen erst noch untersucht werden. Vielleicht wird es auf diese Frage auch keine einfache Antwort geben können.^[18]

Ein Beispiel für das komplexe Zusammenspiel der beiden Mechanismen fanden Vogelstein und Mitarbeiter, als sie die Auswirkungen eines DNMT1 und DNMT3b Doppel-*knockouts* auf die Expression von $p16^{INK4A}$ in humanen Darmkrebszellen (HCT116) untersuchten.^[9] Wie später noch näher erläutert werden wird, kommt es in Tumorzellen zu einer fehlerhaften, jedoch reversiblen Methylierung von Genpromotoren und somit zur Inaktivierung der assoziierten Gene (in diesem Fall $p16^{INK4A}$). Das Auslöschen der Methyltransferase-Aktivität durch den *knockout* reaktivierte zunächst durch die Demethylierung des Promotors das in HCT116-Wildtyp stillgelegte Gen, einhergehend mit einer Demethylierung von Histon H3 (genauer H3K9) und einer Acetylierung von Histon H4. Nachdem die Zellen zweiundzwanzigmal passagiert worden waren, kam es zur Remethylierung von H3K9 und der Deaktivierung des $p16$ Gens, allerdings *ohne* eine gleichzeitige Remethylierung des Promotors. Weitere 60 Passagen später konnte auch die Methylierung der Promotorregion wieder festgestellt werden, während H4 erneut deacetyliert worden war. Bei diesem Experiment wurde somit durch das Ausschalten der DNA Methyltransferaseaktivität eine Änderung der Histonmarkierungen veranlasst, verbunden mit der Aktivierung eines zuvor deaktivierten Gens. Die erneute Repression fand jedoch allein durch Veränderungen des Histoncodes statt, ohne die Beteiligung der DNA Methylierung. Erst im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde der Promotor wieder methyliert, was aber keine Auswirkungen mehr auf den Expressionsstatus des $p16$ -Gens hatte.

3.3.3.3 Genomische Prägung

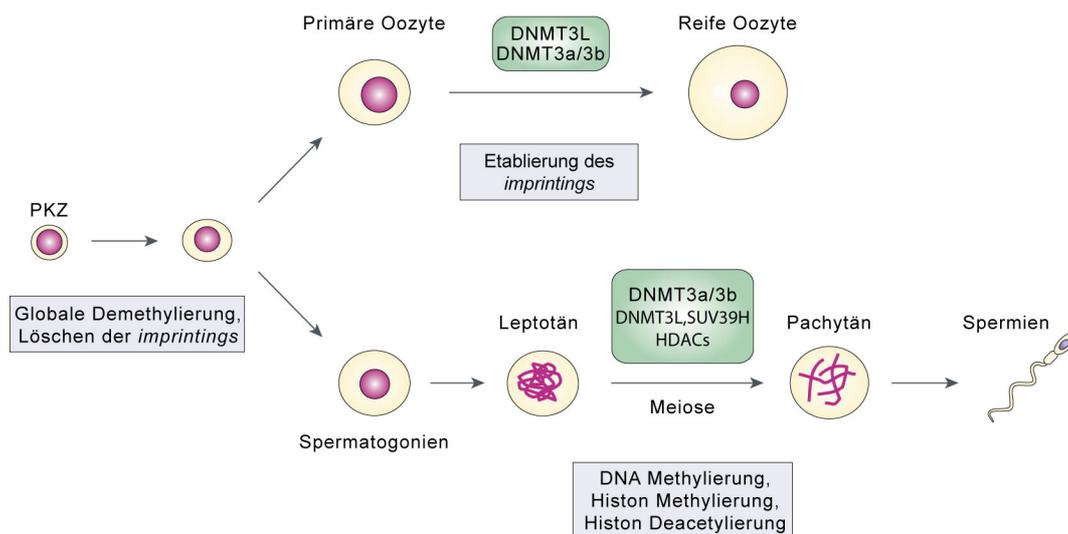
Unter genomischer Prägung (*genomic imprinting*) versteht man die epigenetische Modifizierung eines spezifischen parentalen Allels in Gameten oder Zygoten, die eine unterschiedliche Expression der beiden Allele eines Gens in den somatischen Zellen der Nachkommenschaft bewirkt. Durch diese epigenetische Prägung ist nur eines der beiden elterlichen Allele aktiv, d. h. die parentalen Gene werden abhängig vom jeweiligen Allel mit einem unterschiedlichen Aktivitätsstatus vererbt - und zwar im Gegensatz zur klassischen *Mendelschen* Vererbung unabhängig vom genetischen Code selbst und zudem reversibel. Dabei können die Allele sowohl in allen Zellen eines Organismus, als auch gewebe- oder entwicklungspezifisch auf bestimmte Zellen beschränkt, unterschiedlich exprimiert werden.^[139] Das wichtigste Kennzeichen geprägter Allele ist eine differierende Methylierung spezifischer DNA Regionen, der sogenannten *differentially methylated regions* (DMRs), welche wiederum bestimmte Kontrolleinheiten (*imprinting control regions*, ICRs) beinhalten. Das Methylierungsmuster dieser DNA Domänen, welche die Genexpression über große Distanzen im Genom steuern können, wird bereits in den Keimzellen etabliert und während der ganzen Entwicklung aufrechterhalten.^[18, 107, 108, 118, 140]

Wie wichtig diese epigenetische „Aufgabenverteilung“ zwischen paternalen und maternalen Genen ist, zeigt folgender Versuch: Experimentell wurden bei Säugern Embryonen erzeugt, die rein männlichen (androgenotischen) oder rein weiblichen (gynogenotischen) Ursprungs waren. Hierzu brachte man durch Transplantation entweder zwei weibliche (maternale) oder zwei männliche (paternale) Vorkerne in einer zuvor entkernten Oozyte zusammen. Die Embryonalentwicklung war somit jeweils nur von der Erbinformation eines Geschlechtes abhängig. In beiden Fällen waren die Embryonen aber nicht überlebensfähig, obwohl das weibliche und das männliche Genom dieselbe genetische Ausstattung besaßen. Der Grund hierfür war das fehlende *imprinting*: Bestimmte Gene *müssen*, je nach ihrer parentalen Herkunft, einen unterschiedlichen Expressionsstatus aufweisen, damit sich der Organismus normal entwickeln kann.^[53]

3.3.3.4 Rolle der DNA Methylierung während der embryonalen Entwicklung

Einige der beschriebenen Prozesse spielen auch und gerade im frühen Entwicklungsstadium eines Organismus eine grundlegende Rolle.^[33, 107, 141] Innerhalb

des Lebenszyklus von Säugetieren gibt es dabei zwei Phasen sogenannter epigenetischer Reprogrammierung, bei der Histonmodifikationen und Methylierungsmarkierungen zunächst „gelöscht“ und anschließend neu etabliert werden: Während der Gametogenese und während der frühen Embryonalentwicklung. Die ersten tiefgreifenden Änderungen des DNA Methylierungsmusters finden schon während der Keimzellentwicklung statt.^[107, 142] Während die primordialen Keimzellen reifen, wird das Erbgut zunächst weitgehend demethyliert, die genomisch geprägten Regionen miteingeschlossen. Im weiteren Verlauf der Gametogenese findet dann eine erste *de novo* Methylierung statt, die auch die genomisch geprägten Bereiche neu etabliert (*genomic imprinting*; Schema 3.9).^[18] Für diese *de novo* Methylierung während der Keimzellentwicklung ist zu weiten Teilen DNMT3a im Verbund mit dem ihm paralogen, enzymatisch inaktiven Protein DNMT3L verantwortlich.^[108, 118]



Schema 3.9: Epigenetische Reprogrammierung während der Keimzellentwicklung (Gametogenese). In den primordialen Keimzellen (PKZ) findet etwa am Tag E11.5 der embryonalen Entwicklung von Mäusen eine Demethylierung der DNA statt, bei der die elterlichen *imprintings* entfernt werden.^[143, 144] Während der Weiterentwicklung zu den Eizellen bzw. den Spermien werden die epigenetischen Markierungen dann neu etabliert, wobei bei der Spermatogenese die Periode zwischen Leptotän und Pachytän im Zuge der Meiose eine besondere Rolle zu spielen scheint.^[18, 118, 142, 145, 146] HDACs = Histondeacetylasen.

Kurz nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zu einer zweiten Demethylierungswelle. Hierbei wird das paternale Genom sehr schnell und offensichtlich aktiv demethyliert, während die Demethylierung des maternalen passiv (d. h. replikations-abhängig) verläuft und die genomisch geprägten Regionen in diesem Fall ausschließt.^[142] Etwa zum Zeitpunkt des Einnistens der befruchteten Eizelle in die Uteruswand findet dann eine erneute, unspezifische *de novo*

Methylierung eines Großteils der CpG-Folgen statt. Die X-Chromosom Inaktivierung wird dabei maßgeblich von DNMT1 übernommen.^[38-40] Anschließend setzt eine Feinregulation ein: Zuerst werden die CpG-Inseln in den Promotoren von Haushaltsgenen erneut demethyliert. Hierbei handelt es sich um Gene, die für grundlegende Prozesse in den meisten Zelltypen bzw. Geweben - unabhängig von deren physiologischen oder Entwicklungsstatus - benötigt werden, und die deshalb in der Regel stark exprimiert vorliegen (z. B. Actin; GAPDH). Im Zuge der Differenzierung werden dann die Gene, die zelltypspezifisch zur Expression kommen sollen, durch Demethylierung aktiviert. Einmal festgelegt, bleibt das Methylierungsmuster über die Lebensspanne eines Organismus weitgehend erhalten.^[1, 36, 37, 40, 107, 142, 147-149] Funktionierende DNA Methylierungs-Mechanismen sind für die gesunde embryonale Entwicklung von elementarer Bedeutung.^[150] Beispielsweise sterben transgene *Dnmt1*^{-/-} Mäuse bereits im Embryonenstadium^[36, 150] und Mäuse ohne DNMT3a Aktivität wenige Wochen nach der Geburt.^[105] Es ist dabei bemerkenswert, dass die DNA Methylierung bzw. die Methyltransferasen für *undifferenzierte* embryonale Stammzellen von Mäusen *nicht* überlebenswichtig zu sein scheinen. Erst im Zuge der Differenzierung kann eine erhöhte Letalitätsrate der Embryonen beobachtet werden.^[39]

Einen detaillierten Überblick über die Veränderungen des globalen genomischen Methylierungsgrads während der frühen Entwicklung am Beispiel der Embryogenese von Mäusezellen gibt Abbildung 3.9.

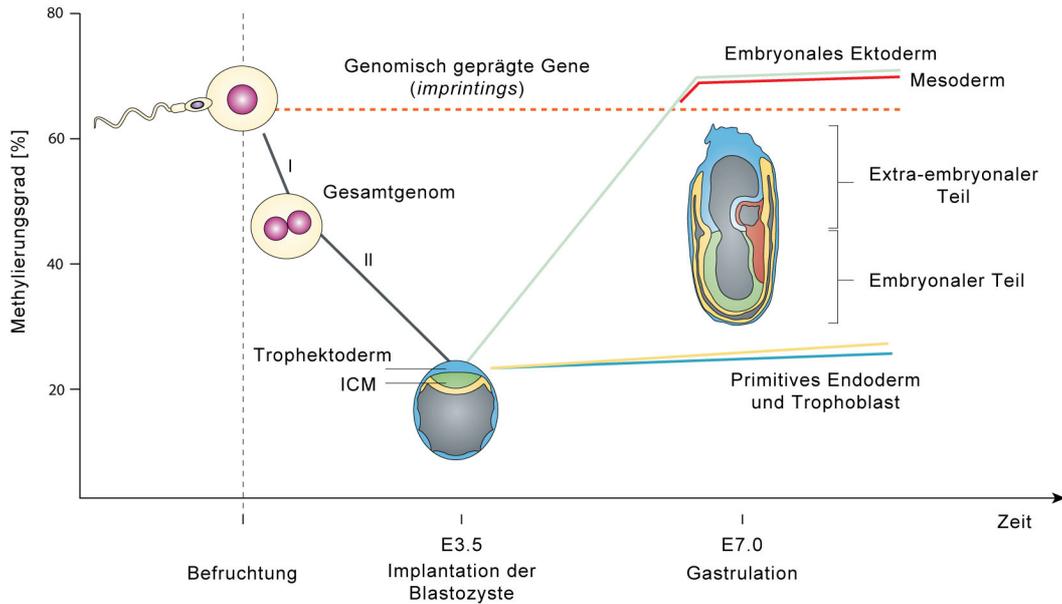


Abbildung 3.9: Änderung der DNA Methylierung während der Embryogenese von Mäusezellen. Nach der Befruchtung wird der Großteil des Genoms in einer ersten Phase (I) aktiv und in einer zweiten passiv (II) demethyliert. Die genomisch geprägten Bereiche (*imprintings*) bleiben hiervon unbehelligt (waagrechte gestrichelte Linie). Am Tag E3.5 erreicht der globale Methylierungsgrad des Blastozysten ein Minimum. Nach der Implantation kommt es zu einer erneuten Etablierung der Methylierungsmuster, und zwar abhängig von der Art des embryonalen Gewebes. *Blau* = Trophektoderm, *gelb* = primitives Endoderm, *grün* = innere Zellmasse (ICM) bzw. jeweils davon abgeleitetes Gewebe.^[18, 142, 148, 151-153]

Sehr gute Übersichtsartikel zur Rolle der epigenetischen Reprogrammierung während Gametogenese und Embryogenese finden sich u. a. bei *Reik*^[37] und *Li*.^[18]

3.3.3.5 Stammzellen und Zelldifferenzierung

Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, im Rahmen einer asymmetrischen Zellteilung Tochterzellen zu generieren, die entweder auch Stammzelleigenschaften besitzen oder aber zu gewebespezifischen Zellsorten ausdifferenzieren. Das größte Differenzierungspotenzial zeigen embryonische Stammzellen (ESZ), die sich theoretisch zu jedem Zelltyp des adulten Organismus entwickeln können und deshalb als pluripotent bezeichnet werden. Weiterhin gibt es adulte Stammzellen, also undifferenzierte Zellen, die in einem ansonsten differenzierten Gewebe oder Organ vorkommen. Sie erneuern sich im Körper ein Leben lang, wobei sie einerseits identische Kopien ihrer selbst produzieren, andererseits sich in spezialisierte Zellen des jeweiligen Gewebes differenzieren können (z. B. entwickeln sich hämatopoetische Stammzellen zu Blutzellen).^[53] Die Fähigkeit der Stammzellen zu Pluripotenz und Selbsterneuerung gründet in erster Linie auf der genau abgestimmten Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter Gene

und ist Bestandteil intensiver Forschung.^[154-157] Auch hier spielt die epigenetische Kontrolle der Genexpression - vermittelt beispielsweise durch die *Polycomb group* (PcG) Proteine - eine grundlegende Rolle. Stammzellen zeichnen sich deshalb ebenfalls durch spezifische Histonmodifikationen und DNA Methylierungsmuster aus.^[11, 158] Ein besonderes Merkmal sind dabei die sogenannten bivalenten Chromatinprofile in embryonischen Stammzellen. Hierbei tragen die Promotoren einiger nicht-transkribierter Gene „widersprüchliche“ Histonmodifikationen: So liegen in einem DNA Abschnitt beispielsweise H3K9ac oder H3K4me, die normalerweise beide mit einem aktiven Chromatinstatus assoziiert werden, und H3K27me, ein Kennzeichen inaktiven Chromatins, gleichzeitig vor. Die betroffenen Gene nehmen durch diese ungewöhnliche Kombination gewissermaßen eine Wartestellung ein („*Poised*“ Genes) und können im Zuge der Differenzierung der Zelle durch geringe Änderungen zelltypspezifisch aktiviert werden (Abbildung 3.10).^[11] Über Methyl-CpG bindende Proteine, die PcG Proteine und die mit ihnen assoziierten Mechanismen ist auch die DNA Methylierung in diese Prozesse involviert, doch liegen die genauen Zusammenhänge noch weitgehend im Dunkeln (siehe Kapitel 3.3.3.2).^[11, 35, 159, 160] In Übereinstimmung mit diesen Annahmen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet, dass modifizierte Nukleoside, welche die DNA Methylierung inhibieren (z. B. 5-Aza-Cytidin; siehe unten), einen Einfluss auf die Zell-Differenzierung zeigen.^[160-167]

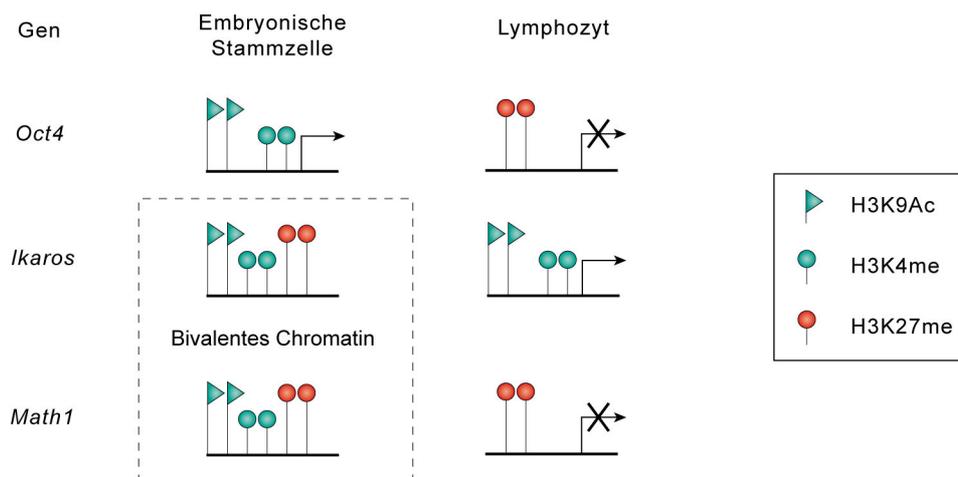
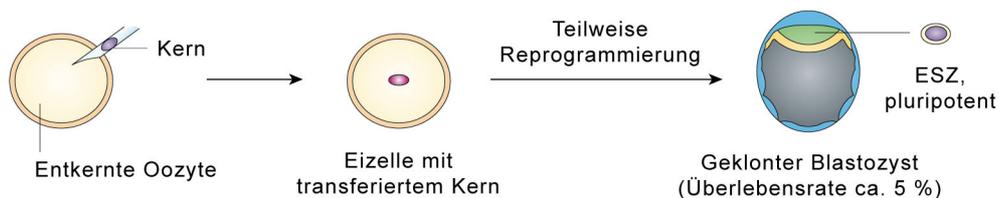


Abbildung 3.10: Bivalente Chromatinprofile in embryonischen Stammzellen (ESZ). Gezeigt ist die unterschiedliche Expression dreier regulatorischer Gene in der undifferenzierten ESZ und dem ausdifferenzierten Lymphozyt. Die Promotorregionen von Genen wie *Ikaros* oder *Math1* zeigen in der ESZ Histonmodifikationen, die normalerweise ausschließlich mit einem aktiven bzw. inaktiven Chromatinstatus assoziiert werden (H3K9Ac und H3K4me bzw. H3K27me).^[11]

Die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen zu therapeutischen wie wissenschaftlichen Zwecken ruft in weiten Teilen der Gesellschaft schwerwiegende ethische Bedenken hervor, weshalb große Anstrengungen unternommen werden, ESZ durch die Rückdifferenzierung somatischer Zellen zu gewinnen. Transferiert man einen somatischen Zellkern aus adultem Gewebe in eine entkernte Oozyte, kann deren Zytoplasma den Kern reprogrammieren und so eine normale embryonale Entwicklung ermöglichen - das heißt, die mit einem differenzierten Status assoziierten epigenetischen Muster sind grundsätzlich als reversibel anzusehen (Schema 3.10). Ein großes Problem ist hierbei jedoch die offensichtlich unvollständige Reprogrammierung der auf diese Weise erhaltenen Zellen, weshalb der weitaus größte Teil der Embryos entweder schon kurz nach der Implantation stirbt oder aber schwerwiegende Entwicklungsstörungen davonträgt.^[18, 53, 168-170] Ein Grund hierfür könnten Fehler in den fein abgestimmten DNA Methylierungsmechanismen sein. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass in geklonten Rinder-Embryos die genom-weite Demethylierung vor der Implantation der befruchteten Eizelle in den Uterus nur unvollständig abläuft. Die *de novo* Methylierung hingegen läuft in den geklonten Embryos früher ab als in nicht-geklonten.^[171-174]

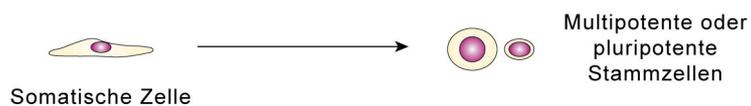
a Klonen (*somatic cell nuclear transfer*)



b Zellfusion



c *In vitro* Reprogrammierung



Schema 3.10: Möglichkeiten der Reprogrammierung von somatischen Kernen. Erfolgreiche *in vitro* Methoden würden es erlauben, die epigenetischen Markierungen von somatischen Zellen vollständig zurückzusetzen und somit das aufwändige und problembehaftete Klonen zu umgehen.^[18, 53, 169]

Eine weitere Möglichkeit der Reprogrammierung des Zellkerns, besteht in der Fusion von somatischen Zellen mit embryonischen Stammzellen. Doch auch in diesem Fall läuft die Dedifferenzierung nur unvollständig ab, und das Ergebnis sind allenfalls multipotente Zellen mit eingeschränktem Differenzierungspotenzial.^[175] Das direkte Klonen von ESZ selbst eignet sich ebenso wenig zum Klonieren von Organismen: Hier kommt es zu einer massiven Störung der Transkription, und nur 3 - 5 % der Embryos können überleben.^[53] Ein ernstes Problem stellen weiterhin die immunologischen Abwehrreaktionen bei der Transplantation körperfremder Stammzellen dar. Hier wird nun versucht, die epigenetische Programmierung des Kerns durch chemische, biochemische oder molekularbiologische Methoden zu manipulieren.^[158, 167, 176] Dies würde es ermöglichen, körpereigene Stammzellen zu therapeutischen Zwecken *in vitro* zu klonen, zu züchten und zu transplantieren. Die geklonten Zellen sollten dann eine erheblich schwächere Immunantwort hervorrufen, als die körperfremden. Diesem Ziel kam man vor kurzem einen Schritt näher, indem durch retrovirale Transduktion verschiedener Transkriptionsfaktoren sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) hergestellt wurden.^[158, 176-178]

3.3.4 Demethylierung der DNA

Angesichts der Beobachtung, dass im Verlaufe der embryonalen Entwicklung bereits etablierte Methylierungsmuster wieder aufgehoben werden, die Methylierung der DNA also - zumindest in einem gewissen Rahmen - reversibel sein muss, stellt sich unweigerlich die Frage nach dem Wie der Demethylierung. Weithin wird eine passive Demethylierung angenommen, d. h. eine unterbleibende Re-Methylierung nach der Replikation.^[36] Dennoch gibt es experimentelle Hinweise auf eine aktive, von der Replikation unabhängige Umkehrung der Methylierung: Mayer et al. beobachteten beispielsweise einen ausgeprägten Rückgang methylierter DNA im paternalen Genom von Mauszygoten kurz nach der Befruchtung, noch *vor* dem Beginn der Zellteilung.^[142] Des Weiteren konnte Surani zeigen, dass bei der Fusion von weitgehend demethylierten primordialen Keimzellen mit somatischen Zellen eine massive Demethylierung der somatischen DNA stattfindet.^[179] Außerdem stellte Jost auch bei inhibierter Replikation eine unveränderte genom-weite Demethylierung in Mäuse-Myoblasten fest (hierbei war offensichtlich 5-Methylcytosin-Glykosylase, 5-MCDG, an der Entfernung der Methylierungs-Markierung beteiligt),^[180] und Barreto

wies die Beteiligung des in die DNA Reparatur involvierten Enzyms Gadd45a nach.^[181] Darüber hinaus legt das Ausmaß des Rückgangs an methylierten Cytosinresten schon aus zeitlichen Gründen einen aktiven, von der langsamen DNA Replikation unabhängigen Demethylierungsmechanismus nahe.^[33] Die zugrundeliegenden molekularbiologischen Prozesse sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die Existenz einer DNA Demethylase konnte bislang nicht nachgewiesen werden.^[36] Teilweise wurde eine Demethylierung über einen *base excision repair*-ähnlichen Mechanismus beobachtet, wobei die methylierte Pyrimidinbase vollständig entfernt und durch Cytosin ersetzt wurde.^[182-185] Das direkte Entfernen der Methylgruppe vom Cytosinring durch Lösen der C-C-Bindung sollte aus energetischen Gründen hingegen nur schwer möglich sein, und dennoch gibt es Untersuchungen, die diesen Reaktionsweg nahe legen.^[179, 186] Ein Übersichtsartikel zu den vergleichsweise gut untersuchten Methylierungs- bzw. Demethylierungsmechanismen in Pflanzen findet sich bei Chan.^[187]

3.3.5 Detektion von 5-Me-dC und Analyse von DNA Methylierungsmustern

Angesichts der nicht zu überschätzenden Bedeutung der DNA Methylierung stellt sich die Frage der präzisen Analyse der methylierungssensitiven Sequenzen der genomischen DNA. Inzwischen gibt es zahlreiche Methoden, die es ermöglichen, sowohl globale als auch lokale genomische Methylierungsmuster aufzuklären und somit Methylierungsprofile zu erstellen (z. B. methylierungs-spezifische PCR,^[188] COBRA,^[189] LUMA,^[190, 191] MethyLight,^[192] oder Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)^[193]).^[194-209] Die meisten Assays beruhen dabei auf der sogenannten Bisulfit Methode, bei der die unmethylierten Cytosinreste chemisch in Uracil überführt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben. Bei der anschließenden PCR wird U als T, 5-Me-dC jedoch als C erkannt und entsprechend amplifiziert. Auf diese Weise kann nach der PCR auf das Methylierungsmuster rückgeschlossen werden; bei einer Amplifikation der unbehandelten DNA wäre diese Information verlorengegangen. Obwohl die Bisulfit Methode schon vergleichsweise lange bekannt ist, hat sie einige schwerwiegende Nachteile, die bisher nicht beseitigt werden konnten (z. B. hoher Verlust und starke Schädigung der DNA bei der Bisulfit Reaktion, sowie unvollständige Konvertierung

von dC zu dU). Hierauf soll im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden. Auskunft zu dieser Problematik geben zahlreiche Publikationen.^[210-218]

Ein sehr guter Überblick über die bekannten Methoden zur Analyse von DNA Methylierungsmustern mit umfassenden Literaturangaben findet sich bei *Laird*.^[219]

3.4 Epigenetik und Krankheitsentstehung

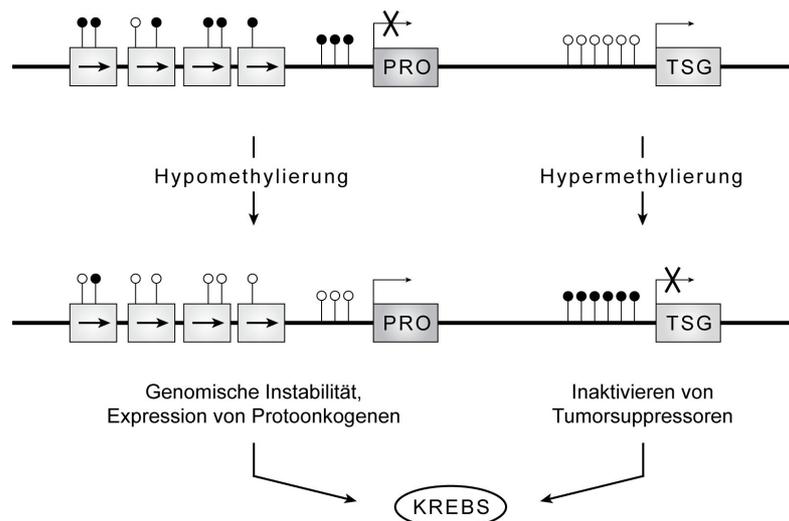
Epigenetische Mechanismen übernehmen entscheidende Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen.^[33] Somit kommt ihnen eine große Verantwortung für die gesunde Entwicklung eines Organismus zu: Störungen der Transkriptionskontrolle, der Chromatinstruktur, der X-Chromosominaktivierung oder der genomischen Prägung müssen zwangsläufig gravierende Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit sowohl der einzelnen Zelle, wie auch des gesamten Zellverbandes haben. In Übereinstimmung mit diesen Annahmen stieg in den letzten Jahren die Zahl der Krankheiten, die in einem direktem Zusammenhang mit fehlerhaften epigenetischen Markierungen im Allgemeinen, und anomalen Methylierungsmustern im Besonderen, zu stehen scheinen. Hierzu zählen so unterschiedliche Erkrankungen wie *Rett*-, *Beckwith-Wiedemann*- (BWS), Fragiles-X- und ICF-Syndrom (ICF = Immundefekt, Centromer-Instabilität und faciale Dysmorphien). Insbesondere spielen epigenetische Fehlentwicklungen aber bei der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle.^[10, 18, 47, 55, 56, 220-224]

Die zentrale Bedeutung epigenetischer Fragestellungen für die menschliche Gesundheit hat mittlerweile dazu geführt, dass neben dem Genom und dem Proteom nunmehr verstärkte Anstrengungen zur Erforschung des *Epigenoms* unternommen werden. Nachdem in den vergangenen Jahren viele Einzelerkenntnisse über stillgelegte Gene, veränderte Chromatinstrukturen etc. publiziert wurden, sollen diese nun in ihren Gesamtzusammenhang eingeordnet, systematisch erweitert und katalogisiert werden. Die genomweite Kartierung der Histonmodifikationen und DNA Methylierungsmuster (des *Methyloms*) soll langfristig nicht nur die Therapie, sondern auch die frühzeitige Prognose epigenetisch begründeter Krankheiten ermöglichen. Um dieses umfangreiche Projekt zu koordinieren, wurden bereits mehrere internationale Projekte ins Leben gerufen.^[15, 225-228]

3.4.1 Epigenetik und Krebs

Aus Sicht der klassischen Krebsforschung werden Mutationen der DNA Basen für die Entartung von Zellen verantwortlich gemacht, also Defekte im genetischen Code. Im Laufe der letzten Jahre wurde die Bedeutung *epigenetischer* Mechanismen für die Kanzerogenese jedoch immer deutlicher.^[10, 57, 200, 220-222, 229] Sehr gute Übersichtsartikel zu diesem komplexen Thema finden sich unter anderem bei Szyf,^[26] Robertson,^[31, 56] Esteller^[15] und Yoo.^[8]

Krebszellen zeigen fundamentale Störungen in ihrem DNA Methylierungsmuster, wobei zwei scheinbar gegenläufige Beobachtungen gemacht werden können: Zum einen sinkt der Gesamtgehalt an 5-Methyl-Cytosin in der genomischen DNA, d. h. es kommt zu einer globalen Demethylierung oder *Hypomethylierung*. Zum anderen werden, vor allem in den Promotorregionen von Genen, massiv CpG Einheiten methyliert, die in gesunden Zellen unmethyliert vorliegen. Lokal kann man also eine *Hypermethylierung* der DNA feststellen.^[15, 230] Beide Phänomene tragen zum Verlust der Kontrolle über den Zellzyklus, und damit über Wachstum und Apoptose, bei (siehe Schema 3.11).^[36, 56] Teilweise wurde bereits versucht, Tumorarten spezifische Störungen im Methylierungsmuster zuzuweisen und diese über einen sogenannten *CpG island methylator phenotype* (CIMP) zu klassifizieren.^[55, 231, 232]



Schema 3.11: Die zwei großen Störungen des genomischen Methylierungsmusters in Tumorzellen: die globale *Hypomethylierung* v.a. von repetitiven Elementen bei gleichzeitiger lokaler *Hypermethylierung* von CpG Inseln in Genpromotoren. PRO = Protoonkogene; TSG = Tumorsuppressorgene; Kästen mit Pfeilen: Repetitive DNA Sequenzen; schwarze Kreise: 5-Me-dC; weiße Kreise: unmethyliertes dC.

Im Folgenden sollen die fehlerhaften epigenetischen Prozesse und Muster in Tumorzellen näher erläutert werden.

1. *Hypomethylierung.* Der Zusammenhang zwischen DNA Methylierung und Krebsentstehung wurde spätestens 1983 offenkundig, als erst *Feinberg* und *Vogelstein*,^[233] anschließend *Ehrlich* et al.^[234] einen anomal niedrigen 5-Me-dC Gehalt von DNA aus humanem Tumorgewebe nachwiesen. Dieser Verlust von Methylierungsmarkierungen ist in vielen Krebsarten verbreitet und hat verschiedene mechanistische Auswirkungen.^[56] Hypomethylierte Sequenzen findet man vor allem in hoch wie auch moderat repetitiven Bereichen des Genoms, was in einer für Krebszellen typischen chromosomalen Instabilität resultiert.^[42, 235, 236] Die Aktivierung von Retrotransposons wie Alu oder LINE-1 durch Demethylierung kann beispielsweise deren Transposition bewirken oder zur fehlerhaften Genregulation durch transkriptionelle Interferenz beitragen.^[236, 237] Betroffen ist auch Satelliten DNA wie Sat2 und Sat α Sequenzen, die etwa in Eierstock- sowie Wilms-Tumoren stark hypomethyliert vorliegen.^[236, 238] Darüber hinaus kann es auch zu genspezifischen Effekten wie der Aktivierung von Onkogenen kommen: so wurde in Lungen- und Darmkarzinomen ein inverser Zusammenhang zwischen globalem Methylierungsgrad und der Genexpression des *k-ras* Protoonkogens gefunden.^[36] Die Hypomethylierung der DNA findet zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Onkogenese statt und korreliert unmittelbar mit der Ernsthaftigkeit und dem metastatischen Potenzial der Erkrankung.^[90]

2. *Hypermethylierung.* Der zweite große Defekt des Methylierungsmusters in Tumorzellen ist die massive Hypermethylierung von CpG-reichen Sequenzen in Genpromotoren, welche in der gesunden Zelle in der Regel unmethyliert vorliegen.^[230] Durch die mit der DNA Methylierung verbundenen Repressionsmechanismen kommt es so zur fehlerhaften Deaktivierung von Genen, die etwa in die Zellzykluskontrolle, DNA Reparatur, Chromatinrestrukturierung oder die Transkription eingebunden und damit eng mit den Ursachen der Tumorgenese selbst verknüpft sind.^[56] Auch die DNA Hypermethylierung ist bereits in sehr frühen Vorläufer-Läsionen zu finden und damit definitiv eine Ursache und nicht nur Folge der pathologischen Transformationen.^[239] Ein sehr gut untersuchtes Tumorsuppressorgen, das durch Methylierung inaktiviert wird, ist *CDKN2A*. Es

codiert für das Protein p16 (auch bekannt als *major tumor suppressor*, MTS-1, oder *inhibitor for cyclin dependent kinase 4a*, INK4a), einen wichtigen Zellzyklusregulator, der über cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb) kontrolliert.^[36] Bei Abwesenheit von p16 ermöglicht phosphoryliertes Rb durch Freigabe des Transkriptionsfaktors E2F den Übergang von der G1- in die S-Phase und somit ein Fortschreiten des Zellzyklus. Verliert *p16* seine Funktionalität, erleichtert dies eine unkontrollierte Zellproliferation.^[41, 85, 240, 241] Otterson zeigte nun in einer Studie, dass in zwölf untersuchten Lungenkrebs Zelllinien, welche keine Deletion oder Mutation des *Rb* oder *CDKN2A* Gens aufwiesen, das Exon 1 von *CDKN2A* methyliert war.^[242] Zudem kann das *Rb*-Gen durch Promotormethylierung direkt stillgelegt werden.^[243]

Die Zahl der bekannten durch Hypermethylierung inaktivierten Gene in Krebszellen wächst stetig.^[15, 220, 244-250] Eine Auswahl ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.^[56]

Tabelle 3.1: Auswahl durch Hypermethylierung deaktivierter Gene in Tumorzellen.

Funktion	Gen	Betroffene Organe
Zellzyklus-Kontrolle	<i>Rb1</i> <i>CDKN2A</i>	Netzhaut Darm, Lunge u.v.a.m.
Metastasierung	<i>CDH1</i> <i>CDH13</i> <i>TIMP3</i> <i>VHL</i>	Brust, Leber, Blut, Magen Lunge, Eierstöcke, Pankreas Gehirn Niere
DNA Reparatur	<i>MLH1</i> <i>MGMT</i> <i>BRCA1</i> <i>GSTP1</i>	Darm, Magen Gehirn, Darm, Lunge, Brust Brust, Eierstöcke Prostata, Leber, Brust, Niere u.a.
Transkription	<i>ESR1</i>	Darm, Brust, Lunge, Blut
Apoptose	<i>DAPK1</i>	Lymphsystem

Ausmaß und Muster der DNA Hyper- und Hypomethylierung scheinen jeweils vom Zell- bzw. Krankheitstyp abhängig und im gewissen Maße spezifisch zu sein, zwischen ihnen besteht aber offensichtlich kein direkter Zusammenhang.^[251, 252]

3. *Onkogene C→T Mutationen.* Nicht zuletzt kann die Methylierung der DNA zum Auftreten von Punktmutationen im genetischen Code und damit zu einer klassischen Ursache der Krebsentstehung beitragen. Wie bereits erwähnt, führt die verstärkte Deaminierung von 5-Me-dC zu C→T Punktmutation, da die zunächst entstandenen

G:T *mismatches* nur sehr langsam repariert werden (CpG Inseln als „Mutations-hotspots“, siehe Abschnitt 3.3.1).^[53] Wie solche Ereignisse zur Tumorentstehung führen können, zeigt das Tumorsuppressorgen *p53*: Mehr als 50 % humaner solider Tumore zeigt Mutationen der *p53* Sequenz, wovon wiederum etwa 24% auf C→T Mutationen in CpG-Dinukleotiden entfallen.^[253] Gleichwohl kann *p53* auch ausschließlich durch eine fehlerhafte CpG-Methylierung der Promotorregion stillgelegt werden.^[244]

4. *Loss of imprinting (LOI)*. Die DNA Methylierung ist außerdem über das Phänomen des Verlusts der genomischen Prägung (*loss of imprinting*, LOI) mit der Krebsentstehung sowie einer Anzahl weiterer Krankheiten verknüpft. Unter *loss of imprinting* versteht man die fehlerhafte Änderung prägender Markierungen durch eine Zu- oder Abnahme der DNA Methylierung in den entsprechenden Sequenzen, resultierend im Verlust der allel-spezifischen Genexpression (siehe hierzu auch Kapitel 3.3.3.3.^[139] Beispiele für gut untersuchte Gene, die diesen Prozessen unterliegen und mit menschlichen Krankheiten in Verbindung stehen - in diesem Fall mit dem *Beckwith-Wiedemann-Syndrom* sowie mit *Wilms Tumoren* - sind *H19* und *Igf2*. Die Allele dieser Gene sind bei gesunden Menschen je ausschließlich maternal bzw. paternal aktiv. Beide Gene werden pro Allel von einem gemeinsamen *enhancer* kontrolliert (siehe Abbildung 3.11). Abhängig vom Methylierungsstatus des Kontrollelements ICR1 kann dieser *enhancer* auf die Promotoren zugreifen und die Genexpression initiieren. Durch die fehlerhafte *de novo* Methylierung von ICR1 kommt es nun zum Verlust des *imprintings* (LOI) von *Igf2*, wodurch der Chromatin Insulator CTCF^[254] am Binden gehindert wird und neben dem paternalen nun auch der maternale *enhancer* auf den *Igf2* Promotor zugreifen kann. Somit findet man in etwa 20 % der Patienten mit BWS bzw. in 70 % der Patienten mit *Wilms Tumor* eine fehlerhafte biallele Expression von *Igf2*.^[56]

Die an der Ausbildung von BWS beteiligten Mechanismen sind weitaus umfangreicher als hier dargestellt und können im Rahmen dieser Einführung nicht detaillierter diskutiert werden. Einen Eindruck von der Komplexität der beteiligten (epi-)genetischen Strukturen vermittelt Abbildung 3.11; der hier behandelte Abschnitt der BWS Region ist farblich hervorgehoben.

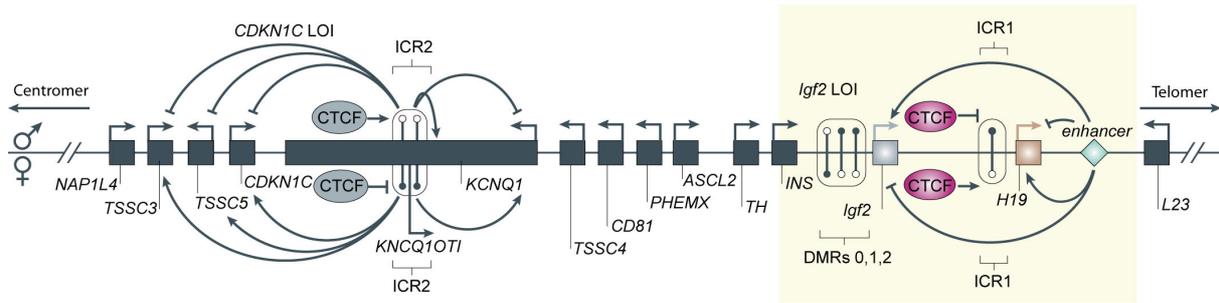


Abbildung 3.11: Ausschnitt aus der BWS Region des Chromosoms 11; dargestellt sind die Verhältnisse beim gesunden Menschen. Der Abschnitt, in dem es zum LOI von *Igf2* kommt, ist hervorgehoben. Bei ausgebildetem *Beckwith-Wiedemann* Syndrom kann aufgrund fehlerhafter *de novo* Methylierung von ICR1 auch der maternale *H19/Igf2 enhancer* auf den *Igf2* Promotor zugreifen. ICR = *imprinting control region*; DMR = *differentially methylated region*; LOI = *loss of imprinting*.^[56]

3.4.2 Ursache der fehlerhaften Methylierungsmuster

Wie es zu den pathologischen Veränderungen der epigenetischen Muster kommt, ist noch weitgehend ungeklärt. Was die fehlerhafte Hypermethylierung angeht, so scheint diese Störung jedenfalls nicht oder nicht nur auf einer erhöhten DNMT Expression zu beruhen.^[252] Sowers und Mitarbeiter haben hierzu mehrere Arbeiten veröffentlicht, die eine Beteiligung von geschädigter DNA nahelegen. Hierzu zeigen sie zwei mögliche Wege auf: Zum einen können oxidative Schäden innerhalb einer CpG Sequenz, wie 8-Oxo-dG oder 5-Hydroxymethyl-dC, Methyl-CpG-bindende Proteine (MBP) am Binden hindern und so die mit ihnen verbundenen epigenetischen Prozesse unterbrechen.^[255] Den gegenteiligen Effekt zeigen 5-Chlor- oder 5-Brom-dC, Cytidin-Derivate, die in Verbindung mit Entzündungen auftreten - sie imitieren 5-Methyl-dC und führen so zu einer *erhöhten* Affinität zu den MBP Proteinen.^[256] Zum zweiten können derartige Nukleosid-Modifikationen aber auch direkt mit DNMT1 wechselwirken und Einfluss auf das Methylierungsmuster nehmen. Demnach werden die 5-halogenierten dC-Derivate von der Methyltransferase als 5-Methyl-dC erkannt und können so während der Replikation zu neuen d(C^{Me}pG) Einheiten führen. Entsteht umgekehrt durch oxidativen Einfluss aus dem 5-Methyl-dC eines methylierten CpG Dinukleotids die 5-Hydroxymethyl-Verbindung, geht die Methylierung an dieser Stelle im Verlauf folgender Replikationen verloren, da DNMT1 diese Modifikation ignoriert.^[257]

3.5 Methyltransferaseinhibitoren

Die entscheidende Rolle, welche die DNA Methylierung bei der Krebsentstehung und vielen weiteren menschlichen Krankheiten spielt, machen sie zu einem attraktiven Ziel für therapeutische Interventionen. Bei den bisher unternommenen Versuchen, fehlerhafte Methylierungsmuster zu korrigieren, lag das Hauptaugenmerk auf der Hypermethylierung, und durch verschiedene Ansätze konnten die Methyltransferase(n) gehemmt und inaktivierte Tumorsuppressorgene re-exprimiert werden.^[15, 41, 47, 220-222, 242, 247, 258-265] Hierbei kamen bisher in erster Linie Nukleosidinhibitoren erfolgreich zur Anwendung, fast ausschließlich Derivate der Zielbase 2'-Desoxycytidin (dC).^[8, 41, 47, 258, 266-269] Nicht-nukleosidische kleine Moleküle wie (-)-Epigallocatechin-3-gallat, Koffeinsäure oder Procainamid sind bislang kaum erwähnenswert und in ihrer Wirkung weit entfernt von den hochpotenten dC-Analoga.^[270-276] Ein guter Übersichtsartikel zu den bislang bekannten Methyltransferase-Inhibitoren findet sich bei Yoo.^[8]

Weiterhin wurde die Expression von DNMT1 mit Hilfe von siRNA^[113, 277, 278] und Antisense-Oligonukleotiden,^[279-282] sowie durch diverse gentechnische Eingriffe (homologe Rekombination,^[114] induzierbarer *knockout*^[283]) inhibiert.

Die beiden wichtigsten cytidin-analogen Inhibitoren wurden schon 1964 Sorm und Mitarbeitern synthetisiert: Zunächst wurde die Ribo-Verbindung 5-Azacytidin (5-Aza-C, **4**) hergestellt, gefolgt von der entsprechenden 2'-desoxygenierten und noch weitaus wirkungsvolleren Verbindung 2'-Desoxy-5-azacytidin (Decitabin, 5-Aza-dC, **5**).^[164, 261, 266, 269, 284-293] Bis heute stellt 5-Aza-dC das bei weitem effektivste Mittel für die DNA Demethylierung und die Inhibierung von DNA Methyltransferasen dar (Abbildung 3.12). Zu den bekanntesten und am besten untersuchten inhibierenden Substanzen zählen weiterhin 1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon (Zebularin, **6**)^[32, 260, 294-297] sowie 2'-Desoxy-5-fluorocytidin (5-Fluoro-dC, **7**).^[92, 100, 298, 299]

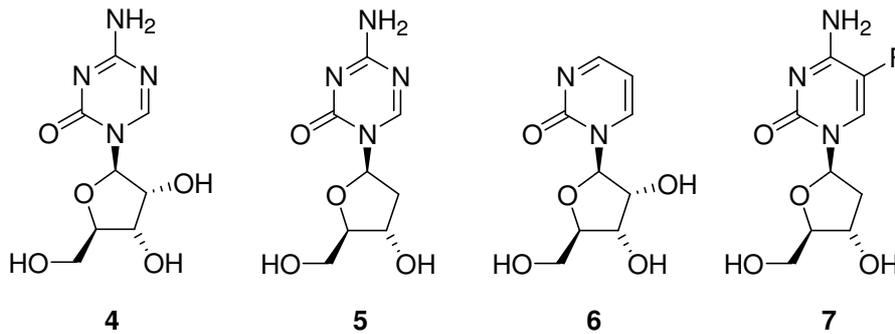


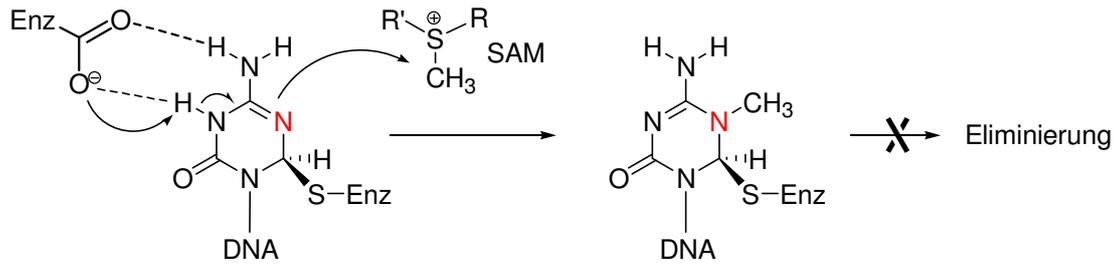
Abbildung 3.12: Die vier bekanntesten Nucleosidinhibitoren für DNA Methyltransferasen: 5-Azacytidin (**4**), 2'-Desoxy-5-azacytidin (Decitabin, **5**), 1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon (Zebularin, **6**), 2'-Desoxy-5-fluorocytidin (5-Fluoro-dC, **7**).

3.5.1 Wirkungsmechanismus der Nucleosidinhibitoren

Die Nucleoside werden nach der Aufnahme in die Zelle u. a. durch Desoxycytidin-Kinase zu den Mono-, Di- und Triphosphaten phosphoryliert und im Zuge der Replikation als dCTP Analoga in die genomische DNA integriert. Ribonucleoside wie 5-Azacytidin müssen allerdings zuvor auf der Diphosphatstufe durch Ribonucleotid-Reduktase am C2' desoxygeniert und somit in den entsprechenden DNA-Baustein überführt werden. Da sie aber grundsätzlich auch in RNA eingebaut werden können, ist ihre Wirksamkeit als Methyltransferase-Inhibitoren im Vergleich zu den 2'-Desoxy-Derivaten stark herabgesetzt.^[167, 290, 300, 301] Die in die genomische DNA integrierten Inhibitoren kommen nach dem Zufallsprinzip auch in CpG Einheiten, den Zielmotiven der Methylasen, zu liegen. Kommt es nun zu einer Methylierungsreaktion, kann die einmal gebildete kovalente Enzym-DNA Bindung nicht mehr gebrochen werden, da die Modifikation der Base die notwendige Eliminierung verhindert (Schema 3.12). Im Fall von 5-Aza-dC (**5**) oder 5-Fluoro-dC (**7**) fehlt schlichtweg das benötigte H-Atom in Position 5 (Schema 3.13).^[8, 65, 302] Der eigentliche Inhibierungsmechanismus von Zebularin (**6**), in dem am C5 noch beide H-Atome vorhanden sind, ist hingegen noch unklar.^[99]



Schema 3.12: Wirkungsweise der Nucleosidinhibitoren. Nach der Überführung in die 5'-Triphosphate werden die Nucleoside im Rahmen der Replikation in die genomische DNA eingebaut, u. a. auch innerhalb von CpG Einheiten. Hier wird die Methyltransferase während der Methylierungsreaktion kovalent und irreversibel gebunden. dC^NTP = 2'-Desoxy-5-azacytidin-5'-triphosphat.



Schema 3.13: Reaktionsmechanismus der Methylase-Inhibierung durch 5-Aza-dC. Aufgrund eines fehlenden H-Atoms in Position 5 kann keine Eliminierung mehr stattfinden und das Enzym nicht mehr freigesetzt werden. Enz = Enzym (Methyltransferase).

Das Enzym steht als Folge der kovalenten Bindung nicht mehr für weitere Methylierungsreaktionen zur Verfügung, und im Verlauf der folgenden Replikationszyklen nimmt der Methylierungsgrad der DNA kontinuierlich und signifikant ab (passive Demethylierung).^[47, 263, 302] Die resultierende Demethylierung von CpG Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen kann schließlich zu deren Reaktivierung und erneuter Expression führen.^[47, 247, 261] Beispielsweise wurde der in Kapitel 3.4.1 erwähnte Tumorsuppressor *p16* nach Decitabin-Behandlung wieder exprimiert, in Übereinstimmung mit einem erniedrigten Methylierungsgrad der genomischen DNA.^[242] Diese Beobachtung wurde bei einer Vielzahl weiterer, durch Hypermethylierung stillgelegter Gene gemacht.^[8, 41, 221, 258]

Die Reexpression inaktiver Gene durch demethylierende Substanzen geht auch mit Änderungen der assoziierten Histonmodifikationen einher, wobei die euchromatischen Strukturen aber offensichtlich nicht vollständig wiederhergestellt werden. *Baylin* beobachtete etwa bei der Reaktivierung des Gens *hMLH1* lediglich die Aufhebung der heterochromatin-typischen Markierungen H3K9me1 und H3K9me2, wohingegen H3K9me3 und H3K27me³ erhalten blieben, welche eigentlich ebenfalls für einen inaktiven Genstatus stehen.^[245]

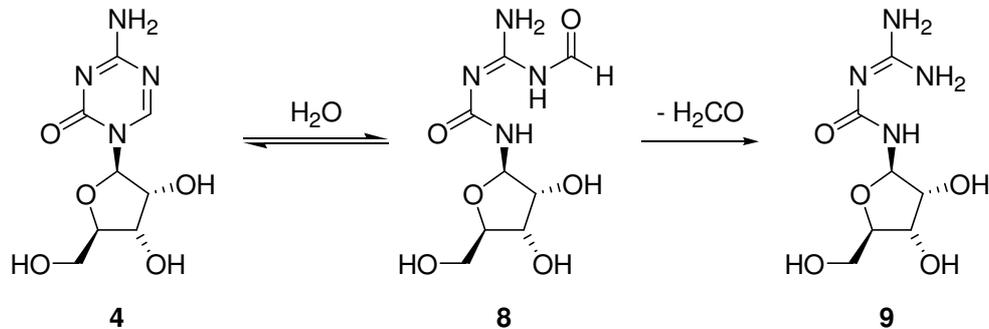
Die irreversible Bindung zwischen Methylase und Nukleosidinhibitor konnte auch zur Aufklärung des Methylierungsmechanismus beitragen. *Klimasauskas* integrierte hierzu 5-Fluoro-dC in einen synthetischen DNA Doppelstrang und kristallisierte ihn mit der bakteriellen Methylase M.HhaI. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnten das Herausdrehen der Base aus der DNA Helix sowie die kovalente Enzym-DNA Bindung während der Methylierungsreaktion belegt werden.^[92]

3.5.2 Eigenschaften und Anwendung der Nukleosidinhibitoren 4 und 5

Die Antitumoreigenschaften von 5-Aza-C wurden schon kurz nach der erstmaligen Synthese 1964 bemerkt, und bereits 1972 befand sich die Substanz in klinischen Studien der Phase II.^[303, 304] Der inhibierende Effekt auf die DNA Methylierung in Säugetierzellen wurde jedoch erst 1979/80 entdeckt.^[161, 167] 1993 konnte eine positive Wirkung bei der Behandlung des Myelodisplastischen Syndroms festgestellt werden, und 5-Aza-C kam nach der Zulassung durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 2004 schließlich unter dem Namen *Vidaza* in den Handel.^[289, 305-307] Das Nukleosid 5-Aza-dC wurde ebenfalls bereits in den 1970er Jahren in klinischen Studien verwendet, wobei seine demethylierende Wirkung die von 5-Aza-C um ein Vielfaches übertrifft. Für die Behandlung von soliden Tumoren scheint 5-Aza-dC, wie 5-Aza-C, nicht besonders geeignet zu sein, jedoch wurden positive Effekte bei Leukämie und anderen hämatologischen Neoplasien festgestellt.^[269, 290, 291, 293, 306, 308-314] 5-Aza-dC zeigte auch *in vivo* einen demethylierenden Effekt auf hypermethylierte Genpromotoren^[315] und befindet sich bereits in klinischen Studien der Phase III.^[8] Von den drei aktiven humanen Methyltransferasen adressiert 5-Aza-dC dabei fast ausschließlich die *maintenance methyltransferase* DNMT1.^[280] Ob und in welchem Ausmaß die *pharmakologische* Aktivität der beiden Substanzen jedoch tatsächlich auf ihre Wechselwirkung mit der DNA Methylierung und der epigenetisch kontrollierten Genrepression zurückgeführt werden kann, ist indes noch weitgehend unklar.^[269]

Als nachteilig erwiesen sich z. T. gravierende Nebenwirkungen der genannten Inhibitoren. So zeigen vor allem 5-Aza-C und 5-Aza-dC eine starke Zytotoxizität, die sicherlich nicht zuletzt auf der irreversiblen Bildung des kovalenten DNA^{5AzadC}-Enzym-Komplexes beruht; teilweise wurde auch eine gewisse Mutagenität beobachtet.^[302, 316-318] Des Weiteren werden beide Wirkstoffe durch Cytidin-Deaminase deaktiviert^[306] und zeigen eine geringe Stabilität in wässriger Lösung, was klinische Anwendungen erheblich erschwert.^[8, 259, 319, 320] Letzteres liegt in der starken Aktivierung der C6-Position des Heterocyclus - verglichen mit natürlichem Cytosin - gegen einen nukleophilen Angriff begründet. In den 5-Aza-Derivaten wird die Elektronendichte im Ring durch ein zusätzliches Stickstoffatom, in 5-Fluoro-dC durch den Fluor-Substituenten, erniedrigt, und im Zebularin fehlt der +M-Effekt der NH₂-Gruppe.^[99, 101] Die Aktivierung ist derart ausgeprägt, dass selbst Methylasen mit Serin- oder Threonin-Mutationen des katalytisch aktiven Cysteinrestes, die mit

unmodifizierten CpG Motiven nicht mehr reagieren können, hier über ihre OH-Gruppe noch kovalente Bindungen zur Base ausbilden.^[101, 321] Unter physiologischen Bedingungen kann es somit leicht zu einer Zersetzung durch nukleophilen Angriff von Wasser am C6 kommen. Schema 3.14 formuliert den postulierten Zersetzungsmechanismus für 5-Azacytidin.^[162, 259, 322]



Schema 3.14: Zersetzung von 5-Aza-C (4) durch Hydrolyse.

3.5.3 Grenzen der Behandlung mit Methyltransferaseinhibitoren

Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die Inhibierung der Methyltransferasen zu therapeutischen Zwecken und die dadurch erzwungene Demethylierung des Genoms eine gewisse Vorsicht erfordert.^[222] An früherer Stelle wurde bereits eingehend auf die Implikation der DNA Hypomethylierung in die Krebsentstehung hingewiesen. Der Einsatz von Methyltransferaseinhibitoren gleicht somit einem Balanceakt: Eine durch Demethylierung hervorgerufene chromosomale Instabilität kann einerseits bereits angeschlagene Tumorzellen zum endgültigen Kollaps führen, andererseits dürfen aber gleichzeitig gesunde Zellen nicht in Mitleidenschaft gezogen oder bestehende Defekte verschärft werden.^[235] Von einem demethylierenden Effekt der künstlichen Substanzen auf die CpG Sequenzen in Genpromotoren selbst sind nur wenig Komplikationen zu erwarten, da diese in gesunden Zellen ohnehin zum größten Teil unmethyliert vorliegen. Prinzipiell scheint eine künstlich hervorgerufene Demethylierung mehr für embryonische denn für adulte Gewebe von Relevanz zu sein. Im Rahmen der embryonalen Entwicklung kommt es zur gezielten Demethylierung bestimmter genomischer Regionen, Prozessen, die präzise reguliert werden, weitreichende Konsequenzen haben und durch Methyltransferaseinhibitoren dementsprechend stark beeinflusst werden könnten.^[260] Das Reaktivieren von durch

Methylierung inaktivierten X-Chromosomen könnte ebenfalls ein Problem darstellen, wurde jedoch noch nicht beobachtet.^[261]

Ein allgemeiner Nachteil der bisher bekannten Inhibitoren ist darüber hinaus die Reversibilität des demethylierten Status und eine früher oder später einsetzende Remethylierung nach Beendigung der Inhibitor-Behandlung.^[294, 323] In jüngerer Zeit werden DNMT-Inhibitoren zur Steigerung der Wirksamkeit deshalb vermehrt mit anderen Wirkstoffen wie Histondeacetylase- und Topoisomerase-Inhibitoren kombiniert.^[8, 47, 247, 292, 324-328]

3.6 Aufgabenstellung und Inhalt der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich entsprechend der ihr zugrunde liegenden Aufgabenstellung in zwei Teile. Im ersten Teil sollte unter Verwendung eines bereits bekannten Nukleosidinhibitors, 2'-Desoxy-5-azacytidin (5-Aza-dC), ein neues Instrument zur gezielten Inhibierung der humanen DNA Methyltransferase DNMT1 in lebenden Zellen entwickelt werden. Es galt hierbei, die oben genannten Nachteile bei der Verwendung des reinen Nukleosids, wie die hydrolytische Instabilität oder die kovalente Bindung des Enzyms an die genomische DNA, zu vermeiden und damit die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren oder sogar zu beseitigen. Der hierzu gewählte Ansatz, die Synthese von Inhibitoren in Form zirkularer, hantelförmiger DNA Konstrukte (DNA *dumbbells*), wird im ersten Teil der Arbeit beschrieben (Kapitel 4). Im zweiten Teil der Arbeit sollten außerdem neue, bislang unbekannte Nukleosidinhibitoren dargestellt und auf ihre physiologischen Effekte hin untersucht werden (Kapitel 5). Neben der Modifikation von 2'-Desoxycytidin erschien hier die Derivatisierung des DNMT1 Inhibitors 1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon (Zebularin, **6**) als vielversprechend. Zebularin zeigt eine verglichen mit 5-Aza-dC stark erhöhte Stabilität in wässriger Lösung und ist weit weniger zytotoxisch, was aber im Gegenzug mit einer massiven Erniedrigung der demethylierenden Wirkung einhergeht.^[260, 329] Deshalb sollte experimentell untersucht werden, ob sich der inhibierende Effekt unter Beibehaltung der Stabilität durch Modifikationen der Base steigern ließe.

4 Dumbbell Inhibitoren

4.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die C5-Methylierung von Cytosin in genomischer DNA durch DNA Methyltransferasen spielt eine zentrale Rolle bei der epigenetischen Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse.^[11, 18, 27-35, 37, 60] Störungen im DNA Methylierungsmuster sind unmittelbar mit der Entstehung einer Vielzahl von menschlichen Krankheiten verknüpft: so zeigen Tumorzellen neben einem insgesamt erniedrigten 5-Methylcytosin-Gehalt typischerweise die Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch verstärkte Methylierung der entsprechenden Promotorregionen.^[10, 15, 26, 55, 57, 200, 220, 230] Mit Hilfe von Methyltransferase-Inhibitoren wie 5-Aza-dC (Decitabin) ist es in einem gewissen Rahmen möglich, diese Fehlentwicklungen zumindest temporär zu stoppen und eine Demethylierung der DNA zu bewirken (siehe auch vorhergehendes Kapitel). Diese Möglichkeit der Einflussnahme auf die DNA Methylierung ist aus zweierlei Hinsicht von großer Bedeutung: Zum einen stellt sie einen Einstieg in die Therapie epigenetisch begründeter Erkrankungen dar, und die Zahl der Beispiele, bei denen die Expression von Tumorsuppressoren durch demethylierende Wirkstoffe reaktiviert werden konnte, wächst beständig.^[8, 41, 47, 242, 261, 262, 291] Zum anderen sind viele der molekularen Zusammenhänge und Mechanismen, die der Etablierung wie auch der Störung der epigenetischen Markierungen zugrunde liegen, noch unzureichend erforscht. Hier besteht weiterhin ein großer Bedarf an neuen biologisch-chemischen Werkzeugen, die es erlauben, die zelluläre Methylierungsmaschinerie gezielt zu manipulieren, etwa indem sie unmittelbar und spezifisch die beteiligten Enzyme adressieren. Es gehört beispielsweise zu den grundlegenden Strategien der Biochemie, die Expression eines Proteins zunächst herunter zu regulieren, um dann anhand der Auswirkungen in der Zelle Aussagen über seine Aufgaben machen zu können. Die zu diesem Zweck verwendeten, bekannten Instrumente, wie beispielsweise RNAi, *Antisense* oder homologe Rekombination, funktionieren jedoch nicht immer in ausreichendem Maße, sind sehr zeit- und arbeitsaufwändig oder bringen anderweitige Probleme mit sich.^[113, 277, 278, 282, 283, 330-332] Beispielsweise führte die genetische Deletion der regulatorischen Domäne von DNMT1 lediglich zu einem verkürzten Protein, das aber immer noch in der Lage war, die DNA Methylierung und damit die Zellproliferation

von Tumorzellen zu einem erheblichen Teil aufrechtzuerhalten. Auch RNAi und *antisense* Strategien konnten das Enzym nicht vollständig ausschalten. Erst ein sogenannter induzierbarer *knockout* bzw. die Kombination von RNAi- und *knockout*-Techniken konnte die DNMT1 Aktivität vollständig unterdrücken.^[110, 280, 283, 330, 331] Die Entwicklung neuer Methoden zur Inhibierung von DNMT1 könnte deshalb die bestehenden Möglichkeiten auf diesem Gebiet maßgeblich erweitern.

Wie in Kapitel 3.3.3.5 ausführlich erläutert, besteht überdies ein enger Zusammenhang zwischen dem DNA Methylierungsmuster und der Fähigkeit von Stammzellen zu Pluripotenz und Selbsterneuerung. Zu Zwecken der Grundlagenforschung wie auch der Entwicklung von stammzellbasierten Therapien werden erhebliche Anstrengungen unternommen, um pluripotente Stammzellen durch die Rückdifferenzierung von adulten somatischen Zellen *in vitro* zu gewinnen, wodurch ethische Bedenken wie auch methodische Probleme umgangen werden könnten. Da dieser Weg ein möglichst weitgehendes Zurücksetzen („Reprogrammieren“) der epigenetischen Markierungen der ausdifferenzierten Zellen voraussetzt, könnten neue Instrumente zur Manipulation der zellulären Methylierungsmechanismen auch hier von großem Interesse sein.^[18, 53, 169]

Das aktuelle Standardreagenz für die Demethylierung von DNA, 5-Aza-dC, weist einige entscheidende Nachteile auf, die seine Verwendbarkeit stark limitieren. Hierzu zählt die bereits in Abschnitt 3.5.2 erörterte Instabilität gegen hydrolytische Zersetzung unter physiologischen Bedingungen.^[162, 269, 286, 319, 320] Die hieraus hervorgehenden Zersetzungsprodukte werden, neben anderen Faktoren, für die hohe Zytotoxizität von 5-Aza-dC verantwortlich gemacht. Von größerer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang aber sicherlich der irreversibel gebildete kovalente Komplex zwischen DNMT1 und der genomischen DNA, der eine fehlerfreie Replikation und Zellteilung unmöglich macht.^[302, 316, 318]

Aufgabenstellung

Um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen und vor allem das Problem des kovalenten Enzym-DNA Adduktes zu vermeiden, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Ansatz für die Inhibierung der Methyltransferase DNMT1 entwickelt werden. Hierzu sollte der effektivste bekannte DNMT1 Nukleosidinhibitor, 5-Aza-dC, in einen kurzen DNA Doppelstrang integriert werden, der durch eine passende

hemimethylierte CpG Zielsequenz als eine Art „Köder“ für die Methylase fungieren sollte. Durch die Methylierung der modifizierten Base sollte das Enzym irreversibel an die Inhibitor DNA gebunden und somit inaktiviert werden. Auf diesem Wege würde die kovalente Bindung der Methyltransferase zur genomischen DNA, wie sie bei der Verwendung des einfachen Nucleosids unvermeidlich ist, vermieden, wodurch die Zytotoxizität des Inhibitors deutlich gesenkt werden sollte. Gleichzeitig sollte durch die hemimethylierte Zielsequenz spezifisch die Methyltransferase DNMT1 neben DNMT3a und DNMT3b adressiert werden können. Dieser Ansatz macht sich weiterhin die Beobachtung zunutze, dass die Stabilität des Nucleosidinhibitors in wässriger Umgebung durch die Einbindung in doppelsträngige DNA massiv erhöht wird.^[329, 333] Die mit der Hydrolyseanfälligkeit des Nucleosids verbundenen Probleme wären somit ebenfalls ausgeräumt.

An einzel- wie doppelsträngige Oligodesoxynucleotide, die *in vivo* eingesetzt werden sollen, müssen nun einige besondere Ansprüche gestellt werden. Das größte Problem stellt der rasche Abbau von Fremd-DNA durch zelluläre Nucleasen, v. a. 3'→5'-Exonucleasen, dar.^[334, 335] Ein einfacher DNA Doppelstrang würde bereits im Cytoplasma zersetzt und könnte nicht bis zur Methyltransferase im Zellkern vordringen. Im Rahmen von Antisense-Strategien wurden in der Vergangenheit jedoch verschiedene Möglichkeiten entwickelt, Oligonucleotide durch chemische Modifikationen vor einer solchen Degradation zu schützen (Abbildung 4.1).^[336-339]

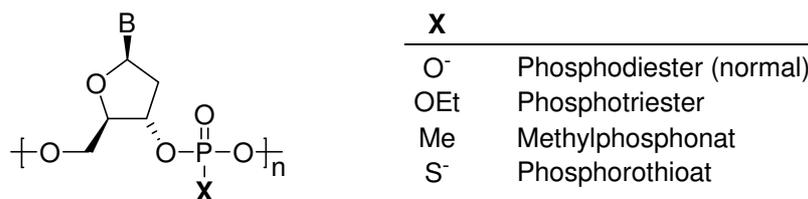
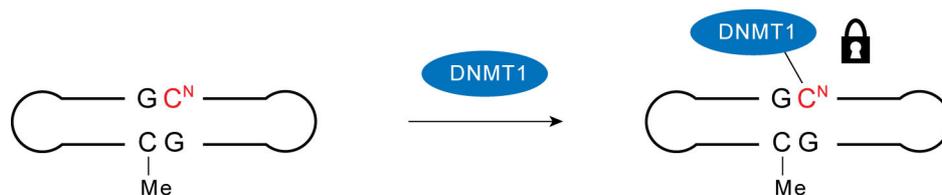


Abbildung 4.1: Modifikationen des Phosphodiester-Rückgrats von DNA zum Schutz gegen Endonucleasen. B = Nucleobase.

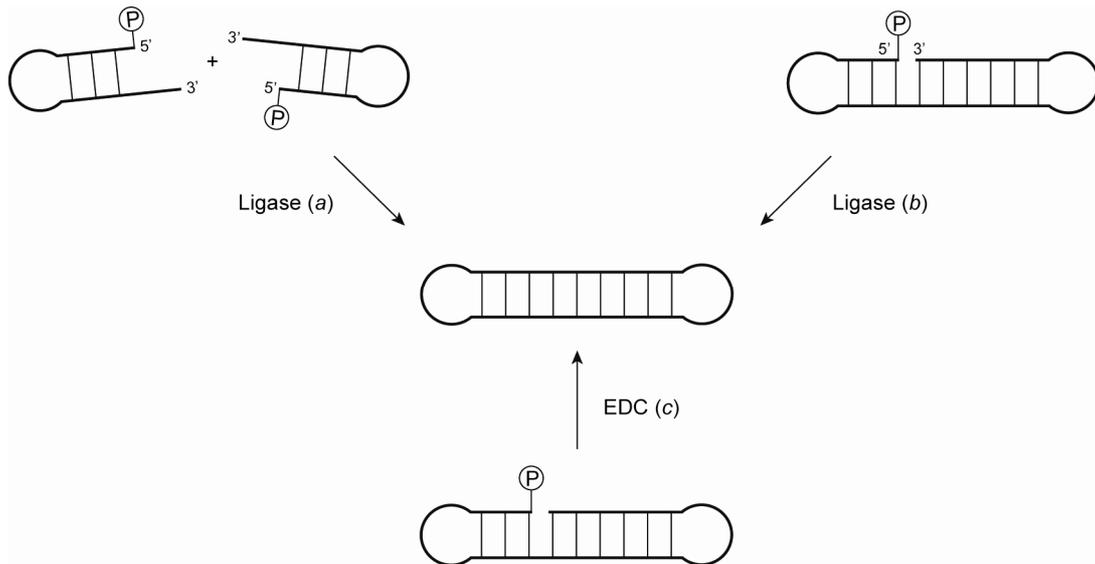
Eine gewisse Bedeutung hat die Verknüpfung der Nucleoside über ein Phosphorothioat-Rückgrat erlangt, und entsprechend modifizierte Oligonucleotide wurden bereits in klinischen Studien auf ihre therapeutische Verwendbarkeit getestet.^[340] Derart veränderte DNA Stränge haben aber wiederum den Nachteil, dass sie ein stark verändertes Bindungsverhalten zeigen und z. B. unspezifisch mit verschiedenen Proteinen wechselwirken.^[336] Hinzu kommt, dass der Nucleosidinhibitor in diesem Fall per Festphasensynthese in das Oligonucleotid

eingebaut werden müsste, was bei 5-Aza-dC nur schwierig und unter großem Arbeitsaufwand zu realisieren wäre.^[341] Nicht zuletzt stellt die Einführung modifizierter Nukleotide eine zusätzliche physiologische Belastung dar und führt möglicherweise zu unvorhersehbaren Nebeneffekten.^[342] Aus diesen Gründen sollte der Nucleosidinhibitor deshalb in einen synthetischen Doppelstrang mit herkömmlichem Phosphodiester-Rückgrat integriert werden, dessen Schutz gegen Exonukleasen durch eine zweifache *hairpin*-Struktur an seinen Enden gewährleistet werden sollte. Die erhöhte Resistenz derartiger hantelförmiger DNA Strukturen (engl. *dumbbells*) gegen Nukleasen konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden.^[342-345] Schema 4.1 zeigt das Prinzip der geplanten DNMT1 DNA Inhibitoren. Indem das Enzym kovalent an den Inhibitor Dumbbell bindet, kann es seine Methylierungsaktivität in der Zelle nicht mehr fortsetzen - gleichzeitig kommt es hier zu keiner irreversiblen Bindung des Enzyms zur genomischen DNA und den damit verbundenen Problemen.



Schema 4.1: Prinzip der irreversiblen Inhibition von DNMT1 durch hantelförmige, zirkuläre DNA Konstrukte (Dumbbells), die die Inhibitorbase 5-Aza-dC (dC^N) tragen.

Die Herstellung zirkularer, einzelsträngiger DNA Konstrukte mit *loop-stem-loop*-Struktur ist enzymatisch auf zwei Wegen denkbar und bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt worden (Schema 4.2). Zum einen kann ein Dumbbell aus zwei DNA Haarnadeln mit komplementären *sticky ends* aufgebaut werden; auf diese Weise wurden solche Konstrukte Mitte der 1980er Jahre erstmals von *Wemmer et al.* hergestellt (Schema 4.2 a).^[346] Synthetisch einfacher und mit höheren Ausbeuten verläuft jedoch der Aufbau über einen teilweise selbstkomplementären Einzelstrang, in dem nur *eine* Lücke zwischen zwei Basen durch Ligation geschlossen werden muss (Schema 4.2 b).^[343, 345, 347] Die Ligation geht dabei mit einer erheblichen Erhöhung der Schmelztemperatur des Doppelstranges im Vergleich zum unligierten Konstrukt einher.^[347, 348] Schließlich gelang *Kulash* 1991 die rein synthetische, enzymfreie Darstellung von Dumbbell DNA, inklusive eines chemischen Ligationsschrittes (Schema 4.2 c).^[348]

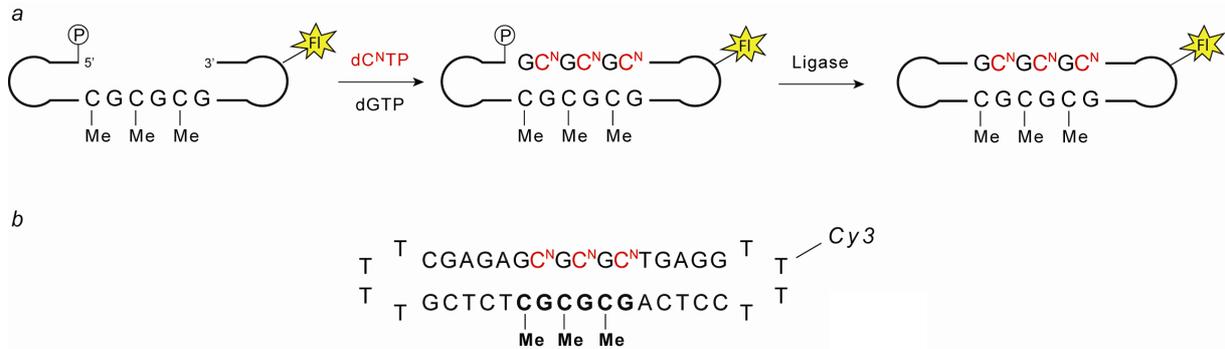


Schema 4.2: Möglichkeiten zum Aufbau einzelsträngiger, zirkularer DNA Konstrukte (Dumbbells). a Aufbau aus zwei Haarnadeln mit *sticky ends*; b Aufbau aus einem einzigen, teils selbstkomplementären Strang und durch enzymatische Ligation; c Vollsynthetischer Aufbau inklusive chemischer Ligation; hier kann der Phosphatrest am 5'- wie auch am 3'-Ende sitzen. P = Phosphat; EDC = 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid.

Während Dumbbell DNA zunächst nur dem Studium der thermodynamischen Eigenschaften ungewöhnlicher DNA Strukturen diene, entdeckte man bald ihr Potenzial zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren.^[342, 343, 345] Blumenfeld konnte in diesem Zusammenhang beobachten, dass hantelförmige Oligonukleotide bei der Transfektion in humane C33 Krebszellen den gewünschten Effekt zeigten, einfache Doppelstrang-Oligonukleotide mit derselben Erkennungssequenz jedoch nicht mehr, während *in vitro* beide gleichermaßen aktiv waren. Dies wurde auf die erhöhte Stabilität der Dumbbells gegen den Abbau durch Nukleasen zurückgeführt.^[343]

Gerade auch hinsichtlich des Einbaus modifizierter Nukleoside ist die zweitgenannte, enzymatische Synthesestrategie sicherlich die am besten geeignete. Auf diesem Wege sollte der schonende enzymatische Einbau des empfindlichen Inhibitors über sein Triphosphat, 5-Aza-dCTP, per *primer extension* ermöglicht werden; die Inkorporation von 5-Aza-dCTP in einfache Doppelstränge war bereits in der Literatur beschrieben worden.^[333, 349, 350] Durch entsprechende Wahl der DNA Sequenz sollte dabei durch die Elongation das CpG Zielmotiv mit d(C^NpG) Einheit in dem einen und d(GpC^{Me}) im komplementären Strang aufgebaut werden. Ausgehend von einem 5'-phosphorylierten Einzelstrang, sollte im Anschluss an die Elongation die Ligation zum zirkularen DNA Konstrukt erfolgen. Um eine empfindliche und

robuste Detektion der Stränge zu ermöglichen, sollten die Konstrukte außerdem mit mindestens einem Cy3 Fluoreszenzlabel versehen werden (siehe Schema 4.3 a). Schema 4.3 b zeigt eine der geplanten Strukturen im Detail. Parallel zu diesem aktiven Inhibitor mussten auch entsprechende Referenzstränge ohne 5-Aza-dC hergestellt werden.



Schema 4.3: a Geplante Synthese der Dumbbell Inhibitor-DNA; b Detailansicht. dC^N = 5-Aza-dC; Fl = Fluoreszenzfarbstoff; P = Phosphat.

Der aktive Dumbbell sollte demnach in der Mitte des Doppelstranges drei d(C^NpG):d(GpC^{Me}) Einheiten tragen. Dieses dreifache DNMT1-Zielmotiv hatte synthetische Gründe: durch den Einbau von sechs Nukleotiden sollte zum einen sichergestellt werden, dass Edukt- und Produktstrang bei der Analyse auf Polyacrylamidgelen eindeutig zu unterscheiden wären. Eine Differenz von sechs Basen sollte darüber hinaus auch eine HPL chromatographische Auftrennung der Reaktionsmischung bei nicht vollständig ablaufenden Elongationen ermöglichen. Die *loop*-Regionen der Haarnadelstrukturen, die die Erkennungssequenz flankieren, sollten durch je vier Thymin-Bausteine gebildet werden. Diese führen, verglichen mit den anderen Basen, zu einer maximalen Erhöhung der Schmelztemperatur und damit zur größten Stabilisierung des Doppelstranges (der *stem*-Region).^[351] Die Haarnadelstrukturen sollten dabei auch die Fluoreszenzmarkierung(en) tragen, da der recht große Cy3-Baustein auf diese Weise möglichst weit von der d(CpG) Erkennungssequenz entfernt ist und die Interaktion mit dem Enzym somit nur wenig stören sollte.

Nach der Synthese und Charakterisierung des Dumbbell-Inhibitors sollten zunächst verschiedene *in vitro* Experimente durchgeführt werden. Neben einer Überprüfung der Resistenz gegen Nukleasen sollte die Wirkung des Inhibitors auf einzelne bakterielle und eukaryotische Methyltransferasen untersucht werden. Hierzu

sollten zum einen EMSA Studien (*electrophoretic mobility shift assays*) unternommen werden, um Informationen über das Bindungsverhalten der Dumbbells zu den Enzymen zu erhalten. Zum anderen sollten geeignete Aktivitätsassays etabliert werden, anhand derer die tatsächliche Inhibierung der Methylierungsreaktion verifiziert werden kann. Bei positivem Verlauf dieser vorbereitenden Experimente sollten im nächsten Schritt die Auswirkungen der Dumbbell Konstrukte auf lebende Zellen untersucht werden. Es galt hierzu, Bedingungen für die Aufnahme der DNA in die Zellen zu finden und durch geeignete analytische Methoden ihre Anreicherung im Zellkern sicherzustellen. Anschließend sollte die Wirkung des Inhibitors auf die Zellproliferation, sowie auf den Methylierungsgrad der genomischen DNA ermittelt werden. Für letzteres war die Etablierung eines Assays notwendig, der die Aufklärung von Änderungen im lokalen oder globalen Methylierungsmuster ermöglichen würde.

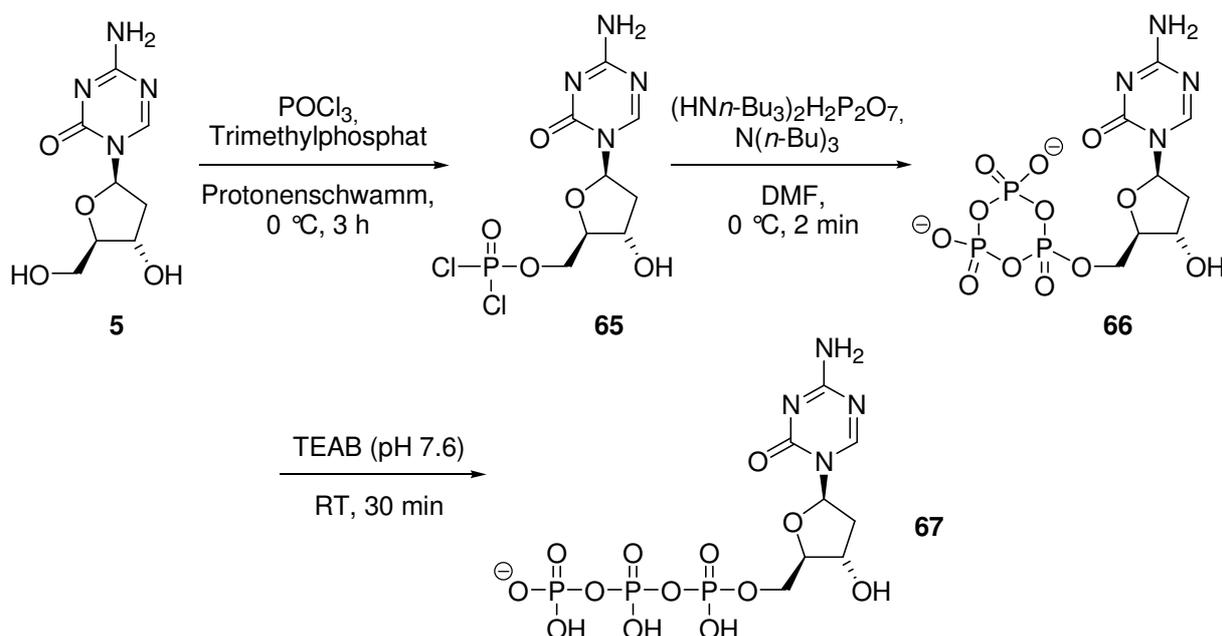
4.2 Synthese der Dumbbell DNA Inhibitoren

Zur Synthese der Dumbbell Inhibitoren musste zunächst das Triphosphat der Inhibitorbase, 2'-Desoxy-5-aza-cytidintriphosphat, hergestellt werden. Nach dem versuchsweisen Einbau in einfache Doppelstränge sollte anschließend der Einbau in Dumbbellstrukturen vorgenommen werden.

4.2.1 Synthese von 2'-Desoxy-5-azacytidintriphosphat (5-Aza-dCTP, **67**)

Die Synthese des 5'-Triphosphats von 5-Aza-dC wurde bereits 1984 von *Kuntz* sowie später auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben,^[333, 350, 352] konnte hier aber weit weniger aufwändig nach einer leicht modifizierten Vorschrift von *Kovácz* durchgeführt werden.^[353] Zunächst wurde dazu das Nukleosid **5** bei 0 °C durch Phosphorylchlorid in das Dichloralkoxyphosphinoxid **65** überführt. Dann wurde die Reaktionslösung mit Pyrophosphat versetzt, die Reaktion jedoch bereits nach 2 min durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonatpuffer (TEAB) abgestoppt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung tiefgefroren und vollständig lyophilisiert (Schema 4.4). Bei diesem Schritt erwiesen sich die Reaktionsdauer sowie der pH-Wert des Puffers als essentiell. Bei einem pH Wert von ≥ 8.4 und einer

Reaktionszeit von 2 h schlug die Synthese fehl, entgegen den Beobachtungen bei anderweitig in der Arbeitsgruppe *Carell* auf diese Weise erfolgreich durchgeführten Triphosphatsynthesen. Diese Probleme sind vermutlich auf die Instabilität von 5-Aza-dC in basischem Milieu zurückzuführen. Das lyophilisierte Reaktionsgemisch wurde säulen-chromatographisch per Sephadex Ionenaustauscher aufgereinigt, wobei die Produktfraktionen jeweils sofort mittels Flüssigstickstoff tiefgefroren wurden. Das Triphosphat **67** wurde bei -80 °C aliquotiert aufbewahrt und war so über zwei Jahre verwendbar.



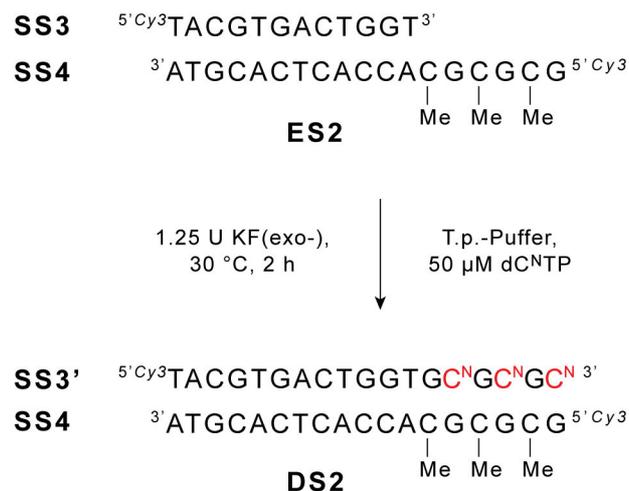
Schema 4.4: Synthese von 2'-Desoxy-5-azacytidin triphosphat (**67**). Protonenschwamm = 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin; TEAB = Triethylammoniumbicarbonatpuffer.

4.2.2 Elongation einfacher Doppelstränge mit 5-Aza-dCTP (**67**)

Zunächst wurde der enzymatische Einbau des hergestellten Triphosphats 5-Aza-dCTP (**67**) anhand einfacher Doppelstränge getestet. Die so ermittelten Reaktionsbedingungen (Polymerase, Puffersystem, Reaktionstemperatur und -zeit) sollten anschließend auf die komplizierteren hantelförmigen Substrate übertragen werden.

Zunächst wurde ein kurzes methyliertes 18mer mit einem 12mer *primer* hybridisiert (**ES1**, Abbildung 4.2 a) und bei Anwesenheit von 50 μM **67** mit den Polymerasen Taq, Vent, Klenow Fragment (KF), Pfx und Pwo inkubiert. Von diesen

Anspruch an die Substrattoleranz der Polymerase stellt. Das zuvor für den einfachen Doppelstrang **DS1** erfolgreich verwendete Enzym Vent (exo-) scheiterte hier; ein erneutes *Screening* war nötig, um schließlich mit 1.25 U Klenow Fragment (3'→5' exo-) in Thermopol Reaktionspuffer (*New England Biolabs*) den modifizierten Doppelstrang **DS2** herstellen zu können (Schema 4.5). Interessanterweise zeigte die Polymerase in dem vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Reaktionspuffer (NEBuffer 2) keine Aktivität.



Schema 4.5: Elongation eines kurzen, zweifach fluoreszenzmarkierten Doppelstranges (**ES2**) unter Verwendung von 5-Aza-dCTP (**67**). Der 12mer *primer* **SS3** wird vollständig zum verlängerten Einzelstrang **SS3'** umgesetzt. T.p. = Thermopol, dC^N = 5-Aza-dC.

Das entsprechende Polyacrylamidgel der Reaktionsmischung zeigte in Übereinstimmung mit der massenspektrometrischen Analyse den vollständigen Umsatz des Eduktstrangs **ES2** (Abbildung 4.3 a, *Spur 1* bzw. b *Spektrum 1*) zum Produktstrang **DS2** (Abbildung 4.3 a, *Spur 2* bzw. b *Spektrum 2*). Die schwachen unteren Banden auf dem nativen Gel stammen von überschüssigem Templatstrang **SS4**. In Abbildung 4.3 b kann man im Massenspektrum nach der Reaktion (*Spektrum 2*) kein Signal mehr für den *primer* beobachten, sondern nur noch einen (breiten) *Peak* für das Produkt **DS2**. Die beiden Produkt-Einzelstränge (**SS3'**, **SS4**) mit den sehr ähnlichen Massen von 6300.3 bzw. 6323.2 Da konnten hierbei nicht aufgelöst werden, und man erhielt nur ein breites Signal bei etwa 6300 Da.

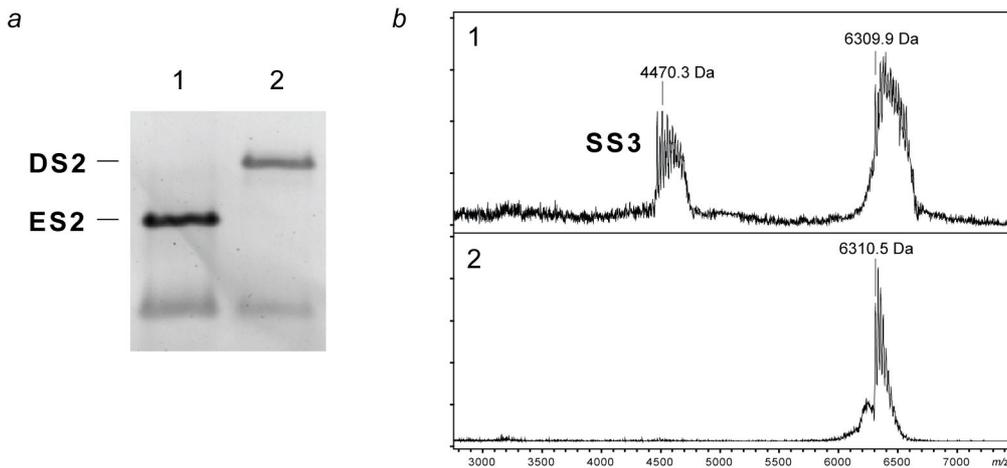
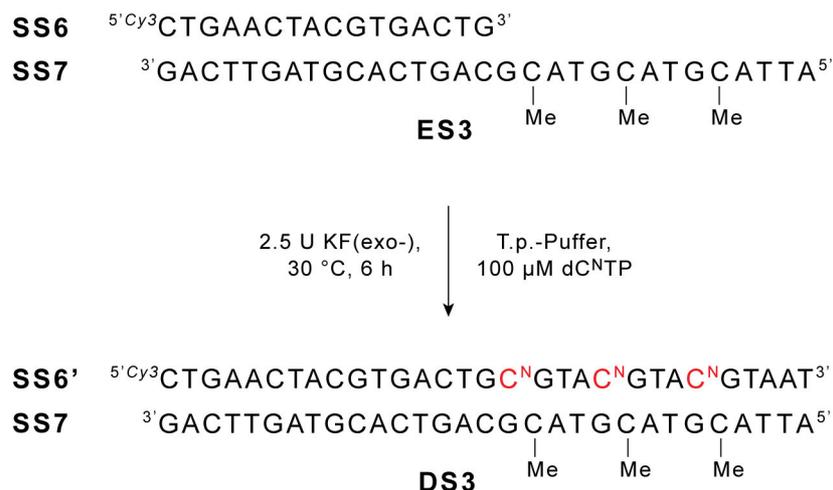


Abbildung 4.3: Analytik zur Synthese von **DS2**. *a* native PAGE; *b* MALDI-TOF. Jeweils 1: **ES2**, 2: **DS2**. Nach der Reaktion ist auf dem Gel kein Eduktstrang (**ES2**) und im Massenspektrum kein nicht verlängerter *primer* (**SS3**) mehr zu detektieren. Schwache untere Banden auf dem Gel: Überschuss an Templatstrang **SS4**.

Unter ähnlichen Bedingungen konnte auch der Doppelstrang **ES3** verlängert werden, wobei der modifizierte Baustein **67** diesmal neben *drei* weiteren Nukleotiden (dGTP, dATP und TTP; je 100 μ M) eingesetzt wurde. Insgesamt mussten in den Eduktstrang 14 Basen eingebaut werden, wobei die d(CpG) Motive hier durch je eine d(ApT) Einheit voneinander getrennt vorlagen. Für einen vollständigen Umsatz zum 30mer **DS3** waren im Gegensatz zu **DS2** eine 5-Aza-dCTP Konzentration von 100 μ M, 2.5 U Polymerase sowie eine verlängerte Reaktionsdauer von 6 h notwendig (Schema 4.6).



Schema 4.6: Elongation eines 16mer *primers* (**SS6**) an einem 30mer (**SS7**) unter Verwendung von 5-Aza-dCTP (**67**). Der *primer* konnte vollständig zum 30mer **SS6'** umgesetzt werden. T.p. = Thermopol, dC^N = 5-Aza-dC.

Abbildung 4.4 zeigt das denaturierende Polyacrylamidgel der Reaktion (SYBR Green Färbung). Die Bande des Edukts erfährt durch die Elongation von **ES3** eine

deutliche Verschiebung, und das Produkt zeigt nach der Reaktion auf dem Gel exakt das gleiche Bild wie der Referenzstrang **DS3ref** (wie **DS3**, aber natürliche dC Bausteine anstelle von dC^N; siehe Anhang); die zwei schwächeren, schneller laufenden Banden rühren von einer teilweisen Denaturierung der Doppelstränge her (*Spuren 4 - 6*). Nach der Elongation ist auf dem Gel kein *primer* (**SS6**) mehr detektierbar (*Spur 4*). Zum Vergleich sind die Einzelstränge **SS6**, **SS7** und **SS8** mit aufgetragen (*Spuren 1 - 3*).

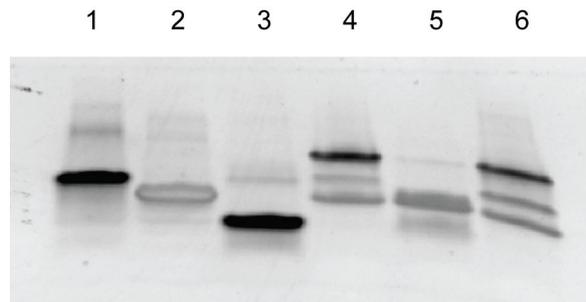


Abbildung 4.4: PAGE der Elongation von **ES3** zu **DS3**. *Spur 1: SS8* (wie **SS6'** aber mit dC statt dC^N); *Spur 2: SS7*; *Spur 3: SS6*; *Spur 4: Reaktionsmischung der Elongationsreaktion*; *Spur 5: ES3*; *Spur 6: DS3ref*.

4.2.3 Einbau von 5-Aza-dCTP (67) in DNA Dumbbellstrukturen

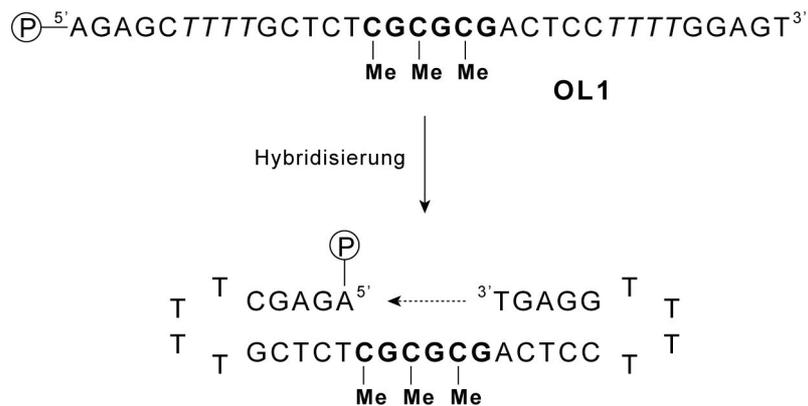
Wie in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, sollten die DNA Dumbbellstrukturen mit 5-Aza-dC nach Schema 4.3 ausgehend von einem einzigen, teils selbstkomplementären Oligonukleotid hergestellt werden. Auch hier wurden die Elongationsversuche zunächst mit einfachen Strängen ohne Fluoreszenzmarkierung begonnen.

4.2.3.1 Dumbbells ohne Fluoreszenzmarkierung

Die Vorversuche mit einfachen DNA Doppelsträngen hatten bereits gezeigt, dass die Reaktionsbedingungen auch bei nur geringfügigen Veränderungen des Templatstranges jedes Mal neu optimiert werden mussten. Diese Feststellung sollte bei den nun begonnenen Dumbbellsynthesen ebenfalls zutreffen.

Die ersten Versuche zum Einbau von 5-Aza-dCTP (**67**) in teilweise selbstkomplementäre, hantelförmige DNA Stränge wurden mit einem einfachen 34mer vorgenommen, dessen beide Enden sich durch Hybridisierung zurückfalten

können und dabei Haarnadelstrukturen ausbilden. Die *Loop*-Regionen dieser Haarnadeln bestanden dabei aus bereits genannten Gründen aus je vier Thymidinresten,^[351] und die *stem*-Regionen wurden durch je 5 Basenpaare gebildet. Diese flankierten die d(C^{Me}pG)₃ Sequenz, die als Templat fungierten und durch den komplementären Einbau von dC^NTP und dGTP zum dreifachen Zielmotiv vervollständigt werden sollte (Schema 4.7). Das fertige, ligierte Konstrukt würde schließlich einen 16 bp Doppelstrang aufweisen, der an den Enden durch die T₄-Haarnadelstrukturen vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt sein sollte.

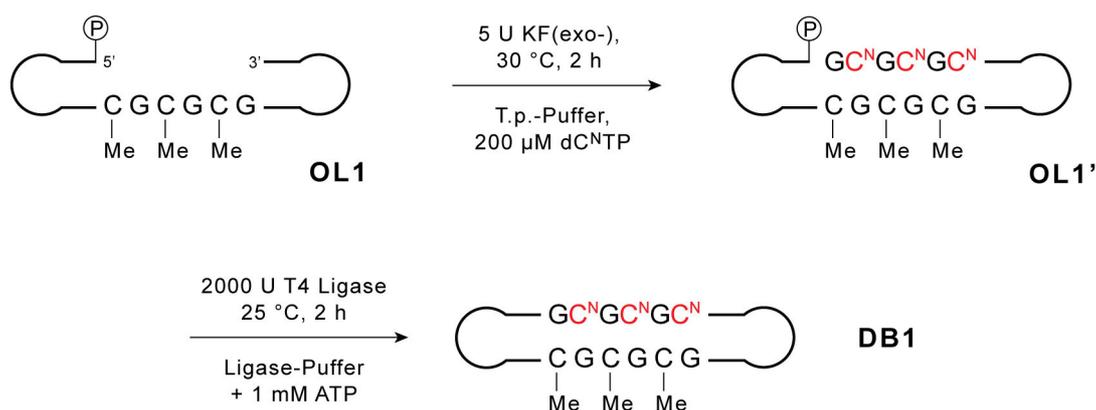


Schema 4.7: Bildung der hantelförmigen Struktur mit zwei haarnadelartigen Regionen aufgrund einer teilweise selbstkomplementären Basensequenz. P = Phosphat; *gestrichelter Pfeil:* durch dC^NTP und dGTP zu elongierender Bereich.

Bei der Länge der Dumbbells wurde hierbei ein Kompromiss eingegangen. Das Enzym DNMT1 hat der Literatur zufolge einen *footprint* von 28 - 30 Basenpaaren, weshalb ein DNA Inhibitor idealerweise einen Doppelstrang von mindestens dieser Länge aufweisen sollte.^[66, 354] Die Analytik der somit benötigten 68mere (30 bp + 2 x T₄-loops) erwies sich jedoch als sehr problematisch. Eine routinemäßige Massenbestimmung durch MALDI-TOF ist bei DNA Oligonukleotiden mit Molekulargewichten von über 20.000 Da generell schwierig und nicht mehr ohne weiteres möglich.^[355] Da geeignetere Methoden wie ESI-FTICR zum Zeitpunkt der ersten Versuche noch nicht zur Verfügung standen, wurde mit der Synthese kürzerer Stränge begonnen, um später mit definierten, sauber charakterisierten Produkten in die *in vitro* Experimente einsteigen zu können. Die MALDI-TOF Analyse der aus diesen Gründen verwendeten 40mere mit ihren Molekulargewichten um die 12.000 Da ist noch gut durchzuführen und von akzeptabler Präzision.

Zur Elongation des in Schema 4.7 gezeigten, hybridisierten Oligonukleotids **OL1** mussten die für **DS3** gefundenen Reaktionsbedingungen weiter angepasst werden.

Analog zu den Beobachtungen bei der Synthese des 30mer Doppelstrangs wurde ausschließlich mit Klenow Fragment (exo-) in Thermopolpuffer bei 30 °C ein nennenswerter Umsatz erreicht, die übrigen Polymerasen (Taq, Vent, KF etc.) wurden wiederum erfolglos eingesetzt. Die praktisch quantitative Elongation von **OL1** gelang schließlich durch die Erhöhung sowohl der 5-Aza-dCTP wie auch der Polymerase Konzentration. Während bislang 100 µM **67** zusammen mit 2.5 U KF(exo-) umgesetzt worden waren, gelang die Reaktion hier erst bei einer Konzentration von 200 µM Triphosphat und der relativ großen Menge von 5 U Polymerase. Dabei konnten bei 30 °C in 2 h 90 pmol Eduktstrang **OL1** vollständig in das verlängerte Produkt **OL1'** überführt werden (Schema 4.8). Auch hier betrug die dGTP Konzentration standardmäßig 100 µM und das Reaktionsvolumen 10 µL. Die Reaktionen wurden dabei durch MALDI-TOF und Kapillarelektrophorese überprüft (siehe unten).



Schema 4.8: Synthese des Dumbbells **DB1** durch Elongation von **OL1** und anschließende Ligation von **OL1'**. Die vereinfachte Darstellung der Stränge steht für die in Schema 4.7 explizit gezeigte Basensequenz. P = Phosphat, T.p. = Thermopol, dC^N = 5-Aza-dC.

Die Ligation der Dumbbellstrukturen zu geschlossenen, zirkularen Strängen erwies sich als unkomplizierter als die Elongationsreaktionen, allein schon weil hier eigentlich nur ein Enzym, T4 Ligase, in Frage kommt. Die in der Literatur beschriebenen Ligationen von DNA Dumbbells wurden über einen Temperaturbereich von 4 - 37 °C bei Reaktionszeiten von bis zu 96 h durchgeführt, oftmals bei Verwendung eines großen Überschusses an Ligase.^[342, 343, 345, 347, 356] Während der Hersteller des in dieser Arbeit eingesetzten Enzyms (*New England Biolabs*) ein Temperaturoptimum von 16 °C angibt, ergab bei der Ligation von **OL1'** zu **DB1** eine Reaktionstemperatur von 25 °C bei einer Reaktionsdauer von 2 h die besten Ergebnisse. Dabei erwies es sich als vorteilhaft, die Ligase in einer sehr

konzentrierten Form einzusetzen (2000 U/ μ L statt der üblichen 400 U/ μ L). Wurde ein zuvor elongierter DNA Dumbbell eingesetzt, war es unabdingbar, zunächst den alten Reaktionspuffer durch Dialyse über Membranfilter zu entfernen, und erst dann Ligase, ATP und Ligase Reaktionspuffer zuzugeben. Die direkte Zugabe der Ligationsreagenzien zur Elongationslösung ergab unbefriedigende Ergebnisse, und auch die direkte Elongation in T4 Ligase Reaktionspuffer verlief nur unvollständig.

Abbildung 4.5 zeigt die Analytik der Synthese von **DB1** durch CE und MALDI-TOF. Bei beiden Techniken war eine sorgfältige Probenvorbereitung absolut essentiell, um verwertbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Im Fall der Kapillarelektrophorese beschränkte sich dies im Wesentlichen auf das ausgiebige Entsalzen der Proben auf Membranfiltern (in der Regel rund 2 h), da Salze die kapillarelektrophoretische Analyse von Oligonukleotiden stark behindern. Die mit der Dialyse meist einhergehende Flüssigkeitszunahme und damit die Verdünnung des Analyten stellte aufgrund der hohen Empfindlichkeit der CE kein Problem dar. Im Gegensatz dazu erwies es sich bei der Probenvorbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie, bei der die Lösungen ebenfalls für 2 - 3 h mit den Membranfiltern behandelt werden mussten, als unabdingbar, die Proben anschließend durch Lyophilisierung wieder aufzukonzentrieren. Um aussagekräftige MALDI Spektren zu erhalten, wurden DNA Lösungen im mikromolaren Bereich benötigt. Weiterhin hatte die zur Kokristallisation verwendete Matrix-Substanz einen großen Einfluss auf die Spektrenqualität. Das Hauptproblem der Analytik von Oligodesoxynukleotiden per MALDI-MS besteht in der Bildung von DNA-Na⁺ und DNA-K⁺ Addukten, die breite Signale und unübersichtliche Spektren zur Folge haben. Durch Austausch der Kalium- und Natriumionen gegen H⁺ oder NH₄⁺ im Zuge der Probenvorbereitung (Ionenaustauscher) oder aber *in situ* auf dem *sampletarget* (Zugabe von Ammoniumcitrat oder -tartrat) in Verbindung mit einer geeigneten Matrix (3-Hydroxypicolinsäure, 3-HPA) kann diesem Effekt vorgebeugt werden.^[355, 357, 358] Im vorliegenden Fall wurde eine Mischung aus 3-HPA, Ammoniumdihydrogencitrat sowie 15-Krone-5 Kronenether verwendet.

4 Dumbbell Inhibitoren

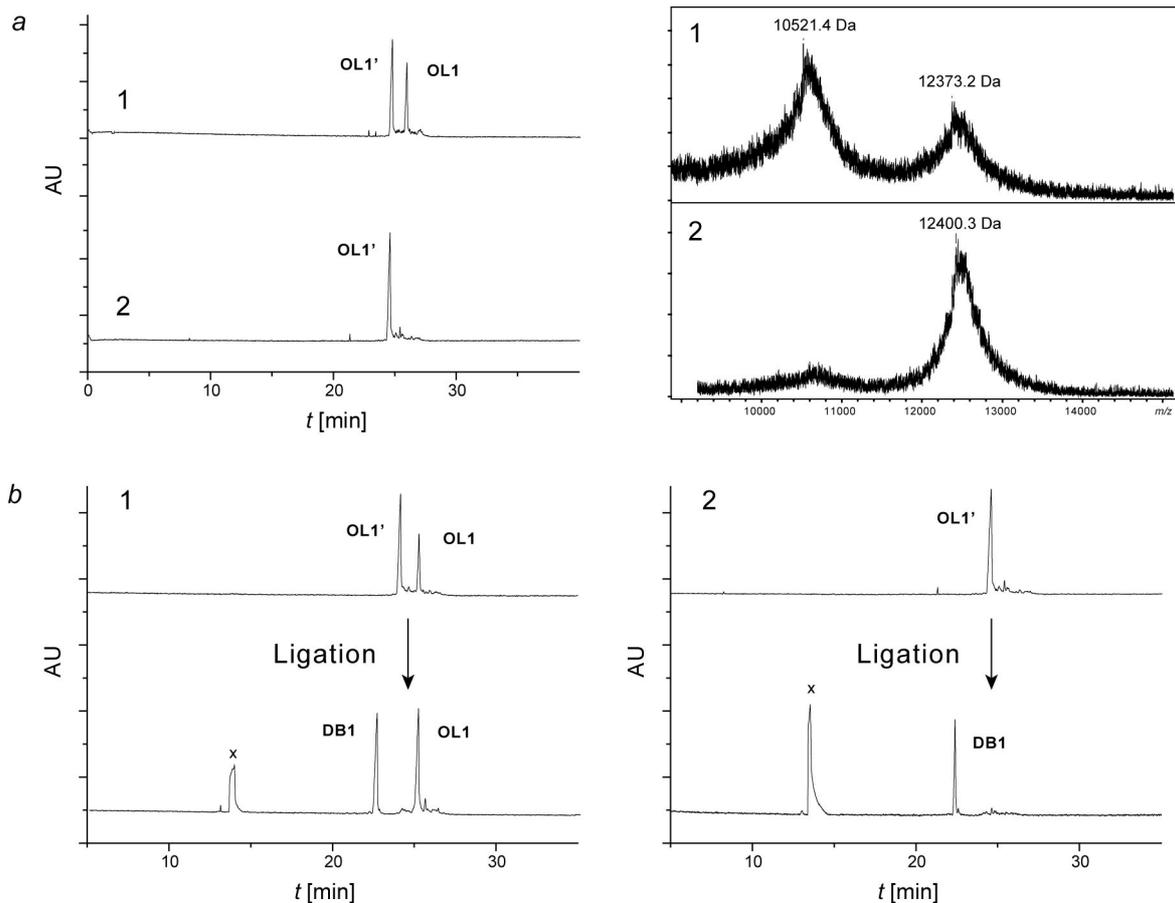


Abbildung 4.5: Analytik der Synthese von **DB1** durch CE und MALDI-TOF. *a Links:* Elektropherogramme einer unvollständig und einer vollständig abgelaufenen Elongationsreaktion (1 bzw. 2); *Rechts:* Die zu den Elektropherogrammen zugehörigen MALDI Spektren; im Fall der vollständig abgelaufenen Reaktion ist im MALDI praktisch kein Edukt-Signal mehr zu sehen; *b* Elektropherogramme der Ligrationsreaktionen der in *a* gezeigten Reaktionsmischungen. Nur der korrekt elongierte Strang **OL1'** wird durch die Ligase umgesetzt, der Eduktstrang **OL1** bleibt unverändert (1); die Ligrationsreaktion verläuft quantitativ (1 und 2). X = ATP.

Abbildung 4.5 *a* zeigt die CE und MALDI-TOF Analytik einer nur teilweise sowie einer vollständig abgelaufenen Elongation von **OL1** (Abbildung 4.5 *a* 1 bzw. 2). Im unteren Elektropherogramm ist gut ersichtlich, dass die Reaktion in diesem Fall praktisch quantitativ abgelaufen ist und kein Edukt mehr detektiert werden kann. Der elongierte Strang bewegte sich dabei überraschenderweise schneller durch die gelgefüllte Kapillare der CE und wurde vor dem kürzeren Eduktstrang detektiert. Die Ergebnisse der CE Analytik deckten sich mit den entsprechenden massenspektrometrischen Untersuchungen. Für die Reaktionsmischung der unvollständig abgelaufenen Reaktion findet man im MALDI Spektrum noch ein starkes Edukt-Signal (*a rechts*, Spektrum 1; $M_{OL1} = 10.523$ Da), bei quantitativem Umsatz wird hingegen nur noch die Masse des Produkts detektiert (*a rechts*, Spektrum 2; $M_{OL1'} = 12.381$ Da). Die hier gezeigten Masse-Spektren stehen bezüglich ihrer Qualität stellvertretend für die durchgeführte MALDI-TOF Analytik von DNA

Oligonukleotiden mit Massen über 10.000 Da. Auch bei höher konzentrierten Probenlösungen oder anderen Matrices konnten keine schärferen Signale erzielt werden, wobei die erreichte Auflösung und Empfindlichkeit aber zur Reaktionskontrolle meist ausreichten. Im späteren Verlauf der Arbeit stand zusätzlich ESI-FTICR Technologie zur Verfügung, die eine sehr exakte Charakterisierung der synthetisierten DNA Konstrukte erlauben sollte (siehe unten).

Abbildung 4.5 *b* zeigt die Ligation der Elongationsreaktionsmischungen aus Abbildung 4.5 *a*. Hierbei konnte wie zu erwarten nur der korrekt elongierte Strang zur geschlossenen Struktur umgesetzt werden, und nicht elongiertes Edukt blieb während der Ligation unverändert (Ligation der unvollständig abgelaufenen Elongation, Abbildung 4.5 *b* 1). Der ligierte Dumbbell **DB1** zeigte dabei eine noch höhere Mobilität als der lediglich elongierte Strang **OL1'**. In Abbildung 4.5 *b* 2 ist die Ligation des reinen, elongierten Konstruktes zu sehen; es ist klar ersichtlich, dass auch die Ligationsreaktion unter den ermittelten Reaktionsbedingungen quantitativ abläuft. Salze und überschüssiges ATP (mit „X“ gekennzeichnetes Signal in den Elektropherogrammen) konnten nach der Reaktion vollständig mit Hilfe von Gelfiltrationssäulen (Biospin 6, *BioRad*) entfernt werden.

Es war im Übrigen möglich, die Reaktionsmischung im Falle einer nicht vollständig verlaufenen Elongation per *reversed phase* HPLC aufzureinigen und anschließend den sauberen, verlängerten Strang quantitativ zu ligieren. Die HPL chromatographische Aufarbeitung war jedoch stets mit herben Verlusten der ohnehin in sehr geringen Mengen vorliegenden DNA verbunden. Deshalb wurde das Augenmerk stets darauf gerichtet, sämtliche Reaktionen auf einen quantitativen Umsatz hin zu optimieren, so dass eine chromatographische Aufreinigung in der Regel nicht notwendig war.

Die Analyse der besprochenen Reaktionen auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (20 %) zeigt Abbildung 4.6. Der elongierte Strang **OL1'** läuft dabei entsprechend seinem höheren Molekulargewicht langsamer als der Eduktstrang **OL1** (*Spuren 1, 2*). Nach der Ligation zeigten die DNA Dumbbells jedoch durchweg eine höhere Mobilität, und die geschlossenen Strukturen wanderten teilweise schneller durch die Gelmatrix als die leichteren Eduktstränge (*Spuren 2, 3*). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Berichten aus der Literatur; die

überwiegend quantitative Ausbeute an ligiertem Produkt wurde bisher hingegen selten beschrieben.^[343, 347, 348]

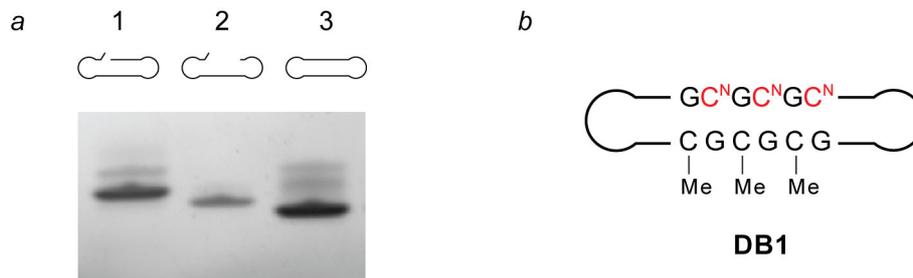


Abbildung 4.6: Synthese von **DB1** durch Elongation von **OL1** und Ligation von **OL1'**. *a* PAGE; *Spur 1:* **OL1'**; *Spur 2:* **OL1**; *Spur 3:* **DB1**; **OL1** wurde hier teilweise um eine Base zuviel verlängert (schwache zusätzliche Bande in *Spur 1*). Der ligierte Strang zeigt eine größere Mobilität auf dem Gel als der nicht-verlängerte Eduktstrang. Detektion der DNA nach Anfärben mit SYBR Green. C^N = 5-Aza-dC.

Nach den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Ligation von **OL1'** zu **DB1** wurden aus den Oligonukleotiden **OL2** und **OL3** die entsprechenden Referenzstränge **DB2** und **DB3** hergestellt. **DB2** trägt dabei ebenfalls das dreifache hemimethylierte DNMT1 Zielmotiv $d(CpG)_3$, allerdings ohne die Inhibitorbase 5-Aza-dC und somit ohne die Möglichkeit, eine kovalente Bindung zum Enzym herzustellen. Ansonsten entspricht die Sequenz der von **DB1**. Der Kontrollstrang **DB3** weist hingegen keinerlei CpG Einheit auf und sollte deshalb in keinster Weise mit einer DNA Methyltransferase wechselwirken. Die Ligationen liefen ebenfalls quantitativ ab, und die ligierten Dumbbells liefen auf den Polyacrylamidgelen schneller als die nicht-ligierten Stränge (Abbildung 4.7).

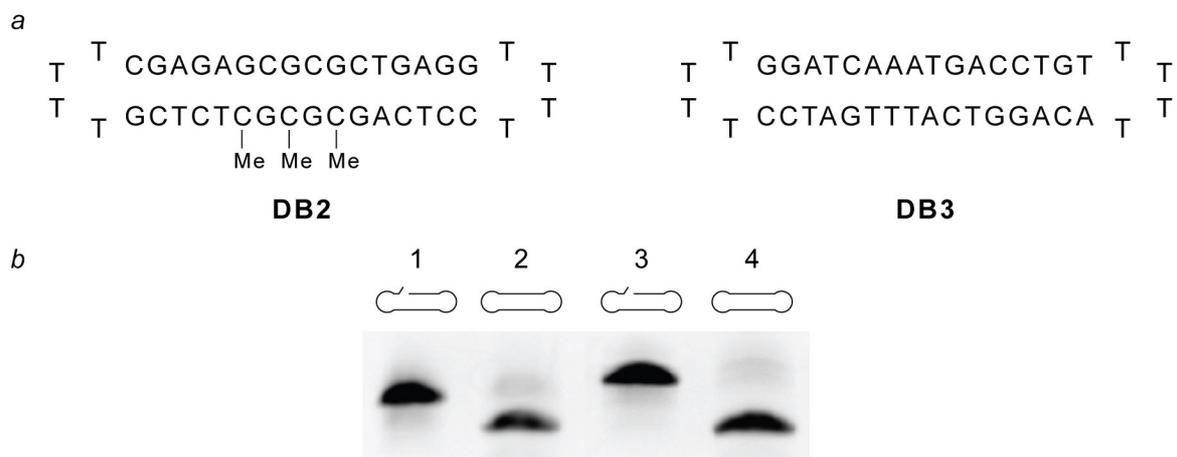


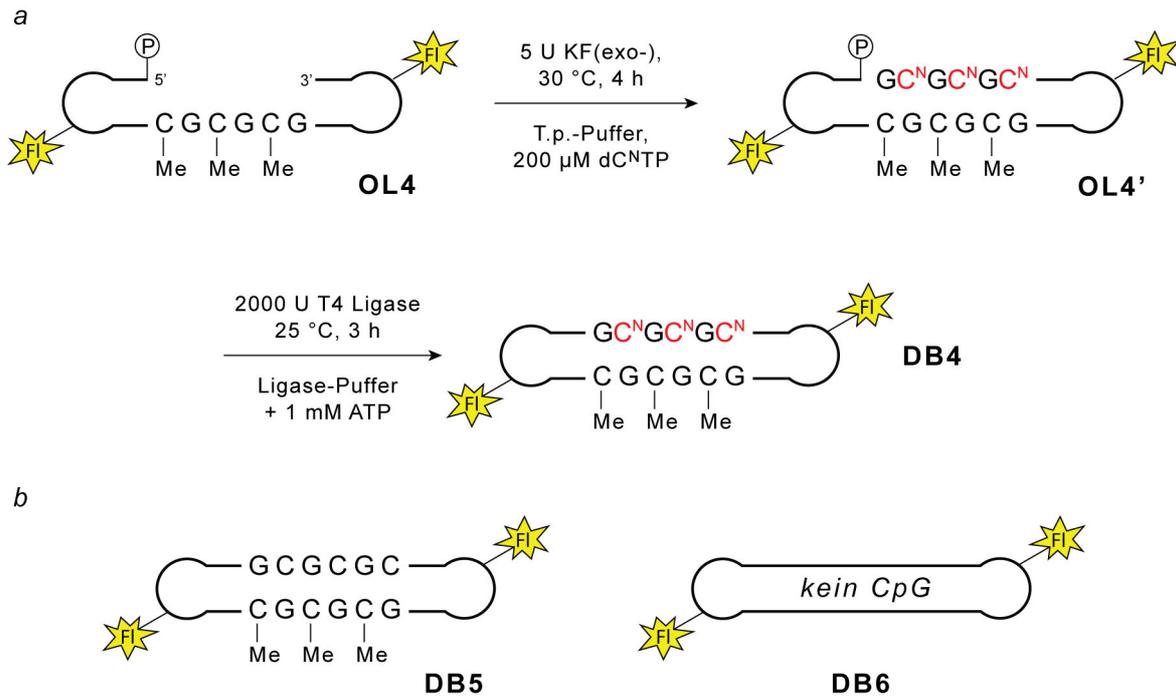
Abbildung 4.7: Die zu **DB1** synthetisierten Referenzstränge **DB2** und **DB3**. *a* Die explizite Sequenz der Produkte; *b* PAGE der Ligrationsreaktionen; *Spur 1:* **OL2**; *Spur 2:* **DB2**; *Spur 3:* **OL3**; *Spur 4:* **DB3**.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Reaktionskontrolle durch die Kapillarelektrophorese zunehmend durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ersetzt, da sich diese Methode als weit weniger arbeitsaufwändig und in ihrer Empfindlichkeit für die bestehenden Aufgabenstellungen als vollkommen ausreichend erwies.

4.2.3.2 Dumbbells mit zwei Fluoreszenzmarkierungen

Um später eine empfindliche und zeitlich stabile Detektierbarkeit der DNA Konstrukte in lebenden Zellen zu ermöglichen, wurden nun zunächst Dumbbells mit zwei Fluoreszenzeinheiten hergestellt. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gewählt, der eine sehr hohe Stabilität gegen *photobleaching* zeigt und bereits bei einer Vielzahl von Experimenten in lebenden Zellen eingesetzt worden war.^[359, 360] Mit einem Absorptionsmaximum von 550 nm ist Cy3 darüber hinaus standardmäßig durch weit verbreitete grüne Laser detektierbar. Mit dem zur Verfügung stehenden *imaging* System (LAS3000, *Fujifilm/Raytest*) konnten einfach Cy3 markierte Oligonukleotide auf Polyacrylamidgelen noch in Mengen von 0.3 pmol pro Spur detektiert werden.

Die Reaktionsbedingungen für **DB1** konnten für die Synthese von **DB4** weitgehend übernommen werden, wobei eine verlängerte Reaktionsdauer von 4 h von Vorteil zu sein schien (Schema 4.9 a). Die Sequenzen von **DB4 - 6** entsprechen denen von **DB1 - 3**, nur dass jede der beiden Haarnadelregionen einen Cy3-markierten Thymidinbaustein enthält. Der Fluoreszenzfarbstoff ist über eine flexible, 17gliedrige Alkylkette mit zwei Amidfunktionen mit dem C5 des Thyminheterocyclus verknüpft. Sowohl die Elongation von **OL4** wie auch die Ligationen von **OL4'**, **OL5** und **OL6** verliefen quantitativ (die Reaktionsdauer der Ligationen wurde ebenfalls auf nunmehr 3 h erhöht; Schema 4.9 b).



Schema 4.9: Die Synthesen der zweifach fluoreszenzmarkierten Dumbbells **DB4 - 6**. Der Referenzstrang **DB6** weist analog zu **DB3** keinerlei CpG Einheit auf. T.p. = Thermopol, P = Phosphat, dC^N = 5-Aza-dC, FI = Cy3 Fluoreszenzfarbstoff.

Als problematisch erwies sich jedoch, dass der Hersteller der Oligonukleotide nicht in der Lage war, die DNA postsynthetisch quantitativ mit der zweifachen Fluoreszenzmarkierung zu versehen, weshalb die gelieferten Lösungen neben dem zweifach markierten Produkt meistens auch noch lediglich einfach markiertes enthielten. Hierdurch war keine saubere Analytik möglich, und sowohl in der Kapillarelektrophorese wie auch auf den PAGE Gelen erhielt man schon für die Eduktstränge mehrere Signale (Abbildung 4.8). In der Folge wurden die Versuche deshalb mit einfach Cy3 markierten Dumbbells fortgesetzt.

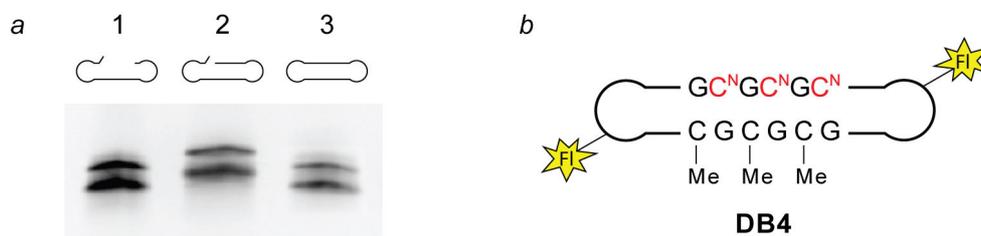
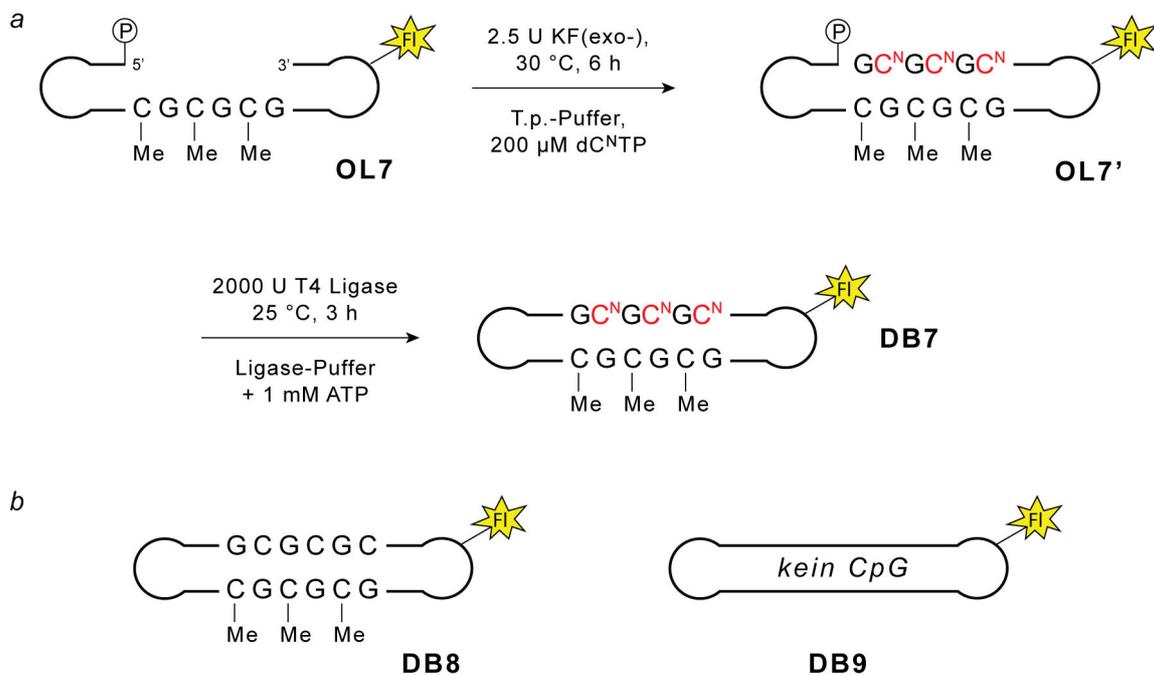


Abbildung 4.8: Synthese von **DB4** durch Elongation von **OL4** und anschließende Ligation von **OL4'**. **a** PAGE; *Spur 1: OL4; Spur 2: OL4'; Spur 3: DB4*. Der ligierte Strang zeigt eine etwas größere Mobilität auf dem Gel als der nicht-verlängerte Eduktstrang **OL4**. Alle drei Oligonukleotide zeigen Doppelbanden aufgrund inhomogener Fluoreszenzmarkierung durch den Hersteller (teilweise eine, teilweise zwei Cy3 Markierungen). C^N = 5-Aza-dC, FI = Cy3 Fluoreszenzfarbstoff.

4.2.3.3 Dumbbells mit einer Fluoreszenzmarkierung

Aus den im vorigen Abschnitt aufgezeigten Gründen wurden nun die den vorigen Strukturen entsprechenden Dumbbells mit nur einem Fluoreszenzlabel hergestellt und für die weiteren Studien verwendet. Die Reaktionszeit für die Elongation von **OL7** zu **OL7'** betrug optimalerweise fünfeinhalb bis sechs Stunden, wobei hier in einem Reaktionsvolumen von 15 μL 180 pmol DNA mittels 2.5 U Klenow Fragment (exo-) umgesetzt werden konnten. Die übrigen Reaktionsparameter blieben die gleichen wie im vorigen Abschnitt. Die Ligationen von **OL7'**, **OL8** und **OL9** wurden analog zu den zweifach Cy3 markierten Konstrukten durchgeführt. Schema 4.10 zeigt die derart hergestellten, einfach fluoreszenzmarkierten Dumbbells **DB7**, **DB8** und **DB9**.^[361]



Schema 4.10: Die Synthesen der einfach fluoreszenzmarkierten Dumbbells **DB7 - 9**. Der Referenzstrang **DB9** weist analog zu **DB3** keinerlei CpG Einheit auf. T.p. = Thermopol, P = Phosphat, dC^N = 5-Aza-dC, FI = Cy3 Fluoreszenzfarbstoff.

Abbildung 4.9 gibt die Analytik der Synthesen der Konstrukte **DB7 - 9** wieder. **OL7'** und **DB7** ergeben auf dem Gel ein ähnliches Bild wie die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Dumbbells, wobei hier das ligierte Produkt (**DB7**) zwar schneller läuft als das lediglich elongierte (**OL7'**), jedoch etwas langsamer als der Eduktstrang (**OL7**; Abbildung 4.9 a). Neben der üblichen PAGE Analytik konnten die Dumbbells **DB7 - 9** außerdem sehr exakt durch ESI-FTICR Massenspektrometrie charakterisiert werden. Auch hier erwies sich eine sorgfältige Probenvorbereitung als

4 Dumbbell Inhibitoren

essentiell für den Erhalt aussagekräftiger Massenspektren. Dazu wurden die Reaktionslösungen bis zu 3 h entsalzt, vollständig lyophilisiert und die Proben in einer Lösung aus 10 mM Ammoniumacetat, 25 mM Piperidin und 25 mM Imidazol bei einer finalen DNA Konzentration von 50 – 100 μ M wieder aufgenommen.^[355, 362-364]

Neben den Additiven ist vor allem eine möglichst hohe DNA Konzentration in der Probe wichtig, weshalb für die ESI-MS Analytik relativ große Substanzmengen benötigt wurden. Abbildung 4.9 *b* zeigt den Ausschnitt eines ESI Spektrums für den Dumbbell **DB7** mit den *Peaks* für die 9 - 14fache Ladung des Moleküls. In Abbildung 4.9 *c* sind für alle drei Konstrukte jeweils die tatsächlich gefundenen Massen (*obere Reihe*) den berechneten gegenübergestellt (*untere Reihe*); hierbei kann eine sehr gute Übereinstimmung festgestellt werden.^[361]

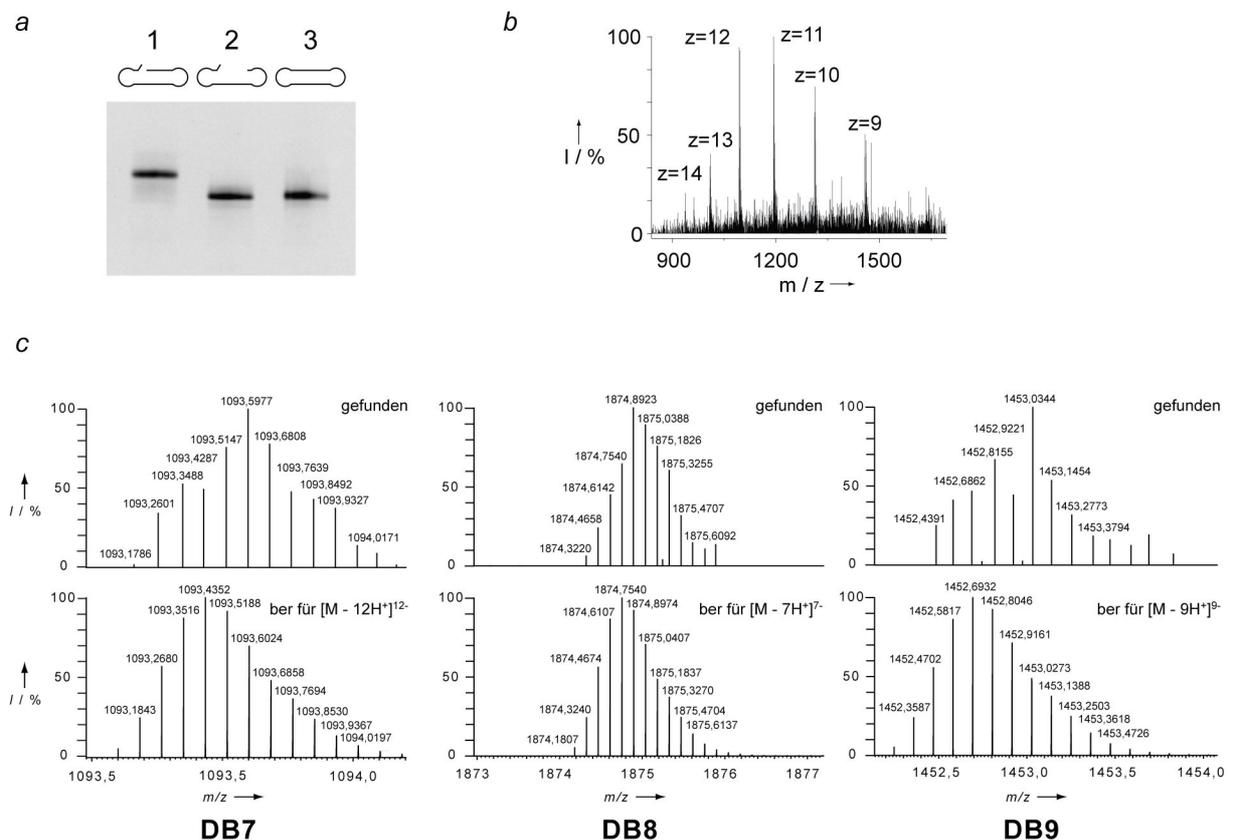


Abbildung 4.9: Analytik der Dumbbells **DB7 – 9**. *a* Denaturierende PAGE; *Spur 1*: verlängertes Produkt, **OL7⁺**; *Spur 2*: Eduktstrang **OL7**; *Spur 3*: ligiertes Produkt, **DB7**; *b* ESI-FTICR Spektrum von **DB7**; *c* ESI-MS Analytik von **DB7 – 9**; *Obere Reihe*: experimentell gefundene Signale; *Untere Reihe*: berechnete Signale.

4.2.3.4 Stabilität der Dumbbell Konstrukte gegen Nukleasen

Die hergestellten DNA Dumbbell Konstrukte sollten durch die Haarnadelstrukturen an den Enden, verglichen mit einfachen Doppelsträngen, eine deutlich erhöhte Stabilität gegen Exonukleasen aufweisen.^[342-345] Um dies zu überprüfen, wurden der Dumbbell **DB8** und der 30mer Doppelstrang **DS3'** (entspricht **DS3**, allerdings mit dC anstelle von 5-Aza-dC) zum einen mit einer einzelnen Exonuklease behandelt (Exonuklease III; Abbildung 4.10 a), zum anderen mit dem Zelllysat von HCT116 Darmkrebszellen (Abbildung 4.10 b).

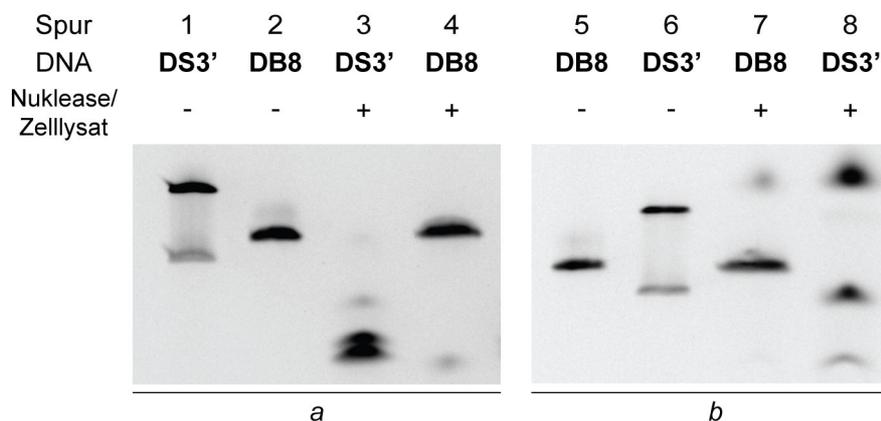


Abbildung 4.10: Resistenz von DNA Dumbbell **DB8** gegen Nukleasen im Vergleich zu **DS3'**. a Exonuklease III, 37 °C, 1 h; b HCT116 Zelllysat, 37 °C, 3.5 h. Spuren 1, 2, 5 und 6: unbehandelte Stränge; Spuren 3, 4, 7 und 8: mit Nuklease bzw. Zelllysat behandelte Proben.

Aus Abbildung 4.10 a ist deutlich ersichtlich, dass der geschlossene Dumbbell gegen Exonuklease III über 1 h resistent ist, während der einfache Doppelstrang in diesem Zeitraum bereits deutlich abgebaut wird (*Spuren 1 - 4*). Die auch für **DB8** schwach erkennbare, langsamere Bande muss von einem Nuklease-DNA Komplex herrühren, der sich auf dem Gel offensichtlich nicht vollständig löst (*Spuren 3, 4*). Wichtig ist jedoch, dass für **DB8** keine Signale im Bereich niedrigerer Molekulargewichte zu sehen sind (*Spur 3*). Bei Inkubation der Stränge mit dem Zelllysat, welches neben verschiedenen Exonukleasen auch Endonukleasen enthält, bietet sich ein ähnliches Bild: nach dreieinhalb Stunden wurde der Doppelstrang **DS3'** vollständig abgebaut, wohingegen der DNA Dumbbell **DB8** fast unverändert vorliegt (*Spuren 5 - 8*). Eine schwache, schneller laufende Bande ist jedoch auch hier bereits zu beobachten (*Spur 8*). Mit der Zeit wird die zirkuläre DNA Struktur von Endonukleasen aufgebrochen und kann dann von Exonukleasen weiter abgebaut

werden, wobei dieser Prozess aber - wie in der Abbildung zu sehen - deutlich langsamer abläuft, als der direkte Abbau der ungeschützten Doppelstränge.^[344]

4.3 *In vitro* Untersuchungen I: Aktivitätsassays

Bevor die Wirkung der neuen Dumbbell-Inhibitoren auf humane Krebszellen ermittelt wurde, sollte zunächst die Wechselwirkung der Konstrukte mit einzelnen, definierten DNA Methyltransferasen untersucht werden. Hierzu wurden zum einen *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs) zum Enzym-DNA Bindungsverhalten durchgeführt, zum anderen wurde mit Hilfe von Restriktionsassays überprüft, ob und wie gut sich die Methylierungsaktivität der Methylasen tatsächlich unterdrücken lässt. In den Experimenten wurden sowohl die leicht zugänglichen bakteriellen Enzyme (M.HhaI und M.SssI), die in erster Näherung als Modelle für ihre eukaryotischen Analoga dienen können, wie auch die komplexe humane DNA Methyltransferase (DNMT1) eingesetzt.^[33, 60, 75, 361]

4.3.1 EMSA Studien (*electrophoretic mobility shift assays*)

Mit Hilfe sogenannter *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs, auch *bandshift assays*) können Aussagen über das Bindungsverhalten der potenziellen DNA Inhibitoren zu bestimmten Enzymen gemacht werden. Hierbei wird die fluoreszenzmarkierte DNA mit dem Enzym inkubiert und die Reaktion anschließend unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel analysiert. Kommt es zu einer stabilen Bindung des Enzyms an die DNA, wird dies auf dem Gel durch eine Bande sichtbar, die deutlich langsamer läuft als die der freien, ungebundenen DNA (*Banden-shift*). Vor der Analyse auf dem Gel können die Reaktionslösungen zusätzlich bei Raumtemperatur oder unter Erwärmen mit denaturierend wirkendem Gelauftragspuffer inkubiert werden, um die Stabilität des Enzym-DNA Komplexes weiter auf die Probe zu stellen.

4.3.1.1 Bakterielle Methyltransferasen (M.HhaI, M.SssI)

Die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI sind erheblich leichter zugänglich als die entsprechenden eukaryotischen Enzyme, zeigen aber prinzipiell

eine ähnliche Reaktivität und können deshalb auf der Suche nach neuen Methylase Inhibitoren gut als einfache Modellsysteme dienen. M.HhaI methyliert die erste Cytidinbase in 5'-GCGC-3' Sequenzen, und M.SssI methyliert sämtliche 5'-CG-3' Einheiten, wobei diese beiden Enzyme im Gegensatz zu DNMT1 keine hemimethylierten Zielmotive benötigen oder bevorzugen. Somit sollte die d(CpG)₃ Einheit in **DB7** auch für M.HhaI und M.SssI eine geeignete Erkennungssequenz darstellen und eine irreversible Bindung des Dumbbells zu diesen Methylasen ermöglichen.

Abbildung 4.11 zeigt die EMS Assays der beiden bakteriellen Enzyme mit dem aktiven Inhibitor Dumbbell **DB7** und den zugehörigen Referenzsträngen **DB8** (wie **DB7**, aber ohne 5-Aza-dC) und **DB9** (ohne jegliche CpG Einheiten).

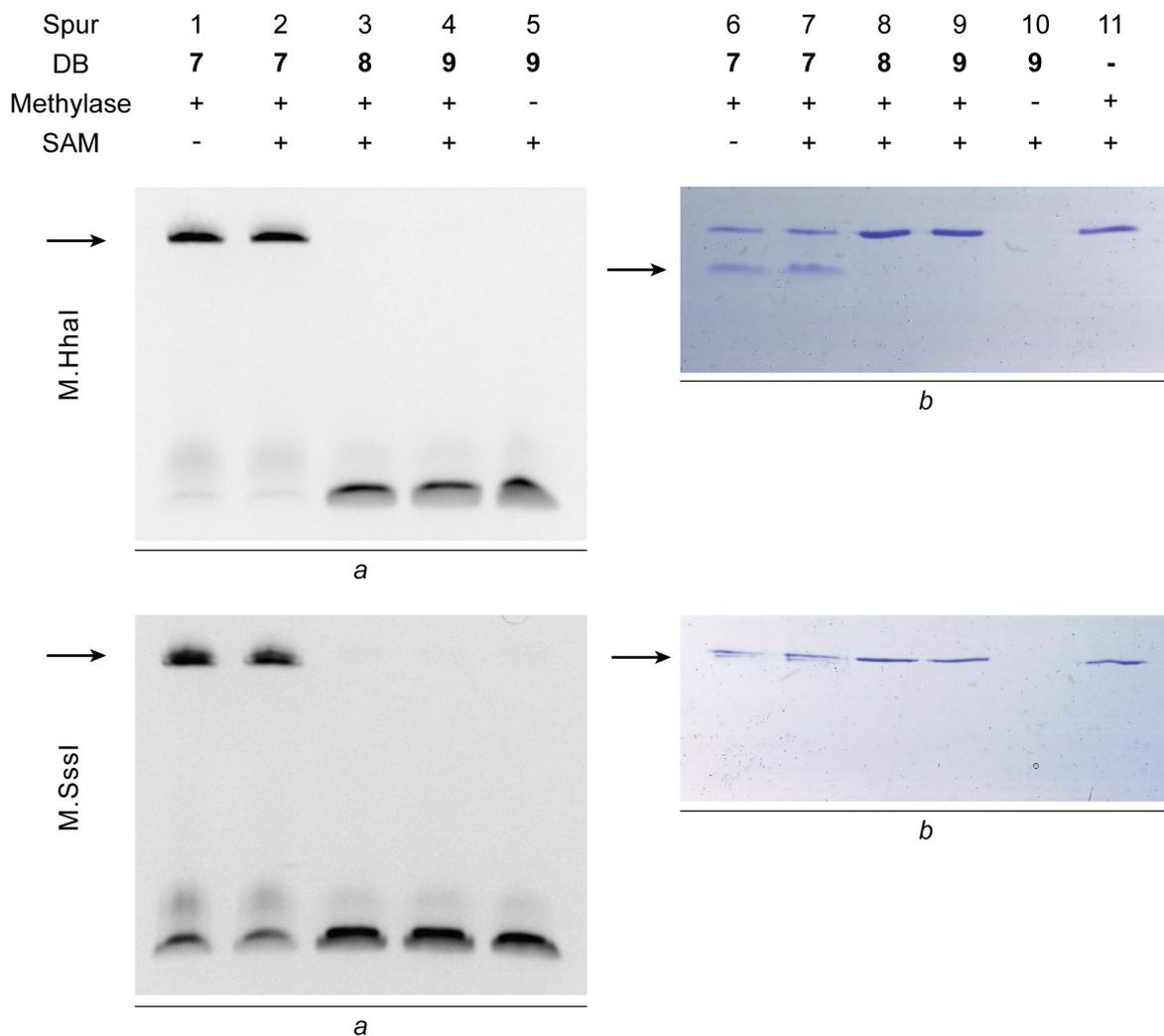


Abbildung 4.11: EMS Assays der bakteriellen Methylasen M.HhaI (*oben*) und M.SssI (*unten*) mit den Dumbbells **DB7**, **DB8** und **DB9**; Inkubation bei 37 °C für 2 h. *a* Fluoreszenzdetektion der DNA; *b* Coomassiefärbung der Proteine. *Spuren 1, 2, 6, 7:* aktiver Dumbbell, **DB7**; *Spuren 3, 4, 8, 9:* Kontrolldumbbells ohne Inhibitorbase, **DB8** und **DB9**; *Spuren 5, 10:* Negativkontrollen ohne Enzym; *Spur 11:* freies Enzym bei Abwesenheit von DNA. *Pfeile:* Enzym-DNA Komplexe.

Die linke Seite der Abbildung zeigt die Fluoreszenzdetektion der DNA (Abbildung 4.11 a), auf der rechten ist die Coomassiefärbung der Proteine zusehen (Abbildung 4.11 b), und die Pfeile markieren die Enzym-DNA Komplexe. Die Ergebnisse waren für die beiden Enzyme sehr ähnlich. Es ist gut ersichtlich, dass nur das Konstrukt mit der Inhibitorbase 5-Aza-dC, **DB7**, einen stabilen Komplex sowohl mit M.HhaI wie auch mit M.SssI bildet, und zwar bei Anwesenheit wie Abwesenheit des Kofaktors S-Adenosylmethionin (SAM, **2**) (*Spuren 1, 2 und 6, 7*). Mit den Kontrollsträngen **DB8** und **DB9** kommt hingegen keinerlei stabile Wechselwirkung zustande, und das Bild auf dem Gel entspricht dem ohne Proteinzugabe (vergleiche *Spuren 3, 4 und 5 bzw. 8, 9 und 10*).^[361]

Auf den Coomassie-gefärbten Gelen (*b*) ist zu sehen, dass die Proteine bei gebundener DNA eine größere Mobilität zeigen. Dies ist auf eine kompaktere Konformation zurückzuführen, die die Proteine bei Substratbindung einnehmen (*induced fit Mechanismus*).^[268, 365]

Die Beobachtung, dass bakterielle Methylasen unabhängig von der Anwesenheit des Kofaktors kovalente Komplexe mit Inhibitorbasen enthaltenden Oligonukleotiden bilden, deckt sich mit entsprechenden Berichten in der Literatur.^[32, 99, 302, 366] Die Abhängigkeit vom Kofaktor ist interessanterweise von der Art des verwendeten Nukleosidinhibitors abhängig: Synthetische DNA Doppelstränge, die CpG Einheiten mit dem Inhibitor 5-Fluoro-dC enthalten, bilden mit M.HhaI nur bei Anwesenheit von SAM einen kovalenten, gegen stark denaturierende Bedingungen stabilen Komplex, wobei die Übertragung einer Methylgruppe stattfindet.^[299, 366]

4.3.1.2 Humane DNA Methyltransferase DNMT1

Nach der erfolgreichen Bindung des Inhibitor Dumbbells **DB7** an die bakteriellen Methylasen M.HhaI und M.SssI wurde das Experiment nun mit der weitaus komplexeren humanen DNA Methyltransferase DNMT1 wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 dargestellt.^[361] In Teil *a* der Abbildung ist das Gel bei Fluoreszenzdetektion der DNA gezeigt, in Teil *b* ist die Coomassiefärbung der Proteine zu sehen. Die schwachen Banden in der unteren Hälfte des Gels stammen wahrscheinlich von Abbauprodukten des Proteins. Enzym und DNA wurden bei der Reaktion in etwa stöchiometrischen Mengen (je 4 pmol) eingesetzt.

4 Dumbbell Inhibitoren

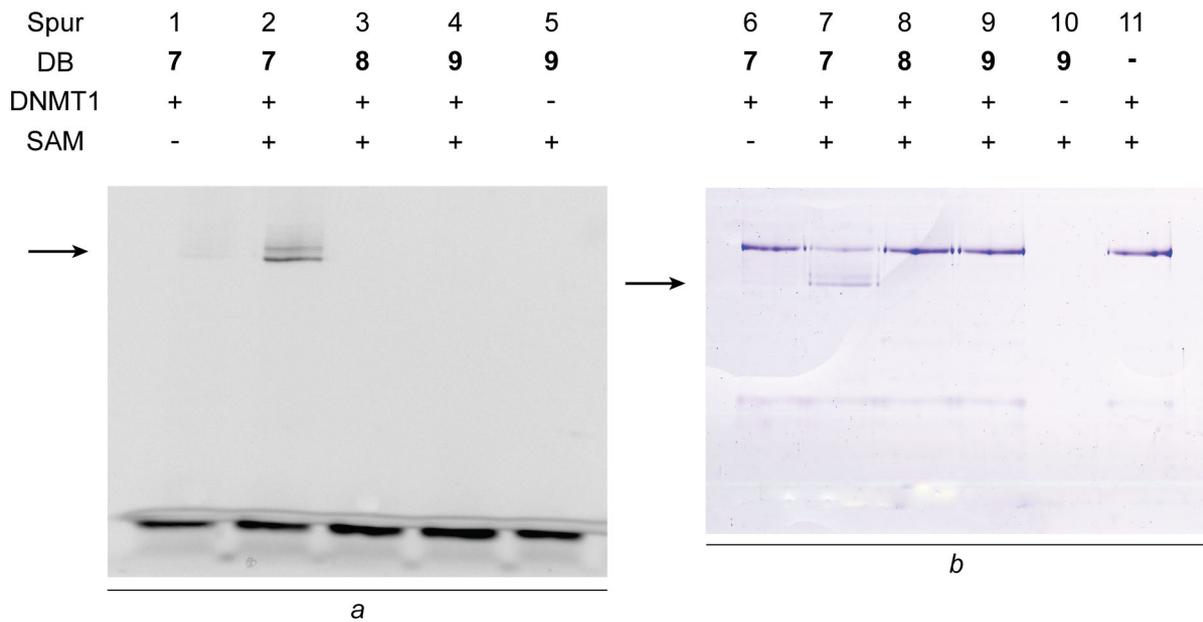


Abbildung 4.12: EMS Assays der humanen Methyltransferase DNMT1 mit den Dumbbells **DB7**, **DB8** und **DB9**; Inkubation bei 37 °C für 1.5 h. *a* DNA Detektion; *b* Protein Detektion; *Spuren 1, 2, 6, 7*: aktiver Dumbbell, **DB7**; *Spuren 3, 4, 8, 9*: Kontrolldumbbells ohne Inhibitorbase; *Spuren 5, 10*: Negativkontrollen ohne Enzym; *Spur 11*: Negativkontrolle ohne DNA. *Pfeile*: Enzym-DNA Komplex.

Wie bei den bakteriellen Methyltransferasen kommt es auch bei DNMT1 nur mit dem aktiven Inhibitor Dumbbell **DB7** zur Ausbildung eines stabilen Enzym-DNA Komplexes (*Spur 2; Pfeil*). Auf dem Commassie-gefärbten Protein-Gel ist deutlich zu erkennen, dass die Mobilität des Enzym-DNA Komplexes größer ist als die des freien Enzyms (Abbildung 4.12 *b*; vergleiche *Spuren 7* und *11*), was für ähnliche Fälle literaturbekannt und auf eine kompaktere Konformation des Proteins bei Substratbindung zurückzuführen ist (*Induced Fit Mechanismus*).^[268, 365] Das gleiche Phänomen war bereits bei den Bindungsstudien mit den bakteriellen Proteinen beobachtet worden. Die Tatsache, dass das DNMT1-DNA Addukt auf dem Gel in Form einer Doppelbande auftritt, ist nur mit der großen Komplexität des Enzyms DNMT1 zu erklären. Interessanterweise ist die Bindung des Proteins zum Inhibitor bei Abwesenheit von SAM stark eingeschränkt, und die entsprechende Bande ist auf dem Gel nur noch schwer zu erkennen (*Spur 1*). Dies widerspricht Literaturangaben, laut denen die stabile Bindung von DNMT1 an 5-Aza-dC-enthaltende DNA von der Anwesenheit des Kofaktors unabhängig sein sollte.^[302, 367] Für die inaktivierende Wirkung des Inhibitors 5-Fluoro-dC ist die Notwendigkeit der Anwesenheit von SAM hingegen bekannt.^[100, 299]

Im Fall der Kontrollstränge **DB8** und **DB9** kommt es zu keiner stabilen Wechselwirkung, und bei der Detektion sowohl der DNA wie auch des Proteins

ergeben sich die gleichen Bilder wie für die Negativkontrollen (nur DNA bzw. nur Protein; vergleiche *Spuren 3, 4 und 5 bzw. 8, 9 und 11*).

Vor der Analyse auf dem Gel wurden die Lösungen lediglich für 5 min bei Raumtemperatur mit Gelauftragungspuffer inkubiert, da schon dreiminütiges Erhitzen auf 70 °C das Protein-DNA Addukt zerstörte und in der Folge keine entsprechende Bande mehr auf dem Gel erkennen ließ. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit analogen Beobachtungen in der Literatur.^[366] Auch hier spielt die Art der verwendeten Inhibitorbase ebenso wie die eingesetzte Methyltransferase eine wichtige Rolle. Zum einen wurde für entsprechende Komplexe von Methylasen mit 5-Fluoro-dC-enthaltender DNA eine bis zu zehnminütige Stabilität bei 90 °C unter denaturierenden Bedingungen berichtet,^[100, 299, 368] zum anderen waren Komplexe der *EcoRII* Methyltransferase mit 5-Aza-dC-enthaltender DNA zumindest für 5 min bei 70 °C stabil.^[96]

Somit erfüllt der Inhibitor trotz der vermeintlich suboptimalen Länge der Doppelstrangregion voll und ganz seine Funktion.^[66] Ob sich die Bindungseigenschaften bei Verwendung eines 30mers weiter verbessern ließen, bliebe noch zu untersuchen.

Um zu untersuchen, ob die Komplexbildung zwischen **DB7** und DNMT1 auch bei gleichzeitiger Anwesenheit eines großen Überschusses an normalem, hemimethyliertem Substrat möglich wäre, wurde das Enzym zunächst für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen des 30mers **DS4** inkubiert (Abbildung 4.13 a). Dann wurde der Inhibitor Dumbbell **DB7** zugegeben und die Inkubation für eine Stunde fortgesetzt. Wie auf dem anschließenden Gel zu sehen ist, wurde die Komplexbildung auch bei einem in Relation zum Inhibitor gesehen 50fachen Überschuss an hemimethyliertem Substrat nicht im Geringsten beeinträchtigt (Abbildung 4.13 b).

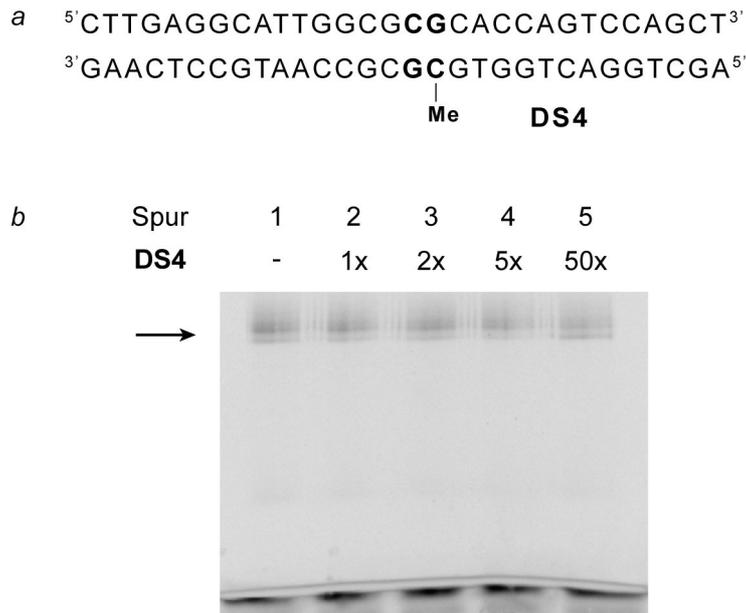


Abbildung 4.13: Komplexbildung von DNMT1 und **DB7** bei Anwesenheit eines konkurrierenden hemimethylierten 30mers (**DS4**). a Sequenz des Konkurrenzstrangs **DS4**. Das hemimethylierte Zielmotiv ist fett hervorgehoben. b Spur 1: Positivkontrolle, nur **DB7**; Spuren 2 - 5: 1-, 2-, 5- und 50facher Überschuss an **DS4**. Pfeil: Enzym-DNA Komplex.

Im Folgenden sollte die Stabilität des Enzym-DNA Komplexes genauer untersucht werden. Hierzu wurde die Frage gestellt, ob der einmal an das Protein gebundene Dumbbell **DB7** durch ein anderes Substrat wieder verdrängt werden könnte - im Fall einer tatsächlich gebildeten kovalenten Bindung dürfte dies nicht möglich sein. Eine Reaktionslösung mit DNMT1 und **DB7** wurde deshalb nach einer Stunde Inkubationszeit mit einem zehnfachen und einem fünfzigfachen Überschuss des Inhibitor Dumbbells **DB1** versetzt. Dieser weist dieselbe Sequenz wie **DB7** auf und enthält ebenfalls die Inhibitorbase 5-Aza-dC, trägt jedoch keine Fluoreszenzmarkierung. Die Bindungseigenschaften von **DB7** und **DB1** sollten also weitgehend identisch sein. Für den Fall, dass die oben beobachtete Komplexbildung nicht auf einer kovalenten Bindung zwischen Protein und DNA beruht, sollte die Intensität der entsprechenden Bande bei Zugabe von nicht-fluoreszierendem Substrat geschwächt werden. Dies konnte jedoch auch bei einem fünfzigfachen Überschuss an **DB1** nicht beobachtet werden (Abbildung 4.14 a).

4 Dumbbell Inhibitoren

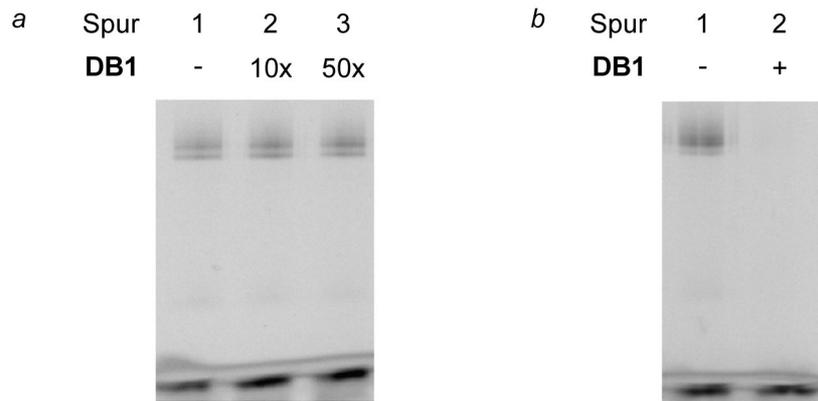


Abbildung 4.14: Versuche der Verdrängung des Inhibitors aus dem Enzym-DNA Komplex. *a* Spur 1: Positivkontrolle, DNMT1-**DB7** Komplex; Spuren 2, 3: Zugabe von 10- und 50fachem Überschuss **DB1** zum DNMT1-**DB7** Komplex; *b* Spur 1: Positivkontrolle, DNMT1-**DB7** Komplex; Spur 2: Zugabe von **DB7** zu DNMT1 nach vorheriger Inkubation mit **DB1**.

Das invers durchgeführte Experiment bestätigte diese Beobachtung noch einmal. Hierbei wurde DNMT1 zunächst für eine Stunde mit **DB1** inkubiert, dann wurde **DB7** zugegeben und die Inkubation für eine weitere Stunde fortgesetzt; auf dem Gel konnte in diesem Fall kein Enzym-DNA Komplex mehr detektiert werden. Die Methyltransferase war hier also bei Zugabe von **DB7** mit dem nicht-fluoreszierenden Dumbbell vollständig und vor allem irreversibel abgesättigt und konnte somit keinen weiteren Inhibitor mehr binden (Abbildung 4.14 *b*, Spur 2). Wurde **DB1** während der ersten Stunde der Inkubation weggelassen, konnte **DB7** problemlos binden und die bekannte Bande auf dem Gel erzeugen (Spur 1, Positivkontrolle).

Neben **DB7** konnten auch mit dem zweifach fluoreszenz-markierten Dumbbell **DB4** sowie mit den einfachen Doppelsträngen **DS2** und **DS3** erfolgreiche EMSA Studien durchgeführt werden. In sämtlichen Fällen kam es zu einer Bindung der DNA Inhibitoren zu der humanen Methyltransferase DNMT1, während die entsprechenden Referenzstränge keine Reaktion zeigten (*Ergebnisse nicht abgebildet*).

Die vorgestellten Ergebnisse belegen die Funktionalität der synthetisierten DNA Dumbbell Konstrukte durch die Bildung stabiler Enzym-DNA Komplexe aufgrund einer kovalenten Bindung zwischen dem Inhibitor und dem Zielenzym, DNMT1. Im Anschluss sollten nun geeignete Experimente etabliert werden, die es erlauben würden, die tatsächliche Inhibierung der Methylierungsaktivität der Methyltransferasen durch die Dumbbell Inhibitoren nachzuweisen.

4.3.2 Restriktions-Schutzassays

Wie in der Einführung bereits erwähnt, ist die DNA Methylierung in Prokaryoten Bestandteil einer Art primitiven Immunsystems zur Abwehr viraler Fremd-DNA. Dabei wird die eigene DNA des Organismus durch Methylierung vor dem Verdau durch zelleigene Restriktionsenzyme geschützt, während unmethylierte, fremde DNA als solche erkannt, abgebaut und somit unschädlich gemacht wird.^[44, 45] Zu jeder Methyltransferase existiert deshalb ein entsprechendes Restriktionsenzym mit derselben DNA Erkennungssequenz; liegt diese methyliert vor, kann sie vom Restriktionsenzym nicht geschnitten werden, und umgekehrt. Dieses Prinzip kann man sich nun zunutze machen, um die Aktivität von Methyltransferasen zu überprüfen: Zunächst inkubiert man DNA, welche die entsprechenden Zielmotiven aufweist, mit der Methylase, und anschließend wird die Probe einem Verdau durch das passende Restriktionsenzym unterworfen. Durch die Analyse auf einem Polyacrylamidgel lässt sich leicht überprüfen, ob die Test-DNA noch intakt ist, also zuvor vollständig methyliert wurde, oder ob sie zu Fragmenten abgebaut wurde, also nicht oder nur teilweise methyliert vorlag. So kann auch leicht ermittelt werden, ob ein potenzieller Methylase Inhibitor in der Lage ist, das Enzym vollständig zu inaktivieren und die Methylierungsreaktion zu unterdrücken; der eingesetzte DNA Strang muss bei der erfolgreichen Inhibierung vollständig vom Restriktionsenzym abgebaut werden.

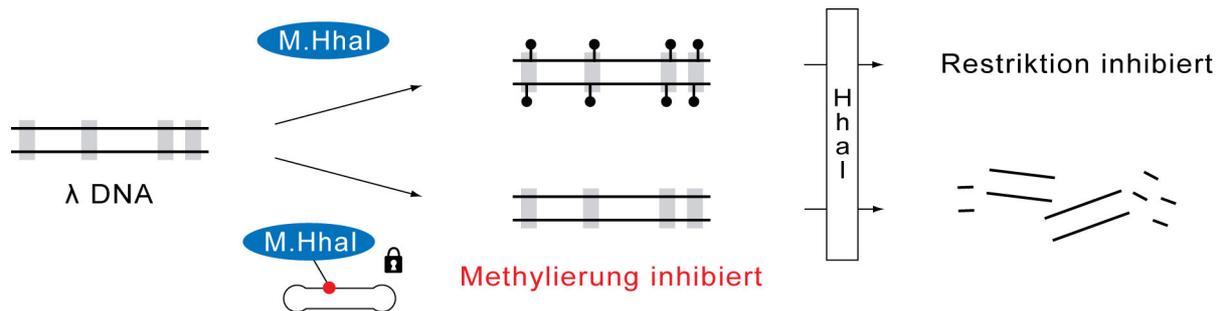
Neben einer geeigneten DNA Sequenz muss nun für jede Methylase auch eine passende Endonuklease ausgewählt werden.

4.3.2.1 Bakterielle Methyltransferasen (*M.HhaI*, *M.SssI*)

Bei den Experimenten mit den bakteriellen Methyltransferasen fällt die Wahl der Test-DNA wie auch der geeigneten Endonuklease leicht, da die Hersteller die Enzyme über die eben beschriebenen Restriktions-Schutzassays charakterisieren. Im Fall von *M.HhaI* (methyliert das erste Cytidin seiner Erkennungssequenz 5'-GCGC-3') definiert der Hersteller *New England Biolabs* beispielsweise eine *unit* des Enzyms als die Menge, die benötigt wird, um 1 µg DNA der Phage λ innerhalb einer Stunde bei 37 °C vor der Restriktion durch *HhaI* Endonuklease (Erkennungssequenz 5'-GCG'C-3') zu schützen. Für die Überprüfung der Aktivität

von M.SssI (Erkennungssequenz 5'-CG-3') wird nach dem gleichen Muster das Restriktionsenzym BstUI eingesetzt (Erkennungssequenz 5'-CG'CG-3').^[369]

Schema 4.11 zeigt das Prinzip des Restriktions-Schutzassays zur Prüfung der Aktivität der Dumbbell Inhibitoren anhand des Systems M.HhaI/HhaI. Wenn der Dumbbell Inhibitor aktiv ist und die Methyltransferase quantitativ und irreversibel bindet, kann diese die λ DNA nicht mehr methylieren, und es kommt zum Restriktionsverdau durch die Endonuklease HhaI.



Schema 4.11: Überprüfung der Aktivität der Inhibitor Dumbbells durch Restriktions-Schutzassays am Beispiel des Systems M.HhaI/HhaI. Die aktive Methylase schützt λ DNA durch Methylierung der 5'-GCGC-3' Motive vor der Restriktion durch HhaI (*oben*). Das erfolgreich inhibierte Enzym kann diese Aufgabe nicht mehr wahrnehmen, die Test-DNA wird abgebaut (*unten*). *Grau:* HhaI Erkennungssequenz; *Schwarze Kreise:* 5-Me-dC; *Roter Kreis:* 5-Aza-dC.

Abbildung 4.15 zeigt die Ergebnisse der Restriktions-Schutzassays von M.HhaI und M.SssI bei Verwendung des Inhibitors **DB7** bzw. der zugehörigen Referenzstränge **DB8** und **DB9**. Beide Methyltransferasen konnten durch **DB7** vollständig inhibiert werden und zeigten folglich keinerlei Methylierungsaktivität mehr, während mit den Kontrollen **DB8** und **DB9** wie gewünscht keinerlei Effekt beobachtet wurde.

Die Methylase wurde hierbei zunächst für 75 min mit den Dumbbell Konstrukten inkubiert, dann wurde λ DNA zugegeben und die Reaktion für 1 h fortgesetzt. Nach dem anschließenden Restriktionsverdau wurden die Reaktionen auf denaturierendem Polyacrylamidgel analysiert (*Spuren 1 - 3* und *7 - 9*). Bei vorheriger Inkubation mit dem aktiven Inhibitor Dumbbell **DB7** zeigen sowohl M.HhaI wie auch M.SssI keinerlei Methylierungsaktivität mehr, und die λ DNA wird bei der Restriktion vollständig abgebaut (*Spuren 1, 7*). Diese Bild entspricht exakt dem bei völliger Abwesenheit einer Methylase (*Spuren 5, 11*). Die Referenzstränge zeigen hingegen keine Wirkung, die λ DNA wird methyliert und folglich nicht mehr verdaut, so, als wären überhaupt keine Dumbbells anwesend gewesen (vergleiche *Spuren 2, 3* und *4*

bzw. 8, 9 und 10). Um sicherzugehen, dass der Inhibitor **DB7** keine hemmende Wirkung auf die Restriktionsenzyme hat, wurden die Reaktionen außerdem bei Anwesenheit des Dumbbell Inhibitors, aber Abwesenheit der Methyltransferase durchgeführt; die Test-DNA wurde aber wie erwartet problemlos von den Endonukleasen verdaut (*Spuren 6, 12*).^[361]

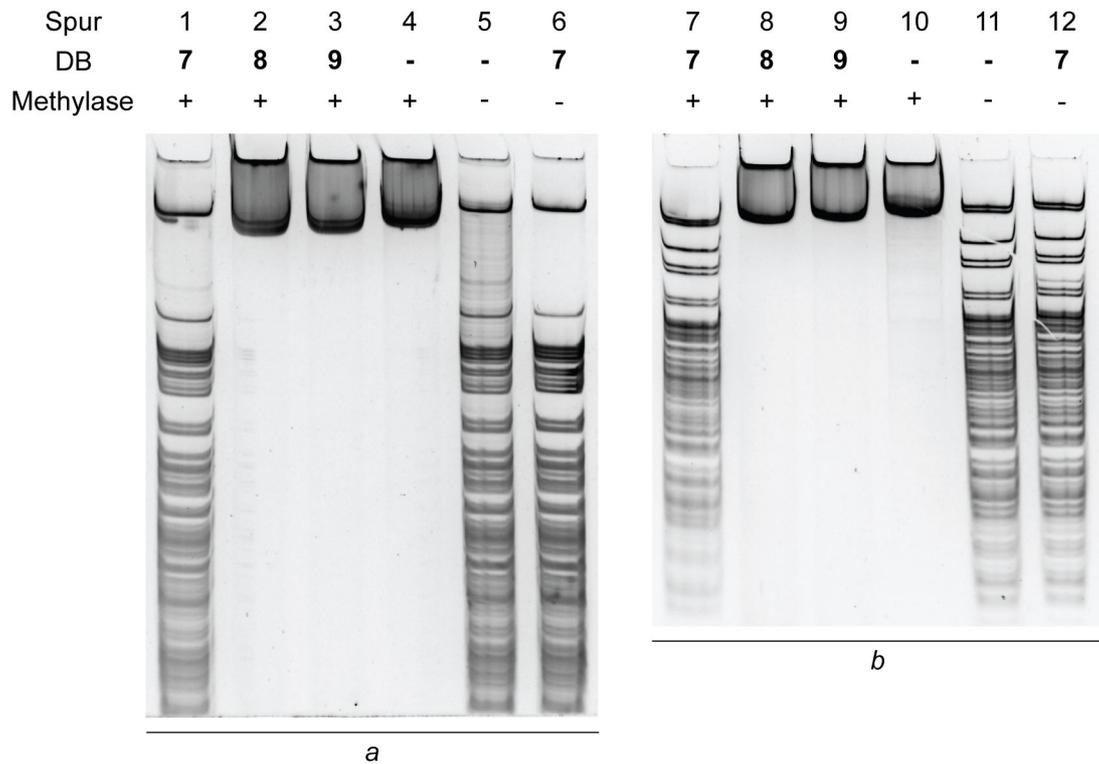


Abbildung 4.15: Restriktions-Schutzassays der bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI (a) und M.SssI (b) mit den Dumbbells **DB7**, **DB8** und **DB9**. Die Enzyme wurden bei 37 °C für 75 min mit den Dumbbells inkubiert, dann für 4 h mit λ DNA, gefolgt von 1 h Restriktionsverdau mit HhaI (a) bzw. BstUI (b). *Spuren 1, 7:* aktiver Dumbbell, **DB7**; *Spuren 2, 3, 8, 9:* Kontrolldumbbells **DB8** und **DB9**; *Spuren 4, 5, 10, 11:* Kontrollen ohne Dumbbells; *Spuren 6, 12:* Kontrolle der Wirkung von **DB7** auf die Restriktionsenzyme.

Mit den zweifach fluoreszenzmarkierten Konstrukten **DB4** - **6** wurden absolut identische Ergebnisse erhalten Auch **DB4** konnte die Methylierungsaktivität der bakteriellen Methylasen vollständig inhibieren, während die Referenzstränge keinen Effekt zeigten (*Ergebnisse nicht abgebildet*).

4.3.2.2 Humane DNA Methyltransferase (DNMT1)

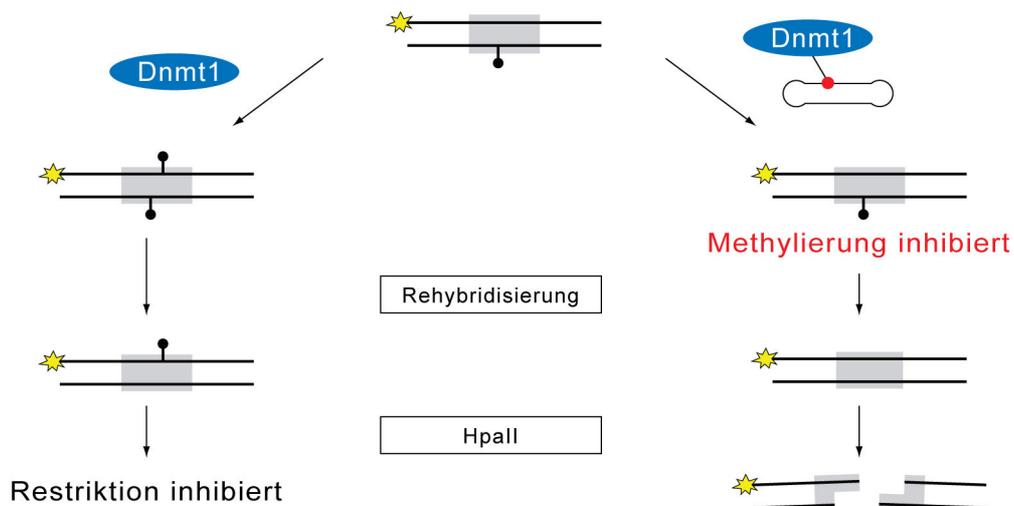
Das entsprechende Experiment mit der humanen Methyltransferase gestaltete sich etwas aufwändiger als das der bakteriellen Enzyme. Das Problem besteht hier darin, dass DNMT1 hemimethylierte Zielmotive, $d(C^{Me}pG):d(GpC)$, benötigt, so dass beispielsweise λ DNA nicht mehr als Substrat eingesetzt werden kann. Die Aktivität

von DNMT1 wurde bzw. wird deshalb meist durch den Einsatz von Tritium-markiertem Kofaktor (SAM) bestimmt, indem die Radioaktivität eines kurzen synthetischen, hemimethylierten Doppelstranges nach der Methylierungsreaktion (Übertragung von $\text{CH}_2(^3\text{H})^+$) ermittelt wird.^[61, 62, 110] Diese Methode ist natürlich sehr arbeitsaufwändig und bedarf einer Besonderen experimentellen Infrastruktur (Radiolabor etc.), die dem Autor nicht zur Verfügung stand.

Zunächst wurde deshalb der Ansatz verfolgt, einen Restriktions-Schutzassay mit synthetischen, hemimethylierten DNA Strängen aufzubauen, der den Einsatz radioaktiver Reagenzien überflüssig machen würde. Dies brachte jedoch das Problem mit sich, dass bislang kein methylierungssensitives Restriktionsenzym bekannt ist, das nur hemimethylierte CpG Einheiten schneidet, und vollständig methylierte nicht. Für einige wenige Enzyme wie *Ascl* (5'-GG'CGCGCC-3'), *BssHII* (5'-G'CGCGC-3') oder *SacII* (5'-GG'CGGG-3') wurde zwar eine Differenzierung von hemimethylierten und vollständig methylierten Erkennungssequenzen beschrieben,^[369] dies konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden. Meistens war lediglich eine vage Präferenz zur Restriktion des hemimethylierten Stranges zu erkennen. *BssHII* wurde beispielsweise bei einem beidseitig methylierten Zielmotiv (5'-G'C^{Me}GCGC-3') vollständig blockiert, konnte aber bei Methylierung nur eines Stranges lediglich 50 % der DNA schneiden, wobei sich die Reaktionsbedingungen nicht weiter optimieren ließen. Für einen Restriktions-Schutzassay nach dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Muster wäre aber eine 100%ige Blockierung bzw. ein 100%iger Abbau notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Somit musste ein kleiner Umweg beschritten werden, der in einem kürzlich erschienenen Bericht von *Valinluck* beschrieben worden war.^[257] Hierbei wurde ein hemimethylierter 27mer Doppelstrang eingesetzt, wobei der nicht-methylierte Einzelstrang durch einen radioaktiven (³²P)-Phosphatrest markiert worden war. Nach der Methylierungsreaktion wurde ein 250facher Überschuss des komplementären, nicht-methylierten Gegenstrangs zugegeben und rehybridisiert. Bei zuvor erfolgter Methylierungsreaktion erhielt man nun einen hemimethylierten Doppelstrang, andernfalls trug die rehybridisierte DNA keinen Methylrest. In ersterem Fall konnte der Strang anschließend nicht mehr durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym *HpaII* (5'-C'CGG-3') geschnitten werden, da dieses bereits durch eine Hemimethylierung der Erkennungssequenz blockiert wird. Bei nicht stattgefundenener Methylierungsreaktion kam es hingegen zum Restriktionsverdau. Es

ist bei diesem Assay hervorzuheben, dass nur eine sehr geringe Menge DNA eingesetzt werden kann, wenn sichergestellt werden soll, dass durch aktives DNMT1 eine vollständige Methylierung stattfindet. Bei Verwendung von 12 U DNMT1 konnten in 5 h bei 37 °C lediglich 10 pmol DNA umgesetzt und gegen die Restriktion geschützt werden. Durch sehr sorgfältiges Arbeiten und einige Modifikationen der Vorschrift gelang es dabei, anstelle der unerwünschten radioaktiven Markierung eine herkömmliche Fluoreszein-Markierung zu verwenden. Schema 4.12 zeigt das Prinzip dieses Restriktions-Schutzassays für DNMT1 im Überblick.



Schema 4.12: Überprüfung der Aktivität der Inhibitor Dumbbells durch Restriktions-Schutzassays im Fall der humanen Methyltransferase DNMT1. Bei einem aktiven Enzym erhält man nach Rehybridisierung einen hemimethylierten Strang, der von HpaII nicht mehr geschnitten werden kann (*links*). Die erfolgreiche Inhibition der Methylase durch einen Inhibitor Dumbbell führt hingegen zum Restriktionsverdau des Test-Strangs (*rechts*). Grau: HpaII Erkennungssequenz; Schwarze Kreise: 5-Me-dC; Sterne: Fluoreszein; Roter Kreis: 5-Aza-dC.

Abbildung 4.16 zeigt die Effekte der Dumbbells **DB7-9** auf die Methylierungsaktivität der humanen Methyltransferase DNMT1. Hierbei wurde die Methylase zunächst für gut eineinhalb Stunden mit den Dumbbell Konstrukten inkubiert und anschließend mit dem Doppelstrang **DS5** (Abbildung 4.16 a) versetzt. Nach fünf Stunden wurde der Doppelstrang mit dem zu **SS11** komplementären, nicht-methylierten Einzelstrang **SS13** rehybridisiert und nach verschiedenen Zwischenschritten einem Restriktionsverdau mit HpaII unterworfen. Wie schon im Fall der bakteriellen Enzyme konnte der Inhibitor Dumbbell **DB7** auch die Methylierungsaktivität der humanen Methyltransferase DNMT1 vollständig inhibieren (Abbildung 4.16 b).^[361]

4 Dumbbell Inhibitoren

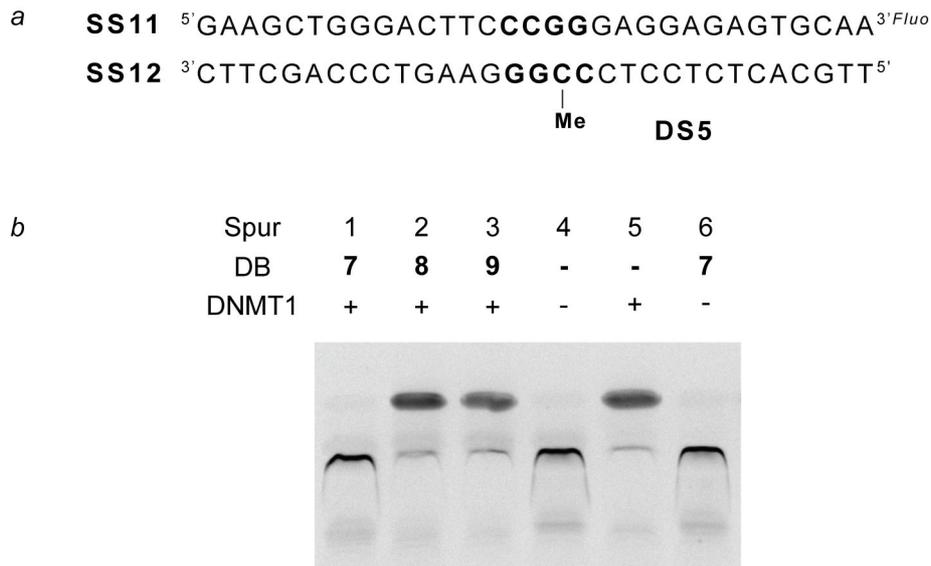


Abbildung 4.16: Restriktions-Schutzassay der humanen Methyltransferase DNMT1 mit den Dumbbells **DB7 - 9**. Das Enzym wurde bei 37 °C für 100 min mit den Dumbbells inkubiert, dann für 5 h mit der Test-DNA (*a*, **DS5**), gefolgt von 1 h Restriktionsverdau HpaI. *Spur 1*: aktiver Dumbbell, **DB7**; *Spuren 2, 3*: Kontrolldumbbells **DB8** und **DB9**; *Spuren 4, 5*: Kontrollen ohne Dumbbells; *Spur 6*: Kontrolle der Wirkung von **DB7** auf das Restriktionsenzym. Fluo = Fluoreszenzmarkierung.

Bei vorheriger Inkubation der Methyltransferase mit dem Konstrukt **DB7** ergibt sich auf dem Gel dasselbe Bild wie bei vollständiger Abwesenheit des Enzyms, und der Doppelstrang wird vollständig geschnitten (vergleiche *Spuren 1* und *4*). Die Referenzstränge **DB8** und **DB9** haben hingegen wie gewünscht keinen Einfluss auf die Methylierungsaktivität von DNMT1 und ermöglichen den vollständigen Schutz des 31mers gegen den Restriktionsverdau (vergleiche *Spuren 2, 3* und *5*). Auch hier wurde sichergestellt, dass der aktive Dumbbell **DB7** keine inhibierende Wirkung auf das Restriktionsenzym HpaI ausübt (*Spur 6*).

Nach diesen vielversprechenden *in vitro* Experimenten, bei denen die inhibierende Wirkung des Dumbbell Konstrukts **DB7** auf die bakteriellen Enzyme M.HhaI und M.SssI sowie auf die humane *maintenance* Methyltransferase DNMT1 aufgrund einer stabilen, vermutlich kovalenten Bindung gezeigt werden konnte, sollten die Untersuchungen nun auf lebende Zellen ausgeweitet werden.

4.4 *In vitro* Untersuchungen II: Zellassays

Um die Wirkung der synthetisierten Konstrukte in Säugetierzellen zu testen, sollten die DNA Dumbbells mit Hilfe eines Transfektionmittels in HCT116 Darmtumorzellen eingeschleust werden. Dabei sollten durch Konfokale *laser-scanning* Mikroskopie sowohl die Transfektion der fluoreszenz-markierten Stränge in die Zellen, wie auch das weitere Vordringen der DNA in die Zellkerne überprüft werden. Nach der Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode und der Lokalisation im Kern sollten die Effekte der Dumbbells auf die Zellproliferation sowie auf die genomischen Methylierungsmuster der Tumorzellen ermittelt werden. Außerdem sollte im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Leonhardt*^[370] versucht werden, mittels Fluoreszenzmikroskopie die Interaktion der Inhibitor Konstrukte mit DNMT1 direkt in der Zelle zu verfolgen.

4.4.1 Kolokalisation von DB7 und DNMT1 in Säugetierzellen

Um die Interaktion der synthetisierten Konstrukte mit DNMT1 in Säugetierzellen zu untersuchen, wurde die Inhibitor DNA von *Schermelleh* (Arbeitsgruppe *Leonhardt*)^[370] in einem modellhaften Experiment in C2C12 Mäusemyoblasten transfiziert; die humane Methyltransferase DNMT1 und die von Mäusen sind sich sehr ähnlich.^[60, 61] Nach der Transfektion mit HiPerFect (*Qiagen*) konnten die DNA Hanteln fluoreszenzmikroskopisch im Zellkern lokalisiert werden. Bemerkenswerterweise konnte in den Mäusezellen auch nach längerer Behandlung keine offensichtliche Toxizität festgestellt werden. 16 h nach der Transfektion des aktiven Inhibitors **DB4** (gleiche Sequenz wie **DB7**, aber zwei Cy3 Markierungen) konnte das endogene DNMT1 der C2C12 Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass der Inhibitorstrang in den Kernen von S-Phasenzellen mit DNMT1 an Stellen aktiver Replikation kolokalisiert (Abbildung 4.17 a). Die Methyltransferase wird ihrerseits über eine PCNA Bindestelle zu den Replikationsgabeln rekrutiert, wo sie das Methylierungsmuster während der Replikation aufrecht erhält.^[64, 77] Wurden die DNA-Hanteln direkt in Zellkerne mikroinjiziert, wurde eine Kolokalisation mit DNMT1 in Zellen in der S-Phase schon nach einer Stunde festgestellt. Die Kontrollstränge ohne 5-Aza-dC, **DB5** und **DB6**,

zeigten hingegen kein solches Verhalten und blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum diffus über den Zellkern verteilt (Abbildung 4.17 b).

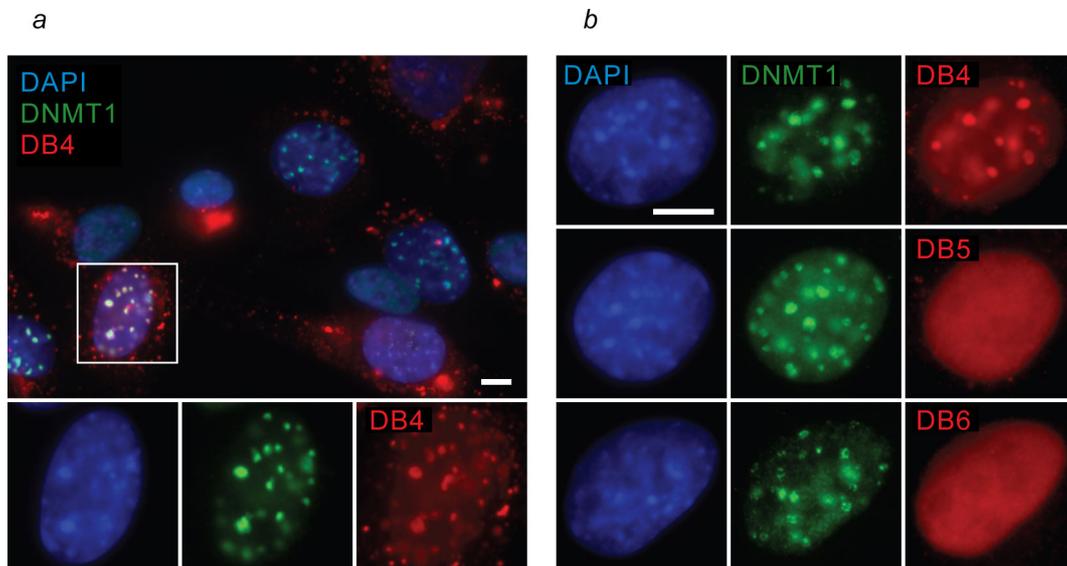


Abbildung 4.17: Behandlung von C2C12-Myoblasten mit den Dumbbells **DB4 - 6** (rot). Nach Fixieren der Zellen mit Formaldehyd wurde endogenes DNMT1 mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (grün) und DNA mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. a Transfektion von **DB4** mit HiPerFect. Der Zellkern im Kasten ist unten vergrößert dargestellt; b C2C12 Zellkerne 1 h nach der Mikroinjektion der Dumbbell Konstrukte. **DB4** kolokalisiert mit DNMT1 an Stellen, an denen auch DNA Replikation stattfindet, während **DB5** und **DB6** diffus im Zellkern verteilt bleiben. Weiße Balken: 5 mm.

Schermelleh et al. konnten somit die Interaktion der Inhibitor DNA im Zellkern von Säugetierzellen direkt fluoreszenzmikroskopisch visualisieren. Damit konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Konstrukte nicht nur isolierte, rekombinante Methyltransferasen „im Reagenzglas“ binden können, sondern DNMT1 auch in der lebenden Zelle adressieren.^[361]

4.4.2 Transfektion der Dumbbells in HCT116 Zellen

Um die Auswirkungen der Dumbbell Konstrukte auf humane Tumorzellen untersuchen zu können, musste eine geeignete Transfektionsmethode gefunden werden, mit der die DNA in den Zellkern eingeschleust werden kann. Nach mehreren Versuchen gelang es schließlich Manetto (Arbeitsgruppe Carell), die Dumbbells mit Hilfe eines kationischen Lipids (Transfectin, Bio-Rad) in guten Ausbeuten in HCT116 Zellen zu transfizieren.^[371] Während der Hersteller für diese Zelllinie eine optimale Zelldichte von 70 - 80 % angab, gelang die Transfektion der Dumbbell Konstrukte

bereits bei etwa 10 - 20 % Konfluenz in ausreichendem Maße.^[372] Interessanterweise war es für den Erfolg der Transfektion maßgeblich, dass die Dumbbells geschlossen und zu einem zirkularen Strang ligiert waren; die nicht-ligierten Konstrukte wurden unter den getesteten Bedingungen nicht in die Zellen eingeschleust. Der Eintritt der DNA in die Zellen wurde stets fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Darüber hinaus konnte durch Konfokale *laser-scanning* Mikroskopie sichergestellt werden, dass die Inhibitoren tatsächlich bis in den Zellkern vordrangen. Abbildung 4.18 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Transfektion von **DB6** 48 h Stunden nach Zugabe der Transfektionslösung zu den Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass sich die transfizierte DNA in den Zellkernen konzentriert und kaum noch im Zytoplasma zu finden ist.

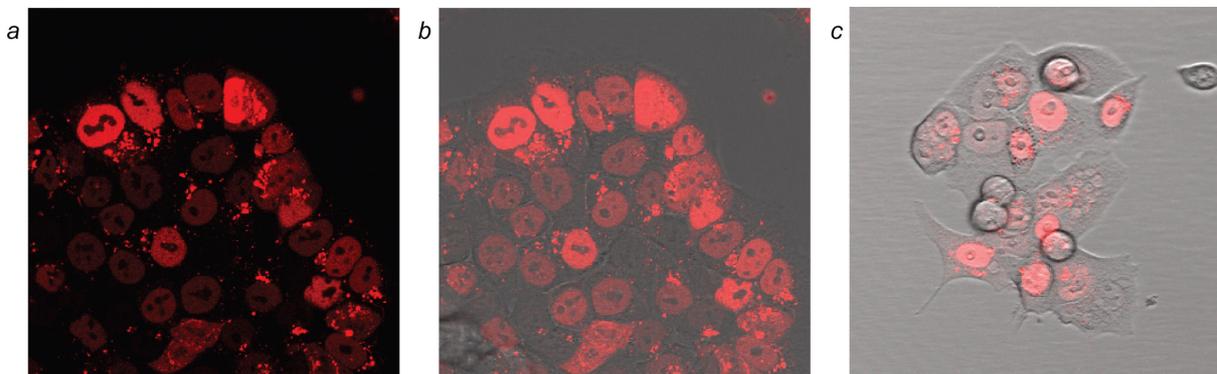


Abbildung 4.18: Transfektion von **DB6** in humane HCT116 Darmtumorzellen. 1 μ M DNA wurden in einem Volumen von 1 mL mit 10 μ L Transfectin Transfektionsmittel 30 min bei RT inkubiert und dann zu den Zellen in 5 mL Medium gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt und die Transfektion fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. a Nur Cy3 Kanal; b Überlagerung Cy3 Kanal und Durchlichtkanal der Aufnahme von (a); c Vergrößerung einer weiteren Cy3-Durchlicht Aufnahme.

Die Zellen wurden stets über Nacht (etwa 16 h) mit der Transfektionslösung inkubiert und dann mit frischem Medium versorgt. Während die DNA zu diesem Zeitpunkt ungleichmäßig im Zytoplasma zu finden war, ließ sich eine gleichmäßige Verteilung der Konstrukte in den Zellkernen meist erst nach weiteren 24 h beobachten (siehe Abbildung).

4.4.3 Auswirkungen der Dumbbells auf die Proliferation von HCT116 Zellen

Nach der Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode sollte nun die Wirkung der Dumbbell Konstrukte auf die Proliferation von HCT116 untersucht werden. Im Idealfall würde der Inhibitor Dumbbell hierbei die zelluläre Methyltransferase

irreversibel binden und inaktivieren, was in der Folge zur Demethylierung von fehlerhaft hypermethylierten Genpromotoren führen würde. Durch die hiermit verbundene Re-Expression von Tumorsuppressorgenen sollten die Kontrollmechanismen der Zellen wieder greifen, die bei einem unkontrollierten Wachstum die Zellteilung stoppen und die Apoptose der Tumorzellen einleiten. Für HCT116 Zellen wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass das Ausschalten bzw. die Inhibierung von DNMT1 ein verringertes Wachstum zur Folge hat.^[9, 283, 288]

Für den Proliferationsassay wurden in 96-*well* Platten je 2500 HCT116 Zellen pro *well* in 100 µL Medium eingesät und an Tag 1 und Tag 3 nach der Einsaat wie im vorigen Abschnitt beschrieben mit den DNA Konstrukten **DB7**, **DB8** und **DB9** transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit dem Transfektionsreagenz versetzt wurden. Am ersten sowie am zweiten Tag nach der zweiten Transfektion wurde mit Hilfe des WST-1 Zellproliferationsreagenz (*Roche Applied Science*) die Zellviabilität ermittelt. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalses WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen zu wasserlöslichem Formazan, wobei die Menge an gebildetem Produkt direkt mit der vorhandenen Anzahl an gesunden, metabolisch aktiven Zellen korreliert. Durch die Quantifizierung des Formazans mit einem *multiwell* Spektrophotometer (*ELISA Reader*) können somit Aussagen über das Zellwachstum gemacht werden.^[373]

Abbildung 4.19 zeigt die durch den WST-1 Assay ermittelten Auswirkungen der DNA Konstrukte **DB7 - 9** auf die Zellproliferation von HCT116 Zellen. Die Ergebnisse sind prozentual in Relation zur Negativkontrolle angegeben, die auf den Wert 100 gesetzt wurde. Alle drei Dumbbell Konstrukte führten, bezogen auf die ausschließlich mit Transfectin behandelten Zellen, zu einer Reduktion der Zellproliferation. Am zweiten Tag nach der zweiten Transfektion (Tag 4 nach der ersten Transfektion bzw. Tag 5 nach der Einsaat) war aber ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Strängen zu sehen: während der Wert für den CpG-freien Strang (**DB9**) im Rahmen der Fehlergrenzen noch in etwa dem des Vortages entsprach (56 %), hatte das Zellwachstum bei der Anwendung des aktiven Konstrukts **DB7** bis auf knapp 12 % abgenommen. Die Zugabe des hemimethylierten Dumbbells ohne 5-Aza-dC, **DB8**, führte zu einer Reduktion auf 22 % des Wertes der Kontrollzellen. Damit zeigte der aktive Inhibitor Dumbbell **DB7** den mit Abstand größten Effekt auf das Wachstum von HCT116 Darmtumorzellen.

4 Dumbbell Inhibitoren

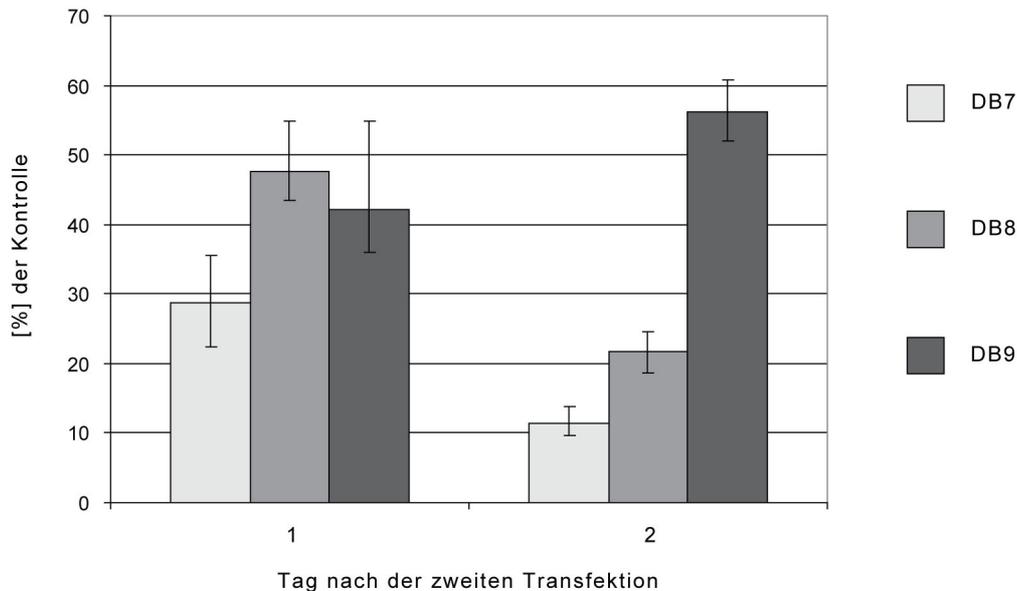


Abbildung 4.19: Auswirkung der Dumbbells **DB7 – 9** auf die Proliferation von HCT116 Darmtumorzellen. Die Konstrukte wurden über einen Zeitraum von insgesamt fünf Tagen zweimal transfiziert. Nach einem bzw. zwei Tagen nach der zweiten Transfektion wurde durch einen WST-1 Assay die Zellviabilität ermittelt. Die Werte sind prozentual in Bezug auf die Negativkontrolle (ausschließlich mit Transfectin behandelte Zellen) angegeben.

Warum auch mit den Referenzsträngen, sogar mit dem Konstrukt ohne CpG Einheiten (**DB9**), ein Rückgang des Zellwachstums um 50 % und mehr beobachtet werden konnte, darüber kann nur spekuliert werden. Natürlich stellt das Einschleusen von Fremd-DNA und dem damit verbundenen kationischen Lipid prinzipiell eine starke Belastung für die Zellen dar, und lediglich die Zugabe des Transfektionsmittels bewirkte bereits eine deutliche Verminderung des Zellwachstums im Vergleich zu völlig unbehandelten Zellen. Zudem muss auch der Fluoreszenzbaustein der Dumbbell Konstrukte (an Thymidin gebundenes Cy3), der früher oder später beim Abbau der DNA durch Nukleasen freigesetzt wird, von der Zelle verarbeitet und entsorgt werden. Letztendlich ist es auch möglich, dass es neben einer Wechselwirkung der Dumbbells mit dem zellulären Methylierungssystem zu unvorhergesehenen Interaktionen mit anderen Proteinen kommen kann, die ihrerseits ebenfalls das Zellwachstum beeinflussen. Wie eingangs bereits erwähnt, können Dumbbellstrukturen beispielsweise gut an bestimmte Transkriptionsfaktoren binden. Die beobachteten Effekte der Dumbbells auf die Zellproliferation müssen somit nicht ausschließlich auf einer Wechselwirkung mit den zellulären Methylierungsmechanismen beruhen.

Um die Auswirkungen der Inhibitoren auf die Methylierungsmaschinerie der Zelle näher zu untersuchen, sollte im Folgenden der Effekt der Dumbbells auf den globalen genomischen Methylierungsgrad ermittelt werden.

4.4.4 Auswirkungen der Dumbbells auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen

Um festzustellen, ob die Dumbbell Konstrukte DNMT1 in den Zellen nicht nur binden, sondern in signifikanter Weise inhibieren können, sollte die Wirkung der Inhibitoren auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Darmtumorzellen untersucht werden. Durch die Inaktivierung von DNMT1 durch beispielsweise 5-Aza-dC ist es möglich, den Gehalt an 5-Me-dC im Genom von Säugetierzellen im Verlauf mehrerer Replikationszyklen drastisch zu verringern. Diese passive Demethylierung findet unter anderem auch in den hypermethylierten Promotorregionen von inaktivierten Genen statt und führt in der Folge zu deren Re-Expression. Mit Hilfe elaborierter, meist sehr arbeitsaufwändiger Methoden (z. B. methylierungsspezifische PCR, MS-PCR)^[188] kann man die lokalen Veränderungen im Methylierungsmuster bestimmter Gensequenzen verfolgen, die jedoch vom Zelltyp wie auch vom verwendeten Nukleosidinhibitor abhängen. Die Ermittlung des Gesamtgehalts an 5-Me-dC in der genomischen DNA (*globaler* Methylierungsgrad) ermöglicht hingegen einen leicht zugänglichen, umfassenden Überblick über den Methylierungsstatus des kompletten Genoms.^[219]

4.4.4.1 Etablierung eines Assays zur Ermittlung des genomischen 5-Me-dC Gehalts

Die etablierten analytischen Methoden zur Ermittlung des genomischen 5-Me-dC Gehalts beruhen meistens auf dem vollständigen Abbau der genomischen DNA und der anschließenden Quantifizierung der erhaltenen einzelnen Bausteine, wobei sowohl beim Verdau wie bei der Analyse des daraus hervorgehenden Gemischs verschiedene Strategien zur Anwendung kommen können. Die DNA kann enzymatisch oder chemisch bis zu den Nukleosid-Monophosphaten oder aber bis zu den reinen Nukleosiden abgebaut werden, die dann entweder per HPLC oder durch Kapillarelektrophorese (CE) voneinander getrennt und quantifiziert werden.^[194, 196, 208, 374-377] Lyko und Mitarbeiter beschrieben weiterhin die

nachträgliche Fluoreszenzmarkierung der Nucleoside, was in Verbindung mit einer Analytik per CE eine sehr hohe Empfindlichkeit und somit den Einsatz sehr geringer DNA Mengen ermöglichen sollte.^[378, 379] Aufgrund entsprechender Berichte in der Literatur sollte die DNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit enzymatisch zu den einfachen Nucleosiden abgebaut werden; dieser Weg schien die wenigsten Nebenreaktionen und die sauberste Analytik zu ermöglichen.

Der 5-Me-dC Gehalt wird dabei prozentual bezogen auf die Gesamtmenge an Cytidin in der DNA angegeben:

$$dC^{Me} [\%] = \frac{A(dC^{Me})}{A(dC^{Me}) + A(dC)} \times 100$$

Gleichung 4.1: Berechnung des 5-Me-dC Gehalts. A = Integral des Signals im HPLC Chromatogramm bzw. Elektroferogramm.

Detektion der Nucleoside durch Kapillarelektrophorese

Für die Auftrennung des Nucleosidgemischs wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit zunächst die Kapillarelektrophorese verwendet. Der größte Vorteil dieser Analytikmethode erwies sich hier jedoch auch als ihr größter Nachteil: durch die komplexe Herkunft des Analyten (Extraktion der DNA aus dem Zelllysat; Aufreinigung durch *spin columns* und Ethanol-Fällung, schrittweiser Verdau durch drei verschiedene Nucleasen) war es schwierig, einwandfreie Elektroferogramme ohne störende Nebensignale zu erhalten. Doch auch wenn nur die gewünschten fünf Signale (dC, dC^{Me}, dG, dA und T) zu sehen waren, war der Fehler auf deren Integrale erheblich und ließ keine aussagekräftigen Ergebnisse zu. Für dieselbe DNA Probe aus HCT116 Zellen schwankte der dC^{Me} Gehalt bei mehreren Läufen auf der CE etwa zwischen 2 und 6 % bei einem Sollwert von etwa 4 %.^[265, 283] Der Grund lag in einem stets relativ kleinen dC^{Me}-Signal, ein Problem, das sich natürlich noch vergrößerte, wenn der 5-Me-dC Gehalt der Probe durch die Inhibitoren noch weiter verringert wurde. Der Versuch, die Methode der Fluoreszenzmarkierung und -detektion nach Lyko et al. anzuwenden, ergab noch schlechtere Ergebnisse und wurde bald wieder verworfen. Die Rückfrage bei den Autoren ergab, dass diese Methode für jedes Analytikproblem abhängig von der Menge an DNA, der verwendeten DNA Extraktionsmethode, des verwendeten CE Geräts etc. jedes Mal

neu und hochspezifisch optimiert werden muss, was eine breite Anwendung und einen hohen Probendurchsatz natürlich erheblich erschwert.

Detektion der Nucleoside durch HPLC

Aufgrund der aufgetretenen Probleme mit der Kapillarelektrophorese sollte die Analytik nun trotz einer geringeren Empfindlichkeit durch HPL Chromatographie erfolgen. Nach einer Methode von *Crain* sowie *Song* konnte genomische DNA in Mengen von bis zu 1 µg durch Nuklease P1, Schlangengift Phosphodiesterase I und alkaline CIP Phosphatase vollständig abgebaut und per *reversed phase* HPLC einwandfrei analysiert werden.^[376, 380] Hierbei trat zunächst das Problem auf, dass auch beim Verdau kommerziell erworbener DNA ein zusätzliches Signal auftauchte, das als 2'-Desoxyinosin identifiziert werden konnte. Dieses stammt von einer Adenosin-Deaminase-Verunreinigung der CIP Phosphatase, die von den Herstellern offensichtlich nie ganz beseitigt werden kann. Durch fünfminütiges Erhitzen des Enzyms auf 95 °C konnte die Deaminase-Aktivität beseitigt werden und der entsprechende *peak* im HPLC Chromatogramm verschwand (Abbildung 4.20, Verdau kommerziell erworbener humaner DNA).

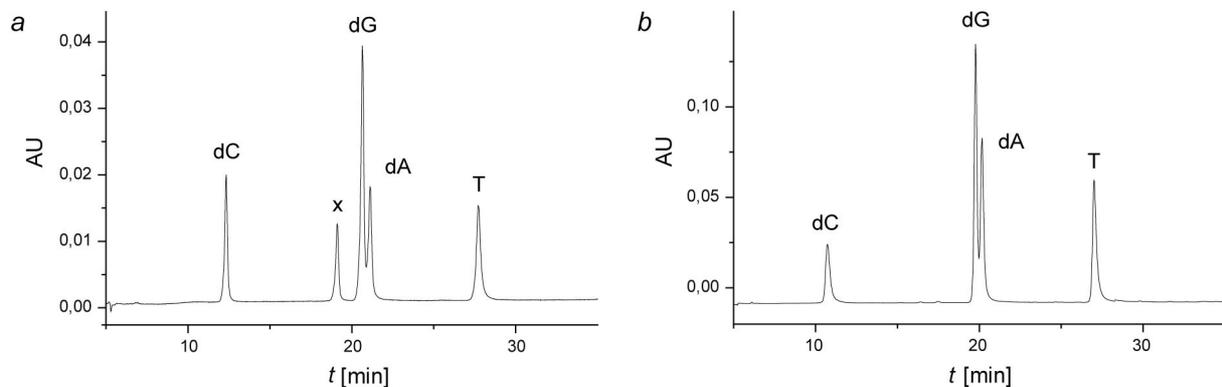


Abbildung 4.20: Problem der Adenosin-Deaminase-Verunreinigung bei Verdau von genomischer DNA unter Verwendung von CIP Phosphatase. *a* Durch die Verunreinigung tritt ein zusätzliches Signal auf (X); *b* Vorheriges Erhitzen des Enzyms oder Verwendung der *Antarctic* Phosphatase beseitigen das Problem.

Der Verdau-Prozess konnte allerdings vereinfacht werden, indem man CIP durch die sogenannte Antarctic Phosphatase (*New England Biolabs*) ersetzte, welches die Verunreinigung erst gar nicht enthielt.

Um die Methode mittels eines Standards zu überprüfen, wurde kommerziell erworbene λ DNA (48 kb) durch die bakterielle Methyltransferase M.HhaI vollständig

methyliert, was durch den vollständig blockierten Restriktionsverdau mit HhaI kontrolliert werden konnte. Die DNA wurde durch dreifache Ethanol-Fällung aufgereinigt und dem Verdau unterworfen. Die HPLC Analyse ergab nach fünf voneinander unabhängigen Verdau-Experimenten einen 5-Me-dC Gehalt von 1.86 % \pm 0.13 %, was eine mittlere Abweichung der Experimente untereinander von knapp 7 % bedeutet. Bei 215 methylierbaren M.HhaI Motiven in der λ DNA Sequenz ergibt sich rechnerisch ein 5-Me-dC Gehalt von 1.8 %, was in sehr guter Übereinstimmung mit dem experimentell ermittelten Wert stand. Die Signale konnten hierbei durch die Verwendung eines *photodiodearray* Detektors über ihre UV Spektren eindeutig den einzelnen Nukleosiden zugeordnet werden. Die Zuordnung wurde außerdem dadurch erleichtert, dass vor jeder Verdau-Serie das Chromatogramm einer Standardlösung der 5 Basen aufgenommen wurde, um eine einwandfreie Trennleistung des aktuell verwendeten Systems sicherzustellen.

Das HPLC Chromatogramm muss zur Bestimmung des 5-Me-dC Gehalts zwingend bei 278 nm aufgenommen bzw. integriert und ausgewertet werden, da dC und 5-Me-dC nur bei dieser Wellenlänge den gleichen Absorptionskoeffizienten haben und direkt miteinander verglichen werden können.

Bei der Analyse extrahierter genomischer DNA aus HCT116 Zellen erwies sich eine sorgfältige Entfernung der RNA als essentiell, um aussagekräftige HPLC Chromatogramme zu erhalten. Verbliebene RNA wird von den Nukleasen ebenfalls abgebaut, und die Ribonukleoside stören anschließend bei der Auswertung der verdauten DNA. Im HPLC Chromatogramm kam das Signal von Uridin stets exakt unter demjenigen von 2'-Desoxycytidin zu liegen und verfälschte so die Integrale und damit die berechneten Werte für den 5-Me-dC Gehalt. Es musste deshalb bei der Auswertung zum einen darauf geachtet werden, dass im Chromatogramm allenfalls schwache Ribonukleosid-Signale zu sehen waren. Zum anderen konnte durch die Verwendung des *photodiodearray* Detektors und die Aufnahme von 3D Spektren sichergestellt werden, dass das Absorptionsmaximum des Desoxycytidin-Signals bei den für dC charakteristischen 270.9 nm lag. War in der Probe hingegen eine signifikante Menge an Uridin vorhanden, lag das Absorptionsmaximum des Signals bei geringeren Werten ($\lambda_{\max}(\text{Uridin}) = 261 \text{ nm}$).

Durch eine entsprechende Aufreinigung der DNA nach der Extraktion gelang es jedoch, die RNA auch bei größerem Probenaufkommen zuverlässig zu entfernen.

Hierzu wurden die Proben zweimal mit RNase behandelt: das erste Mal für einige Minuten während der Aufreinigung des Zelllysats mit dem Extraktionskit (*Qiagen*), und ein zweites Mal nach der Extraktion (16 h bei RT). Die DNA wurde anschließend sowohl durch Ethanol-Fällung wie auch durch Gelfiltrationssäulen (*Biospin 6*, *Bio-Rad*) sorgfältig gereinigt und konnte auf diese Weise meist quantitativ von Ribonukleotiden/-nucleosiden befreit werden. Abbildung 4.21 *a* zeigt das Chromatogramm eines mit RNA verunreinigten Verdau, Abbildung 4.21 *b* das typische Bild nach der erfolgreichen RNase Behandlung. Das 5-Me-dC Signal entspricht hier einem Gehalt von etwa 4 % dC^{Me} , ein Wert, wie er für unbehandelte HCT116 Darmtumorzellen typisch ist.^[265, 283]

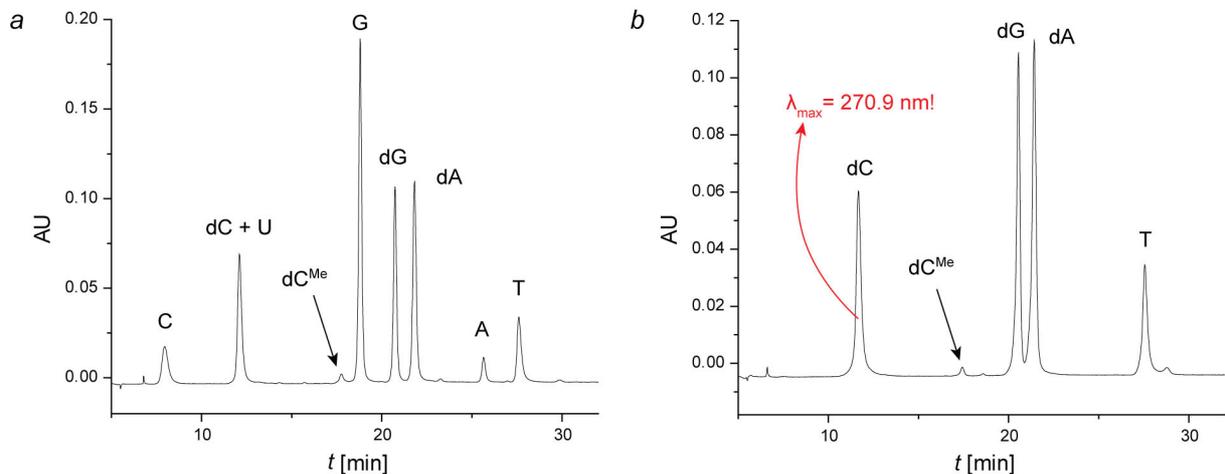


Abbildung 4.21: Totalverdau von 3 µg genomischer DNA aus HCT116 Zellen. *a* HPLC Chromatogramm bei Verunreinigung mit RNA; die Signale von dC und U fallen zusammen; *b* HPLC Chromatogramm nach erfolgreicher RNase Behandlung; bei Abwesenheit von U ist für das dC Signal das charakteristische Absorptionsmaximum von 270.9 nm zu finden. Puffer A: 0.1 M TEAA in H₂O, Puffer B: 0.1 M TEAA in 20 % H₂O/80 % MeCN; 0→20 % B in 45 min. Aufgenommen bei $\lambda = 278 \text{ nm}$. dC^{Me} = 5-Me-dC.

Um zu überprüfen, ob die Methode auch bei einer durch DNMT1 Inhibitoren verringerten Menge an 5-Me-dC noch ausreichende Signalstärken und damit zuverlässige Aussagen erlauben würde, wurden HCT116 Zellen während eines Wachstums von sechs Tagen über drei Tage mit 1 µM 5-Aza-dC inkubiert. Das Chromatogramm des anschließenden Totalverdaus der genomischen DNA zeigt Abbildung 4.22. Der dC^{Me} Gehalt wurde durch den Inhibitor reproduzierbar von 4.6 % auf 1.6 % reduziert, wobei das entsprechende HPLC Signal einwandfrei integriert und ausgewertet werden konnte.

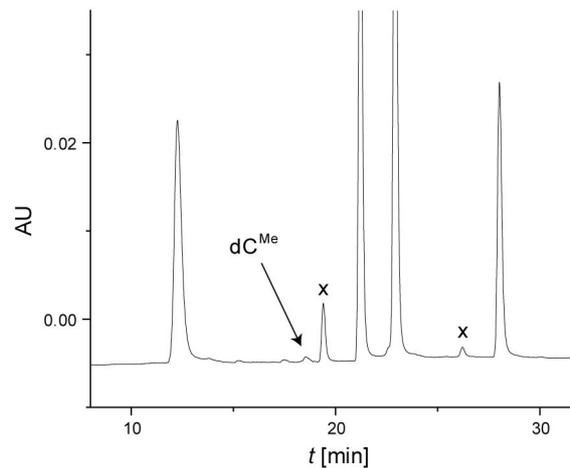


Abbildung 4.22: Totalverdau von HCT116 DNA nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Der 5-Me-dC Gehalt wurde nach dreitägiger Inkubation mit 1 μ M Inhibitor von 4.6 % auf 1.6 % gesenkt. X = RNA Reste, die hier aber bei der Auswertung nicht störten. Die Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt, die Signale für dG und dA sind nicht vollständig zu sehen. dC^{Me} = 5-Me-dC.

Während auch mit den in der Literatur angegebenen Mengen von 1 μ g DNA akzeptable Chromatogramme erhalten wurden, wurden zur Bestimmung des 5-Me-dC Gehalts in der Regel 3 μ g DNA eingesetzt, um durch ein starkes dC^{Me} Signal den Fehler bei der Berechnung möglichst gering zu halten.

4.4.4.2 5-Me-dC Gehalt nach Transfektion der Dumbbell Konstrukte

Um die Wirkung der Dumbbell Konstrukte auf den Methylierungsgrad zu untersuchen, wurden die Doppelstränge wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben in HCT116 Zellen transfiziert und die genomische DNA auf die beschriebene Weise verdaut und analysiert. Es stellte sich dabei heraus, dass die Inhibitoren über einen Zeitraum von weit mehr als sieben Tagen mindestens dreimal transfiziert werden mussten, um einen Effekt auf die globale DNA Methylierung sehen zu können. Erste Versuche, bei denen die Konstrukte während einer Woche zweimal in die Zellen eingeschleust wurden, zeigten keine Änderungen des 5-Me-dC Gehalts der behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Für das erfolgreiche Experiment wurden die Zellen schließlich über 2 Wochen gezogen und an den Tagen 1, 4 und 9 nach der Einsaat mit den Dumbbells **DB7**, **DB8** und **DB9** transfiziert. An Tag 12 wurden die Zellen lysiert und die DNA wurde extrahiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Transfectin behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Eine Fehlerangabe auf die erhaltenen Werte erschien in diesem Fall nicht sinnvoll, da die DNA Proben aufgrund der sehr geringen Mengen

nur jeweils zweimal (**DB7**) bzw. dreimal (**DB8**, **DB9**) verdaut werden konnten. Die hierbei ermittelten Werte waren jedoch sehr konsistent und bei den verschiedenen Verdauexperimenten nahezu identisch. Das Diagramm gibt deshalb die Mittelwerte an.

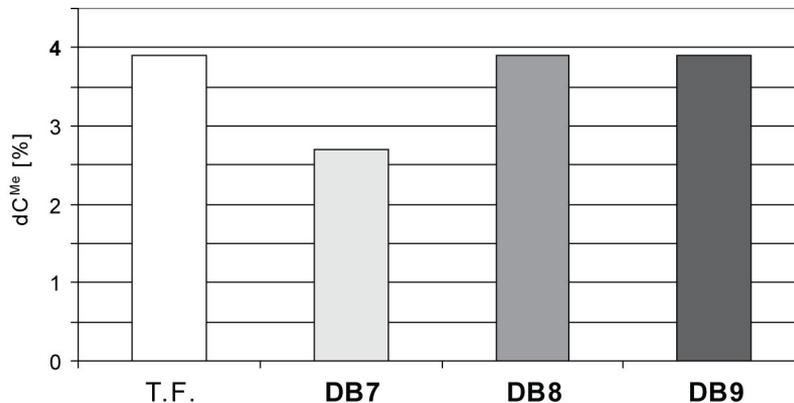


Abbildung 4.23: Wirkung der Dumbbells **DB7 - 9** auf den genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen. Die Zellen wurden dreimal mit den DNA Konstrukten transfiziert und nach insgesamt 13 Tagen lysiert. T.F. = Negativkontrolle, Zellen nur mit Transfectin behandelt; der 5-Me-dC Gehalt von gänzlich unbehandelten HCT116 Zellen beträgt laut Literatur 4-4.5 %.^[265, 283]

Die Werte für 5-Me-dC Gehalt der drei Kontrollen (nur Transfectin, **DB8**, **DB9**) waren praktisch alle identisch und lagen bei 3.9 %, d.h. die Referenzstränge **DB8** (Sequenz wie der aktive Dumbbell **DB7** aber ohne 5-Aza-dC) und **DB9** (keine CpG Einheiten) hatten keinerlei Auswirkung auf den Methylierungsgrad. Die Transfektion des Inhibitor Dumbbells **DB7** reduzierte dagegen den Anteil an 5-Me-dC in der genomischen DNA der HCT116 Zellen auf 2.7 %, oder anders ausgedrückt auf 69 % des Wertes der Transfectin-Kontrolle.^[361] Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zellproliferationsassays zeigte hier also ausschließlich das Konstrukt mit der Inhibitorbase den gewünschten Effekt, so dass die leicht wachstumsinhibierende Wirkung von **DB8** und **DB9** vermutlich nicht auf eine Wechselwirkung mit den zellulären Methyltransferasen zurückzuführen ist.

Abbildung 4.24 zeigt eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Experiments (a) sowie lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen am Tag der Zellyse (Tag 12 nach der Einsaat der Zellen, b). Beim Vergleich der Zelldichten (10fache Vergrößerung, b, oben) gilt es zu beachten, dass die Zellen eine unterschiedliche Anzahl an Passagen (Split) durchlaufen haben. Zum Vergleich sind außerdem die

Bilder von HCT116 Zellen abgebildet, die während eines Zeitraums von sechs Tagen für zwei Tage mit 2 μM 5-Aza-dC behandelt worden waren.

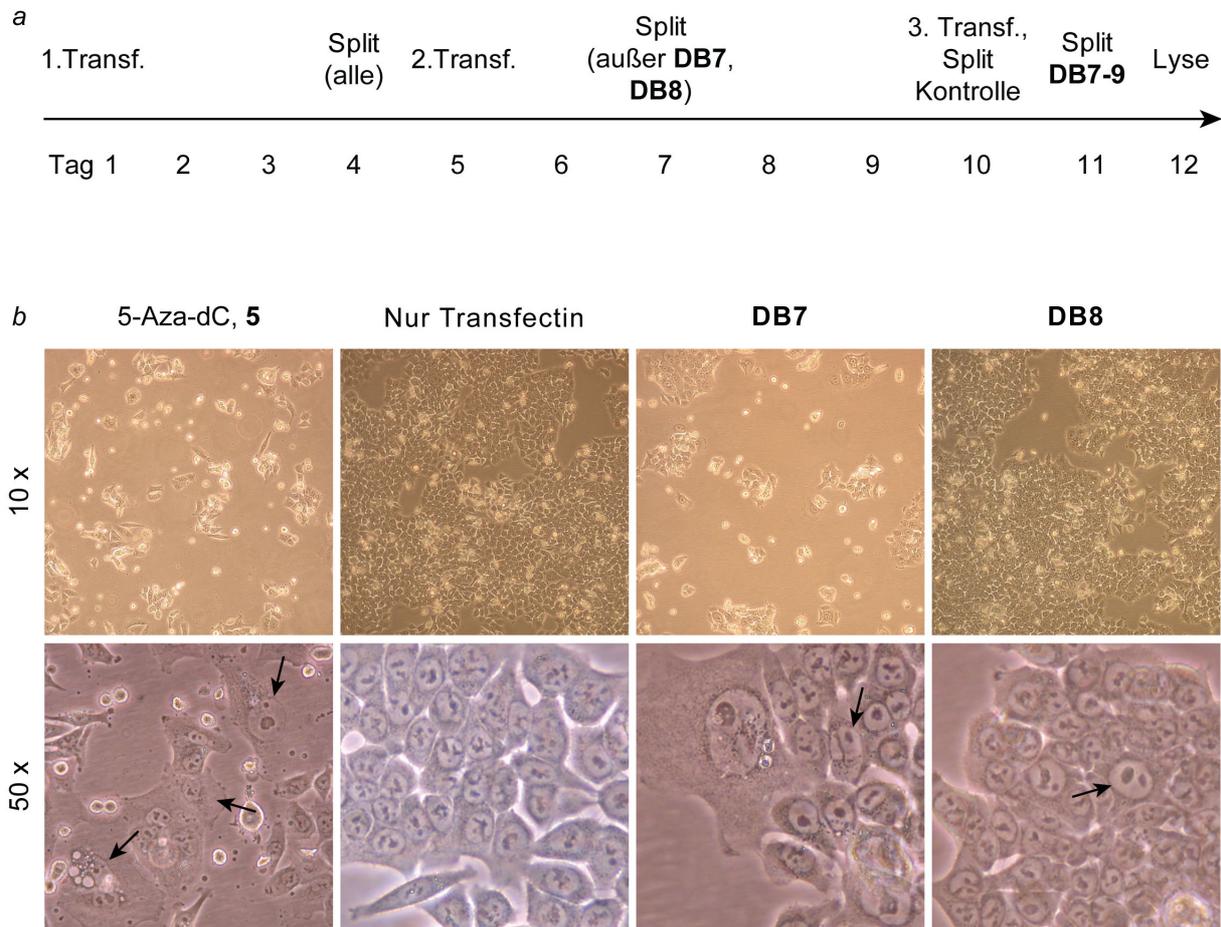


Abbildung 4.24: Behandlung von HCT116 Darmtumorzellen mit den Dumbbell Konstrukten **DB7 - 9**. **a** Zeitlicher Ablauf des Experiments. **b** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen am Tag der Zellyse (Tag 12 nach der Einsaat). Zum Vergleich: Behandlung mit 2 μM **5** für zwei Tage (ganz links). Die Bilder der Transfectin-Kontrolle gleichen denen ohne jeglichen Zusatz, die bei Zugabe von **DB8** gleichen denen der Zugabe von **DB9**. *Obere Reihe:* Vergrößerung 10x, *untere Reihe:* Vergrößerung 50x; *Pfeile:* zerstörte bzw. anomal veränderte Zellen.

In Abschnitt 4.4.3 wurde der Einfluss der Konstrukte auf die Zellproliferation durch einen entsprechenden Assay exakt quantifiziert, doch in diesem Experiment können auch mit bloßem Auge klare Unterschiede im Zellwachstum der verschiedenen Ansätze erkannt werden. In der 10fachen Vergrößerung (Abbildung 4.24 *b*, *obere Reihe*) zeigen die Zellen nach Zugabe von **DB8** eine ähnliche Dichte wie die Transfectin-Kontrolle, wobei diese allerdings auch einmal mehr passagiert worden war. Einen drastischen Effekt zeigt dagegen die Transfektion des aktiven Dumbbell Inhibitors **DB7**: hier waren am Tag der Zellyse gerade noch genug Zellen für die Extraktion einer ausreichenden Menge an DNA vorhanden. In der 50fachen Vergrößerung (Abbildung 4.24 *b*, *untere Reihe*) sieht man auch deutliche

Auswirkungen auf die Zellform und den äußeren Zellzustand. Während das Bild der mit Transfectin behandelten Zellen dem von normalen, unbehandelten HCT116 Zellen entspricht, können bei dem Ansatz mit **DB7** viele zerstörte Zellen gefunden werden, die sich in der Auflösung befinden. Die betroffenen Zellen blähen sich dabei auf und verlieren mit der Zeit ihre scharfe Kontur, es bilden sich kleine Bläschen und die Zellmembran verschwindet zusehends (*Pfeile*). Dieselben Beobachtungen kann man bei Zugabe des Nukleosidinhibitors 5-Aza-dC, **5**, machen (Abbildung 4.24 *b*, ganz links). Bei der Transfektion der Referenzstränge **DB8** und **DB9** treten zwar auch einige kleinere Anomalien auf, wie z. B. eine leichte Vergrößerung mancher Zellen (*Pfeil*), insgesamt entspricht das Bild aber dem der intakten, unbehandelten Kontrollzellen.

Auch im Fluoreszenzmikroskop konnte man die Zerstörung der Zellen unter Einwirkung von **DB7** gut beobachten. Abbildung 4.25 zeigt die Überlagerung von Durchlicht- und Cy3-Kanal der Zellen am Tag der Zellyse nach der Transfektion von **DB7** (*a*) sowie **DB8** (*b*). Während das Dumbbell Konstrukt **DB8** noch in intakten Zellkernen zu lokalisieren war, die sich scharf gegen die Umgebung abhoben, war **DB7** oft in undefinierten Konglomeraten aus Resten von Zellen zu finden, die sich offensichtlich gerade aufgelöst hatten (*Pfeile*).

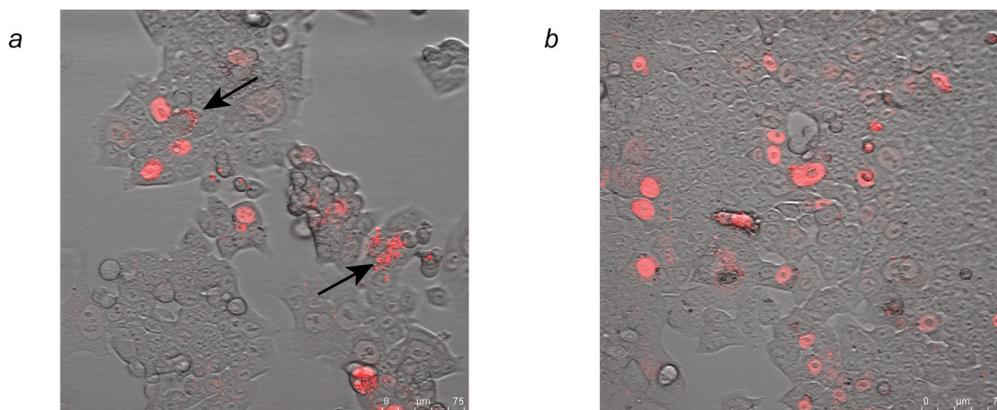


Abbildung 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Großaufnahmen von HCT116 Zellen nach drei Transfektionen mit den Konstrukten **DB7** (*a*) und **DB8** (*b*). Überlagerung von Cy3- und Durchlichtkanal. *Pfeile*: Defekte Zellen mit transfiziertem **DB7**, die sich offensichtlich gerade in der Auflösung befinden bzw. sich gerade aufgelöst haben.

4.5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Die Cytosin-C5 DNA Methylierung spielt zusammen mit der Modifikation der Histone eine fundamentale Rolle bei der epigenetischen Regulierung der Genexpression, und Störungen dieser eng miteinander verknüpften Mechanismen können schwere Krankheiten wie Krebs zur Folge haben. So wird in Tumorzellen ein verglichen mit gesunden Zellen reduzierter globaler Methylierungsgrad der genomischen DNA vorgefunden, während durch eine lokal erhöhte $d(C^{Me}pG)$ Dichte vor allem in Promotorregionen wichtige Tumorsuppressorgene wie z. B. *p53* inaktiviert werden. Sowohl mit Hinblick auf therapeutische Eingriffe wie auch unter dem Gesichtspunkt einer ausgedehnten Grundlagenforschung auf diesem Gebiet erscheint es als folgerichtig, nach Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die zelluläre Methylierungsmaschinerie zu suchen. Hierbei kamen bereits verschiedene Nukleosidinhibitoren, *antisense* Oligonukleotide, kleine Moleküle sowie molekularbiologische Techniken wie RNAi oder homologe Rekombination zur Anwendung, um über die entsprechenden Methyltransferasen die DNA Methylierung zu regulieren. ^[114, 277, 279-281, 283]

Um ein neues, leicht zugängliches Instrument für die Inhibierung der *maintenance methyltransferase* DNMT1 zu entwickeln, wurden im Rahmen dieser Arbeit zirkuläre, hantelförmige DNA Konstrukte (Dumbbells) hergestellt, die ein hemimethyliertes DNMT1 Zielmotiv mit der Inhibitorbase 5-Aza-dC als potenziellem Methylgruppenakzeptor tragen: $d(C^{Me}pG):d(GpC^N)$. Hierbei konnten die Dumbbells **DB1 - 9**, die kein, ein oder zwei Cy3 Fluoreszenzlabel tragen, synthetisiert und durch Kapillarelektrophorese, PAGE, MALDI-TOF bzw. ESI-FTICR charakterisiert werden. Durch EMS- wie auch durch Restriktions-Schutzassays konnte einwandfrei gezeigt werden, dass nur die aktiven Inhibitor Dumbbells **DB1**, **DB4** und **DB7** mit dem modifizierten Nukleosid **5** eine kovalente Bindung zu den Methyltransferasen M.HhaI, M.SssI und DNMT1 ausbilden konnten. Mit den zu diesen Konstrukten hergestellten Referenzsträngen **DB2**, **DB5** und **DB8** (hemimethyliertes Zielmotiv, aber keine Inhibitorbase **5**) sowie **DB3**, **DB6**, und **DB9** (überhaupt kein CpG Motiv) konnten keinerlei stabile Enzym-DNA Komplexe beobachtet werden.

Um den Effekt der Inhibitor Dumbbells auf lebende Zellen zu untersuchen, wurden die Konstrukte **DB7 - 9** erfolgreich in humane HCT116 Darmtumorzellen transfiziert, wo sie durch Konfokale *laser-scanning* Mikroskopie klar im Zellkern

lokalisiert werden konnten. Im Rahmen eines WST-1 Zellproliferationsassays konnte beobachtet werden, dass der Inhibitor Dumbbell **DB7** das Wachstum der Tumorzellen drastisch inhibiert, wobei allerdings auch der Kontrollstrang **DB8** einen unerwartet starken Effekt zeigte. In der Folge wurde die Auswirkung der Konstrukte auf den globalen genomischen Methylierungsgrad der HCT116 Zellen untersucht. Hierzu wurde eine entsprechende Methode etabliert, bei der die genomische DNA auch bei größerem Probenaufkommen praktisch RNA-frei aus den Zellen extrahiert, vollständig zu den Nucleosiden verdaut und anschließend durch HPL Chromatographie auf ihren 5-Me-dC Gehalt analysiert werden konnte. Es zeigte sich, dass der aktive Dumbbell **DB7** nach dreimaliger Transfektion während eines Zeitraums von 12 Tagen den genomischen Methylierungsgrad signifikant reduzieren konnte; die Referenzstränge **DB8** und **DB9** zeigten keinerlei Auswirkung auf den 5-Me-dC Gehalt.

Bei weiterführenden Studien müsste zunächst das Experiment der Reduzierung des globalen genomischen Methylierungsgrads durch den Inhibitor Dumbbell **DB7** verifiziert werden. Hierzu ist es unabdingbar sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht auf den Abbau des Konstrukts im Zellkern und dadurch freigesetztes 5-Aza-dC hervorgerufen wird; hierdurch würde natürlich das Prinzip des Dumbbell Ansatzes völlig konterkariert. Ein einfacher Weg, dies zu überprüfen, besteht in der Synthese und Anwendung eines Dumbbells, der 5-Aza-dC trägt, allerdings nicht in einem CpG Kontext. Ein solches Konstrukt sollte von DNMT1 nicht gebunden werden und deshalb keinen Effekt zeigen, es sei denn, der Strang würde bis auf die Nucleoside abgebaut, mit den erwähnten Konsequenzen. In diesem Falle müssten Wege gefunden werden, um die Konstrukte noch stabiler gegen die zellulären Nucleasen zu machen, beispielsweise indem die Strukturen teilweise über ein Phosphorthioatrückgrat aufgebaut werden.

Die vorgestellten Dumbbell Konstrukte erlauben noch vielfältige Modifikationen und verschiedene Einsatzmöglichkeiten. In erster Linie könnte versucht werden, das Bindungsverhalten gegenüber DNMT1 zu optimieren, indem man die Sequenz und/oder die Länge des Doppelstranges ändert. Beispielsweise wäre es interessant, ob sich bei Einbau lediglich einer d(CpG) Zielsequenz Unterschiede zu den bereits synthetisierten Konstrukten erkennen ließen. In der Literatur wurde vereinzelt

berichtet, dass Tandem-d(CpG) Einheiten schlechter von DNMT1 gebunden wurden, als Ziel motive, die durch mehrere andere Basenpaare voneinander getrennt vorlagen.^[381] Um mit den bekannten Methoden zur Desaktivierung von DNMT1 konkurrieren zu können, wäre ein signifikanter demethylierender Effekt in einem Zeitraum von maximal einer Woche wünschenswert. Die aktuell angewendeten siRNA und *antisense* Strategien benötigen in der Regel zehn oder mehr Tage, um das Protein auf Mengen zu reduzieren, die nicht mehr nachweisbar sind. Gleichzeitig wird die Methyltransferasen-Aktivität nicht vollständig ausgeschaltet, sondern nur um bis zu 90 % gesenkt.^[59, 278, 280, 282, 332] Durch die Optimierung der vorgestellten Inhibitoren könnte eventuell ein höherer Wirkungsgrad erreicht werden. Durch ein entsprechendes Design der Dumbbells könnten auch alle drei humanen Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) auf einmal adressiert werden, was aufgrund der vielfach gezeigten Kooperation und teilweisen Redundanz der Enzyme interessant sein könnte; in mehreren Experimenten war das Ausschalten der DNMT1-Aktivität allein zu wenig, um den Methylierungsgrad ausreichend zu senken.^[113, 114]

Prinzipiell stellen die Dumbbell Strukturen auch ein sehr gutes Instrument dar, um neue potenzielle Nukleosidinhibitoren für DNMT1 direkt in der Zelle auf ihre Funktionalität zu testen, indem etwaige Probleme mit der Triphosphatsynthese durch die zellulären Kinasen zunächst umgangen werden können.

Darüber hinaus wäre eine Erweiterung der zellulären Studien auf andere Zelllinien unabdingbar.^[332] Neben anderen Arten von Tumorzellen müssen die Dumbbell Inhibitoren vor allem auch auf gesunde Zellen angewendet werden, um die verglichen mit einfachem 5-Aza-dC angenommene geringere Zytotoxizität zu verifizieren. In die Untersuchungen zur Auswirkung der Konstrukte auf die DNA Methylierung sollten neben dem globalen genomischen Methylierungsgrad auch lokale Methylierungsmuster miteinbezogen werden. Es ist durchaus vorstellbar, dass der Gesamtgehalt an 5-Me-dC in der genomischen DNA behandelter Zellen in etwa gleich bleibt, es aber in den Promotorregionen einzelner Tumorsuppressoren dennoch zu einer Demethylierung und somit zur Re-Expression des assoziierten Gens kommt. Hierzu ist das Etablieren von Methoden notwendig, durch die der Methylierungsgrad einzelner genomischer DNA Sequenzen ermittelt werden kann (z. B. methylierungs-spezifische PCR, MS-PCR).

Die durchgeführten Studien beweisen in ihrer Gesamtheit die Funktionalität des Prinzips der DNMT1 Inhibierung durch zirkulare, hantelförmige DNA Konstrukte und zeigen darüber hinaus deutlich die Ausbaufähigkeit und das weitere Potenzial dieser neuen molekularbiologischen Instrumente.

5 Neue Nukleosidinhibitoren

5.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Krebszellen weisen massive Störungen der epigenetischen Strukturen und Mechanismen auf, insbesondere in Form einer tiefgreifenden Veränderung des DNA Methylierungsmusters. Die Hypermethylierung von Genpromotoren und die globale Hypomethylierung des Genoms verursachen die fehlerhafte transkriptionelle Inaktivierung von Genen sowie genomische Instabilität und tragen damit maßgeblich zur Initiierung, aber auch zur Aufrechterhaltung malignen Zellwachstums bei. Vor allem die Hypermethylierung stellt dabei aufgrund ihrer potenziellen Reversibilität ein geeignetes therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Krebserkrankungen dar.^[10, 55, 56, 200, 220, 230] Auf der Suche nach Ansätzen für eine auf epigenetischen Mechanismen basierende Krebstherapie wurde deshalb versucht, durch die Inhibierung der humanen DNA Methyltransferase DNMT1 weitere schadhafte Methylierungsprozesse zu verhindern und die „gesunden“ Methylierungsmuster wiederherzustellen. Dabei wurden diverse demethylierende Substanzen gefunden, die das Wachstum von Tumoren hemmen und verschiedene für eine normale Zellfunktion essentielle Gene reaktivieren konnten.^[8, 33, 41, 47, 222, 261, 291]

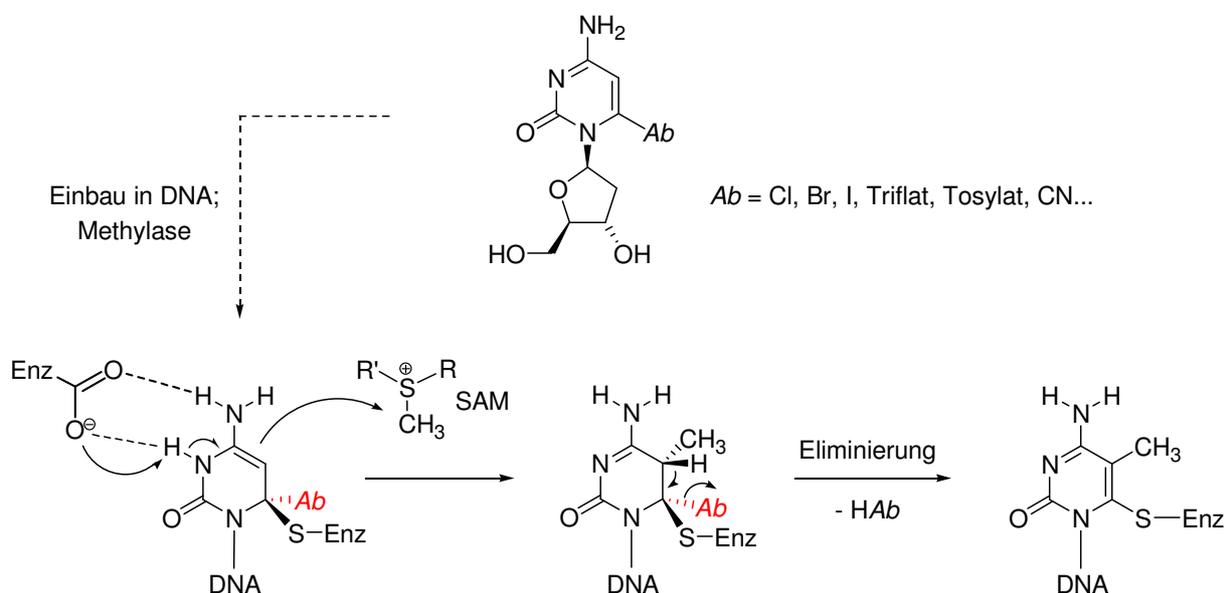
Der bislang effektivste bekannte DNMT1-Inhibitor ist das dC-Derivat 2'-Desoxy-5-azacytidin (5-Aza-dC), der allerdings einige signifikante Nachteile aufweist. Neben einer hohen Zytotoxizität zeigt die Substanz eine geringe Stabilität unter physiologischen Bedingungen.^[162, 286, 317, 319, 320] Es wurden deshalb in der Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, um Alternativen mit günstigeren medizinalchemischen Eigenschaften zu finden, wobei das Hauptaugenmerk weiterhin auf der Entwicklung nukleosidischer Inhibitoren lag (siehe hierzu auch Kapitel 3.5).^[8, 41]

Nach der erfolgreichen Darstellung und Charakterisierung der Dumbbell-DNA Konstrukte mittels des bereits bekannten DNMT1 Inhibitors 5-Aza-dC im ersten Teil dieser Arbeit, sollten im zweiten Teil Ansätze zur Synthese bislang unbekannter Nukleosidinhibitoren entwickelt werden. Hierbei war es das Ziel, auf experimentellem Wege Substanzen zu finden, die bei einem größtmöglichen demethylierenden Effekt allenfalls geringfügige physiologische Nebenwirkungen und gleichzeitig eine hohe

hydrolytische Stabilität zeigen. Im Rahmen dieser Aufgabenstellung wurden zwei unterschiedliche synthetische Strategien verfolgt: Zum einen die Synthese von 2'-Desoxycytidinderivaten mit einer guten Abgangsgruppe in C6 Position, zum anderen die Darstellung von Derivaten des bekannten Inhibitors Zebularin. Durch die Anwendung auf die humane Krebszelllinie HCT116 sollten die neuen Substanzen anschließend auf ihre demethylierende Wirkung überprüft werden. Außerdem sollten die potentiellen Inhibitoren über ihre Triphosphate in kurze DNA Stränge eingebaut werden, um ihr Reaktionsverhalten gegen Methyltransferasen *in vitro* untersuchen zu können.

5.2 Synthese von C6-substituierten 2'-Desoxycytidinderivaten

Die erste Strategie, Alternativen zum DNMT1 Nukleosidinhibitor 5-Aza-dC zu finden, bestand in der Synthese von 2'-Desoxycytidinderivaten mit einer guten Abgangsgruppe in C6-Position. Diese Modifikation sollte die Bildung der irreversiblen Enzym-Nukleosid Bindung über einen neuartigen Mechanismus ermöglichen (Schema 5.1).



Schema 5.1: Die geplante Derivatisierung von 2'-Desoxycytidin (*oben*) und die erhofften mechanistischen Auswirkungen auf die Reaktion mit Methyltransferasen (*unten*). Ab = Abgangsgruppe; Enz = Enzym.

Die Methyltransferase sollte demnach zunächst, wie im Fall der natürlichen Base, die Methylgruppe vom Kofaktor auf die Base übertragen. Im Gegensatz zur Reaktion mit Inhibitoren wie 5-Aza-dC sollte sich an dieser Stelle aber eine

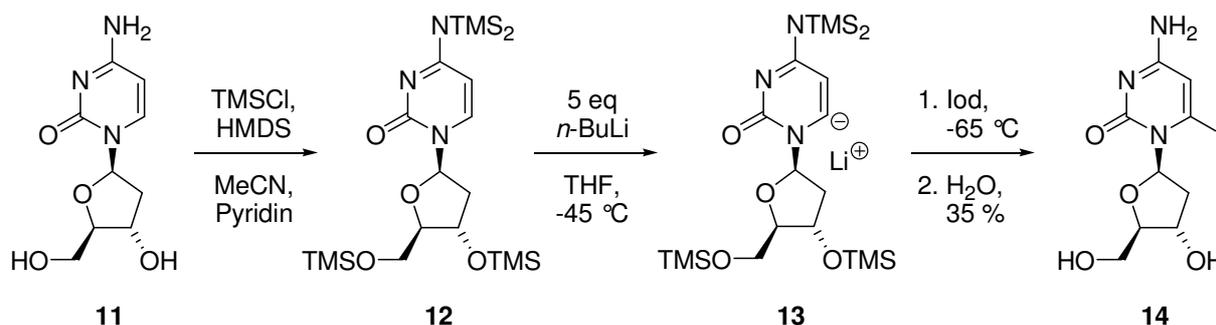
Eliminierung anschließen, bei der nun idealerweise nicht das Enzym, sondern die Abgangsgruppe das Molekül verlassen sollte.

Bei der Wahl der Abgangsgruppe wurden zunächst die Halogene Chlor, Brom und Iod ins Auge gefasst, da diese neben ihren guten Eigenschaften als Nukleofuge sterisch relativ anspruchslos sind und somit die Bindung der Base zum Enzym nicht behindern sollten.

5.2.1 Versuche zur Synthese von 6-Halogen-dC Derivaten

5.2.1.1 Direkte Substitution an 2'-Desoxycytidin

Während die C5-Halogen-Derivate von 2'-Desoxycytidin alle bekannt und sogar kommerziell erhältlich sind, gibt es für die C6-substituierten Verbindungen lediglich eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1973.^[382] Darin beschreiben *Pichat* und *Guilbert* die C6-Modifikation von dC über die vollständige Trimethylsilyl-(TMS)-Schützung der Verbindung (nach *Sweeley*^[383]), Deprotonierung mit *n*-Butyllithium und Umsetzung mit einem entsprechenden Elektrophil. Durch Verwendung von Methyljodid, Iod und Kohlendioxid wurden auf diese Weise laut *Pichat* 6-Methyl-, 6-Iod- sowie 6-Carboxy-dC dargestellt. Schema 5.2 zeigt die veröffentlichte Synthese anhand des Beispiels 6-Iod-dC (**14**).



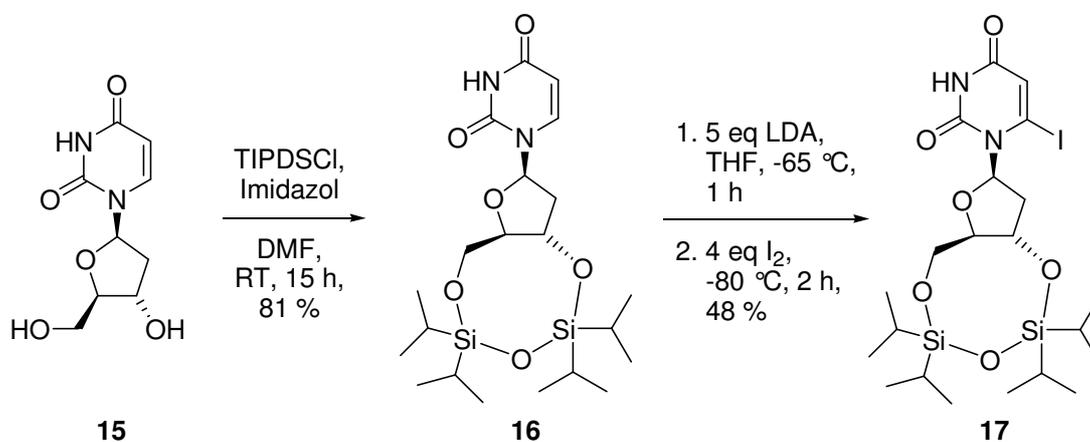
Schema 5.2: Synthese von 6-Iod-dC (**14**) nach *Pichat*.^[382] HMDS = Hexamethyldisilazan, TMSCl = Trimethylsilylchlorid.

Die Ergebnisse der genannten Autoren ließen sich im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduzieren. Weder die Änderung der Reaktionsdauer oder -temperatur, der Äquivalente des Silylierungsmittels, des Lösungsmittels noch die Verwendung anderer Elektrophile (Diphenyldisulfid) oder vermeintlicher Katalysatoren (Ammoniumsulfat)^[384] brachte den Erfolg. Es wurde auch versucht, das Rohprodukt einer TMS-Schützung wiederholt zur Silylierung einzusetzen, oder

zunächst die 3'- und 5'-OH-Gruppe durch 1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dichlordisiloxan^[385] und die freie NH₂-Gruppe anschließend mit Trimethylsilylchlorid oder 1,1,4,4-Tetramethyl-1,4-dichlordisilylethylen (CDSE^[386]) zu schützen. Hierbei konnte die gewünschte Substanz jedoch weder in der Reaktionsmischung massenspektrometrisch nachgewiesen werden, noch war es möglich, das Rohprodukt definiert weiter umzusetzen. In der Regel konnte per MALDI- bzw. ESI-MS lediglich die erfolgreiche Schützung der OH-Gruppen festgestellt werden. Ebenso schlug die Umsetzung von lediglich OH-geschütztem dC mit *n*-BuLi und Iod fehl. Die Versuche zur direkten Einführung eines Halogens an 2'-Desoxycytidin wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

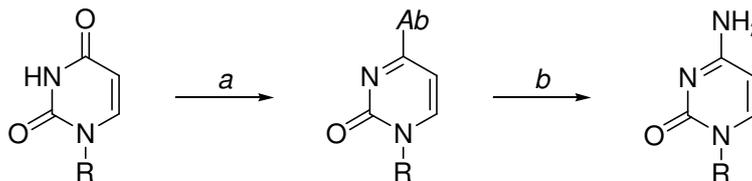
5.2.1.2 Synthese über 6-Halogen-dU

Als weitere Möglichkeit sollte die literaturbekannte Verbindung 2'-Desoxy-6-ioduridin durch ein geeignetes Reagenz zum entsprechenden Cytidin-Derivat umgesetzt werden. Dieser Syntheseweg wurde bereits für die entsprechende Transformation von verschiedenen 5-Halogen-Uridinverbindungen beschrieben.^[387, 388] Hierzu ist es zunächst notwendig, die OH-Gruppen des Eduktes 2'-Desoxyuridin durch Silylierung zu schützen, indem **15** mit Imidazol und 1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dichlordisiloxan (TIPDSCI) umgesetzt wird.^[385] Der zyklische Silylether **16** konnte nach Aufreinigung in 81 % Ausbeute gewonnen werden. Das geschützte Nukleosid **16** wurde nach Tanaka durch 5 Äquivalente frisch hergestelltes Lithiumdiisopropylamin (LDA) selektiv am C6 lithiiert und durch die Zugabe von Iod in das silylierte 6-Iod-dU Derivat **17** überführt (Schema 5.3).^[389]



Schema 5.3: Synthese von TIPDS-geschütztem 6-Iod-dU (**17**). TIPDSCI = 1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-dichlordisiloxan.

Für die Transformation von Uridin- zu Cytidin-Derivaten sind bereits mehrere Synthesewege beschrieben worden. Dabei wird stets eine gute Abgangsgruppe am C4 der Nukleobase geschaffen (z. B. Triazolyl- oder Triisopropylphenylsulfonyl-Rest, Schema 5.4 a), welche anschließend durch das gewünschte Amin (hier: Ammoniak, Schema 5.4 b) verdrängt wird.^[386-388, 390-393] Der letzte Schritt ist dabei im vorliegenden Fall als kritisch anzusehen, da das basische Amin prinzipiell den Iod-Substituenten im Edukt oder Produkt nukleophil verdrängen könnte.



Schema 5.4: Überführung von Uridin- in die entsprechenden Cytidinderivate. *Ab* = Triazolyl; Triisopropylphenylsulfonyl u. a.

Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht über die Reagenzien und Bedingungen, die angewendet wurden, um **17** in das entsprechende 6-Iodcytidin-Derivat zu überführen. Es konnten jedoch weder die Zielverbindung noch die Zwischenstufen bei den genannten Synthesen isoliert oder in der rohen Reaktionsmischung nachgewiesen werden, während aber gleichzeitig auch kein Hinweis auf eine Nebenreaktion mit Ammoniak zu 6-Amino-Derivaten vorlag. Auch dieser potenzielle Syntheseweg zu 6-halogen-substituierten Cytidinderivaten wurde deshalb aufgegeben.

Tabelle 5.1: Versuche zur Überführung von **17** in das entsprechende 6-Iodcytidin-Derivat.

Nr.	Abgangsgr.	Bedingungen	Lit.
1	Triazolyl	17 , 1,2,4-Triazol, 4-Chlorphenyldichlorphosphat, Pyridin, RT, 16 h; NH ₃ konz, RT, 2 h.	[391, 393]
2	Triazolyl	1,2,4-Triazol, Phosphorylchlorid, Acetonitril, 0 °C, 5 min; Triethylamin, 0 °C, 1 h; 17 , 0 °C → RT, 4 h; NH _{3(g)} , RT, 2 h.	[388, 390]
3	TPS ^a	17 , TPSCI, Triethylamin, DMAP, Acetonitril, RT, 1 h; NH ₃ konz, 0 °C, 1 h.	[386]
4; 5	TPS	17 , NaH, THF, RT, 1 h; TPSCI, RT, 3.5 h und 16 h; NH ₃ konz, 0 °C, 10 min.	[394]
6; 7	Triflat	17 , Trimethylsilylchlorid, Dichlormethan, Pyridin, RT, 1 h; Trifluor-methansulfonsäureanhydrid, RT, 1 h; Methanol. NH ₃ , RT, 20 min und 16 h.	[392]

^a TPS = 2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl

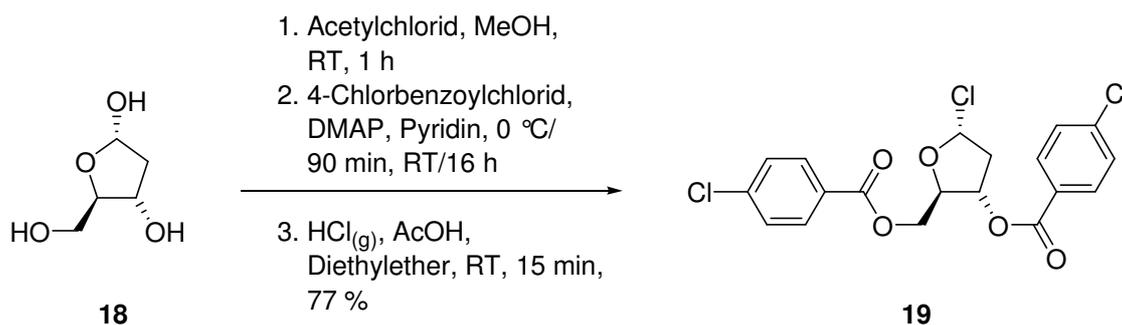
5.2.1.3 Synthese über Nukleosidierung

Die Synthese von 2'-Desoxycytidinderivaten durch eine Nukleosidierung, ausgehend von Zucker und Nukleobase, ist prinzipiell eher problematisch. Verglichen mit der Synthese der Ribo-Verbindungen ist bei den 2'-Desoxy-Nukleosiden meist nur schwer eine zufriedenstellende α/β -Selektivität zu erreichen, da in 2'-Position keine dirigierende Modifikation mit Nachbargruppeneffekt eingeführt werden kann. Insbesondere die Umsetzung von aminosubstituierten Heterocyclen wie Cytosin kann Schwierigkeiten bereiten, wenn zur Aktivierung *Lewis*-Säuren wie Trimethylsilyltriflat eingesetzt werden (z. B. *Silyl-Hilbert-Johnson*-Methode). Diese bilden mit der Aminofunktion starke σ -Komplexe, die die Reaktion massiv verlangsamen oder gänzlich verhindern können.^[395]

Aus diesen Gründen sollte die Nukleosidierung nach einer Vorschrift von *Aoyama* durchgeführt werden, welche in der Arbeitsgruppe *Carell* bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte, sich aber ursprünglich auf die Darstellung von 2'-Desoxyuridinen beschränkte. Bei dieser Synthese wird der Zucker in Form der 1-Chlor-Verbindung eingesetzt und unter der katalytischen Wirkung der *Brönstedt*-Säure *p*-Nitrophenol mit der silylierten Nukleobase zur Reaktion gebracht.^[396] *Aoyama* berichtet bei der Verwendung von *p*-Nitrophenol die verstärkte Bildung des β -Anomers; außerdem wird bei dieser Methode die Verwendung einer *Lewis*-Säure

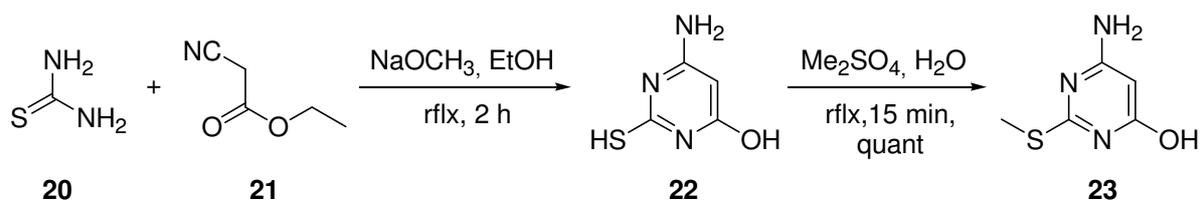
vermieden. Ein ähnlicher Syntheseweg, allerdings ohne den Zusatz von *p*-Nitrophenol, wurde auch von *Colacino* berichtet.^[397]

Zunächst mussten die Alkoholfunktionen des entsprechenden 2-Desoxy- α -D-ribofuranosylchlorids durch geeignete Schutzgruppen gegen einen elektrophilen Angriff geschützt werden. Hierbei fiel die Wahl auf *p*-Chlorbenzoyl-Reste. Nukleoside mit dieser Modifikation kristallisieren zwar Literaturangaben zufolge schlechter als die einfachen Toluoyl-Derivate, was die Trennung von α/β -Produktgemischen erschweren könnte, jedoch können die *p*-Chlorbenzoyl-Gruppen unter milderen basischen Bedingungen wieder abgespalten werden.^[395] Diese Eigenschaft könnte sich hinsichtlich der vermutlich hohen Reaktivität des Produkts gegenüber Basen als essentiell für den Syntheserfolg herausstellen. 2-Desoxy-3,5-bis-*O*-(*p*-chlorbenzoyl)- α -D-ribofuranosylchlorid (**19**) wurde nach zwei Stufen aus 2-Desoxy- α -D-ribose (**18**) in 77 % Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten (Schema 5.5).^[398]



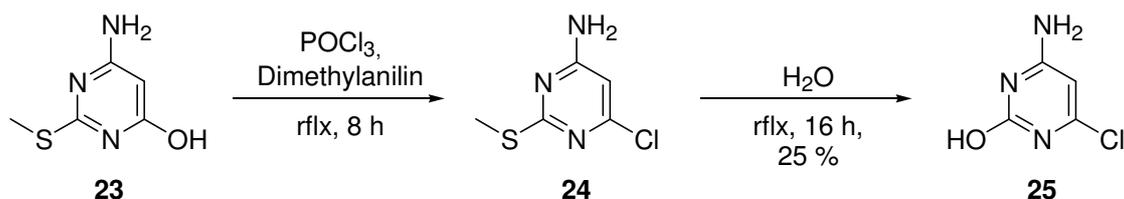
Schema 5.5: Synthese des für die Nukleosidierung benötigten α -D-Ribofuranosylchlorids **19**.

Von den drei als Nukleobase in Frage kommenden 6-Halogen-Cytosinderivaten ist lediglich die Synthese der Chlorverbindung, 4-Amino-6-chlorpyrimidin-2-ol, bekannt. Im ersten Schritt wurde hierzu der heterocyclische Ring aufgebaut, indem Ethylcyanoacetat (**20**) und Thioharnstoff (**21**) unter Zusatz von Natriummethylat zum Produkt **22** kondensiert wurden, welches nicht isoliert werden musste. Nach der anschließenden Methylierung von **22** durch Dimethylsulfat konnte das Pyrimidinderivat **23** in quantitativer Ausbeute als farbloser Feststoff isoliert werden (Schema 5.6).^[399]



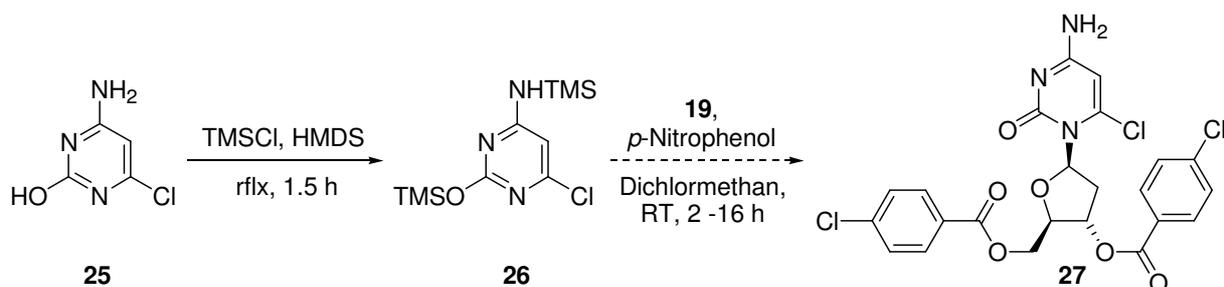
Schema 5.6: Aufbau des Heterocyclus **23** aus Thioharnstoff (**20**) und Ethylcyanoacetat (**21**). Produkt **22** musste während der Synthese nicht isoliert werden.

Verbindung **23** wurde durch Erhitzen mit Phosphorylchlorid chloriert, wodurch man die 6-chlorsubstituierte Verbindung **24** in Form eines gummiartigen, schlecht zu handhabenden Feststoffs erhielt (Schema 5.7). Dieser wurde ohne weitere Aufreinigung in die nachfolgende Reaktion eingesetzt und durch Erhitzen mit Wasser in das Cytosinderivat **25** überführt. Die Substanz kristallisierte während der Aufarbeitung allerdings nur zögerlich und konnte in lediglich 25 % Ausbeute gewonnen werden.^[400]



Schema 5.7: Synthese des für die Nucleosidierung benötigten 6-Chlorcytosins (**25**). Produkt **24** wurde während der Synthese nicht isoliert.

Für die Nucleosidierung nach *Aoyama*^[396] wurde das 6-Chlorcytosinderivat **25** zunächst mittels Trimethylsilylchlorid und Hexamethyldisilazan silyliert (Schema 5.8). Durch die Silylierung von Amino- und Alkoholfunktion wird dabei die Nucleophilie der Stickstoffatome von Verbindung **26** erhöht, da ihre freien Elektronenpaare nicht mehr Bestandteil des aromatischen Systems sind.^[395] Produkt **26** wurde ohne weitere Aufreinigung unter Zusatz von *p*-Nitrophenol mit dem Chlorzucker **19** umgesetzt.



Schema 5.8: Die geplante Glykosylierung von **25** zum Aufbau eines 6-chlor-substituierten Cytidinderivats. HMDS = Hexamethyldisilazan, TMSCl = Trimethylsilylchlorid.

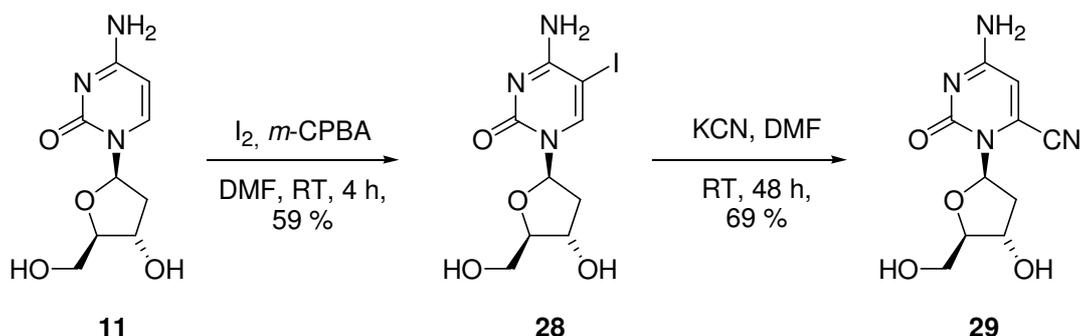
Bereits nach zwei Stunden konnte in der Reaktionsmischung per MALDI-MS (Matrizes ATT und DHB) ein neues Produkt mit passendem Molekulargewicht und Substitutionsmuster (charakteristisch für drei enthaltene Chloratome) detektiert werden (m/z für $[M]^+$: ber. 537.03, gef. 537.03). Diese Beobachtung war reproduzierbar und konnte durch ESI(-)-HRMS noch einmal bestätigt werden (m/z für $C_{23}H_{17}Cl_3N_3O_6^-$ $[M-H]^-$: ber. 536.0188, gef. 536.0179). Die Isolierung der Substanz(en) war jedoch auch bei Anwendung verschiedener Methoden zur Aufarbeitung nicht möglich. Sobald das Reaktionsgemisch im Zuge der standardmäßigen Aufarbeitung mit Wasser in Berührung kam, konnte das Produkt massenspektrometrisch nicht mehr nachgewiesen werden. Die direkte säulenchromatographische Aufreinigung war weder bei der Verwendung von Silicagel noch von neutralem Alox erfolgreich.

Die Versuche zur Synthese von 6-halogensubstituierten Cytidinderivaten wurden hieraufhin eingestellt.

5.2.2 Synthese von 2'-Desoxy-6-cyanocytidin (29)

Als weitere mögliche Abgangsgruppe mit einem geringen sterischen Anspruch kam Cyanid in Frage. Die Ribo-Verbindung 6-Cyanocytidin war, ebenso wie entsprechende Uridinderivate, bereits bekannt. Die Synthesen gingen jeweils vom 5-Brom- oder 5-Iodnukleosid aus, welches wahlweise mit Natriumcyanid oder Kaliumcyanid umgesetzt wurde. Die angegebenen Bedingungen reichen von 25 - 80 °C Reaktionstemperatur, 2 - 64 h Reaktionszeit und 1.5 - 6.0 Äquivalenten verwendetem Alkalicyanid.^[390, 401, 402] 6-Cyanocytidin wurde dabei von *Matsuda* durch zweieinhalbstündige Reaktion von 5-Bromcytidin mit 1.3 Äquivalenten Natriumcyanid bei Raumtemperatur hergestellt.

Nachdem erste Versuche mit Natriumcyanid und kommerziell erhältlichem 2'-Desoxy-5-bromcytidin gescheitert waren, wurde das 5-Iod-Derivat **28** eingesetzt, welches leicht aus 2'-Desoxycytidin gewonnen werden kann.^[403] Die Umsetzung mit Kaliumcyanid in Dimethylformamid bei Raumtemperatur für 48 h war schließlich erfolgreich, und **29** konnte als fast farbloser, glasartiger Feststoff in 68 % Ausbeute isoliert werden (Schema 5.9).

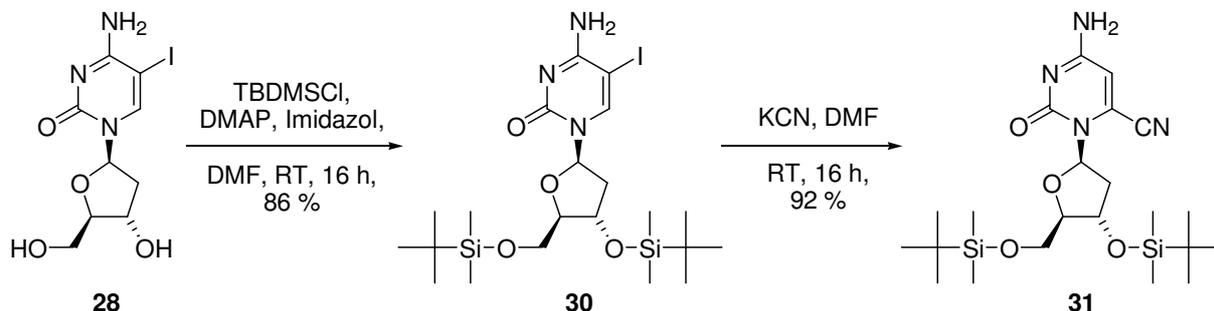


Schema 5.9: Direkte Synthese von 6-CN-dC (**29**) aus ungeschütztem 5-Iod-dC (**28**). *m*-CPBA = Metachlorperbenzoesäure.

Als problematisch erwies sich hierbei, dass die Reaktion hinsichtlich der Ausbeute und vor allem der Produktreinheit nur sehr schlecht reproduzierbar war. So trat regelmäßig ohne erkennbare Gründe ein nichtidentifizierbares Nebenprodukt auf, das sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften wie **29** zeigte und deshalb praktisch nicht abgetrennt werden konnte. Erschwerend kam hinzu, dass Cytidinderivate mit ungeschützten OH-Gruppen aufgrund ihrer hohen Hydrophilie generell schwierig durch gängige säulenchromatographische Verfahren aufzureinigen sind. Die Änderung verschiedener Parameter wie Reaktionsdauer und -temperatur sowie der Anzahl an KCN-Äquivalenten brachten keine Fortschritte. Das isolierte, reine Produkt erwies sich dabei als sehr stabil, so dass Probleme durch eine Zersetzung während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden konnten.

Insbesondere um die Aufreinigung nach der Umsetzung zu vereinfachen, sollte die Reaktion deshalb mit 3',5'-silylgeschütztem 5-Iodcytidin durchgeführt werden. Die Modifikation der Alkoholfunktionen mit Silylschutzgruppen wie dem *tert*-Butyldimethylsilyl-Rest sollte die Verbindung deutlich unpolarer machen und so die säulenchromatographische Aufarbeitung mittels Silicagel und unpolarem, organischem Lösungsmittel erleichtern. Hierzu wurde das 5-Iod-Derivat **28** nach einer literaturbekannten Vorschrift mit 86 % Ausbeute in die bis-silylierte Verbindung **30** überführt.^[404] Die Umsetzung mit Kaliumcyanid erfolgte nun überraschend glatt, und bereits nach 16 h konnte das geschützte 6-Cyanonukleosid **31** in einer sehr guten Ausbeute von 92 % isoliert werden. Während schon die dünnschichtchromatographische Überprüfung der Reaktionsmischung die Bildung eines einzigen Produkts andeutete, verlief auch die Aufreinigung durch

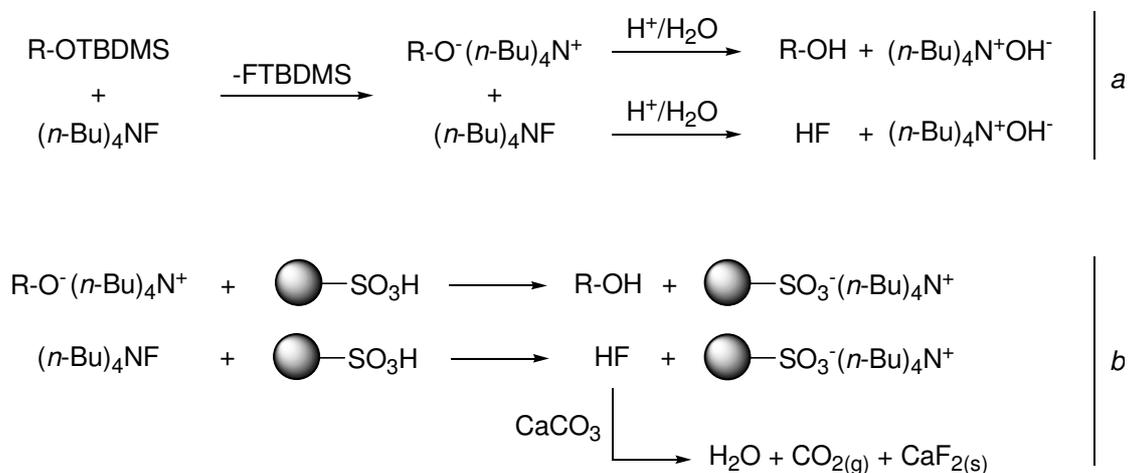
Säulenchromatographie völlig problemlos, so dass **31** in hoher Reinheit erhalten wurde (Schema 5.10).



Schema 5.10: Einführung des Cyanidrestes an silyl-geschütztem 5-Iod-dC (**30**). TBDMS-Cl = *tert*-Butyldimethylsilylchlorid.

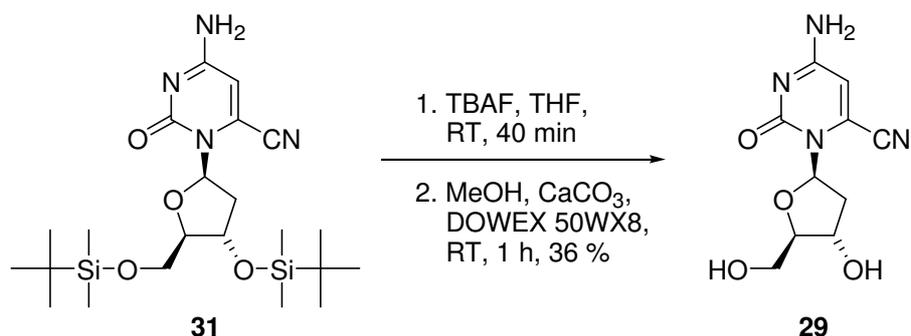
Die Abspaltung der Silylschutzgruppen von **31** nach Standardmethoden bereitete hingegen einige Schwierigkeiten, da die Verwendung von HF-Pyridin-Komplex ein uneinheitliches Produkt ergab und der einfache Umsatz mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF)^[405] stets hartnäckige TBA-Verunreinigungen zur Folge hatte. Die Entschützung gelang schließlich nach einer neuen Vorschrift von *Kaburagi* et al. aus dem Jahr 2007, die auch bei den späteren Synthesen der 2'-Desoxyzebularinderivate **34** - **36** erfolgreich angewendet wurde.^[406] Die Probleme bei der Abspaltung von Silylschutzgruppen mit TBAF rühren meist von dem notwendigen großen Überschuss des Reagenzes her. Dieser Überschuss an TBAF sowie die daraus hervorgehenden Reaktionsprodukte sind während der Aufarbeitung oft schwierig und in der Regel nur durch wässrige Extraktion zu entfernen (Schema 5.11, Gleichungen a). Dieser Punkt bringt natürlich erhebliche Probleme mit sich, wenn das entschützte Produkt ebenfalls sehr gut wasserlöslich ist. Bei einfacher säulenchromatographischer Aufarbeitung der Reaktionsmischung erhält man im Falle von Nukleosiden hingegen oft nicht näher definierbare, vermutlich salzartige Verbindungen aus dem entschützten Molekül und Tetra-*n*-butylammonium-Resten. Diese sind sehr stabil und lassen sich nicht mehr in das reine Nukleosid überführen, wodurch weder eine zufriedenstellende Analytik des gewünschten Produkts noch dessen definierte weitere Umsetzung möglich ist. Nach *Kaburagi* kann nun auf die wässrige Aufarbeitung verzichtet werden, indem der TBAF-Überschuss durch Zugabe von Calciumcarbonat und einem Ionenaustauscher (DOWEX 50WX8) neutralisiert wird. TBA-Reste können so leicht mit der festen Phase abgetrennt werden, während das Carbonat entstandenes HF vernichtet und die Reaktion noch

weiter auf die Produktseite verschiebt (Schema 5.11, Gleichungen *b*). Das freie Nucleosid kann nach der Reaktion mit Methanol von Ionenaustauscherharz und CaF_2 getrennt werden.



Schema 5.11: Abspaltung von Silylschutzgruppen unter nicht-wässrigen Bedingungen nach *Kaburagi*.^[406] *a* Reaktionsprodukte bei der Abspaltung von TBDMS-Gruppen mit TBAF. *b* Neutralisierung der Reaktionsprodukte mittels Ionenaustauscher-Harz (schwarze Kreise). R = Organischer Rest, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

Auf diese Art konnte das freie C6-substituierte Nucleosid **29** rein, allerdings in lediglich moderater Ausbeute gewonnen werden (36 %, nicht optimiert; Schema 5.12). In der Literatur werden für diese Methode hingegen Ausbeuten von über 90 % bei Mehrfachentschützungen berichtet, so dass die vorgestellte Synthese durch Änderung der Reaktionsbedingungen sicherlich noch optimiert werden könnte.^[406]



Schema 5.12: Herstellung von 6-CN-dC (**29**) über die Entschützung der entsprechenden TBDMS-geschützten Verbindung **31**. TBAF = Tetra-*n*-butylammoniumfluorid.

Das Produkt **29** erwies sich in wässriger Lösung als sehr stabil, eine Eigenschaft, die natürlich eine Grundvoraussetzung für die Anwendung der

Substanz in zellulären Studien ist. Erst nach mehreren Tagen konnten im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum erste kleine Signale eines Zersetzungsproduktes beobachtet werden.

5.3 Synthese von 2'-Desoxyzebularinderivaten

Aufgrund der beschriebenen Nachteile des bislang wirksamsten DNMT1 Inhibitors 2'-Desoxy-5-azacytidin (5-Aza-dC) wurden in der Vergangenheit umfangreiche Anstrengungen unternommen, um Alternativen in Form nukleosidischer wie auch nicht-nukleosidischer Substanzen zu finden.^[8, 222] Am erfolgreichsten waren hierbei die in Abbildung 5.2 gezeigten Nukleosidinhibitoren 1-(β -D-Ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon (Zebularin, **6**)^[32, 260, 294-297] und 2'-Desoxy-5-fluorocytidin (5-Fluoro-dC, **7**).^[92, 100, 298, 299]

Die Synthese von Zebularin wurde erstmals 1961 von *Funakoshi* durch Nukleosidierung des Ribofuranosylchlorids nach *Fox* durchgeführt und in den folgenden Jahrzehnten von diversen Arbeitsgruppen auf verschiedenen Wegen verbessert.^[407-410] Nachdem zunächst vor allem die inhibierenden Effekte auf Desoxycytidin-Deaminase untersucht worden waren, konnte *Zhou* im Jahr 2002 anhand einer Kristallstruktur die Bildung eines kovalenten Komplexes zwischen der Methyltransferase M.HhaI und einem DNA Doppelstrang mit Zebularin nachweisen. Hinweise auf eine solche Komplexbildung hatte es jedoch schon früher gegeben.^[32, 99, 321, 411-414] Im Jahr 2003 wiesen *Cheng* et al. zusätzlich die demethylierende Wirkung der Substanz und die damit verbundene Reaktivierung stillgelegter Gene nach.^[295] Im gleichen Zuge wurde eine Antitumor-Aktivität gegen verschiedene Krebszelllinien gefunden.^[294, 410] Der Reaktions- und Wirkungsmechanismus von Zebularin ist dabei dem der anderen DNMT Nukleosidinhibitoren sehr ähnlich. Auch hier ist die C6 Position verglichen mit Cytosin deutlich gegen nukleophile Angriffe aktiviert, was mit der fehlenden Aminofunktion und der damit verbundenen Erniedrigung der Elektronendichte des Heterocyclus zu erklären ist. Hierdurch werden *Michael*-ähnliche Additionen an das ungesättigte System ermöglicht.^[321, 415, 416] Wie schon für 5-Fluoro-dC gezeigt, wird das Pyrimidinon-Nukleosid von der Methyltransferase aus der DNA-Helix herausgeklappt, wobei eine kovalente Bindung zwischen der Position C6 und dem aktiven Cystein-Rest des Enzyms gebildet wird. Das Fehlen der C4 Aminogruppe und die damit verbundene

Bindungsschwächung des Basenpaares dZeb:dG scheinen die Reaktion dabei zu erleichtern, da unter anderem eine inverse Relation zwischen der Basenpaar-Bindungsstärke der Zielbase und der Reaktivität der Methyltransferase beobachtet wurde.^[321, 417, 418] Abbildung 5.1 *links* zeigt die oben erwähnte, ternäre Kristallstruktur von Zhou mit der Methylase M.HhaI, der DNA mit herausgeklapptem Desoxyzebularinrest sowie mit AdoHcy (**3**). Letzteres ist das Reaktionsprodukt des Kofaktors SAM (**2**) nach erfolgter Methylierungsreaktion (siehe Kapitel 3.3.2). Die Tatsache, dass der gezeigte Komplex bei Anwesenheit von AdoHcy statt SAM zustande kam, belegt, dass bei der Reaktion von Zebularin im Gegensatz zu 5-Fluoro-dC keine Methylierung erfolgt und damit kein SAM notwendig ist. Das in Abbildung 5.1 gezeigte bakterielle Enzym M.HhaI methyliert die erste Cytidinbase seiner Erkennungssequenz 5'-GCGC-3' bzw. im vorliegenden Fall 5'-G(Zeb)GC-3', wobei die kovalente Bindung über den Cysteinrest Cys81 des Proteins hergestellt wird.^[33] Warum der so entstandene Komplex allerdings nicht auch wieder über eine β -Eliminierung zerfällt, ist noch ungeklärt (Abbildung 5.1 *rechts*); im Gegensatz zur Situation bei 5-Aza-dC oder 5-Fluoro-dC wäre das benötigte H-Atom am C5 beim Zebularin auf der 5,6-Dihydropyrimidinon-Stufe noch vorhanden.^[32, 321]

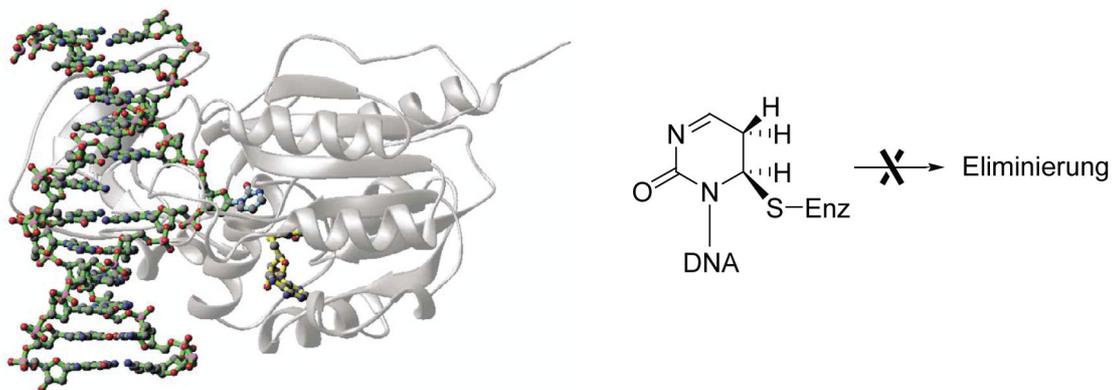
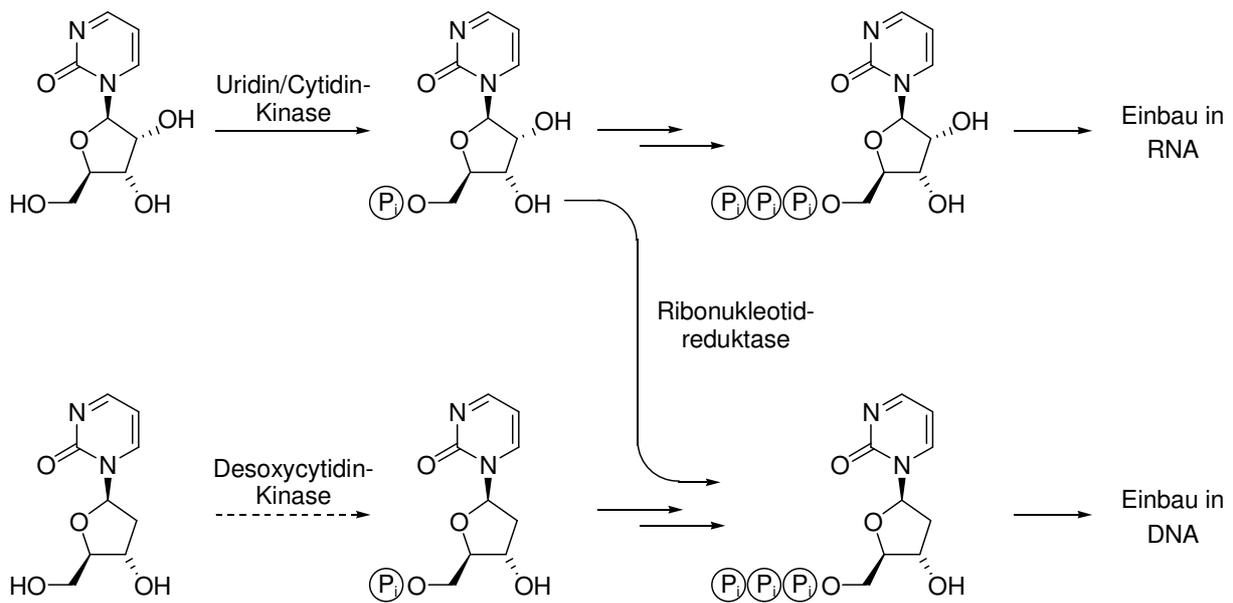


Abbildung 5.1: *Links:* Ternäre Kristallstruktur der bakteriellen Methyltransferase M.HhaI mit DNA und AdoHcy. Die zu methylierende Base (hier: Desoxyzebularin, *blau*) wurde aus der DNA Helix herausgeklappt (*base flipping* Mechanismus); *gelb:* AdoHcy. *Rechts:* Die kovalente Bindung des katalytisch aktiven Cysteinrestes des Enzyms zum C6 der Zebularinbase kann nicht mehr durch Eliminierung gebrochen werden.^[32]

Wie 5-Azacytidin (5-Aza-C, **4**) wird auch Zebularin in der Zelle teilweise direkt durch Uridin/Cytidin-Kinase in das Monophosphat und dann durch weitere Kinasen in sein Triphosphat überführt, und somit zu einem nicht unbeträchtlichen Teil in die zelluläre RNA eingebaut. Über die Auswirkungen dieser Aufnahme in die RNA ist aber bislang praktisch nichts bekannt. Andererseits kann Zebularindiphosphat durch

Ribonukleotid-Reduktase desoxygeniert und auf diesem Wege über das 2'-Desoxyzebularintriphosphat auch in die genomische DNA integriert werden (Schema 5.13).^[300] Zebularin hat dabei verglichen mit 5-Fluoro-dC oder 5-Aza-dC den Vorteil, dass es nicht durch Cytidin-Deaminase desaminiert und damit deaktiviert werden kann.^[8] Wie bereits erwähnt zeigt die Substanz sogar eine inhibierende Wirkung auf Deaminasen und kann somit die physiologische Wirksamkeit von z. B. 5-Aza-dC im Rahmen einer kombinierten Therapie steigern, da der Inhibitor dann nicht mehr durch Deaminierung inaktiviert wird.^[411, 412, 419]



Schema 5.13: Metabolismus von Zebularin (**6**) und 2'-Desoxyzebularin (**32**) in der Zelle. Für den Einbau in die genomische DNA muss Zebularin erst in 2'-Position desoxygeniert werden. Ein Großteil wird jedoch vorher in die RNA inkorporiert (ca. siebenmal mehr als in DNA).^[300] P_i = Phosphat.

Weiterhin ist Zebularin in wässriger Lösung in sauren und neutralen pH Bereichen stabil und zeigt eine deutlich geringere Zytotoxizität als die 5-Azacytidinderivate, was eine orale Applikation im Rahmen therapeutischer Anwendungen ermöglichen sollte. Die Halbwertszeit bei pH 7.0 und 37 °C wird mit etwa 21 Tagen angegeben und liegt damit weit über dem entsprechenden Wert der 5-Azacytidinderivate.^[260, 295, 322]

Die oben erwähnten Vorzüge von Zebularin werden jedoch durch mehrere, teils gravierende Nachteile wieder aufgehoben. Zum ersten ist die demethylierende Wirkung dieser Substanz um Größenordnungen geringer als die von 5-Aza-dC, so dass erheblich höhere Dosen appliziert werden müssen, um den gewünschten Effekt

hervorzurufen (IC-Werte 5-Aza-dC: nM-Bereich, Zebularin: μM -Bereich).^[8, 265, 295] Zum zweiten kann das Problem des unerwünschten Einbaus in die RNA im Fall von Zebularin nicht einfach dadurch behoben werden, dass man die entsprechende 2'-Desoxyverbindung **32** einsetzt, da diese ein sehr schlechtes Substrat für die Desoxycytidin-Kinase darstellt. Im Gegensatz zur Situation bei 5-Aza-C/5-Aza-dC ist hier also das 2'-Desoxy-Derivat ein schlechterer Inhibitor als die Ribo-Verbindung. Der Einbau von Zebularin in die RNA findet dabei etwa siebenmal häufiger statt als der in die genomische DNA, wobei der limitierende Schritt die Desoxygenierung des Zebularindiphosphats zu sein scheint.^[8, 300, 420] Nicht zuletzt zeigte Zebularin in Nagetieren und Primaten nur eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit.^[297]

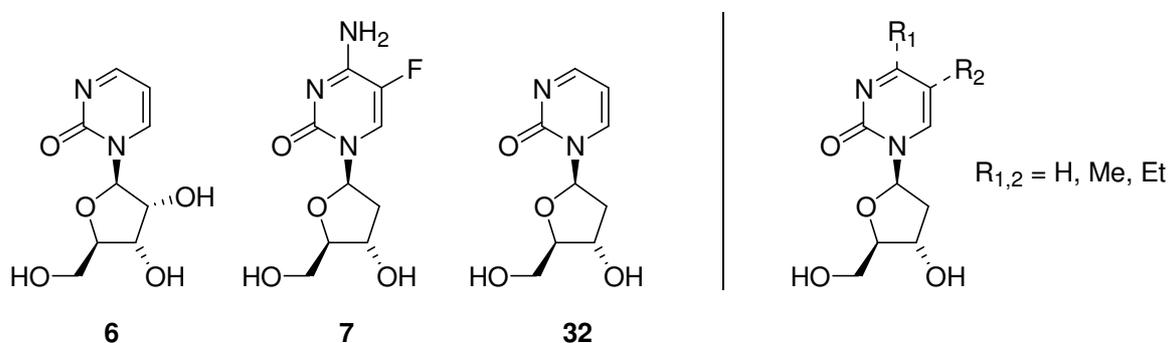


Abbildung 5.2: Links: Die bekannten Nukleosidinhibitoren Zebularin (**6**) und 5-Fluoro-dC (**7**), sowie das 2'-Desoxyderivat von Zebularin, **32**. Rechts: Die geplante Derivatisierung von **32** durch kurze Alkylreste.

Aus diesen Gründen erschien es vielversprechend zu untersuchen, ob durch die Derivatisierung von 2'-Desoxyzebularin **32** eine Verbesserung der physiologischen Eigenschaften zu erreichen wäre (Abbildung 5.2, rechts).^[300] Hierzu sollten durch Modifikation der Positionen C4 und C5 der Heterobase mehrere neue Verbindungen dargestellt und anschließend mit den bekannten Stammverbindungen Zebularin bzw. 2'-Desoxyzebularin verglichen werden. Hierbei bot sich aufgrund aktueller Entwicklungen in der Arbeitsgruppe *Carell* die Derivatisierung durch kurze Alkylreste an.^[421, 422] Neben der Ermittlung der Stabilität in wässriger Lösung sollten die Substanzen durch die verschiedenen in der Einleitung genannten *in vitro* Untersuchungen eingehend studiert werden.

Abbildung 5.3 gibt einen Überblick über die im Zuge dieser Aufgabenstellung synthetisierten Nukleoside. Von den Substanzen **32**, **33** und **34** wurden außerdem die 5'-Triphosphate hergestellt.

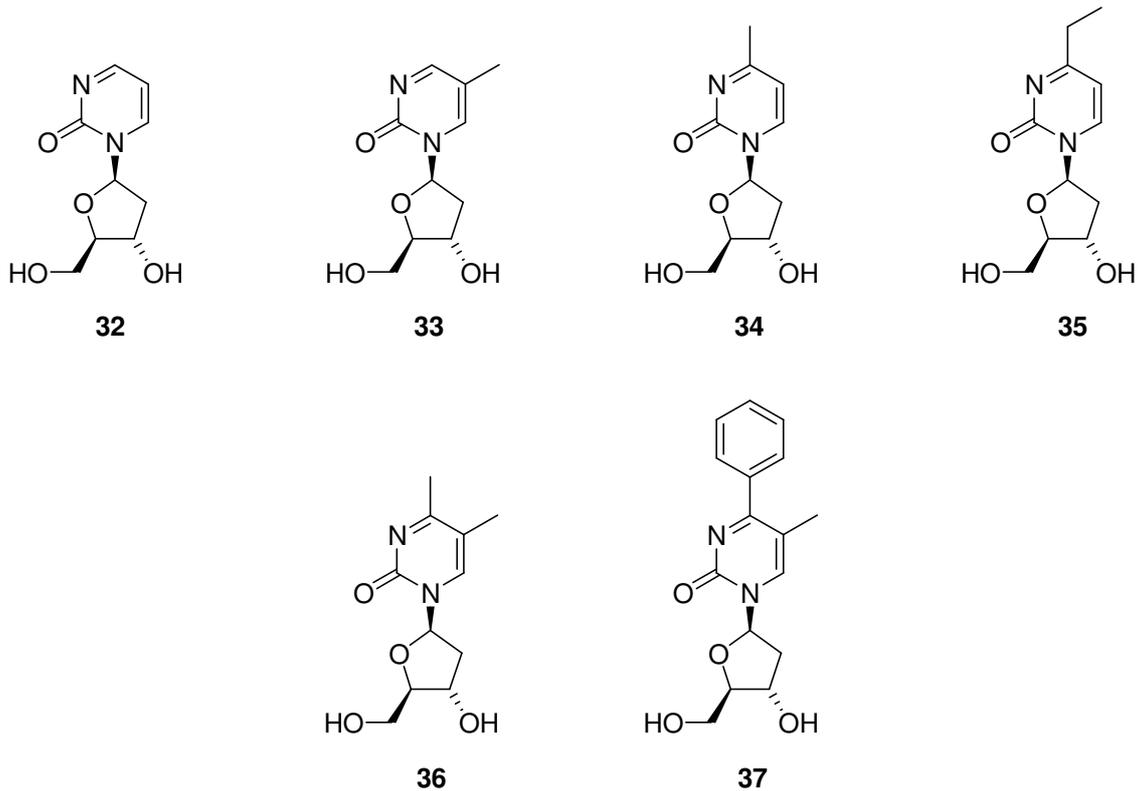


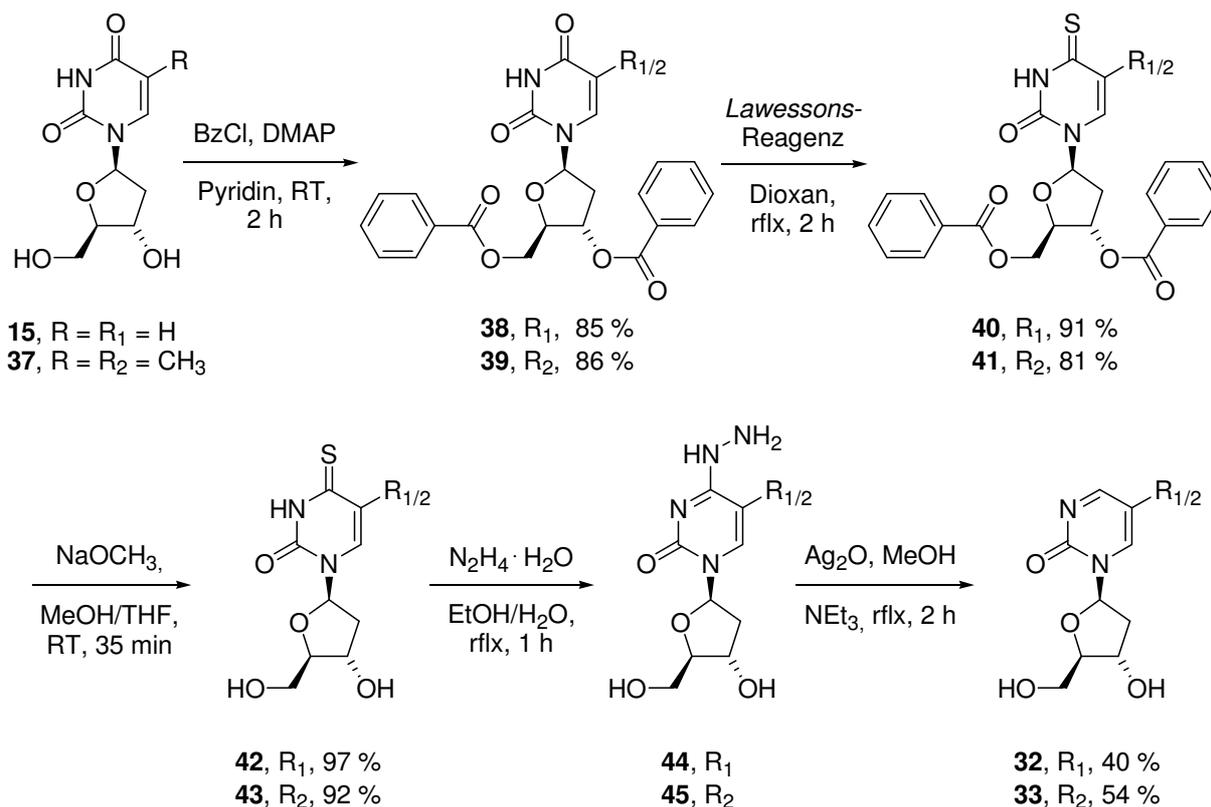
Abbildung 5.3: Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Referenzsubstanzen **32** und **33** sowie die neuen Nukleoside **34** - **37**.

Die durchgeführten Experimente und die Ergebnisse gliedern sich wie folgt: Kapitel 5.3.1 beschreibt die Synthese der Referenzsubstanz 2'-Desoxyzebularin (dZeb, **32**) sowie des ebenfalls literaturbekannten Derivats 2'-Desoxy-5-methylzebularin (5-Me-dZeb, **33**). In Kapitel 5.3.2 wird die Darstellung der Verbindungen 4-Me-dZeb (**34**), 4-Et-dZeb (**35**), 4,5-DiMe-dZeb (**36**) sowie der Modellverbindung 4-Phe-5-Me-dZeb (**37**) beschrieben. Die Triphosphatsynthesen werden in Kapitel 5.4, die *in vitro* Versuche schließlich in Kapitel 5.5 behandelt. (Anm.: Zebularin als Referenzsubstanz war kommerziell erhältlich.)

5.3.1 Synthese von 2'-Desoxyzebularin (**32**) und 2'-Desoxy-5-methylzebularin (**33**)

Die beiden literaturbekannten Substanzen 2'-Desoxyzebularin (**32**) und 2'-Desoxy-5-methylzebularin (**33**) wurden über den gleichen Syntheseweg hergestellt und werden hier deshalb gemeinsam behandelt.

Die bekannten Synthesen von Pyrimidin-2-on-desoxyribonukleosiden verlaufen entweder über die Kupplung des Zuckers mit der Heterobase,^[423-426] oder sie beruhen auf der Desoxygenierung der entsprechenden 2'-Desoxyuridin- oder Thymidinderivate in C4 Position.^[99, 415, 419, 427-430] Gleiches gilt für die bekannten analogen Ribonukleoside.^[408, 410, 430-433] Nukleosid **32** wurde erstmals 1964 von *Laland* durch Reduktion von dU mit Natriumamalgam dargestellt, allerdings in schlechten Ausbeuten.^[434] Aufgrund der bereits erwähnten synthetischen Nachteile der Nukleosidierung wurde in der vorliegenden Arbeit dem Weg über die Desoxygenierung von 2'-Desoxyuridin bzw. von Thymidin der Vorzug gegeben. Hierzu muss das 4-Hydrazinopyrimidinonukleosid hergestellt werden, welches anschließend mit einem geeigneten Oxidationsmittel umgesetzt wird. Die Synthese der Hydrazinverbindung wurde bereits durch Reaktion von Hydrazinhydrat mit dem 4-(1,2,4-Triazol-1-yl-), dem 4-(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-) sowie dem 4-Thio-pyrimidin-2-on-Nukleosid beschrieben. Für die Oxidation wurde meist Silber(I)oxid, neuerdings auch *N*-Phenyltriazolindion (PTAD) verwendet.^[99, 415, 419, 427-430] Von den bekannten Synthesen wurden mehrere durchgeführt, wobei eine Vorschrift nach *Taylor* die besten Ausbeuten lieferte (Schema 5.14).^[99] Im ersten Schritt wurden die Nukleoside (**15**, **37**) hierbei mit Benzoylchlorid 3'- und 5'-benzoyliert und anschließend mit *Lawessons* Reagenz in sehr guten Ausbeuten zu den 4-Thio-Derivaten **40** und **41** umgesetzt. Die Entschützung mit Natriummethylat zu den freien Nukleosiden **42** und **43** verlief ebenfalls problemlos. Die anschließende Reaktion mit Hydrazinhydrat lieferte die 4-Hydrazinopyrimidinon-Verbindungen, die aber nicht weiter aufgereinigt werden mussten und lediglich im rohen Zustand NMR-spektroskopisch identifiziert wurden. Wie auch in der Literatur berichtet, war die nun folgende Oxidation der limitierende Schritt der Synthese.^[99, 428] In Übereinstimmung mit den beschriebenen Beobachtungen konnten bei der Umsetzung von **44** und **45** mit Silber(I)oxid lediglich Ausbeuten um die 50 % erreicht werden. Die Nukleoside **32** und **33** konnten entgegen anderslautender Angaben von *Wightman* problemlos säulenchromatographisch aufgereinigt und somit sehr rein und in ausreichenden Mengen hergestellt werden.^[433]

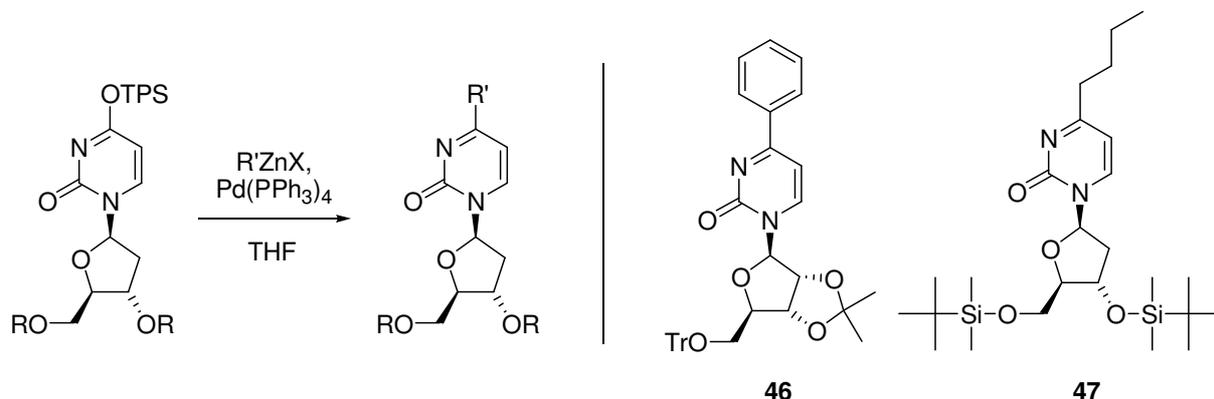


Schema 5.14: Synthese der als Referenzen benötigten Nucleoside 2'-Desoxyzeburin (dZeb, **32**) sowie 5-Methyl-2'-desoxyzeburin (5-Me-dZeb, **33**). Lawesson = 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetan-2,4-disulfid. R₁ = H, R₂ = CH₃.

5.3.2 Synthesen der 2'-Desoxyzeburinderivate **34** - **37**

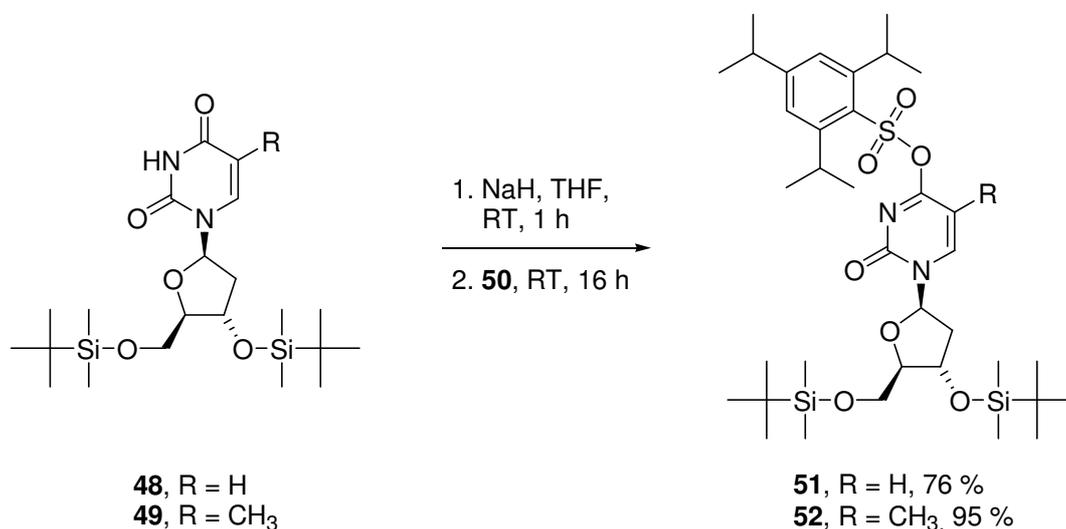
Pyrimidinnucleoside mit gesättigten C4 Alkylsubstituenten wurden in der Vergangenheit meist aufwändig über die Glykosylierung der entsprechenden Heterocyclen hergestellt.^[408, 431, 432, 435-438] Außerdem wurde die C4 Position durch Umsetzung von Alkoholen, Aminen, Thiolen und CH-aciden Verbindungen mit den 4-(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl)-, 4-Chlor- sowie 4-(1,2,4-Triazolyl)-Nucleosiden modifiziert.^[99, 394, 439, 440] Die reaktiveren 4-Brom- und 4-Iod-Nucleoside sind bereits zu instabil. Von den zuvor genannten Abgangsgruppen bot sich vor allem die 2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-Gruppe (TPS) an, da die entsprechenden Verbindungen leicht zugänglich und im Vergleich etwa zu den 4-Chlor-Derivaten sehr stabil sind. So können sie ohne Probleme säulenchromatographisch aufgereinigt und unter Argon bei -20 °C über Monate unversehrt aufbewahrt werden. Hennecke aus der Arbeitsgruppe Carell hatte in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich die Möglichkeit der C-C-Bindungsknüpfung an 4-TPS-Uridderivaten über Negishi-

Kupplungen untersucht und über diesen Weg die Verbindungen **46** und **47** hergestellt (Schema 5.15).^[421, 422]



Schema 5.15: Derivatisierung der C4 Position durch *Negishi*-Kreuzkupplungen nach *Hennecke*.^[422]

An diese Studien sollte nun angeknüpft werden, um den Pyrimidinon-Heterocyclus von 2'-Desoxyzebularin (dZeb) mit kurzen Alkylresten zu modifizieren. Zunächst wurden durch Umsetzung von silylgeschütztem 2'-Desoxyuridin bzw. Thymidin mit 2,4,6-Triisopropylphenylsulfonylchlorid (**50**) in guten bis sehr guten Ausbeuten die Arylsulfonate 4-TPS-dU(TBDMS₂) (**51**) und 4-TPS-dT(TBDMS₂) (**52**) hergestellt (Schema 5.16).

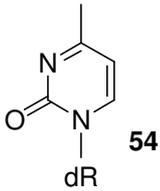
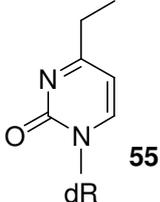
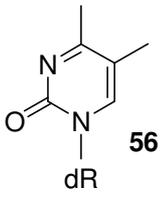
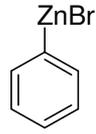
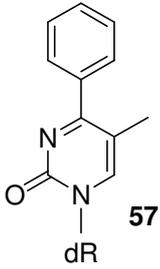


Schema 5.16: Herstellung der für die Kreuzkupplungen benötigten 4-Arylsulfonate **51** und **52**.

In der Folge konnten die Arylsulfonate **51** und **52** mit Dimethyl- bzw. Diethylzink unter Zugabe von Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) zu den silylgeschützten Desoxyzebularinderivaten **54**, **55**, und **56** umgesetzt werden. Um zu überprüfen, ob über diese Methode auch sterisch anspruchsvollere Produkte herstellbar sind, wurde im Rahmen dieser Studien außerdem erfolgreich das 4-Phenyl-pyrimidinonnukleosid

57 synthetisiert. Einen Überblick über die dargestellten Produkte und die angewendeten Reaktionsbedingungen gibt Tabelle 5.2.

Tabelle 5.2: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der *Negishi*-Kreuzkupplungen.

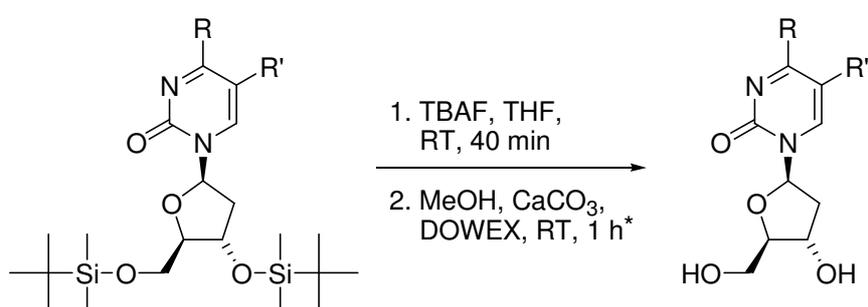
Nr.	Substrat	Nukleophil	Katalysator	t(Reaktion)	Produkt	Ausbeute
1	48	ZnMe ₂	Pd(PPh ₃) ₄ , 0.5 mol-%	16 h		61 %
2	48	ZnEt ₂	Pd(PPh ₃) ₄ , 1.0 mol-%	2.5 h		59 %
3	49	ZnMe ₂	Pd(PPh ₃) ₄ , 0.3 mol-%	2.5 h		61 %
4	49	 53	PdCl ₂ (dppf), 2.5 mol-%	3 d		68 %

Bei den Synthesen erwiesen sich prinzipiell geringe Katalysatormengen als vorteilhaft, vor allem hinsichtlich der Reinheit der erhaltenen Substanzen. Wurden die üblichen 10 mol-% verwendet, war es nicht möglich, den Palladiumkatalysator vollständig vom Produkt abzutrennen. Im Falle der Synthesen von **54** - **56** waren selbst 2.5 mol-% zuviel und erlaubten in der Folge keine einwandfreie NMR-Analytik der meist braunen, öligen Reaktionsprodukte. Der Einsatz anderer Palladiumkatalysatoren wie PdCl₂(dppf) (dppf = 1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen) oder Pd(dba)₃ (dba = Dibenzylidenaceton) führte zu keinen Verbesserungen. Durch Verwendung von maximal 1 mol-% Pd(PPh₃)₄ waren schließlich per ¹H-NMR-Spektroskopie keine Katalysatorrückstände mehr detektierbar. Dies war verbunden mit einer deutlich verbesserten Qualität der

nunmehr meist farblosen, glasartigen Feststoffe. Von den 4-Alkylderivaten war 4-Me-dZeb(TBDMS₂) (**54**) am schwierigsten herzustellen. Hier wurden erstaunlicherweise sogar längere Reaktionszeiten benötigt, als bei der Synthese des sterisch anspruchsvolleren Produkts **56** (Tabelle 5.2, Einträge 1 und 3). Während man **48** in der Regel mindestens über Nacht mit ZnMe₂ umsetzen musste, um eine maximale Ausbeute zu erreichen, verlief die analoge Reaktion von **49** in weniger als drei Stunden. Für die Umsetzung von **48** mit ZnEt₂ wurde ebenfalls eine erheblich kürzere Reaktionszeit beobachtet (Tabelle 5.2, Eintrag 2). Gleichwohl unterschieden sich die erzielbaren Ausbeuten schließlich kaum und erreichten lediglich einen moderaten Bereich von etwa 60 %. Im Fall der sterisch anspruchsvollen Modellverbindung **57**, bei deren Synthese außerdem eine sp²-sp² Kupplung stattfindet (bei den übrigen Verbindungen: sp²-sp³), war schließlich eine Reaktionsdauer von drei Tagen nötig. Diesmal erwies sich der Einsatz von 2.5 mol-% Pd(dppf) als am besten geeignet (Tabelle 5.2, Eintrag 4). Eventuelle Katalysatorreste bereiteten hier keinerlei Schwierigkeiten. Die Ausbeute erreichte auch bei dieser Synthese nur knapp 68 %. Gleichzeitig konnte aber am Ende der Reaktion, ebenso wie bei den übrigen Synthesen, per Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr detektiert werden. Das 4-Phenylderivat **57** wurde aus rein synthetischem Interesse hergestellt; für die Inhibierung von Methyltransferasen ist die Substanz aus sterischen Gründen nicht geeignet.

Am Beispiel der Synthese des 4-Methylderivats **54** wurde in der Folge versucht, die Ausbeuten der Reaktion durch Änderung verschiedener Reaktionsparameter zu verbessern. Zunächst wurde die Reaktionstemperatur erhöht, was aber ebenso wie eine einfache Verlängerung der Reaktionsdauer keinerlei Auswirkungen zeigte. Auch der Einsatz größerer Mengen des Katalysators Pd(PPh₃)₄ (bis zu 10 mol-%) hatte nur unerheblichen Einfluss auf die Ausbeute. Bei Verwendung der Palladiumkatalysatoren PdCl₂(dppf) oder Pd(dba₃) konnte dagegen überhaupt kein Umsatz mehr festgestellt werden, auch nicht nach einer Reaktionszeit von drei Tagen. Einen negativen Effekt zeigte während dieser Versuche eine Erhöhung der eingesetzten Eduktmengen. Während die oben angegebenen Ausbeuten bei einem Einsatz der Arylsulfonate im 300 - 600 mg-Massstab erreicht worden waren, verschlechterten sich die Werte noch einmal, wenn die Menge der Reagenzien verdoppelt wurde. Weitere Versuche, die vorgestellten Kupplungsreaktionen zu optimieren, wurden damit aufgegeben.

Die Entschützung der alkylierten Nukleoside **54** - **56** wurde analog zur Entschützung der 6-Cyanoverbindung **31** nach *Kaburagi* durchgeführt (Schema 5.17; siehe auch Kapitel 5.2.2). Mit Ausbeuten von rund 50 bis 60 % wurden so die Desoxyzebularinderivate **34** (4-Me-dZeb), **35** (4-Et-dZeb) und **36** (4,5-DiMe-dZeb) erhalten.^[406] Das 4-phenylsubstituierte Derivat **57** spielte dabei auch hier eine Sonderrolle und konnte problemlos nach der TBAF-Standardmethode zu Verbindung **37** (4-Phe-5-Me-dZeb) umgesetzt werden.^[421] Eine Übersicht über die erzielten Ausbeuten gibt Tabelle 5.3.



Schema 5.17: Abspaltung der Silylschutzgruppen von den hergestellten Zebularinderivaten. *Bei der Entschützung von **57** entfiel der zweite Schritt.

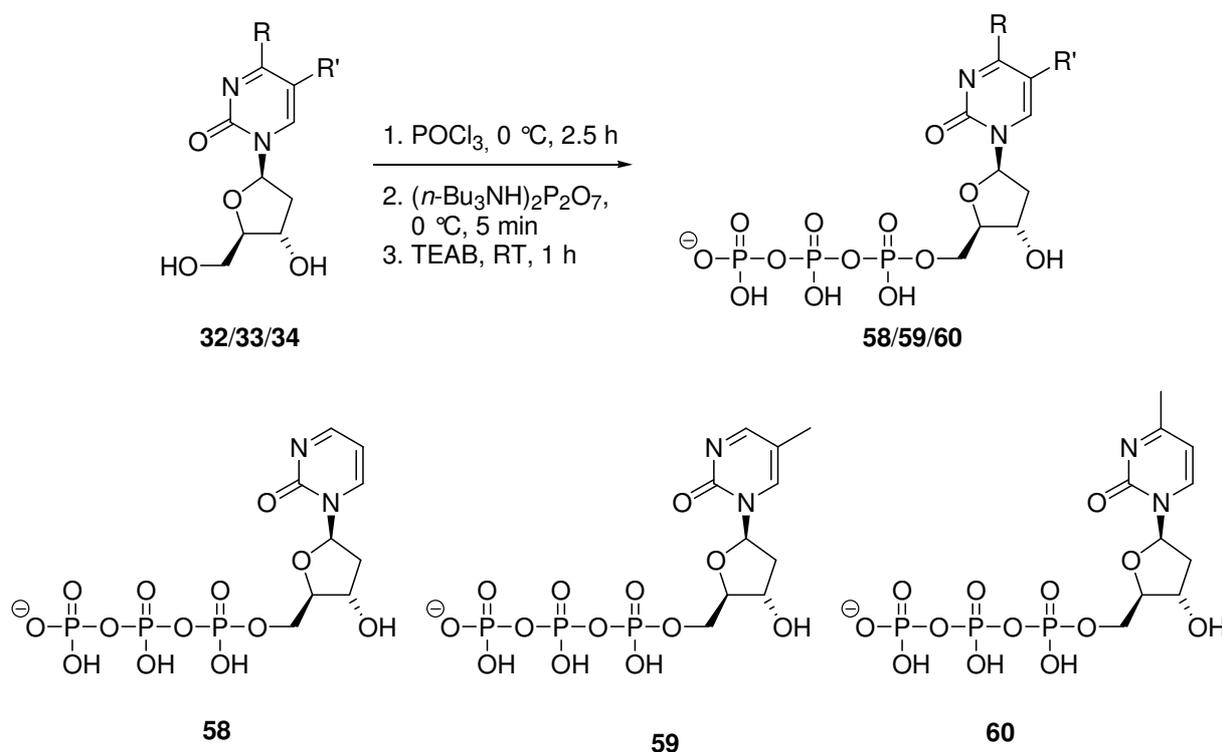
Tabelle 5.3: Ausbeuten der Synthesen von **34** - **37**.

Nr.	Edukt	Entschütztes Produkt	Ausbeute
1	54	4-Me-dZeb, 34	63 %
2	55	4-Et-dZeb, 35	57 %
3	56	4,5-DiMe-dZeb, 36	49 %
4	57	4-Phe-5-Me-dZeb, 37	76 %

Alle vier Substanzen erwiesen sich in wässriger Lösung als äußerst stabil und zeigten im ¹H-NMR-Spektrum auch nach zwei Wochen bei Raumtemperatur keine Anzeichen einer Zersetzung.

5.4 Triphosphatsynthesen

Analog der Synthese des 5-Aza-dC-Triphosphats **63** wurden von den Verbindungen **32** - **34** durch sukzessive Umsetzung mit Phosphorylchlorid und Pyrophosphat nach *Kovácz* die entsprechenden 5'-Triphosphate **58** - **60** hergestellt (Schema 5.18; siehe auch Abschnitt 4.2.1).^[353] Dabei konnten die Reaktionsmischungen problemlos durch präparative *reversed phase* HPL Chromatographie aufgereinigt werden (Ansätze mit bis zu 0.5 mmol Nukleosid).

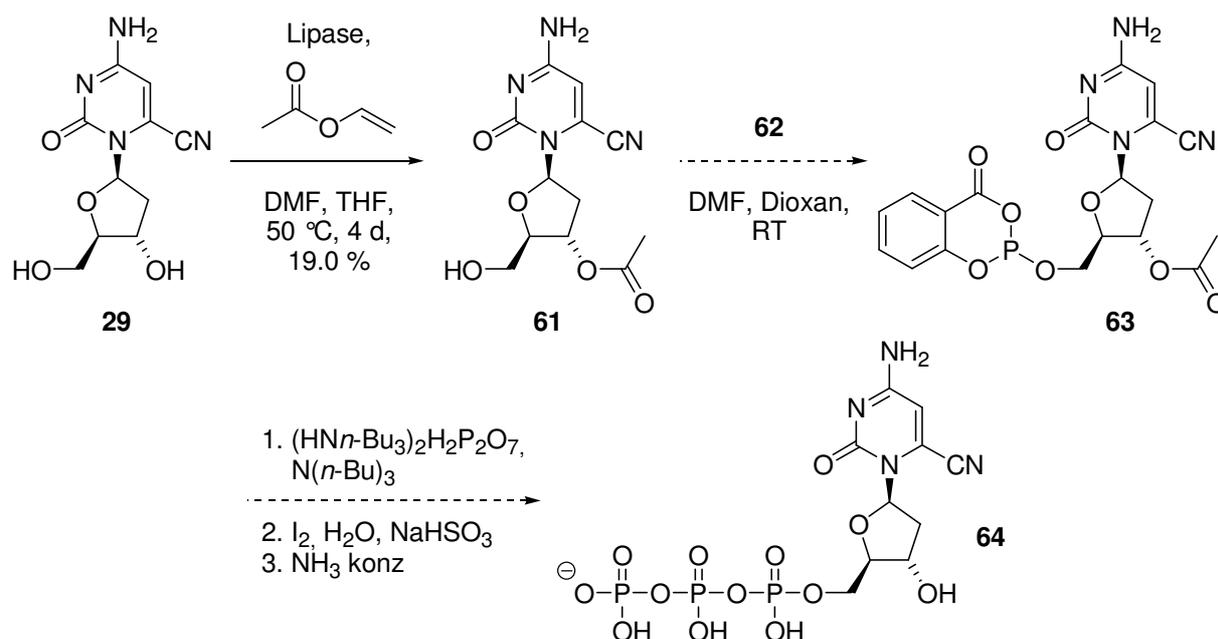


Schema 5.18: Synthese der 5'-Triphosphate dZebTP (**58**), 5-Me-dZebTP (**59**) sowie 4-Me-dZebTP (**60**).

Erstaunlicherweise gelang die Darstellung des Triphosphats der in Kapitel 5.2.2 beschriebenen 6-Cyanoverbindung **29** auf dem genannten Syntheseweg nicht, selbst unter den modifizierten Bedingungen, wie sie schon für das empfindliche 5-Aza-dC-Triphosphat **65** geschildert wurden (Kapitel 4.2.1). Das gewünschte Produkt war in der Reaktionsmischung auch nach mehreren Syntheseversuchen massenspektrometrisch nicht nachzuweisen.

Daraufhin wurde eine Methode von *Ludwig* und *Eckstein* angewendet, wenn auch in dem Bewusstsein, dass hier am Ende ein kritischer basischer Syntheseschritt notwendig wäre (Schema 5.19).^[441] Hierbei musste das Nukleosid zunächst in

3'-Position *O*-acetylgeschützt werden, was regioselektiv durch Verwendung einer Lipase möglich ist. Das 6-Cyanocytidinderivat **29** konnte auf diese Art mit Vinylacetat in einem DMF/THF Lösungsmittelgemisch enzymatisch vermittelt in die 3'-*O*-Acetylverbindung **61** überführt werden, wenn auch nur mit bescheidenen 19 % Ausbeute. In der Folge sollte das Nukleosid durch 2-Chlor-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (**62**) zum Phosphorigsäuretriester **63** umgesetzt werden, welcher mittels Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat zur 5'-Triphosphatfunktion führen sollte. Bereits auf dieser Stufe konnte das phosphorylierte Produkt jedoch nicht in der Reaktionsmischung detektiert werden. Da sich manche Substanzen in komplexen Stoffgemischen jedoch erfahrungsgemäß nur schlecht durch MALDI-TOF nachweisen lassen, wurde die Reaktion dennoch durch Zugabe von Ammoniak fortgeführt. Das Triphosphat **64** konnte aber auch nach einer HPL chromatographischen Aufreinigung der Reaktionsmischung nicht detektiert werden.



Schema 5.19: Geplante Synthese des 5'-Triphosphats des 6-Cyano-Cytidinderivats **29**. Die 3'-acetylierte Verbindung **61** konnte jedoch nicht zum Zielmolekül **64** umgesetzt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die hier aus Zeitgründen nicht mehr bearbeitet werden konnte, wäre schließlich die äußerst schonende Herstellung des Triphosphats auf enzymatischem Weg.^[350]

5.5 *In vitro* Untersuchungen

Im Folgenden sollte das Potenzial der synthetisierten Nukleoside zur Wechselwirkung mit DNA Methyltransferasen untersucht werden. Hierzu wurden analog zu den 5-Aza-dC Dumbbell-Inhibitoren EMSA Studien (*electrophoretic mobility shift assays*), Zellproliferationsassays sowie Analysen des globalen Methylierungsgrads von HCT116 Zellen durchgeführt.

5.5.1 Einbau der Triphosphate in DNA

Zunächst sollten das nur leicht modifizierte neue Desoxyzebularinderivat **34** ebenso wie 2'-Desoxyzebularin (**32**) selbst über die Triphosphate **58** bzw. **60** in kurze synthetische DNA Stränge eingebaut werden, um durch EMS Assays das Bindungsverhalten gegenüber isolierten DNA Methyltransferasen zu ermitteln. Aufgrund der bereits vorhandenen Expertise bot sich als DNA Templat das schon in im ersten Teil der Arbeit verwendete, hantelförmige Oligonukleotid **OL7** an. Dies ermöglichte außerdem, dass die mit dem bekannten Inhibitor 5-Aza-dC gemachten Beobachtungen (Kapitel 4) bei den neuen Experimenten als Vergleich herangezogen werden konnten.

Der Einbau von **58** erwies sich als relativ unkompliziert, da die Synthesebedingungen für **DB7** fast vollständig übernommen werden konnten (vergleiche Abschnitt 4.2.3.3). Wie 5-Aza-dCTP (**67**) wurde auch 2'-Desoxyzebularintriphosphat (**58**) von der DNA Polymerase Klenow Fragment (3'→5' exo-) problemlos als Substrat akzeptiert, und nach sechsständiger Inkubation bei 30 °C und 100 µM dGTP war der hybridisierte Strang **OL7** praktisch vollständig zum elongierten Produkt umgesetzt worden (Abbildung 5.4 a, *Spuren 1* und *2*). Im Unterschied zu **67** musste **58** allerdings nur in einer Konzentration von 60 µM eingesetzt werden (vgl. **67**: 200 µM). Bereits bei einer Erhöhung der Konzentration auf 120 µM lief die Elongation mit etwa 70 % nur noch unvollständig ab. Der verlängerte Doppelstrang konnte im Anschluss analog zu **DB7** mit T4 Ligase zur geschlossenen, hantelförmigen Struktur **DB10** ligiert werden. Auch in diesem Fall wurde wieder beobachtet, dass der ligierte, geschlossene Strang auf denaturierendem Polyacrylamidgel eine erheblich größere Mobilität zeigte, als der

nicht-ligierte, offene Duplex. Nach der Ligation findet man **DB7** etwa auf einer Höhe mit dem Eduktstrang **OL7** (Abbildung 5.4, vergleiche *Spuren 2, 3 und 4*).

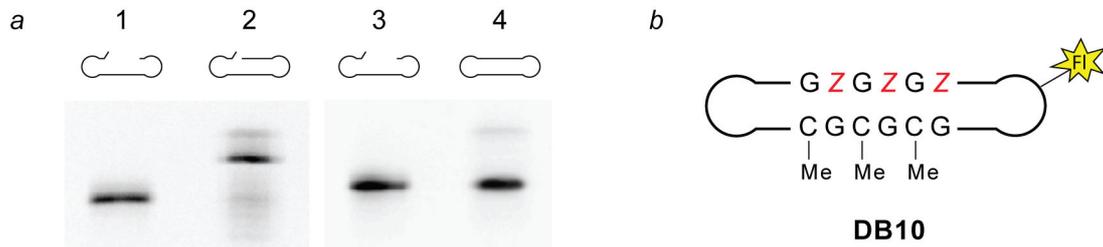


Abbildung 5.4: Synthese von **DB10** durch Elongation von **OL7** mit dGTP sowie dZebTP (**58**) und anschließende Ligation von **OL1**". a PAGE; *Spur 1: OL1; Spur 2: OL1*"'; *Spur 3: OL1; Spur 4: das ligierte Konstrukt, DB10*. **OL1** wurde hier teilweise um eine Base zuviel verlängert (schwache zusätzliche Bande in *Spur 2*). Der ligierte Produktstrang **DB10** zeigt auf dem Gel eine ähnliche Mobilität wie der nicht-verlängerte Eduktstrang **OL1** (vergleiche *Spuren 3 und 4*). Z = 2'-Desoxyzebularin (**32**); Fl = Cy3-Markierung.

Auf dem Gel in Abbildung 5.4 ist nach der Elongation eine weitere schwache Bande zu erkennen, die eine noch geringere Mobilität als der verlängerte Strang zeigt (*Spur 2*). Diese Bande stammt vermutlich von einem Nebenprodukt, in dem eine oder mehrere Nukleotide zuviel eingebaut wurden; ein solcher Strang kann in der Folge nicht mehr ligiert werden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist diese Bande auch nach der Behandlung mit Ligase noch zu finden (*Spur 4*). Dieses Nebenprodukt tauchte gelegentlich, vermutlich verursacht durch suboptimale Reaktionsbedingungen, auf und konnte nie vollständig unterdrückt werden. Neben der Änderung von Parametern wie Temperatur, Reaktionszeit und Puffersystem wurde außerdem versucht, die Reaktion mit Klenow Fragment durchzuführen, welches die 3'→5' Exonukleaseaktivität noch besitzt und den Einbau der zusätzlichen Base eventuell korrigieren könnte. Diese Polymerase führte jedoch schon nach einer Inkubationszeit von 30 min zu einem weitgehenden Abbau des Doppelstrangs (analog zur Reaktion mit **60**, siehe Abbildung 5.6).

Während die Synthese von **DB10** trotz geringer Mengen an fehlerhaft elongiertem Nebenprodukt insgesamt doch zufriedenstellend und mit guten Ausbeuten verlief, gestaltete sich der Einbau des Triphosphats **60** als vergleichsweise problematisch (Abbildung 5.5). Bei Anwendung der bisher gut geeigneten Reaktionsbedingungen (6 h bei 30 °C; Polymerase Klenow Fragment (exo-)) wurden allenfalls 50 % des Eduktstranges elongiert (*Spur 4*). Dabei war der

Einsatz von mindestens 2 U Polymerase erforderlich, um überhaupt einen nennenswerten Umsatz zu sehen (*Spur 3*).

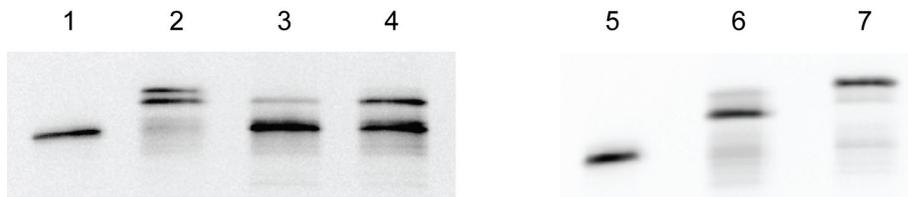


Abbildung 5.5: Elongationsversuche von **OL7** mit **60** und KF (exo-) (je 2 U, bis auf *Spur 3*) bei 30 °C; *Spuren 1, 5:* Eduktstrang **OL7**; *Spur 2:* 140 µM **60**; *Spur 3:* 350 µM **60**, 0.2 U KF (exo-); *Spur 4:* 350 µM **60**; *Spur 6:* 60 µM **58**; *Spur 7:* 350 µM **60**; *Spuren 2 - 4:* 6 h; *Spuren 6, 7:* 16 h.

Eine höhere Konzentration an Triphosphat verschlechterte die Ausbeuten ebenfalls; eine geringere führte hingegen zu fast vollständigem Umsatz, gleichzeitig aber auch zum fehlerhaften Einbau eines zusätzlichen Nukleotids (siehe Doppelbande in *Spur 2*). Eine HPL chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte gelang nicht. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 16 h konnte nunmehr ausschließlich das fehlerhafte Produkt detektiert werden, im Gegensatz zur analogen Reaktion mit dem Triphosphat **58**, bei der nur wenig Nebenprodukt gebildet wurde (*Spuren 6, 7*).

Daraufhin sollte der Einsatz anderer Polymerasen überprüft werden, wobei man im vorliegenden Fall der Einschränkung unterliegt, dass das Enzym ein möglichst niedriges Temperaturoptimum aufweisen muss. Grund hierfür ist die kurze, nur fünf Basen lange Doppelstrangsequenz ACTCC, an der elongiert werden soll. Ein einfacher Doppelstrang mit dieser Basenfolge weist rechnerisch eine Schmelztemperatur von nur 16 °C auf. Die aktuell verfügbaren Polymerasen wie Vent(exo-) oder Bst hatten jedoch alle ein Temperaturoptimum von ≥ 60 °C und waren somit für die Verlängerung von **OL7** ungeeignet, auch wenn die *tatsächliche* Schmelztemperatur des Strangs aufgrund der Hairpinstruktur des Systems über der errechneten liegen sollte. Versuche, solche Polymerasen dennoch einzusetzen, blieben erfolglos (z. B. Bst Polymerase; siehe Abbildung 5.6, *Spur 6*). Ebenso scheiterte, wie schon beim Einbau von Desoxyzebularin, die Verwendung von Klenow Fragment mit erhaltener 3'→5' Exonukleaseaktivität (KF), um eine längere Reaktionszeit ohne die damit verbundene Bildung des oben erwähnten Nebenprodukts zu ermöglichen. Je nach Reaktionspuffer wurde nach 30 min bei 30 °C entweder überhaupt kein Umsatz, oder aber der massive Abbau des

Doppelstranges beobachtet (Abbildung 5.6, *Spuren 2 - 5*). (Anm.: Das entsprechende Gel der Reaktion unter Einsatz von Triphosphat **58** sah im Wesentlichen identisch aus.)

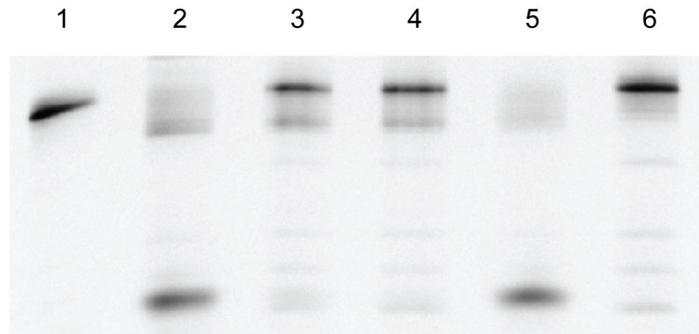


Abbildung 5.6: Elongationsversuche von **OL7** mit **60** und KF bei 30 °C für 30 min in verschiedenen Reaktionspuffern; *Spur 1:* Eduktstrang **OL7**; *Spur 2:* Thermopolpuffer; *Spur 3:* NEB 2; *Spur 4:* T4 Ligationspuffer; *Spur 5:* NEB 4; *Spur 6:* 8 U Bst Polymerase, 30 °C, 5 h. Konzentration **60**: 350 µM.

Einigermaßen zufriedenstellende Ergebnisse brachte schließlich die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37 °C. Durch Inkubation mit Klenow Fragment (exo-) für dreieinhalb Stunden konnte **OL7** fast vollständig elongiert werden, ohne dass sich zuviel Nebenprodukt bildete (Abbildung 5.7 a, *Spuren 1 und 2*). Nach der Ligation mit T4 Ligase, die standardmäßig durchgeführt werden konnte, ergibt sich auf dem Polyacrylamidgel für den geschlossenen Dumbbell **DB11** ein ähnliches Bild wie im Fall von **DB10** (Abbildung 5.7 a, *Spuren 3 und 4*; vergleiche Abbildung 5.4).

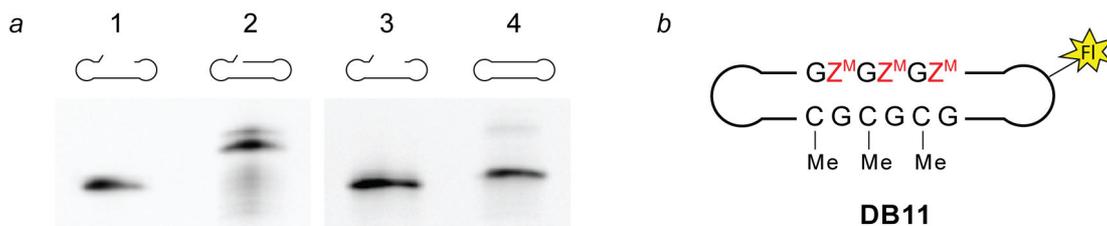


Abbildung 5.7: Synthese von **DB11** durch Elongation von **OL7** mit dGTP sowie 4-Me-dZebTP (**60**) und anschließende Ligation von **OL1'''**. a) PAGE; *Spur 1:* **OL1**; *Spur 2:* **OL1'''**; *Spur 3:* **OL1**; *Spur 4:* das ligierte Konstrukt, **DB11**. **OL1** wurde hier teilweise um eine Base zuviel verlängert (schwache zusätzliche Bande in *Spur 2*). Der ligierte Produkt-Strang **DB11** zeigt auf dem Gel eine deutlich höhere Mobilität als der lediglich verlängerte Strang **OL1'''** (vergleiche *Spuren 2 und 4*). Z^{Me} = 2'-Desoxy-4-methylzebularin (**34**); FI = Cy3-Markierung.

Für beide Triphosphate, **58** und **60**, ist außerdem zu bemerken, dass die modifizierten Nukleotide trotz der fehlenden 4-Aminofunktion durchgehend als Cytidinanaloga und nur gegenüber von dG in die Dumbbell DNA eingebaut wurden. Führt man die Reaktion unter Abwesenheit von dGTP durch, konnte kein

elongiertes Produkt detektiert werden. Beide Moleküle verhalten sich hier somit, in Übereinstimmung mit der Literatur, biochemisch wie Cytidinderivate.^[300]

Der Einbau des Triphosphats von 5-Methyl-dZeb, **59**, erwies sich ersten Versuchen zufolge als noch problematischer als im Fall von **60** und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu keinem erfolgreichen Abschluss mehr gebracht werden.

5.5.2 EMSA Studien

Um das Bindungsverhalten zu einzelnen DNA Methyltransferasen zu untersuchen, wurden mit den Strängen **DB10** und **DB11** EMS Assays durchgeführt, analog zu den Experimenten mit den Inhibitor-Dumbbells **DB4** und **DB7** (Kapitel 4.3.1).

Den EMS Assay mit der humanen Methyltransferase DNMT1 zeigt das Gel in Abbildung 5.8. In *Spur 1* ist als Vergleich und als Positivkontrolle die Reaktion mit dem Dumbbell **DB7**, der 5-Aza-dC als Inhibitorbase trägt, aufgetragen. Der kovalente Enzym-DNA-Komplex ist in Form der bereits Abschnitt 4.3.1.2 beschriebenen Doppelbande deutlich zu erkennen (vergleiche Abbildung 4.12). Auch der Dumbbell mit 2'-Desoxyzebularin, **DB10**, führt zur Komplexbildung, wobei hier aus bislang ungeklärten Gründen nur eine einzelne Bande auf dem SDS Gel zu sehen ist (*Spur 2*). Ernüchternd ist dagegen das Ergebnis der Reaktion von DNMT1 mit **DB11**, welcher das neue Zebularinderivat **34** trägt. Hier scheint es zu keiner kovalenten Bindung zwischen Enzym und DNA Strang zu kommen, und das Bild entspricht dem der Negativkontrollen (vergleiche *Spur 3* mit den *Spuren 4 - 6*).

5 Neue Nukleosidinhibitoren

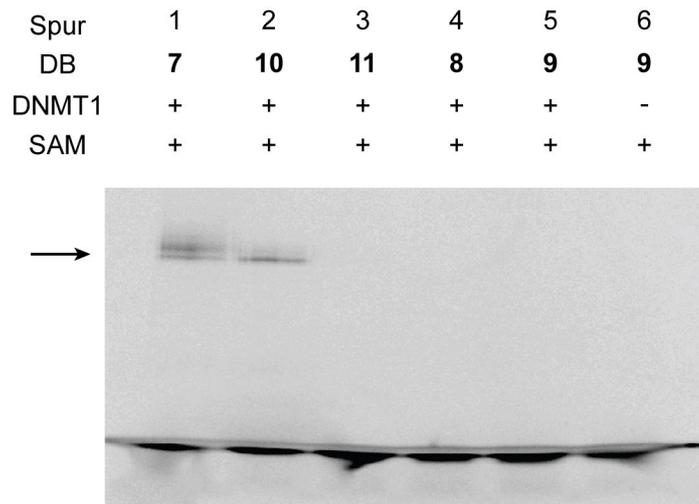


Abbildung 5.8: EMSA der Dumbbells **DB10** und **DB11** DNMT1; Inkubation bei 37 °C für 1.5 h; *Spur 1:* Positivkontrolle; *Spur 2:* **DB10**; *Spur 3:* **DB11**; *Spuren 4 - 6:* Negativkontrollen. *Pfeil:* Enzym-DNA-Komplex.

Erfolgreicher verliefen dagegen zunächst die Bindungsstudien mit den bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI. Die neuen Dumbbells **DB10** und **DB11** führten unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der eukaryotischen Methylase beide zur Ausbildung von Enzym-DNA-Komplexen und zeigten auf dem Gel die entsprechenden Banden (Abbildung 5.9; *a* M.HhaI, *b* M.SssI). Im Gegensatz zur Reaktion mit der humanen Methyltransferase ist im Fall der bakteriellen Enzyme unter den drei Inhibitor-Dumbbells interessanterweise zunächst kein Unterschied festzustellen. Die Gelbanden des Enzym-DNA-Komplexes zeigen für **DB7**, **DB10** und **DB11** die gleichen Intensitäten (vergleiche die *Spuren 1 - 3* bzw. *7 - 9*).

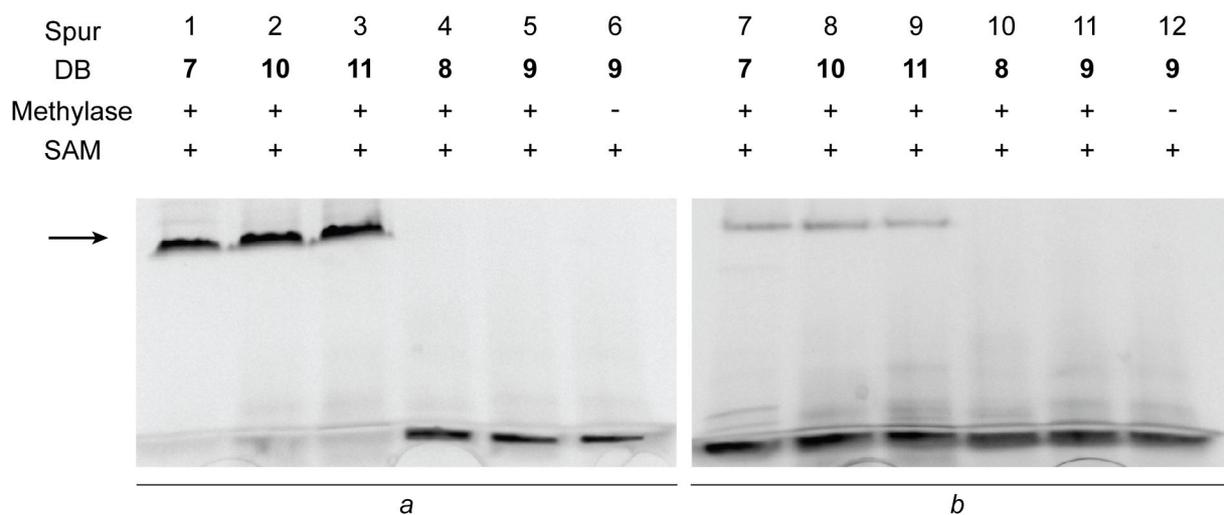


Abbildung 5.9: EMSA der Dumbbells **DB10** und **DB11** mit M.HhaI (*a*) und M.SssI (*b*); Inkubation bei 37 °C für 2 h; *Spuren 1, 7:* Positivkontrollen mit **DB7**; *Spuren 2, 8:* **DB10**; *Spuren 3, 9:* **DB11**; *Spuren 4 - 6, 10 - 12:* Negativkontrollen. *Pfeil:* Enzym-DNA-Komplex.

Die Natur der gebildeten Enzym-DNA-Komplexe sollte anhand des Bindungsverhaltens von M.HhaI noch eingehender untersucht werden. Um etwas über die Rolle des Kofaktors zu erfahren, wurde das in Abbildung 5.9 gezeigte EMSA Experiment noch einmal in Abhängigkeit von SAM durchgeführt. In Abbildung 5.10 *a* ist zu sehen, dass die Komplexbildung der drei Dumbbells bei Anwesenheit von SAM zwar praktisch identisch ist, dass sich der Komplex aus **DB11** und M.HhaI aber ohne Kofaktor offensichtlich schlechter bildet (vgl. die *Spuren 3* und *5*). Die Kofaktor-unabhängige Komplexbildung zwischen M.HhaI und kurzen DNA Strängen mit Desoxyzebularin in der Erkennungssequenz befand sich dabei in Übereinstimmung mit der Literatur und war unter anderem bereits von *Zhou et al.* beschrieben worden.^[32, 99] Eine weitere Differenzierung konnte beobachtet werden, wenn die Reaktionslösung vor der Analyse auf dem Gel zunächst mit SDS Auftragspuffer für 5 min auf 90 °C erhitzt wurde (Abbildung 5.10 *b*). Die Komplexe der Inhibitoren **DB7** und **DB10** waren bei Zugabe von SAM weitgehend hitzestabil, zersetzten sich aber teilweise, wenn bei der Reaktion kein Kofaktor vorhanden gewesen war (vergleiche *Spuren 7, 8* und *10, 11*). Diese Beobachtung ist bereits bemerkenswert, da eine gewisse Hitzeempfindlichkeit des gebildeten Dihydropyrimidinons zwar in der Literatur bekannt ist, andererseits aber die Ausbildung des kovalenten Komplexes und damit seine Eigenschaften völlig unabhängig vom Kofaktor sein sollten.^[98, 99, 322, 442] Weitaus dramatischer waren die Effekte jedoch im Fall von **DB11**. Hier zeigte der mit der Methylase gebildete Komplex keinerlei Resistenz gegen Erhitzen unter denaturierenden Bedingungen (vergleiche *Spuren 3, 5* und *9, 12*). Auch wenn selbst kovalente Enzym-DNA-Komplexe prinzipiell nicht unbegrenzt stabil gegen Einwirkung von Hitze und denaturierenden Reagenzien sein müssen, so ist der Unterschied zwischen **DB11** auf der einen und **DB7** und **DB10** auf der anderen Seite doch überaus deutlich (vergleiche die *Spuren 7, 8* und *9*).^[99, 321, 442] Die Schlussfolgerung liegt damit nahe, dass hier keine kovalente Bindung der DNA zum Enzym gebildet worden war.

5 Neue Nukleosidinhibitoren

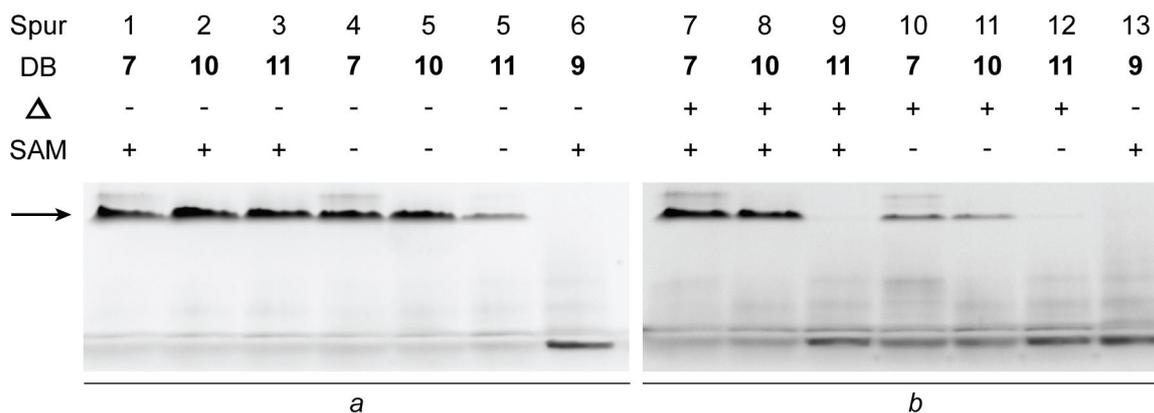


Abbildung 5.10: Einfluss von Kofaktor und Hitzeeinwirkung auf die Stabilität der Enzym-DNA Komplexe; EMS Assays der Dumbbells **DB10** und **DB11** mit M.HhaI. Die EMSA Reaktionslösungen wurden vor der Analyse auf dem Gel zusammen mit SDS Auftragspuffer für 5 min bei Raumtemperatur gehalten (a) bzw. auf 90 °C erhitzt (b). Pfeil = Enzym-DNA Komplex.

Trotz des minimalen Unterschieds der Molekülstrukturen der Verbindungen **32** (dZeb) und **34** (4-Me-dZeb), der lediglich in einer Methylgruppe in C4 Position besteht, zeigten sich somit große Differenzen bei der Wechselwirkung mit biologischen Systemen. Bemerkenswerterweise wurde für das 5-Methyl-Derivat **33** von *Hurd* eine kovalente Bindung zu einer Methyltransferase beschrieben, wobei die Bindung hier allerdings auch schwächer als bei 2'-Desoxyzebularin sein soll.^[443]

Neben den Ergebnissen mit dem Inhibitor **DB11** werfen die Ergebnisse der vorgestellten EMSA Studien jedoch eine Reihe weiterer interessanter Fragen auf. So ist es erstaunlich, dass sich die Enzym-DNA-Komplexe der bakteriellen Methylasen mit dem 5-Aza-dC enthaltenden Inhibitor **DB7** als derart hitzestabil erwiesen, nachdem bei der Reaktion mit DNMT1 das genaue Gegenteil beobachtet worden war (Kapitel 4.3.1.2). Die naheliegende Erklärung über die hydrolytische Instabilität von 5-Aza-dC kann angesichts der neuen Ergebnisse (zumindest in dieser Einfachheit) sicherlich nicht aufrechterhalten werden. Weiterhin ist beachtlich, dass die Stabilität der Komplexe gegen Denaturierung im Fall von **DB7** und **DB10** deutlich von der Anwesenheit des Kofaktors abhängt, ebenso wie der **DB11**-Enzym-Komplex bei dessen Abwesenheit nur erheblich schlechter gebildet wird. In der Literatur wurde bereits von dieser komplexen Rolle des Kofaktors berichtet, die sowohl von der jeweiligen Methylase wie auch von der Inhibitorbase abzuhängen scheint.^[96, 99, 321, 442, 444]

Zur Aufklärung dieser Fragen sind weitere eingehende Untersuchungen notwendig. Beispielsweise könnte über Verdrängungsexperimente geklärt werden, wie stark die Bindung der einzelnen Dumbbells zu den Enzymen ist und ob ihr

einkovalenter Charakter zugesprochen werden kann. Durch die Verwendung von ^3H -markiertem SAM ließe sich außerdem die Rolle des Kofaktors weiter untersuchen, da man so der Frage nachgehen könnte, ob bei der Reaktion die Übertragung einer Methylgruppe erfolgt oder nicht. Im Fall der Reaktion von M.Hhal mit einem Zebularin-enthaltenden DNA Strang beispielsweise findet nach *Zhou* kein Methyltransfer statt. Es bliebe zu klären, ob dies bei einem DNA Substrat mit dem modifizierten Molekül **34** auch noch zutrifft.^[32]

5.5.3 Auswirkungen der neuen Nukleoside auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Zellen

Um den möglichen Einfluss der neuen Nukleoside auf zelluläre Methylierungsmechanismen zu untersuchen, wurde der Effekt der Substanzen auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von humanen Darmkrebszellen (HCT116) ermittelt. Die genomische DNA dieser Krebszelllinie weist einen 5-Methyl-dC Gehalt von rund 4 % auf, der durch Einwirkung demethylierender Reagenzien wie 5-Aza-dC deutlich reduziert werden kann.^[265, 283] Die Zellen wurden nach der Einsaat sechs Tage weiter gezogen, wobei das Medium an vier Tagen mit 20, 300 und 1000 μM Nukleosid versetzt wurde. Am sechsten Tag wurde die DNA aus den Zellen extrahiert und einem enzymatischen Verdau unterworfen. Die erhaltene Nukleosidmischung wurde anschließend durch *reversed phase* HPLC analysiert. Aus den Integralen (A) der Signale für dC und 5-Me-dC kann man nach $\text{dC}^{\text{Me}} [\%] = \frac{A(\text{dC}^{\text{Me}})}{A(\text{dC}^{\text{Me}}) + A(\text{dC})} \times 100$ den globalen genomischen Methylierungsgrad errechnen.

Das Diagramm in Abbildung 5.11 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse. Die ermittelten Werte des Gehalts an 5-Methyl-dC sind dabei nicht absolut, sondern in Relation zur jeweiligen Kontrolle (dC^{Me} Gehalt parallel gezogener, unbehandelter Zellen) angegeben, deren Methylierungsgrad auf 100 % gesetzt wurde. Diese Art der Präsentation erleichtert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da der Methylierungsgrad der jeweiligen Negativkontrollen stets leicht schwankte und nie exakt bei den in der Literatur angegebenen 4 % lag.^[265] Als Positivkontrolle diente die DNA von Zellen, die mit 5-Aza-dC (**5**) behandelt worden waren. Der stark zytotoxische Inhibitor musste während des sechstägigen Experiments allerdings

lediglich zwei Tage und in einer Konzentration von nur 2 μM zu den Zellen gegeben werden, um bereits einen drastischen Effekt zu erreichen. Der absolute Methylierungsgrad der Zellen wurde hierbei beispielsweise von 3.9 % auf 0.8 % erniedrigt. Damit zeigte die genomische DNA nach der Behandlung mit 5-Aza-dC nur noch 21.5 % des 5-Me-dC Gehalts der DNA der unbehandelten Zellen (Abbildung 5.11).

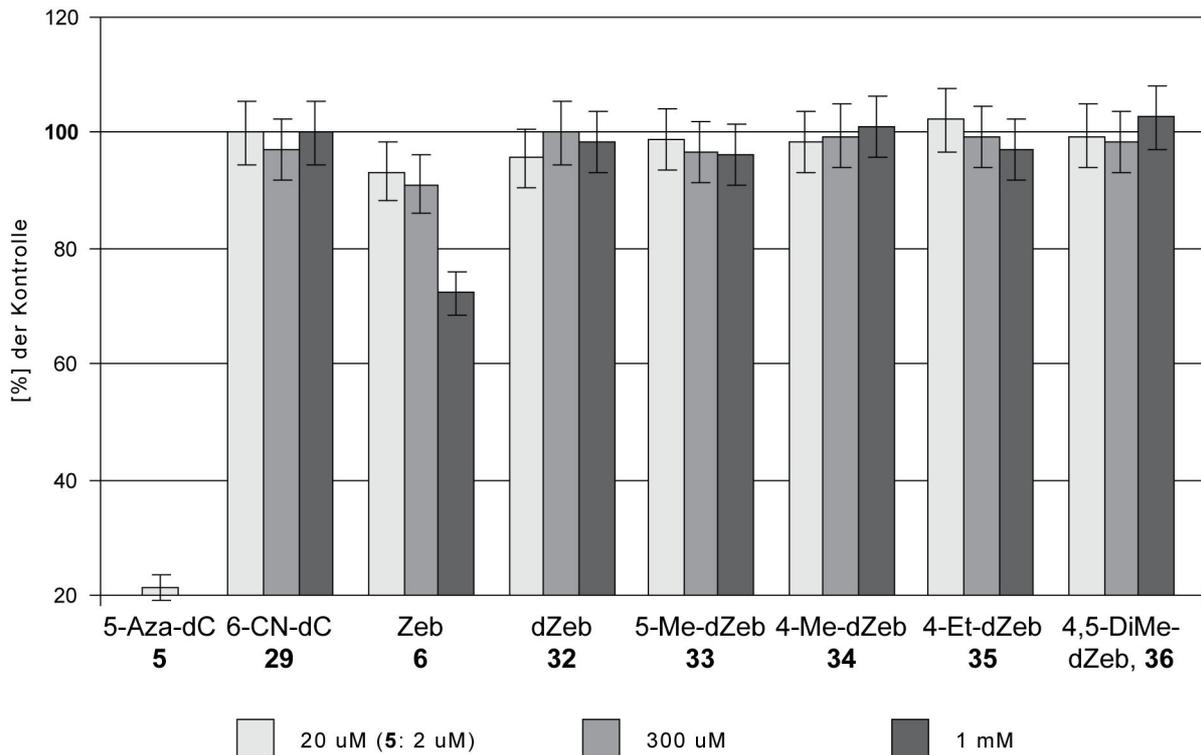


Abbildung 5.11: Auswirkung der neuen Nukleoside sowie der entsprechenden Referenzsubstanzen auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116 Darmtumorzellen. Die Zellen wurden über vier Tage mit 20, 300 und 1000 μM der neuen Substanzen inkubiert (Referenzsubstanzen abweichend: **5**: 2 d, **6**: 3 d), und nach insgesamt sechs Tagen wurde die DNA extrahiert, einem enzymatischen Totalverdau unterworfen und per HPLC auf ihren 5-Me-dC Gehalt analysiert. Der Methylierungsgrad unbehandelter Zellen wurde auf 100 % gesetzt; der absolute Wert für HCT116 Zellen liegt bei 4 - 4.5 %.^[265, 283]

Als weitere Referenz diente Zebularin (**6**), das jedoch in Übereinstimmung mit der Literatur erst bei deutlich höheren Konzentrationen als **5** den Methylierungsgrad senkte: eine Konzentration von 1 mM Inhibitor im Medium war notwendig, um den 5-Me-dC Gehalt auf 72.2 % der Kontrolle zu senken. Bei einem Vergleich von Zebularin mit den neuen Derivaten ist allerdings zu beachten, dass diese Substanz nur dreimal zu den Zellen gegeben wurde, die übrigen Nukleoside (bis auf **5**) jedoch viermal. Grund hierfür war die bei drei Anwendungen von **6** bereits deutlich sichtbare Hemmung des Zellwachstums. Es musste jedoch stets gewährleistet werden, dass

zum Zeitpunkt der Zellyse noch genügend Zellen und damit eine ausreichende Menge zu extrahierender DNA zur Verfügung stand.

Die Versuche mit den in dieser Arbeit neu synthetisierten Substanzen verliefen enttäuschend. Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass keiner der potentiellen Nukleosidinhibitoren einen nennenswerten Effekt auf die globale genomische DNA Methylierung von HCT116 Zellen zeigte. Im Rahmen der Fehlergrenzen blieb der Methylierungsgrad bei sämtlichen Nukleosiden unverändert, selbst bei millimolaren Inhibitorkonzentrationen Auch 2'-Desoxyzebularin (**32**) zeigte bei den eingesetzten Konzentrationen praktisch keine Wirkung. Abbildung 5.12 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturen am Tag der DNA Extraktion für das neue Nukleosid **34** und die Referenzsubstanzen **5** und **6**. Bereits bei 10facher Vergrößerung war ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Zelldichte zu erkennen: Während das Bild bei **34** annähernd dem der Kontrolle entsprach, inhibierten **6** und vor allem **5** das Zellwachstum deutlich (*obere Reihe*; man beachte außerdem die unterschiedlichen Konzentrationen, siehe Abbildung 5.11).

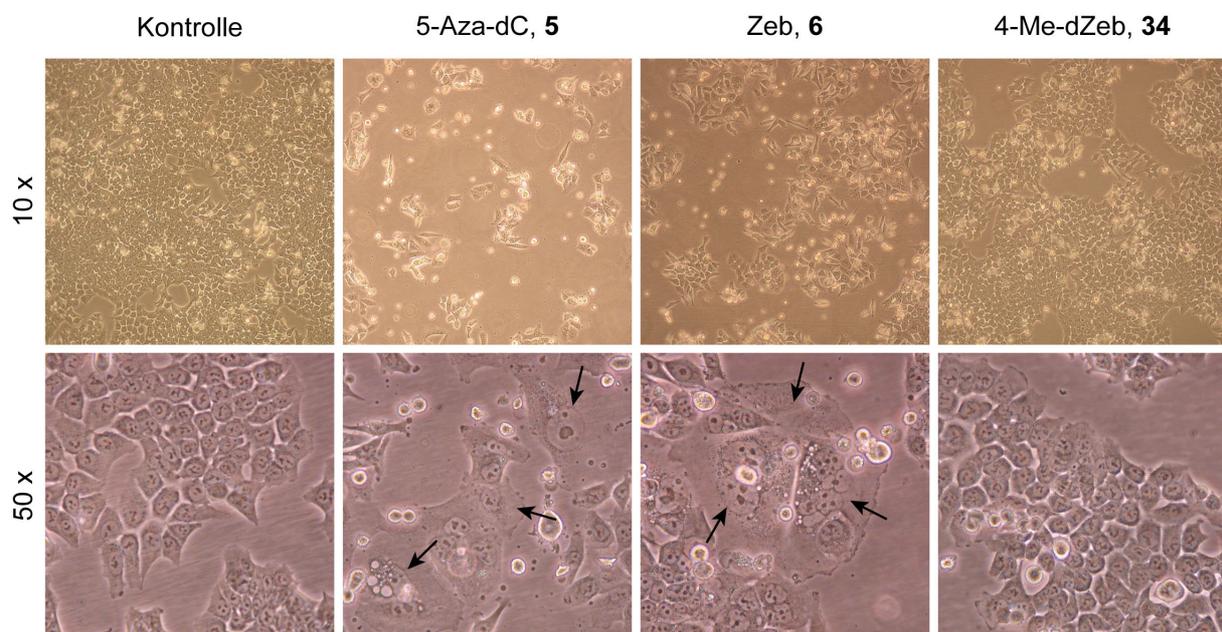


Abbildung 5.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen der HCT116 Zellen nach der Behandlung mit den Nukleosidinhibitoren; alle Zellen wurden an Tag 6 nach der Einsaat lysiert. Inkubationskonzentrationen und -zeiträume: **5**: 2 μ M, 2 d; **6**: 1 mM, 3 d; **34**: 1 mM, 4 d. *Obere Reihe*: Vergrößerung 10x; *Untere Reihe*: Vergrößerung 50x; *Pfeile*: zerstörte Zellen.

In Übereinstimmung mit dieser Feststellung konnten bei Behandlung mit **34** auch keine morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet werden, im

Gegensatz zu den beiden bekannten Inhibitoren (*untere Reihe*). Sowohl bei Zugabe von 5-Aza-dC wie auch von Zebularin wurde ein Großteil der Zellen massiv geschädigt, wobei sich die betroffenen Zellen stark aufblähten, ihre klaren Konturen verloren und sich schließlich auflösten (*Pfeile*). Bei den übrigen, in Abbildung 5.12 nicht gezeigten Nukleosiden entsprach das Bild weitgehend dem der Kontrolle.

Das Zebularinderivat **34** wurde zusätzlich über einen verlängerten Zeitraum von zwei Wochen angewendet (ebenfalls in den Konzentrationen 20, 300 und 1000 mM), zeigte aber auch hier weder Veränderungen im globalen Methylierungsgehalt noch hinsichtlich der Zellmorphologie.

Wie für Desoxyzebularin in der Literatur bereits beschrieben, kann die Ursache für die Unwirksamkeit der Nukleoside zum einen in der metabolischen Verwertung in der Zelle und der mangelhaften Konvertierung zu den 5'-Triphosphaten liegen.^[300] Zur Aufklärung des Metabolismus' der Substanzen wären jedoch noch weitere Studien erforderlich. Zum anderen muss aber gerade in Verbindung mit den Ergebnissen der EMS Assays aus Kapitel 5.5.2 auch die grundsätzliche Funktionalität der potentiellen neuen Inhibitoren in Frage gestellt werden.

5.5.4 Auswirkungen der neuen Nukleoside auf die Zellproliferation von HCT116 Zellen

Parallel zu den Untersuchungen zur globalen genomischen DNA Methylierung wurde mittels des bereits beschriebenen WST Assays die Wirkung der Nukleoside auf die Zellproliferation ermittelt. Im Idealfall würden die Inhibitoren analog zu 5-Aza-dC in die genomische DNA integriert, wo sie DNMT1 kovalent binden und somit inhibieren würden. Durch die hiermit verbundene Demethylierung von Genpromotoren und die resultierende Re-Expression von Tumorsuppressorgenen sollten die Kontrollmechanismen der Zellen wieder greifen, die bei einem unkontrollierten Wachstum die Zellteilung stoppen und die Apoptose der Tumorzellen einleiten. Für HCT116 Zellen wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass das Ausschalten bzw. Inhibieren von DNMT1 ein verringertes Wachstum zur Folge hat.^[9, 283, 288]

Für den Proliferationsassay wurden HCT116 Zellen in 96-*well* Platten (je 2500 Zellen pro *well*) für drei Tage mit Nukleosid-Konzentrationen von 20, 300 und 1000 μ M

behandelt und am vierten Tag wurde die Zellviabilität bestimmt. Als Positivkontrolle dienten wie im vorigen Kapitel 5-Aza-dC behandelte Zellen, als Negativkontrolle wurde überhaupt kein Nucleosid zugesetzt. Die Ergebnisse sind auch hier prozentual in Bezug auf die Kontrollen angegeben, welchen der Wert 100 % zugewiesen wird. Abbildung 5.13 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

Hier zeigte sich nun ein differenzierteres Bild als bei den Untersuchungen zur globalen DNA Methylierung. Der als Positivkontrolle eingesetzte Inhibitor **5** inhibierte das Zellwachstum schon bei einer Konzentration von 2 μM deutlich, und zum Zeitpunkt der Messung waren verglichen mit der Kontrolle nur noch 44 % der Zellen voll funktionsfähig. Das einzige Cytidinderivat unter den neuen Nucleosiden, 6-CN-dC (**29**), zeigte zumindest einen schwachen Effekt und erniedrigte das Zellwachstum um knapp 20 %, allerdings erst bei einer Konzentration von 1 mM. Drastisch wirkte sich hingegen die Anwendung von Zebularin (**6**) aus, wenn auch nur bei deutlich höheren Dosen verglichen mit 5-Aza-dC. Hier waren nach dreitägiger Einwirkung von 1 mM Nucleosid im Vergleich zur Kontrolle nur noch knapp 20 % der Zellen lebensfähig.

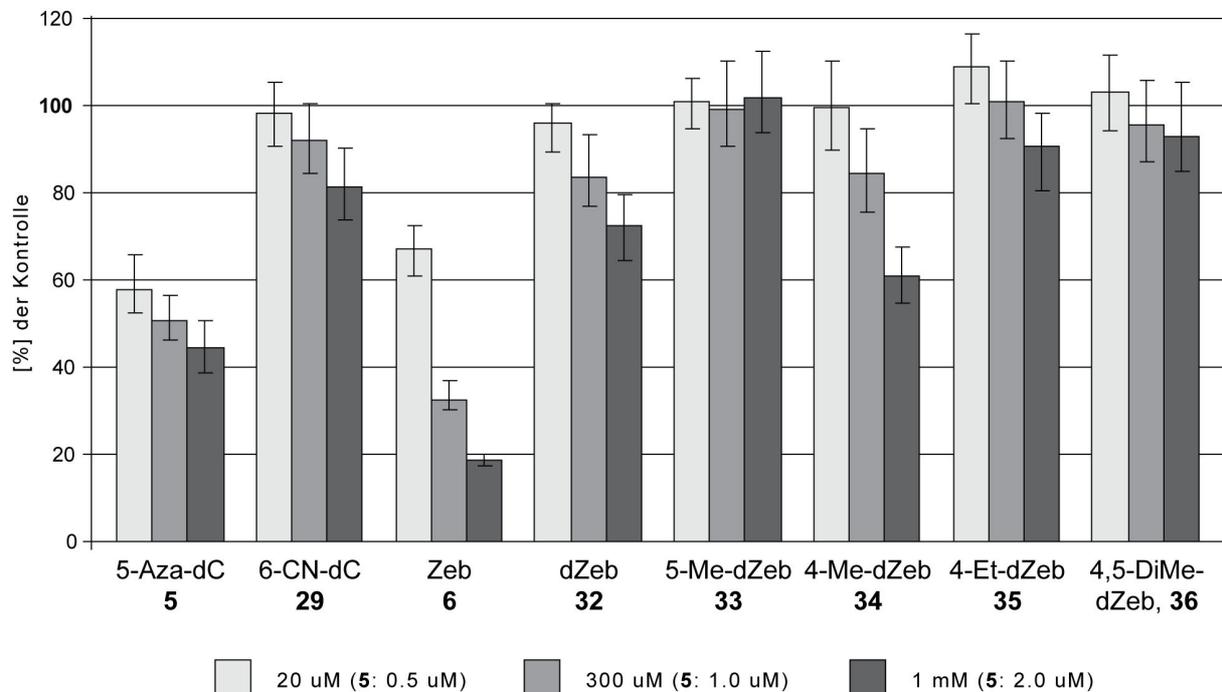


Abbildung 5.13: Auswirkung der neuen Nucleoside sowie der entsprechenden Referenzsubstanzen auf die Zellproliferation von HCT116 Darmtumorzellen. Die Zellen wurden über drei Tage mit 20, 300 und 1000 μM der neuen Substanzen inkubiert (Referenzsubstanzen **5** und **6** abweichend), und nach insgesamt vier Tagen wurde durch einen WST-1 Assay die Zellviabilität bestimmt. Der Wert für das Zellwachstum unbehandelter Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Von den übrigen Zebularinderivaten zeigte zwar keines eine vergleichbare Reduktion der Zellproliferation, dennoch konnten bei den Substanzen **32** und **34** durchaus nennenswerte Effekte beobachtet werden. Während 2'-Desoxyzebularin (**32**) das Wachstum bei 1 mM bereits auf 72 % erniedrigte, waren nach Anwendung des neuen Nukleosids 4-Me-dZeb (**34**) nur noch knapp 60 % der Zellen voll funktionsfähig. Bei den Nukleosiden **33**, **35** und **36** konnten hingegen im Rahmen der Fehlergrenzen keine Auswirkungen auf die Zellproliferation festgestellt werden.

Man muss bei der Diskussion dieser Ergebnisse natürlich beachten, dass auf dem bisherigen Stand der Untersuchungen keine Aussagen über die Ursachen der inhibierenden Wirkung auf die Zellproliferation gemacht werden können. Während bei der Ermittlung des genomischen 5-Me-dC Gehalts eine recht spezifische Wechselwirkung betrachtet wird - nämlich die zwischen dem Nukleosid und der zellulären Methylierungsmaschinerie - sieht man bei einem Zellproliferationsassay die Wirkung der Substanzen auf eine große Vielzahl an Signalwegen. Als ein Beispiel eines Wirkungsmechanismus neben der DNA Methylierung sei hier nur der bekannte inhibierende Effekt von Zebularin auf Cytidineaminasen genannt. Auf welche Art ein Stoff das Zellwachstum letztendlich hemmt, kann in der Regel nur durch aufwändige Studien geklärt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass einige der synthetisierten Substanzen biologisch aktiv sind und in zelluläre Mechanismen eingreifen können.

5.6 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Aufgrund gravierender Nachteile des bekanntesten DNMT1 Inhibitors 5-Aza-dC (**5**) erschien es lohnenswert, nach alternativen Nukleosiden zu suchen, die bei gleicher biologischer Wirkung eine erhöhte hydrolytische Stabilität und eine verminderte Zytotoxizität aufweisen. Hierbei bot es sich zum einen an, Derivate von 1-(β -D-Ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon (Zebularin, **6**) zu synthetisieren, dessen demethylierende Wirkung bekannt, jedoch weitaus geringer als die von 5-Aza-dC ist. Zum anderen wurden Versuche unternommen, 2'-Desoxycytidinderivate mit einer Abgangsgruppe in C6 Position herzustellen.

Folgende potentielle Nukleosidinhibitoren wurden neben dem Referenzmolekül **32** dargestellt: 6-CN-dC (**29**), 5-Me-dZeb (**33**), 4-Me-dZeb (**34**), 4-Et-dZeb (**35**), 4,5-

DiMe-dZeb (**36**) und 4-Phe-5-Me-dZeb (**37**) (Abbildung 5.3). Die Verbindungen **32**, **33** und **34** konnten außerdem in ihre 5'-Triphosphate überführt werden (**58**, **59** und **60**). Die Triphosphatsynthese der offensichtlich empfindlicheren Verbindung **29** scheiterte auch nach mehreren Versuchen. Eine weitere Möglichkeit, die Synthese zum Erfolg zu führen, bestünde eventuell in der enzymatischen Einführung der Triphosphatfunktion, was weitaus mildere Reaktionsbedingungen ermöglichen würde. Die Triphosphate **58** und **60** wurden mittels der Polymerase Klenow Fragment (exo-) erfolgreich in kurze synthetische DNA Stränge eingebaut (**DB10**, **DB11**). Für Verbindung **59** besteht in dieser Hinsicht hingegen noch einiger Optimierungsbedarf, z. B. über den Einsatz weiterer DNA Polymerasen. Prinzipiell können Desoxyzebularinderivate aber auch vollsynthetisch durch Festphasensynthese in künstliche DNA Stränge eingebaut werden; 2'-Desoxyzebularin übersteht die hierbei notwendige Behandlung mit Ammoniak weitgehend unbeschadet (30 min/50 °C).^[32, 329]

Die *in vitro* Bindungsstudien (EMSA) von **DB10** und **DB11** mit den DNA Methyltransferasen DNMT1, M.HhaI und M.SssI ergaben ein sehr komplexes Bild. Während **DB11** mit DNMT1 überhaupt keinen auf Polyacrylamidgel detektierbaren Komplex bildete, erwies sich der Komplex mit der bakteriellen Methylase M.HhaI als instabil gegen denaturierende Bedingungen. Die Stabilität der entsprechenden Enzym-DNA-Komplexe von **DB7** und **DB10** war hingegen deutlich von der Anwesenheit des Kofaktors abhängig und war geringer, wenn kein SAM zur Reaktion gegeben wurde. Auch die Bildung des **DB11**-M.HhaI-Komplexes war bei Abwesenheit von SAM weniger ausgeprägt. Wie in Kapitel 5.5.2 bereits ausgeführt sind hier zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen weitere Untersuchungen notwendig.

Eine Wirkung der neuen Nukleoside auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von humanen HCT116 Darmkrebszellen konnte nicht nachgewiesen werden. In weiterführenden Studien müssen neben dem absoluten 5-Me-dC Gehalt der genomischen DNA auch die lokalen Methylierungsmuster untersucht werden. Es wäre beispielsweise interessant, mittels methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) den Methylierungsstatus bestimmter Genpromotoren vor und nach der Nukleosidbehandlung zu ermitteln, denn auch

wenn der Gehalt an 5-Me-dC insgesamt ungefähr gleich bleibt, könnte es zu lokalen Veränderungen und der Re-Expression eines Tumorsuppressorgens kommen. Nur so ließen sich anschließend Aussagen darüber treffen, ob die wachstumshemmenden Effekte der Nukleoside **29**, **32** und **34** auf eine Wechselwirkung mit den zellulären Methylierungsmechanismen zurückzuführen sind. Prinzipiell müssen die Studien auch auf andere Zelllinien erweitert werden, da die Auswirkungen einer Inhibierung von DNMT1 vom Zelltyp abhängig sein können.^[332]

Wie am Beispiel von 2'-Desoxyzebularin bereits gezeigt werden konnte, kann ein geringer Effekt in der Zelle in der mangelhaften Konvertierung des Nukleosids zum 5'-Monophosphat begründet liegen. Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung der potenziellen Nukleosidinhibitoren zu erhöhen, wäre deshalb die Überführung in 5'-Monophosphat-Vorstufen. Diese setzen, einmal in der Zelle, das 5'-Monophosphat frei, das nun durch entsprechende Kinasen in das Triphosphat überführt und in die genomische DNA eingebaut werden kann.^[428]

Die fehlgeschlagene Synthese des Triphosphats von 6-Cyano-dC (**67**) könnte weiterhin auf enzymatischem Wege erfolgreich sein.^[350] Durch den somit möglichen Einbau dieses neuen Nukleosids in kurze synthetische DNA Stränge könnte dann die bislang hypothetische Inhibierung von Methyltransferasen durch das C6-substituierte Cytidinderivat überprüft werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Organisch –chemische Synthese

6.1.1 Material und Methoden

Allgemeines: Sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in mehrfach evakuierten und mit Argon rückbefüllten Schlenkkolben durchgeführt. Wenn notwendig (z. B. bei Palladium katalysierten Kreuzkupplungen), wurden die Reaktionslösungen vor dem Start der Reaktion durch mehrfaches Einfrieren mit Flüssigstickstoff, Auftauen unter Hochvakuum und Rückbefüllen mit Argon von Sauerstoff befreit. Molekularsieb wurde vor der Verwendung mit Wasser staubfrei gewaschen, im Trockenschrank vorgetrocknet und dann unter Hochvakuum im Sandbad (ca. 350 °C) für mindestens 12 h getrocknet. Zum Entfernen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde ein Laborota 4001-efficient Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* verwendet, welcher mit einem Vario PC2001-Membranpumpenstand der Firma *Vacuubrand* ausgestattet war. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde eine Ölvakuumpumpe *RZ-4* der Firma *Vacuubrand* verwendet (Endvakuum 10^{-2} - 10^{-3} mbar). Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen wurde eine Alpha 2-4 Lyophilie der Firma *Christ* verwendet.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in den kommerziellen Qualitätsstufen *puriss.*, *p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *Aldrich*, *Lancaster* oder *Sigma* bezogen. Bidestilliertes Wasser (Impedanz 18.2 MΩ) wurde mit einer Milli-Q Plus Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, oder *Aldrich* bezogen, Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung destilliert.

Die folgenden Verbindungen wurden nach Literaturvorschriften hergestellt: 2'-Desoxy-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxanediyl)-uridin,^[385] 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-ioduridin,^[445] 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethyl-silyl)-uridin,^[404] 3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-thymidin,^[404] 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(benzoyl)-uridin,^[99] 3',5'-Bis-*O*-(benzoyl)-thymidin,^[99] Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0).^[446]

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (Kieselgel-60, F254-Dünnschicht, 5 cm × 10 cm) bzw. Polyesterfertigplatten (Polygram SILG/UV254, 4 cm × 8 cm) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der Substanzen wurden die Platten unter UV-Licht betrachtet ($\lambda = 254$ nm bzw. 366 nm) bzw. mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL konz. Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) angefärbt.

UV-Vis-Spektren wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* Spektrometer mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *multicellblock* aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten der Firma *Helma* verwendet, welche 4 mm Innendurchmesser, 10 mm Strahlengang und ein Innenvolumen von 1 mL besaßen.

IR-Spektren wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100* Spektrometer aufgenommen, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war. Die Lage der Banden ist in cm^{-1} angegeben, die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach) und *br* (breit) gekennzeichnet.

Kapillargelelektrophorese (CE) wurde mit einem P/ACE MDQ DNA System der Firma *Beckman-Coulter* durchgeführt. Es wurden polyimidbeschichtete *fused silica*-Kapillaren (Gesamtlänge 30 cm, Länge zum Detektorfenster 20 cm, Innendurchmesser 100 μm) verwendet. Als Trennmatrix diente ein 6 %iges, unvernetztes Polyacrylamidgel, als Laufpuffer wurde 0.1 M TRIS Borat-EDTA/7 M Harnstoff (pH 8.3) verwendet. Die Proben wurden vor der Injektion auf Membranfiltern (MF *Membrane Filters*, Porengröße 0,025 μm) der Firma *Millipore* bis zu 3 h entsalzt und wenn nötig durch Lyophilisierung wieder aufkonzentriert. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von 10 kV für 1-8 s. Für die folgende Trennung wurde eine Spannung von 9-12 kV über 45 min angelegt, die Temperatur betrug je nach Messung zwischen 25 und 50 °C. Die Proben wurden bei $\lambda = 254$ nm detektiert.

Kernresonanzspektren (NMR) wurden auf den Geräten *Bruker DRX 200*, *Bruker AMX 300*, *Bruker ARX 300*, *Bruker AMX 400*, *Bruker AMX 500*, *Bruker AMX 600*, *Varian Oxford 200* und *Varian XL 400* aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei

Raumtemperatur, die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ für ^1H - und ^{13}C -NMR ist in ppm relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) angegeben. Kopplungskonstanten J wurden mit Hilfe der Software MestRes (*Mestrelab Research*) bestimmt und sind in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quadruplett), sept (Septuplett), m (Multipllett) sowie ggf. deren Kombination gekennzeichnet.

Massenspektren (MS) wurden auf den Geräten *Finnigan* MAT 95 Q (EI, FAB), *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Finnigan* TSQ 7000 (ESI), *Finnigan* MAT 95 S (ESI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 90 (EI, FAB) gemessen. Die wichtigsten Signale m/z werden in u angegeben, wenn möglich mit einer Zuordnung und der Intensität in Prozent, bezogen auf das intensivste Signal, in Klammern. Es wird das Monoisotopensignal angegeben. Hochauflösende Massenspektren (HR-MS) wurden auf den Geräten *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 95 S (ESI) gemessen. Für die ESI Messung von DNA Proben (ab etwa $M = 10.000$) wurden diese 2 h durch Dialyse auf Membranfiltern (MF *Membrane Filters*, Porengröße $0,025\ \mu\text{m}$) der Firma *Millipore* entsalzt, vollständig lyophilisiert und in 10 mM NH_4OAc , 25 mM Piperidin und 25 mM Imidazol zu einer DNA Konzentration von mind. $60\ \mu\text{M}$ (höhere Konzentrationen erwiesen sich als vorteilhaft) aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker* Autoflex II gemessen. Als Matrix wurden wahlweise gesättigte Lösungen von Sinapinsäure, 6-Aza-2-thiothymin (ATT), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) in 1:1 Wasser/Acetonitril verwendet. Für MALDI Messungen von DNA Proben (bis etwa $M = 10.000$) wurden diese zunächst ebenfalls auf Membranfiltern (*Millipore*) 1 -2 h entsalzt, dann durch teilweises Lyophilisieren aufkonzentriert (möglichst bis zu mikromolaren Konzentrationen) und mit einer speziellen Matrix gemessen (50 mg HPA, 10 mg Diammoniumhydrogencitrat, $10\ \mu\text{L}$ 15-Krone-5 in 1 mL H_2O).

HPL-Chromatographie wurde auf Anlagen der Hersteller *Waters* und *Merck-Hitachi* durchgeführt. Für analytische Trennungen standen zwei Anlagen der LaChrom Serie der Firma *Merck-Hitachi* und zwei Anlagen der Alliance Serie der Firma *Waters* zur Verfügung. Alle Anlagen verfügten über Gradientenpumpensysteme, Autosampler für

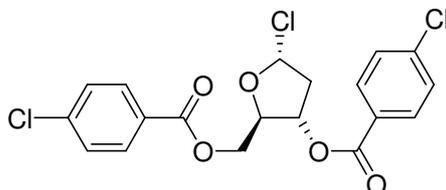
die Probenaufgabe und UV/Vis-Detektoren. Teilweise verfügten die Anlagen auch über *Diodearray* Detektoren. Für semipreparative Trennungen standen eine Anlage der LaChrom Serie der Firma *Merck-Hitachi* und eine Anlage der Breeze Serie der Firma *Waters* zur Verfügung. Beide Anlagen verfügten über ein Gradientenpumpensystem, ein Mehrwegeventil zur manuellen Probenaufgabe (Firma *Rheodyme*) und einen UV/Vis-Detektor. *Reversed phase* Chromatographiesäulen verschiedener Art wurden von der Firma *Macherey-Nagel* bezogen. Das benötigte Wasser wurde durch eine Milli-Q Plus Anlage der Firma *Millipore* von Verunreinigungen und Salzen befreit. *Gradient grade* Acetonitril wurde von den Firmen *Fisher* oder *VWR*, alle sonstigen Chemikalien (z.B. Salze und Reagenzien für Puffer) von der Firma *Fluka* (Qualität Biochemika) bezogen.

Säulenchromatographie wurde je nach Trennungsproblem bei Normaldruck oder unter leichtem N₂-Überdruck durchgeführt. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm) der Firma *Merck* verwendet. Gegebenenfalls wurde das Kieselgel durch Rühren mit Pyridin, Entfernung des Pyridins *in vacuo*, Trocknung und Lagerung im Trockenschrank (80°C) deaktiviert. Die verwendeten Lösungsmittel waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert, Chloroform und Dichlormethan unter Zusatz von Kaliumhydrogencarbonat. Im Text sind jeweils die Ausmaße der verwendeten Kieselgelsäule (Länge x Durchmesser) sowie das Lösungsmittelgemisch in Volumenanteilen angegeben.

6.1.2 Synthesevorschriften

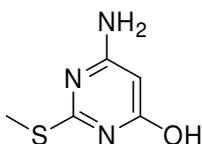
6.1.2.1 Synthese von C6-substituierten 2'-Desoxycytidinderivaten

2-Desoxy-3,5-bis-O-(p-chlorbenzoyl)- α -D-ribofuranosylchlorid (**19**)^[398]



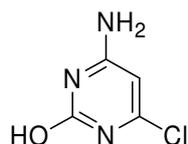
2-Desoxy- α -D-ribose (**18**, 8.620 g, 64.3 mmol) wurde in Methanol (12 mL) gelöst, mit Acetylchlorid (0.32 mL, 0.352 g, 4.5 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von abs. Pyridin (13 mL) wurde das Lösungsmittel vollständig *in vacuo* entfernt und der Rückstand einmal mit abs. Pyridin (35 mL) koevaporiert. Das erhaltene klare Öl wurde in abs. Pyridin (35 mL) aufgenommen, im Eisbad gekühlt und mit 4-Dimethylaminopyridin (0.43 g, 3.5 mmol) versetzt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde bei 0 °C 4-Chlorbenzoylchlorid (18.2 mL, 24.752 g, 141.5 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung anschließend noch 1 h bei 0 °C und 16 h bei RT weitergerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mL Wasser beendet und die Reaktionslösung mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 100 mL), 15 % wässr. Schwefelsäurelösung (2 x 100 mL), Wasser und ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Diethylether (100 mL) aufgenommen und ausgefallener Feststoff durch Filtration entfernt. Die Lösung wurde bis auf 30 mL eingeeengt und mit Eissessig (60 mL) versetzt. Anschließend wurde 15 min $\text{HCl}_{(g)}$ eingeleitet; die ausgefallenen farblosen Kristalle wurden abfiltriert, mit Isohexan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (21.163 g, 49.3 mmol, 77 %).

$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}_3\text{O}_5$, $M = 429.68$; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.04 - 7.94$ (m, 4H, H_{Aryl}), 7.45 – 7.37 (m, 4H, H_{Aryl}), 6.48 – 6.46 (m, 1H, H1), 5.54 (ddd, $^3J = 7.4, 2.9$ Hz, 1H, H3), 4.86 – 4.83 (m, 1H, H4), 4.68 (dd, $^2J = 12.1, 3.5$ Hz, 1H, H5_A), 4.60 (dd, $^2J = 12.1, 4.7$ Hz, 1H, H5_B), 2.89 – 2.73 (m, 2H, H2); **HRMS** (ESI⁺): m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{O}_5^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 429.0058; gefunden 429.0061.

2-Methylthio-4-amino-6-pyrimidinol (23)^[399]

Natriummethylat (4.6 g, 85 mmol) wurde in Ethanol gelöst (75 mL), mit Thioharnstoff (6.4 g, 84 mmol) und Ethylcyanoacetat (8.4 mL, 8.9 g, 78 mmol) versetzt und 1 h unter Rückfluss erhitzt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Nach Zugabe von Wasser (15 mL) und Dimethylsulfat (7.3 mL, 9.7 g, 77 mmol) wurde weitere 10 min unter Rückfluss erhitzt und die Reaktionslösung anschließend im Eisbad abgekühlt, wobei aus der klaren Lösung ein kristalliner Feststoff ausfiel, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet wurde (12.3 g, 78 mmol, 99.9 %).

$C_5H_7N_3OS$, $M = 157.19$; 1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 7.28$ (s, br, 2H, NH), 5.64 (s, 1H, CH), 5.19 (s, br, 1H, OH), 2.32 (s, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (75 Hz, Pyridin- d_5): $\delta = 168.4, 167.5, 166.0, 85.3, 15.4$; **MS** (EI+): m/z berechnet für $C_5H_7N_3OS^+$ $[M]^+$: 157.0; gefunden 157.0.

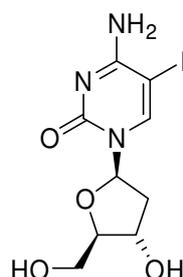
4-Amino-6-chloropyrimidin-2-ol (25)^[400]

Zu 2-Methylthio-4-amino-6-pyrimidinol (**23**, 10.00 g, 63.6 mmol) in Dimethylanilin (4 mL) wurde vorsichtig Phosphorylchlorid (50 mL) gegeben; dabei wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um entstehenden Chlorwasserstoff auszutreiben. Die gelbe Lösung wurde 8 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Der orange-farbige Rückstand wurde in Eiswasser gegossen; man ließ das Gemisch unter kräftigem Rühren auf RT auftauen, wobei sich der ausgefallene Feststoff fast vollständig wieder löste. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat 16 h auf 100 °C erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel teilweise am Rotationsverdampfer entfernt worden war, wurde auf 4 °C abgekühlt, wobei das HCl-Salz als gelblicher Feststoff ausfiel. Der Feststoff wurde in Wasser (500 mL, 90 °C)

gelöst, die Lösung filtriert und das heiße Filtrat mit konz. Natriumhydroxidlösung auf pH 7 gebracht. Die klare Lösung wurde bei 4 °C gelagert; hierbei schied sich nach einigen Tagen das Produkt **25** als farbloser Feststoff ab (2.28 g, 15.7 mmol, 25 %).

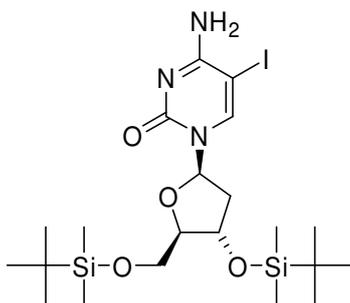
$C_4H_4ClN_3O$, $M = 145.55$; ^1H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.33$ (s, br, 2H, NH), 5.61 (s, 1H, CH), 3.39 (s, br, 1H, OH); $^{13}C-NMR$ (75 Hz, DMSO- d_6): $\delta = 159.8$ (2C), 155.9, 87.6; **MS** (EI+): m/z berechnet für $C_4H_4ClN_3O^+$ $[M]^+$: 145.0; gefunden 145.0.

2'-Desoxy-5-iodcytidin (**28**)^[403]



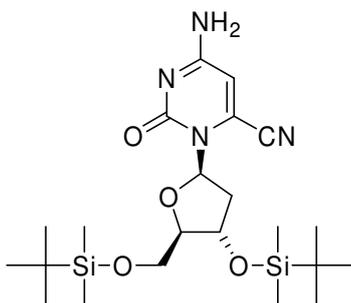
2'-Desoxycytidin (**11**, 2.00 g, 8.80 mmol) wurde in DMF gelöst, mit Iod (1.34 g, 5.30 mmol) und *m*-Chlorperbenzoesäure (1.97 g, 11.44 mmol) versetzt und 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mehrfach säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 12 x 5.5, Laufmittel = org. Phase von Isopropanol/Ethylacetat/Wasser 1:4:2). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **28** in Form farbloser Kristallnadeln (1.82 g, 5.14 mmol, 59 %).

$C_9H_{12}IN_3O_4$, $M = 353.14$; $R_f = 0.38$ (Chloroform/Methanol 3:1); ^1H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.28$ (s, 1H, H6), 7.78 (s, br, 1H, NH), 6.58 (s, br, 1H, NH), 6.08 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 1H, H1'), 5.19 (d, $^2J = 4.3$ Hz, 1H, C3'-OH), 5.18 (t, $^2J = 5.0$ Hz, 1H, C5'-OH), 4.24 - 4.18 (m, 1H, H3'), 3.80 - 3.77 (m, 1H, H4'), 3.66 - 3.51 (m, 2H, H5'), 2.14 (ddd, $J = 13.2, 6.1, 3.8$ Hz, 1H, H2'A), 1.99 (ddd, $^2J = 13.1, 6.4, 6.4$, 1H, H2'B); $^{13}C-NMR$ (75 Hz, DMSO- d_6): $\delta = 164.0, 154.2, 147.6, 87.7, 85.6, 70.3, 61.2, 56.8, 41.2$.

2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iodcytidin (30)

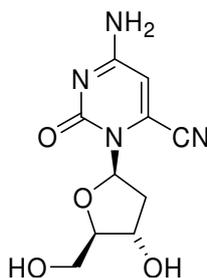
2'-Desoxy-5-iodcytidin (**28**, 2.23 g, 6.3 mmol) wurde in abs. DMF (34 mL) gelöst, bei RT mit Imidazol (2.60 g, 37.6 mmol), 4-(Dimethylamino)-pyridin (0.03 g, 0.2 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2.87 g, 19.0 mmol) versetzt und 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 20 x 5.5, Chloroform/Methanol 30:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **30** als leicht beige farbenen Feststoff (3.16 g, 5.4 mmol, 86 %).

$C_{21}H_{40}IN_3O_4Si_2$, **M** = 581,64; **R_f** = 0.1 (Chloroform/Methanol 30:1); **¹H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.05 (s, 1H, H6), 6.17 (dd, $^3J = 7.0, 6.0$ Hz, 1H, H1'), 4.28 (dd, $^3J = 5.9, 3.0$ Hz, 1H, H3'), 3.94 - 3.91 (m, 1H, H4'), 3.83 (dd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, 1H, H5'_A), 3.69 (ddd, $J = 11.5, 2.5$ Hz, 1H, H5'_B), 2.39 (ddd, $J = 13.3, 5.8, 2.9$ Hz, 1H, H2'_A), 1.99 (ddd, $J = 13.3, 7.1, 6.3$ Hz, 1H, H2'_B); **¹³C-NMR** (100 Hz, $DMSO-d_6$): δ = 167.5, 158.5, 152.3, 93.7, 92.2, 77.4, 68.1, 61.1, 47.9, 31.3, 31.0, 23.7, 23.2, 0.6, 0.4, 0.1, 0.0; **HRMS** (ESI⁺): m/z berechnet für $C_{21}H_{41}IN_3O_4Si_2^+$ [M + H]⁺ : 582.1675; gefunden 582.1700.

2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-6-cyanocytidin (31)

2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-iodocytidin (**30**, 0.20 g, 0.3 mmol) wurde, fein pulverisiert, in DMF (10 mL) gelöst und bei RT mit Kaliumcyanid (0.03 g, 0.5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 16 h gerührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 30 x 5.5, Chloroform/Methanol 15:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **31** als farblosen Feststoff (0.15 g, 0.3 mmol, 92 %).

$C_{22}H_{40}N_4O_4Si_2$, $M = 480,75$; $R_f = 0.1$ (Chloroform/Methanol 15:1); **IR** (ATR): $\nu = 3328$ br, 3090 br, 2953 w, 2928 w, 2856 w, 2238 w, 1643 s, 1617 s, 1532 s, 1471 s, 1425 w, 1378 w, 1344 w, 1251 w, 1209 w, 1188 w, 1086 br, 1057 s, 973 w, 953 w, 911 w, 874 w, 831 s, 774 s, 665 m, 640 m cm^{-1} ; **UV** ($CHCl_3$): $\lambda = 294$ nm; **1H -NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.80$ (s, 1H, NH), 7.65 (s, 1H, NH), 6.40 (s, 1H, H5), 6.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H1'), 4.35 (ddd, $J = 7.6, 3.9, 3.9$ Hz, 1H, H3'), 3.76 - 3.68 (m, 3H, H4' + H5'), 2.55 - 2.50 (m, 1H, H2'A), 2.06 (ddd, $J = 13.6, 7.2, 3.8$, 1H, H2'B); **^{13}C -NMR** (100 Hz, $DMSO-d_6$): $\delta = 163.8; 153.8; 125.4; 112.7; 106.4; 87.4; 85.6; 72.5, 63.2, 26.2, 26.1, 18.5, 18.1, -4.3, -4.5, -4.9, -5.0$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{22}H_{41}N_4O_4Si_2^+ [M + H]^+$: 481.2661; gefunden 481.2667.

2'-Desoxy-6-cyanocytidin (6-CN-dC) (29)

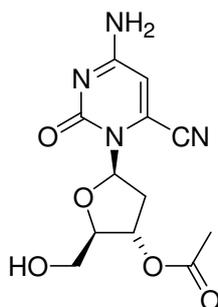
A. Durch direkte Umsetzung von 5-Iod-dC mit Cyanid: 2'-Desoxy-5-iodcytidin (**28**, 0.400 g, 1.13 mmol) wurde in abs. DMF (20 mL) gelöst, die Lösung im Eisbad gekühlt und Kaliumcyanid zugegeben (0.111 g, 1.7 mmol). Man ließ das Eisbad langsam auftauen und die Lösung 2 Tage bei RT rühren. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer zügig entfernt (Wasserbadtemperatur 50 °C); das Reaktionsgemisch wurde hierbei auf Kieselgur aufgezogen, im Hochvakuum getrocknet und anschließend säulen-chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 12 x 3.5, Chloroform/Methanol 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **29** als leicht gelblichen, glasartigen Feststoff (0.196 g, 0.78 mmol, 69 %).

B. Durch Entschützung von 5-Iod-dC(TBDMS)₂.^[406] 2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(tert-butyl-di-methylsilyl)-6-cyanocytidin (**31**, 0.22 g, 0.46 mmol) wurde in abs. THF (7.0 mL) gelöst und bei RT mit Tetrabutylammoniumfluorid (1.01 mL, 1.01 mmol, 1 M in THF) versetzt. Nach 40 min Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von Calciumcarbonat (0.300 g, 300.00 mmol), Methanol (2.4 mL) sowie DOWEX 50 WX8-200 Resin (H⁺ Form; 0.890 g) gestoppt. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung durch 2 cm Kieselgur filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 10 x 2.5, Chloroform/Methanol 20:1 → 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **29** als farblosen, glasartigen Feststoff (0.040 g, 0.17 mmol, 36 %).

C₁₀H₁₂N₄O₄, **M** = 252.23; **R_f** = 0.1 (Chloroform/Methanol 10:1); **IR** (ATR): ν = 3361 s, 3309 s, 3224 m, 3186 m, 2246 w, 1623 s, 1603 s, 1524 m, 1479 m, 1343 m, 1033 m, 1000 w cm⁻¹; **UV** (H₂O): λ = 293 nm; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.84 (s, 1H, NH), 7.72 (s, 1H, NH), 6.44 (s, 1H, H5), 6.28 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, H1'), 5.26 (d, ²J = 5.1 Hz, 1H, C3'-OH), 4.77 (t, ²J = 5.6 Hz, 1H, C5'-OH), 4.17 – 4.11 (m, 1H, H3'), 3.69 – 3.65 (m, 1H, H4'), 3.63 – 3.53 (m, 2H, H5'), 2.45 – 2.40 (m, 1H, H2'_A), 2.05 (ddd,

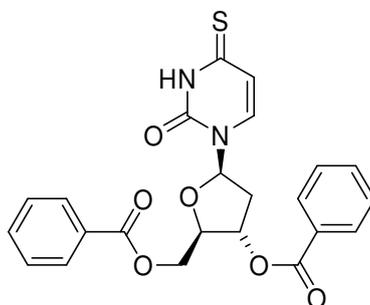
$J = 13.8, 7.2, 3.7, 1\text{H}, \text{H}2'_\text{B}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, DMSO- d_6): $\delta = 163.9, 154.0, 126.0, 112.7, 106.4, 88.0, 85.4, 71.1, 61.9, 39.0$; **HRMS** (ESI-): m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4^- [\text{M} - \text{H}]^-$: 251.0786; gefunden 251.0783.

2'-Desoxy-3'-O-acetyl-6-cyanocytidin (6-CN-dC) (**61**)



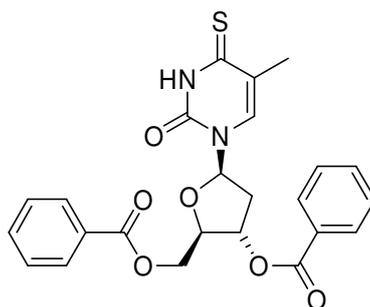
2'-Desoxy-6-cyanocytidin (**29**, 0.29 g, 1.13 mmol) wurde in abs. DMF (2.5 mL) und abs. THF (20 mL) gelöst. Unter Luftausschluss wurden Vinylacetat (209 μL , 2.26 mmol) und Lipase (0.57 g, auf Keramikpartikeln) zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde 4 Tage bei 50 °C gerührt. Der Feststoff wurde über einen Papierfilter abgetrennt und mit Methanol ausgewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgearbeitet (Kieselgel 10 x 3.5, Chloroform/Methanol 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **61** als farblosen Feststoff (0.05 g, 0.21 mmol, 19 %).

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$, $\mathbf{M} = 294.26$; $\mathbf{R}_f = 0.1$ (Chloroform/Methanol 10:1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 6.46$ (s, 1H, H6), 6.37 - 6.33 (m, 1H, H1'), 5.27 - 5.30 (m, 1H, H3'), 4.04 - 4.08 (m, 1H, H4'), 3.87 - 3.79 (m, 2H, H5'), 2.91 - 2.83 (m, 1H, H2'_A), 2.38 - 2.32 (ddd, $J = 14.4, 7.1, 3.3, 1\text{H}, \text{H}2'_\text{B}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, DMSO- d_6): $\delta = 170.7, 164.2, 155.2, 126.5, 111.4, 105.7, 87.3, 85.1, 74.1, 61.7, 35.8, 19.4$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 295.1037; gefunden 295.1036.

6.1.2.2 Synthese der Zebularinderivate **32** und **33** sowie der 5'-Triphosphate **58** und **59****2'-Desoxy-3',5'-bis-O-benzoyl-4-thiouridin (40)**^[99]

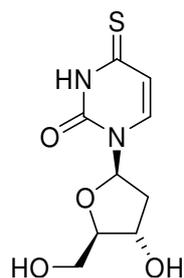
2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(benzoyl)-uridin (**38**, 0.600 g, 1.38 mmol) wurde in abs. Dioxan (10 mL) gelöst, mit 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulfid (*Lawessons Reagenz*) (0.723 g, 1.79 mmol) versetzt und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe von Natriumhydrogencarbonatlösung (20 mL, 1 M) beendet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt (Wasserbadtemperatur 60 °C). Der Rückstand wurde mit Chloroform aufgenommen, die Lösung mit 3 x 100 mL Natriumhydrogencarbonatlösung (1 M) und je einmal mit 200 mL Wasser sowie ges. Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 12 x 3.5, Isohexan/Ethylacetat 1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **40** als gelben, schaumartigen Feststoff (0.569 g, 1.26 mmol, 91 %).

$C_{23}H_{20}N_2O_6S$, $M = 452.48$; $R_f = 0.71$ (Isohexan/Ethylacetat 1:1); ^1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 9.48$ (s, 1H, NH), 8.06 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, H_{Aryl}), 8.00 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Aryl}), 7.63 – 7.61 (m, 2H, H_{Aryl}), 7.50 – 7.47 (m, 4H, H_{Aryl}), 7.36 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H6), 6.34 (dd, $^3J = 7.9$, 5.9 Hz, 1H, H1'), 6.27 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H5), 5.64 – 5.63 (m, 1H, H3'), 4.76 – 4.70 (m, 2H, H5'), 4.59 – 4.58 (m, 1H, H4'), 2.82 – 2.79 (m, 1H, H2'A), 2.33 (ddd, $J = 14.6$, 7.3, 7.3 Hz, 1H, H2'B); $^{13}C-NMR$ (150 Hz, $CDCl_3$): $\delta = 189.6$, 166.2, 147.5, 134.0, 134.0, 133.5, 130.0, 129.7, 129.0, 128.9, 113.8, 86.2, 83.4, 75.0, 64.3, 38.7; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{23}H_{21}N_2O_6S^+$ $[M + H]^+$: 453.1115; gefunden 453.1102.

3',5'-bis-O-benzoyl-4-thiothymidin (41)^[99]

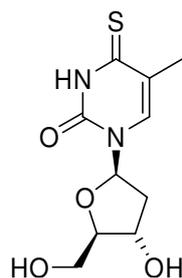
3',5'-bis-O-(benzoyl)-thymidin (**39**, 3.00 g, 6.87 mmol) wurde in abs. Dioxan (50 mL) gelöst und analog **38** mit 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulfid (*Lawessons Reagenz*) (3.62 g, 8.94 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 15 x 5.5, Isohexan/Ethylacetat 1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **41** als gelben, schaumartigen Feststoff (2.60 g, 5.57 mmol, 81 %).

$C_{24}H_{22}N_2O_6S$, $M = 466.51$; $R_f = 0.75$ (Isohexan/Ethylacetat 1:1); ^1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 9.47$ (s, 1H, NH), 8.06 (dd, $J = 8.4, 1.3$ Hz, 2H, H_{Aryl}), 8.03 (dd, $J = 8.4, 1.3$ Hz, 2H, H_{Aryl}), 7.64 – 7.60 (m, 2H, H_{Aryl}), 7.50 – 7.46 (m, 4H, H_{Aryl}), 7.34 (d, $^3J = 1.1$ Hz, 1H, H6), 6.40 (dd, $^3J = 8.6, 5.5$ Hz, 1H, H1'), 5.67 – 5.65 (m, 1H, H3'), 4.81 (dd, $J = 12.2, 3.0$ Hz, 1H, H5'A), 4.70 (dd, $J = 12.3, 3.6$ Hz, 1H, H5'B), 4.58 – 4.57 (m, 1H, H4'), 2.78 (ddd, $J = 14.3, 5.6, 1.6$, 1H, H2'A), 2.37 – 2.32 (m, 1H, H2'B); $^{13}C-NMR$ (150 Hz, $CDCl_3$): $\delta = 190.6, 166.3, 147.6, 130.8, 130.0, 129.7, 129.4, 129.0, 128.8, 119.9, 85.7, 83.3, 75.2, 64.4, 38.6, 17.1$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{24}H_{23}N_2O_6S^+ [M + H]^+$: 467.1271; gefunden 467.1262.

2'-Desoxy-4-thiouridin (42)^[99]

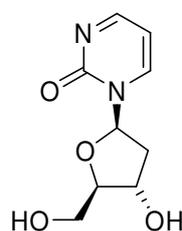
2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-benzoyl-4-thiouridin (**40**, 0.556 g, 1.23 mmol) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus abs. THF und abs. Methanol (30 mL, 1:2) gelöst, mit Natriummethanolat (0.146 g, 2.70 mmol) versetzt und 35 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eisessig (150 μ L) beendet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 12 x 3.5, Chloroform/Methanol 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **42** als gelben, glasartigen Feststoff (0.290 g, 1.19 mmol, 97 %).

$C_9H_{12}N_2O_4S$, $M = 244.27$; $R_f = 0.24$ (Chloroform/Methanol 10:1); 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.77$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 6.35 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 6.19 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, H1'), 4.36 (ddd, $J = 6.7, 3.6, 3.6$ Hz, 1H, H3'), 3.93 – 3.90 (m, 1H, H4'), 3.76 (dd, $J = 12.0, 3.3$ Hz, 1H, H5'A), 3.76 (dd, $J = 12.0, 3.8$ Hz, 1H, H5'B), 2.31 (ddd, $J = 13.7, 6.2, 3.7$ Hz, 1H, H2'A), 2.19 (ddd, $J = 13.4, 6.6, 6.6$ Hz, 1H, H2'B); ^{13}C -NMR (100 Hz, CD_3OD): $\delta = 191.1, 148.5, 135.3, 113.2, 88.1, 86.0, 70.9, 61.5, 40.3$; HRMS (ESI+): m/z berechnet für $C_9H_{13}N_2O_4S^+ [M + H]^+$: 245.0591; gefunden 245.0587.

4-Thiothymidin (43)^[99]

3',5'-bis-*O*-benzoyl-4-thiothymidin (**41**, 2.60 g, 5.57 mmol) wurde analog **40** mit Natriummethanolat (0.66 g, 12.26 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 20 x 3.5, Chloroform/Methanol 19:1 → 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **43** als gelben, glasartigen Feststoff (1.32 g, 5.12 mmol, 92 %).

$C_{10}H_{14}N_2O_4S$, $M = 258.29$; $R_f = 0.05$ (Chloroform/Methanol 10:1); 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.83$ (d, $^3J = 1.0$ Hz, 1H, H6), 6.20 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, H1'), 4.38 (ddd, $^3J = 7.0, 3.7, 3.7$ Hz 1H, H3'), 3.92 – 3.90 (m, 1H, H4'), 3.80 (dd, $J = 12.1, 3.1$ Hz, 1H, H5'_A), 3.72 (dd, $J = 12.1, 3.7$ Hz, 1H, H5'_B), 2.32 – 2.18 (m, 2H, H2'), 2.03 (d, $^4J = 1.0$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (100 Hz, CD_3OD): $\delta = 191.4, 148.7, 132.7, 119.3, 87.8, 85.6, 70.8, 61.5, 40.3, 16.2$; HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $C_{10}H_{15}N_2O_4S^+$ [$M + H$]⁺ : 259.0747; gefunden 259.0744.

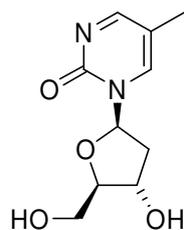
1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon (dZeb) (32)^[99]

2'-Desoxy-4-thiouridin (**42**, 0.290 g, 1.19 mmol) wurde in wässrigem Ethanol (14 mL Ethanol + 0.55 mL Wasser) mit Hydrazinhydrat (288 μ L, 0.297 g, 5.94 mmol) versetzt und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Die zu Beginn gelbe Reaktionslösung verfärbte sich dabei grünlich und erschien zum Ende der Reaktion fast farblos. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt das rohe Hydrazinderivat **44** als

gelben, schaumartigen Feststoff. Das Rohprodukt wurde lediglich durch $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie kontrolliert und ohne Aufreinigung weiter eingesetzt. Man nahm in Methanol (8 mL) auf, versetzte die Lösung mit Silber(I)oxid (0.257 g, 1.12 mmol) sowie Triethylamin (80 μL , 0.058 g, 0.57 mmol) und erhitze die schwarze Suspension 2 h unter Rückfluss. Anschließend wurde vorsichtig über etwa 2 cm Kieselgur abfiltriert, mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt 0.150 g leicht gelbliches Rohprodukt, das bereits nur wenige Verunreinigungen aufwies. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel 20 x 1.5, Chloroform/Methanol 1:0 \rightarrow 10:1) wurde **32** als farbloser Feststoff erhalten (0.110 g, 0.47 mmol, 40 %).

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, **M** = 212.20; **R_f** = 0.1 (Chloroform/Methanol 10:1); **UV** (H_2O): λ = 303 nm; **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CD_3OD): δ = 8.65 (dd, J = 6.7, 2.7 Hz, 1H, H4), 8.56 (dd, J = 4.2, 2.8 Hz, 1H, H6), 6.56 (dd, J = 6.7, 4.3 Hz, 1H, H5), 6.16 (t, 3J = 6.1 Hz, 1H, H1'), 4.36 (ddd, 3J = 6.2, 4.3, 4.3 Hz, 1H, H3'), 4.04 – 4.02 (m, 1H, H4'), 3.83 (dd, J = 12.2, 3.2 Hz, 1H, H5'A), 3.73 (dd, J = 12.2, 3.8 Hz, 1H, H5'B), 2.57 (ddd, J = 13.8, 6.3, 4.5 Hz, 1H, H2'A), 2.17 (ddd, J = 13.7, 6.1, 6.1 Hz, 1H, H2'B); **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 Hz, CD_3OD): δ = 166.0, 156.1, 145.1, 104.8, 88.6, 88.1, 70.2, 61.1, 41.4; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4^+$ [**M** + **H**] $^+$: 213.0870; gefunden 213.0877.

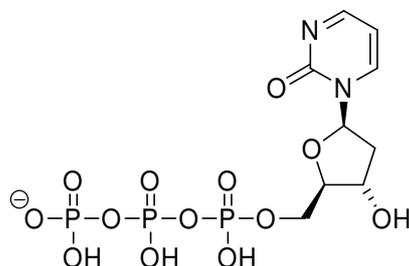
1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon (5-Me-dZeb) (**33**)^[99]



4-Thiothymidin (**43**, 1.32 g, 5.12 mmol) wurde analog **42** mit Hydrazinhydrat (1.4 mL, 1.44 g, 25.00 mmol) zum Hydrazinderivat **45** umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in Ethanol (50 mL) aufgenommen und analog **44** mit Silber(I)oxid (2.30 g, 10.00 mmol) und Triethylamin (0.5 mL, 0.363 g, 3.59 mmol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 20 x 3.5, Chloroform/Methanol 1:0 \rightarrow 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **33** als farblosen Feststoff (0.620 g, 2.74 mmol, 54 %).

$C_{10}H_{14}N_2O_4$, $M = 226.23$; $R_f = 0.1$ (Chloroform/Methanol 10:1); **UV** (H_2O): $\lambda = 313$ nm; **1H -NMR** (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.48 - 8.45$ (m, 2H, H4 + H6), 6.16 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, H1'), 4.35 (ddd, $^3J = 6.2, 4.3, 4.3$ Hz, 1H, H3'), 4.02 – 4.00 (m, 1H, H4'), 3.85 (dd, $J = 12.2, 3.1$ Hz, 1H, H5'A), 3.74 (dd, $J = 12.2, 3.7$ Hz, 1H, H5'B), 2.53 (ddd, $J = 13.7, 6.3, 4.6$ Hz, 1H, H2'A), 2.18 – 2.12 (m, 1H, H2'B), 2.13 (s, 3H, CH_3); **^{13}C -NMR** (100 Hz, CD_3OD): $\delta = 167.5, 155.8, 142.9, 114.4, 88.4, 87.9, 70.0, 61.0, 41.4, 13.0$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{10}H_{15}N_2O_4^+ [M + H]^+$: 227.1026; gefunden 227.1020.

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-triphosphat (dZebTP) (**58**)



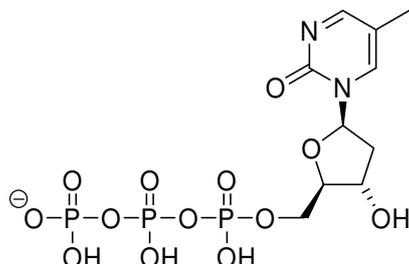
Folgende Lösungen wurden angesetzt und über Nacht über Molsieb getrocknet:

Lösung 1: 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm, 0.161 g, 0.75 mmol) in Trimethylphosphat (3.7 mL); *Lösung 2*: *n*-Tributylamin (737 μ L) und Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat (0.310 g, 0.90 mmol) in abs. DMF (5 mL).

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon (**32**, 0.160 g, 0.47 mmol) wurde mit *Lösung 1* aufgenommen, im Eisbad gekühlt, mit Phosphorylchlorid (51.3 μ L, 0.56 mmol) versetzt und 2.5 h bei 0 °C gerührt. *Lösung 2* wurde zugegeben und die Reaktion nach 5 min Rühren mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, pH 8.5, 50 mL) gestoppt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung tiefgefroren und vollständig lyophilisiert.^[353] Das Reaktionsgemisch wurde in etwa 4 mL Wasser aufgenommen und per *reversed phase* HPLC (C18) aufgereinigt (0 \rightarrow 20 % Puffer B (0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser/Acetonitril 20:80) in 45 min; Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser)). Das Produkt konnte bei 17.4 min detektiert und isoliert werden. Das Triphosphat **58** konnte mit der DNA Polymerase Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' Exo-) erfolgreich in DNA Doppelstränge eingebaut werden (siehe Kapitel 5.5.1).

$C_9H_{14}N_2O_{13}P_3^-$, **M** = 451.13; **MS** (MALDI-, ATT): m/z berechnet für $C_9H_{14}N_2O_{13}P_3^-$ $[M]^-$: 450.97; gefunden 450.89; **UV** (H_2O): λ = 304 nm.

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon-triphosphat (5-Me-dZebTP) (59)

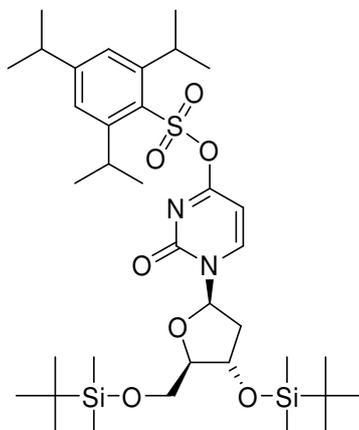


Folgende Lösungen wurden angesetzt und über Nacht über Molsieb getrocknet:

Lösung 1: 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm, 0.150 g, 0.70 mmol) in Trimethylphosphat (3.7 mL); *Lösung 2:* *n*-Tributylamin (693 μ L) und Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat (0.290 g, 0.84 mmol) in abs. DMF (5.1 mL).

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon (**33**, 0.100 g, 0.47 mmol) wurde mit Phosphorylchlorid (47.7 μ L, 0.52 mmol) und den oben genannten Reagenzien analog **32** umgesetzt.^[353] Das Produkt konnte bei 21.7 min detektiert und isoliert werden. Das Triphosphat **59** konnte mit der DNA Polymerase Klenow Fragment (3'→5' Exo-) erfolgreich in DNA Doppelstränge eingebaut werden (siehe Kapitel 5.5.1).

$C_{10}H_{16}N_2O_{13}P_3^-$, **M** = 465.16; **MS** (MALDI-, DHB): m/z berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_{13}P_3^-$ $[M]^-$: 464.97; gefunden 464.81; **UV** (H_2O): λ = 314 nm.

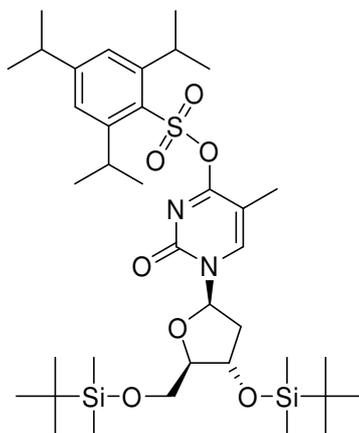
6.1.2.3 Synthese der Zebularinderivate **34** - **37** sowie des 5'-Triphosphats **60****2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-4-O-(2,4,6-triisopropylphenylsulfonyl)-uridin (51)**^[394]

2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(*tert*-butylidimethylsilyl)-uridin (**48**, 3.00 g, 6.6 mmol) wurde in abs. THF (80 mL) gelöst und nach Zugabe von Natriumhydrid (0.79 g, 32.9 mmol) 1 h bei RT gerührt. Zu der milchigen Suspension wurde 2,4,6-Triisopropylsulfonsäurechlorid (3.95 g, 13 mmol) gegeben und es wurde weitere 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Eis (ca. 10 g) sowie ges. Ammoniumchloridlösung (ca. 20 mL) beendet und das Produkt mit 3 x 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 15 x 5.5 cm, Isohexan/Ethylacetat 9:1). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **51** als farblosen, schaumartigen Feststoff (3.61 g, 5.0 mmol, 76 %).

$C_{36}H_{62}N_2O_7SSi_2$, $M = 723,12$; $R_f = 0.4$ (Isohexan/Ethylacetat 9:1); ^1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.45$ (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, H6), 7.18 (s, 2H, H_{Aryl}), 6.06 (dd, $^3J = 6.3$, 4.3 Hz, 1H, H1'), 5.99 (d, $^3J = 7.3$ Hz, H5), 4.33 - 4.30 (m, 1H, H3'), 4.24 (sept, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, $CH(CH_3)_2$), 3.94 - 3.92 (m, 2H, H4' + H5'_A), 3.75 - 3.73 (m, 1H, H5'_B), 2.89 (sept, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2.46 (ddd, $J = 13.1, 6.4, 6.4$ Hz, 1H, H2'_A), 2.11 (ddd, $J = 13.5, 6.3, 4.3$, 1H, H2'_B), 1.32 - 1.23 (m, 18H, $CH(CH_3)_2$), 0.89 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.84 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.08 - 0.03 (m, 12H, $SiCH_3$); $^{13}C-NMR$ (150 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 167.4, 154.8, 154.3, 151.6, 146.4, 131.1, 124.4, 94.8, 88.2, 87.7, 69.9, 61.9, 42.5, 34.7, 30.1, 26.3, 26.1, 25.0, 25.0, 24.8, 23.8, 18.7, 18.3, -4.1, -4.6, -5.1$;

HRMS (ESI+): m/z berechnet für $C_{36}H_{63}O_7N_2^{32}S^{28}Si_2^+$ $[M + H]^+$: 723.3889; gefunden 723.3883.

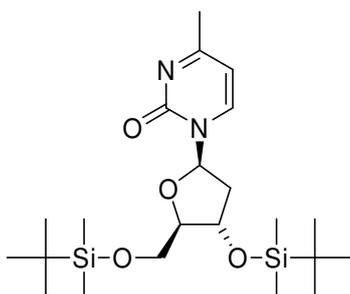
3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-(2,4,6-triisopropylphenyl-sulfonyl)-thymidin (52)^[394]



3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-thymidin (**49**, 2.353 g, 5 mmol) wurde mit Natriumhydrid (0.604 g, 25 mmol) und 2,4,6-Triisopropylsulfonsäurechlorid (3.029 g, 10 mmol) in abs. THF (60 mL) analog **48** umgesetzt und aufgereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **52** als farblosen, schaumartigen Feststoff (3.5 g, 4.8 mmol, 95 %).

$C_{37}H_{64}N_2O_7SSi_2$, $M = 737,15$; $R_f = 0.3$ (Isohexan/Ethylacetat 9:1); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.97$ (s, 1H, H6), 7.19 (s, 2H, H_{Aryl}), 6.12 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, H1'), 4.32 - 4.29 (m, 3H, H3' + $CH(CH_3)_2$), 3.96 (m, 1H, H4'), 3.89 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, H5'_A), 3.74 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, H5'_B), 2.90 (sept, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2.50 - 2.47 (m, 1H, H2'_A), 2.03 (s, 3H, CCH_3), 1.96 (ddd, $J = 12.8, 6.2, 6.2$, 1H, H2'_B), 1.32 - 1.24 (m, 18H, $CH(CH_3)_2$), 0.91 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.86 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.09 - 0.04 (m, 12H, $SiCH_3$); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 166.4$; 154.5, 153.9, 151.3, 143.2, 131.1, 124.2, 103.5, 88.6, 87.5, 71.8, 62.8, 42.7, 34.5, 29.9, 26.1, 25.9, 24.8, 24.5, 23.7, 18.6, 18.2, 12.6, -4.6, -4.7, -5.2; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{37}H_{65}O_7N_2^{32}S^{28}Si_2^+$ $[M + H]^+$: 737.4046; gefunden 737.4034.

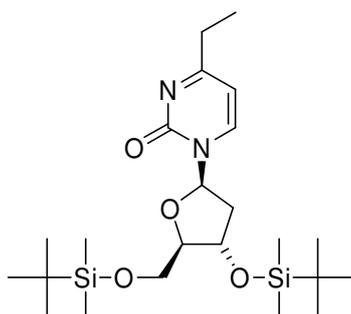
1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (54)



Zinkchlorid (0.97 mL, 0.97 mmol, 1 M in THF) wurde in abs. THF (5 mL) bei 0 °C mit Methyllithium (0.55 mL, 0.88 mmol, 1.6 M in Diethylether) versetzt und 90 min gerührt. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (2.5 mg, 0.5 mol-%) und 2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-(2,4,6-triisopropylphenyl-sulfonyl)-uridin (**51**, 0.318 g, 0.44 mmol, in 5 mL THF) wurden zugegeben und die Lösung wurde 16 h bei RT fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis und ges. Ammoniumchloridlösung (ca. 10 mL) beendet und anschließend wurde mit 4 x 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 100 mL wässriger Pyridin-(1 %), Ammoniumchlorid-, Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 22 x 3.5 cm, Isohexan/Ethylacetat 1:1 → 1:0). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **54** als fast farbloses Öl (0.121 g, 0.27 mmol, 61 %).

$C_{22}H_{42}N_2O_4Si_2$, **M** = 454.75; **R_f** = 0.21 (Isohexan/Ethylacetat 1:1); **IR** (ATR): ν = 2953 w, 2929 w, 2856 w, 1658 m, 1623 w, 1623 w, 1252 m, 1110 m, 1077 m, 1028 m, 832 s, 775 s cm^{-1} ; **UV** (CHCl₃): λ = 302 nm; **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.32 (d, 3J = 6.7 Hz, 1H, H6), 6.21 – 6.16 (m, 2H, H5 + H1'), 4.38 – 4.32 (m, 1H, H3'), 3.97 – 3.91 (m, 2H, H4' + H5'A), 3.76 (dd, 1H, J = 12.1, 2.5 Hz, H5'B), 2.55 (ddd, J = 13.0, 6.3, 6.3 Hz, 1H, H2'A), 2.39 (s, 3H, CCH₃), 2.17 – 2.09 (m, 1H, H2'B), 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.86 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃), 0.09 (s, 3H, SiCH₃), 0.04 (s, 3H, SiCH₃), 0.03 (s, 3H, SiCH₃); **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 175.8, 154.9, 142.3, 104.2, 87.7, 86.9, 69.7, 61.6, 42.2, 25.8, 25.6, 25.0, 18.3, 17.8, -4.6, -5.0, -5.6, -5.6; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{22}H_{43}O_4N_2^{28}Si_2^+$ [M + H]⁺ : 455.2756; gefunden 455.2759.

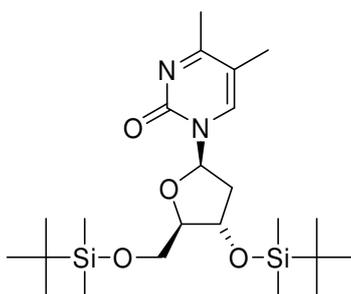
1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-ethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (55)



2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-(2,4,6-triisopropylphenyl-sulfonyl)-uridin (**51**, 0.318 g, 0.44 mmol) wurde in abs. THF (6 mL) vorgelegt, bei RT mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (5 mg, 1 mol-%) sowie Diethylzink (0.97 mL, 0.97 mmol, 1 M in Hexan) versetzt und nach 2.5 h Rühren analog (**54**) aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 19 x 3.5 cm, Isohexan/Ethylacetat 1:1); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **55** als leicht gelblichen, glasartigen Feststoff (0.121 g, 0.26 mmol, 59 %).

$C_{23}H_{44}N_2O_4Si_2$, $M = 468.78$; $R_f = 0.27$ (Isohexan/Ethylacetat 1:1); **IR** (ATR): $\nu = 2953$ m, 2929 m, 2885 w, 2857 m, 1660 s, 1620 w, 1252 m, 1110 m cm^{-1} ; **UV** ($CHCl_3$): $\lambda = 302$ nm; **1H -NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.31$ (d, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H6), 6.21 – 6.14 (m, 2H, H5 + H1'), 4.38 – 4.30 (m, 1H, H3'), 3.97 – 3.91 (m, 2H, H4' + H5'_A), 3.78 – 3.71 (m, 1H, H5'_B), 2.62 (q, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 2.60 – 2.46 (m, 1H, H2'_A), 2.13 (ddd, $J = 13.6, 6.5, 4.5$ Hz, 1H, H2'_B), 1.24 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.89 (s, 9H, C(CH_3)₃), 0.84 (s, 9H, C(CH_3)₃), 0.08 (s, 3H, Si CH_3), 0.07 (s, 3H, Si CH_3), 0.02 (s, 3H, Si CH_3), 0.02 (s, 3H, Si CH_3); **^{13}C -NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 180.6, 155.5, 142.8, 103.5, 88.0, 87.2, 77.59, 77.3, 76.8, 70.0, 61.9, 42.5, 31.9, 26.1, 25.9, 18.6, 18.2, 12.1, -4.3, -4.7, -5.3, -5.3$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{23}H_{45}O_4N_2^{28}Si_2^+$ [$M + H$]⁺: 469.2912; gefunden 469.2914.

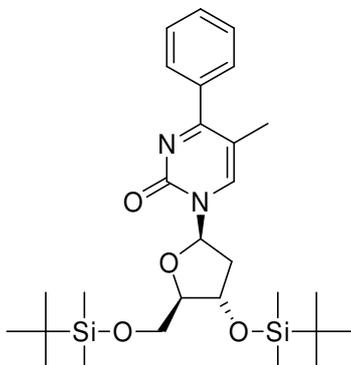
1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4,5-dimethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (56)



3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*O*-(2,4,6-triisopropylphenyl-sulfonyl)-thymidin (**52**, 0.82 g, 1.1 mmol) wurde in abs. THF (20 mL) vorgelegt, bei RT mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (5 mg, 0.3 mol-%) sowie Dimethylzink (2.2 mL, 2.2 mmol, 1 M in Hexan) versetzt und nach 2.5 h Rühren analog **54** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 20 x 3.5 cm, Isohexan/Ethylacetat 1:1 → 1:2); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **56** als leicht gelblichen, glasartigen Feststoff (0.32 g, 0.7 mmol, 61 %).

$C_{23}H_{44}N_2O_4Si_2$, $M = 468,78$ g/mol; $R_f = 0.5$ (Isohexan/Ethylacetat 1:1); **IR** (ATR): $\nu = 3471$ w, 3226 w, 2962 m, 2928 m, 2855 m, 1661 s, 1586 w, 1511 m, 1461 m, 1251 s, 1093 br, 1031 m, 964 w, 941 w, 820 s, 774 s, 670 w cm^{-1} ; **UV** ($CHCl_3$): $\lambda = 311$ nm; **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.82$ (s, 1H, H6), 6.20 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 1H, H1'), 4.33 – 4.28 (m, 1H, H3'), 3.94 (dd, $^3J = 6.0, 2.7$ Hz, 1H, H4'), 3.86 (dd, $J = 11.4, 2.7$ Hz, 1H, H5'_A), 3.72 (dd, $J = 11.4, 2.6$ Hz, 1H, H5'_B), 2.51 (ddd, $J = 13.4, 6.2, 3.8$ Hz, 1H, H2'_A), 2.31 (s, 3H, C4- CH_3), 1.99 (s, 1H, C5- CH_3), 1.98 – 1.91 (m, 1H, H2'_B), 0.85 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.82 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.05 (s, 3H, Si CH_3), 0.04 (s, 3H, Si CH_3), 0.01 (s, 3H, Si CH_3), 0.00 (s, 3H, Si CH_3); **^{13}C -NMR** (150 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 181.3, 160.4, 145.0, 117.4, 93.7, 92.4, 77.0, 68.0, 47.9, 31.3, 31.1, 28.8, 23.8, 23.4, 20.6, 0.8, 0.5, 0.0$; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{23}H_{45}N_2O_4Si_2^+$ $[M + H]^+$: 469.2912; gefunden 469.2919.

1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-phenyl-5-methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (4-Phe-5-Me-dZeb) (57**)**

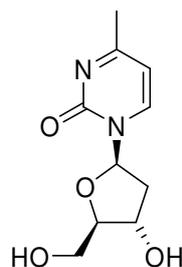


Herstellung des Grignard Reagenzes (PhMgBr, 0.5 M in THF): Benzylbromid (1.382 g, 921 μ L, 8.80 mmol), gelöst in abs. THF (8 mL), wurde langsam zu einer Suspension von Magnesium (0.214 g, 8.80 mmol) in abs. THF (10 mL) gegeben; nach dem Abflauen der Reaktion wurde die Reaktionslösung 1 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf RT abkühlen gelassen. *Kreuzkupplung*: 3.52 mL der Grignardlösung (1.76 mmol) wurden bei 0 °C zu einer Lösung von Zinkchlorid (1.94 mL, 1.94 mmol, 1 M in THF) in abs. THF (9 mL) gegeben. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurden, nach Entfernen des Eisbades, 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-O-(2,4,6-triisopropylphenyl-sulfonyl)-thymidin (**52**, 0.649 g, 0.88 mmol) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium(II) (0.018 g, 2.5 mol-%), gelöst in abs. THF (entgast; 9 mL), zugegeben. Nach 3 Tagen bei RT wurde die Reaktion analog **54** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 26 x 3.5 cm, Isohexan/Ethylacetat 3:1); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **57** als farbloses Öl (0.316 g, 0.60 mmol, 68 %).

$C_{28}H_{46}N_2O_4Si_2$, $M = 530.85$; $R_f = 0.67$ (Isohexan/EtOAc: 1/1); **IR** (ATR): $\nu = 2953$ m, 2929 m, 2857 m, 1659 s, 1489 m, 1471 m, 1462 m, 1390 w, 1326 w, 1252 s, 1190 w, 1076 s, 1029 m, 1003 m, 990 m, 968 w, 885 w, 831 s, 775 s, 711 m, 698 m, 670 m cm^{-1} ; **UV** (CHCl₃): $\lambda = 260, 328$ nm; **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.06$ (s, 1H, H6), 7.61 - 7.57 (m, 2H, H_{Aryl}), 7.46 - 7.40 (m, 3H, H_{Aryl}), 6.19 (t, 1H, ³J = 6.3 Hz, H1'), 4.43 - 4.37 (m, 1H, H3'), 4.05 - 4.00 (m, 1H, H4'), 3.95 (dd, J = 11.5, 2.6 Hz, 1H, H5'_A), 3.80 (dd, J = 11.5, 2.6 Hz, 1H, H5'_B), 2.65 (ddd, J = 13.5, 6.2, 3.9 Hz, 1H, H2'_A), 2.16 - 2.04 (m, 1H, H2'_B), 2.12 (s, 3H, C5-CH₃), 0.92 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.08 (s, 3H, SiCH₃), 0.07 (s, 3H,

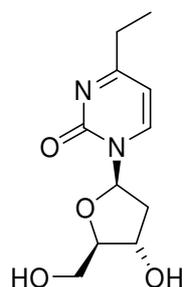
SiCH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.5, 155.1, 142.0, 137.9, 129.8, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 111.0, 88.4, 87.3, 71.6, 62.6, 42.6, 25.9 (3C), 25.7 (3C), 18.4, 18.0, 16.7, -4.5, -4.9, -5.4 (2C); HRMS (ESI⁺): m/z: ber. für C₃₄H₆₂N₃O₄Si₂⁺ [M + HNEt₃]⁺: 632.4273; gef.: 632.4271.

1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-4-methyl-2(1H)-pyrimidinon (4-Me-dZeb) (34)



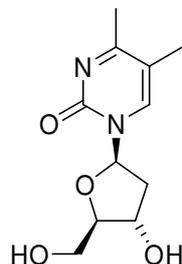
1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (**54**, 0.380 g, 0.84 mmol) wurde in abs. THF (12 mL) vorgelegt und bei 0 °C mit Tetrabutylammoniumfluorid (1.85 mL, 1.85 mmol, 1 M in THF) versetzt. Nach 10 min wurde das Eisbad entfernt und anschließend weitere 20 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Calciumcarbonat (0.540 g, 500.00 mmol), Methanol (4.4 mL) sowie DOWEX 50 WX8-200 Resin (H⁺ Form; 1.63 g) gestoppt. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung durch 2 cm Kieselgur filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, 21 x 3.5, Chloroform/Methanol 20:1 → 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **34** als farblosen, glasartigen Feststoff (0.120 g, 0.53 mmol, 63 %).

C₁₀H₁₄N₂O₄, **M** = 226.23 g/mol; **R_f** = 0.09 (Chloroform/Methanol 9:1); **IR** (ATR): ν = 3336 br, 2923 w, 2502 w, 1634 s, 1525 m, 1457 w, 1095 m, 1026 m cm⁻¹; **UV** (CHCl₃): λ = 302 nm; **¹H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): δ = 8.46 (d, ³J = 6.9 Hz, 1H, H6), 6.47 (d, ³J = 6.9 Hz, 1H, H5), 6.16 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H, H1'), 4.34 (ddd, ³J = 6.2, 4.2, 4.2 Hz, 1H, H3'), 4.02 – 3.99 (m, 1H, H4'), 3.81 (dd, J = 12.2, 3.2 Hz, 1H, H5'_A), 3.72 (dd, J = 12.1, 3.8 Hz, 1H, H5'_B), 2.52 (ddd, J = 13.7, 6.2, 4.4 Hz, 1H, H2'_A), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.14 (ddd, J = 13.6, 6.1, 6.1 Hz, 1H, H2'_B); **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ = 177.2, 155.9, 143.6, 105.4, 88.4, 87.8, 70.3, 61.1, 41.4, 23.5; **HRMS** (ESI⁻): m/z berechnet für C₁₁H₁₅N₂O₆⁻ [M + HCOO]⁻: 271,0936; gefunden 271.0936.

1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-4-ethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (4-Et-dZeb) (35)

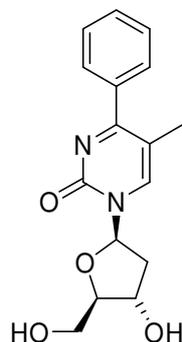
1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-ethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (**55**, 0.727 g, 1.55 mmol) wurde in abs. THF (20 mL) vorgelegt und bei 0 °C analog **54** mit Tetrabutylammoniumfluorid (3.41 mL, 3.41 mmol, 1 M in THF) umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 28 x 3.5 cm, Chloroform/Methanol 1:0 → 9:1); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **35** als leicht gelblichen, glasartigen Feststoff (0.212 g, 0.88 mmol, 57 %).

$C_{11}H_{16}N_2O_4$, $M = 240.26$ g/mol; $R_f = 0.25$ (Chloroform/Methanol 9:1); **IR** (ATR): $\nu = 3332$ br, 2936 w, 2476 w, 1639 s, 1598 m, 1525 m, 1451 m, 1094 m, 1046 m cm^{-1} ; **UV** ($CHCl_3$): $\lambda = 301$ nm; **1H -NMR** (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.48$ (d, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H6), 6.49 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, H5), 6.17 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, H1'), 4.34 (ddd, $^3J = 6.2$, 4.1, 4.1 Hz, 1H, H3'), 4.02 – 3.99 (m, 1H, H4'), 3.81 (dd, $J = 12.1$, 3.3 Hz, 1H, H5'A), 3.72 (dd, $J = 12.1$, 3.8 Hz, 1H, H5'B), 2.63 (q, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, CH_2CH_3), 2.52 (ddd, $J = 13.7$, 6.3, 4.4 Hz, 1H, H2'A), 2.14 (ddd, $J = 13.6$, 6.2, 6.2 Hz, 1H, H2'B), 1.23 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3); **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 181.3$, 156.0, 143.6, 104.4, 88.2, 87.6, 70.1, 60.9, 41.1, 30.9, 11.0; **HRMS** (ESI+): m/z berechnet für $C_{11}H_{17}N_2O_4^+$ [$M + H$] $^+$: 241,1183; gefunden 241.1181.

1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-4,5-dimethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (4,5-DiMe-dZeb) (**36**)

1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4,5-dimethyl-2(1*H*)-pyrimidinon (**56**, 0.340 g, 0.73 mmol) wurde in abs. THF (10 mL) vorgelegt und bei 0 °C analog **54** mit Tetrabutylammoniumfluorid (1.61 mL, 1.61 mmol, 1 M in THF) umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 15 x 3.5 cm, Chloroform/Methanol 20:1 → 10:1); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **36** als farblosen Feststoff (0.090 g, 0.40 mmol, 49 %).

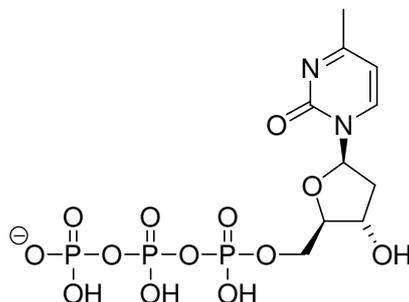
$C_{11}H_{16}N_2O_4$, $M = 240.26$ g/mol; $R_f = 0.1$ (Chloroform/Methanol 10:1); **IR** (ATR): $\nu = 3283$ br, 3154 br, 2934 m, 1648 s, 1630 s, 1521 m, 1323 w, 1086 m, 1001 m cm^{-1} ; **UV** (H_2O): $\lambda = 308$ nm; **1H -NMR** (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.97$ (s, 1H, H6), 6.10 (t, 1H, $^3J = 6.3$ Hz, H1'), 4.32 – 4.28 (m, 1H, H3'), 4.02 – 3.98 (m, 1H, H4'), 3.78 – 3.74 (m, 1H, H5'_A), 3.68 – 3.63 (m, 1H, H5'_B), 2.48 – 2.41 (m, 1H, H2'_A), 2.26 (s, 3H, C4-CH₃), 2.21 – 2.14 (m 1H, H2'_B), 1.98 (s, 3H, C5-CH₃); **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 178.1, 141.0, 116.0, 87.2, 87.1, 69.9, 60.8, 39.8, 22.2, 13.9$ ppm; **HRMS** (ESI⁺): m/z berechnet für $C_{11}H_{17}N_2O_4^+ [M + H]^+$: 241,1183; gefunden 241.1184.

1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-4-phenyl-5-methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (**37**)

1-(2'-Desoxy-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-ribofuranosyl)-4-phenyl-5-methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (**57**, 0.315 g, 0.59 mmol) wurde in abs. THF (8 mL) vorgelegt und bei 0 °C mit Tetrabutylammoniumfluorid (1.3 mL, 1.31 mmol, 1 M in THF) versetzt. Nach 10 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 27 x 1 cm, Chloroform/Methanol 10:1); nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **37** als farblosen Feststoff (0.135 g, 0.45 mmol, 76 %).

$C_{16}H_{18}N_2O_4$, $M = 302.33$; $R_f = 0.2$ (Chloroform/Methanol 10:1); **IR** (ATR): $\nu = 3258$ br, 2941 m, 2915 m, 2473 m, 24223m, 1633 s, 1592 s, 1508 m, 1491 m, 1414 m, 1227 w, 1105 w, 1061 m, 991 w, 782 m cm^{-1} ; **UV** ($CHCl_3$): $\lambda = 260, 328$ nm; **1H -NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.54$ (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 7.59 - 7.56 (m, 2H, H_{Aryl}), 7.49 - 7.47 (m, 3H, H_{Aryl}), 6.23 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, H1'), 4.0 (ddd, $^3J = 6.1, 4.4$ Hz, 1H, H3'), 4.04 - 4.01 (m, 1H, H4'), 3.88 (dd, $J = 12.2, 3.1$ Hz, 1H, H5'A), 3.77 (dd, $J = 12.2, 3.7$ Hz, 1H, H5'B), 2.56 (ddd, $J = 13.7, 6.3, 4.7$ Hz, 1H, H2'A), 2.23 (m, $J = 13.7, 6.1, 6.1$ Hz, 1H, H2'B), 2.12 (d, $^3J = 0.76$ Hz, 3H, C5- CH_3); **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 175.1, 155.8, 144.0, 137.7, 130.0, 128.3, 128.2, 112.8, 88.4, 87.8, 70.1, 61.0, 41.4, 15.2$; **HRMS** (ESI⁺): m/z : ber. für $C_{16}H_{19}N_2O_4^+$ [M + H]⁺: 303.1339; gef.: 303.1338.

**1-(2'-Desoxyribofuranosyl)-4-methyl-2(1H)-pyrimidinon-triphosphat
(4-Me-dZebTP) (60)**



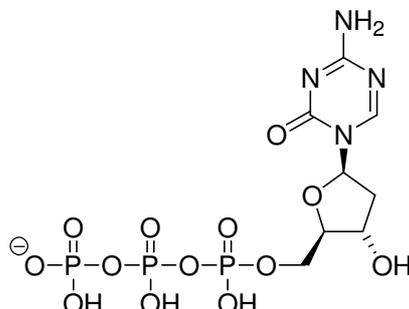
Folgende Lösungen wurden angesetzt und über Nacht über Molsieb getrocknet:

Lösung 1: 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm, 0.075 g, 0.35 mmol) in Trimethylphosphat (1.7 mL); *Lösung 2:* *n*-Tributylamin (345 μ L) und Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat (0.145 g, 0.42 mmol) in abs. DMF (4 mL).

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon (**34**, 0.050 g, 0.22 mmol) wurde mit Phosphorylchlorid (24 μ L, 0.26 mmol) und den oben genannten Reagenzien analog der Synthese von **58** umgesetzt.^[353] Das Produkt konnte bei 20.3 min detektiert und isoliert werden. Das Triphosphat **60** konnte mit der DNA Polymerase Klenow Fragment (3'→5' Exo-) erfolgreich in DNA Doppelstränge eingebaut werden (siehe Kapitel 5.5.1).

$C_{10}H_{16}N_2O_{13}P_3^-$, **M** = 466.17; **MS** (MALDI-, ATT): *m/z* berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_{13}P_3^-$ [**M**]⁻ : 464.99; gefunden 464.88; **UV** (H₂O): λ = 298 nm.

6.1.2.4 Synthese von 5-Aza-dCTP

2'-Desoxy-5-azacytidin-triphosphat (dC^NTP, 67)

Folgende Lösungen wurden angesetzt und über Nacht über Molsieb getrocknet: *Lösung 1*: 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm, 0.046 g, 214 μmol) in Trimethylphosphat (1.1 mL); *Lösung 2*: *n*-Tributylamin (207 μL) und Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat (0.087 g, 253 μmol) in abs. DMF (1.5 mL). 2'-Desoxy-5-azacytidin (**5**, 0.030 g, 132 μmol) wurde mit *Lösung 1* aufgenommen, im Eisbad gekühlt, mit Phosphorylchlorid (14.3 μL , 157 μmol) versetzt und 3 h bei 0 °C gerührt. *Lösung 2* wurde zugegeben und die Reaktion nach 2 min Rühren mit Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB, 1.0 M, **pH 7.5**, 50 mL) gestoppt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung tiefgefroren und vollständig lyophilisiert.^[353] Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (*Sephadex* Ionenaustauscher, 5.5 x 1.5, konditioniert mit 0.1M TEAB (pH 7.6); 0.1 M \rightarrow 1 M TEAB), wobei die erhaltenen Fraktionen sofort mittels $\text{N}_{2(l)}$ tiefgefroren wurden. Das Produkt wurde bei 0.4 M Puffer eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vollständig lyophilisiert. (*Anmerkung*: Die Aufreinigung durch *reversed phase* HPLC schlug hier fehl, was jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach an der verwendeten, schon älteren präparativen Chromatographiesäule lag; prinzipiell ist die HPLC Reinigung durchaus möglich (und zu bevorzugen)). Das Triphosphat **67** konnte mit der DNA Polymerase Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' Exo-) erfolgreich in DNA Doppelstränge eingebaut werden (siehe Kapitel 4.2). $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}_3^-$, **M** = 467.14; **MS** (MALDI-, ATT): *m/z* berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}_3^-$ [**M**]⁻: 466.98; gefunden 467.04.

6.2 Biochemische Arbeiten

6.2.1 Material und Methoden

Synthetische Oligonukleotide, BioChemikalien. Synthetische DNA Eduktstränge wurden von den Firmen *IBA* (Cy3 sowie 5-Me-dC enthaltende Stränge) und *Metabion* (Standardstränge) HPLC-gereinigt und in Konzentrationen von 100 μM bezogen. Enzyme mit den entsprechenden Reaktionspuffern, ATP, BSA, humane genomische DNA sowie λ DNA wurden von *New England Biolabs*, *Sigma-Aldrich* und *Roche* bezogen; außerdem wurden Proben von DNMT1 freundlicherweise vom Arbeitskreis *Leonhardt* (Department für Biologie II, LMU München) zur Verfügung gestellt. Acrylamidstocklösungen für die Gelanalytik (Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat und Rotiphorese 30) stammten von *Roth*, TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin) für die Gelpolymerisation von *Fluka*.

Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide bei 260 nm wurden durch Addition der Extinktionskoeffizienten der Einzelbasen berechnet. Diese betragen: dA 15.0 L/mmol·cm, dC 7.1 L/mmol·cm, dG 12.0 L/mmol·cm, dT 8.4 L/mmol·cm. Für die Fluoreszenzlabel wurden 13.7 L/mmol·cm für Fluoreszein und 5 L/mmol·cm für Cy3^[447] (bei Labeling am Ende eines Stranges) bzw. 10.8 L/mmol·cm für dT-Cy3^[360] (internes Labeling) verwendet. Für 5-Aza-dC und 5-Methyl-dC wurde in erster Näherung der Wert für unmodifiziertes dC, für die Zebularinderivate der Wert von 2'-Desoxyzebularin (2.2 L/mmol·cm) angenommen (für dZeb bei 303 nm gilt $\epsilon_{303\text{nm}} = 6.47 \text{ L/mmol}\cdot\text{cm}$).^[415] Für 5-Me-dC wurde der Wert für 255 nm verwendet (5 L/mmol·cm).^[448]

Bestimmung von Protein- und DNA Konzentrationen. DNA Konzentrationen wurden mit einem Nanodrop Photospektrometer (*Nanodrop Technologies*) bestimmt. Protein Konzentrationen wurden per *Bradford* Protein Assay ermittelt.^[449] Hierbei wird ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue R250 durch Interaktion mit den basischen Aminosäureseitenketten von Arginin und Lysin von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurden jeweils 200 μL der *Bradford*-Stammlösung (*Bio-Rad*) mit 800 μL bidestilliertem Wasser versetzt. Hierzu wurden 0.5-10 μL der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach 10 min

Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer anhand von BSA-Standardlösungen bekannter Konzentrationen ermittelten Kalibriergeraden ließ sich dann die gesuchte Proteinkonzentration ablesen.

Gelanalytik. DNA Proben wurden auf denaturierenden oder nativen Polyacrylamidgelen (PAAG), DNA-Protein Komplexe teilweise auch auf SDS Gelen in einer Mini-PROTEAN 3-Kammer von *Bio-Rad* analysiert (die Abmessungen der Gele betragen 83 mm (w) x 82 mm (h) x 0,75 mm (d)). Proben auf denaturierenden/nativen PAA Gelen wurden zunächst mit 50 % PAA Auftragspuffer gemischt und in 1x TBE Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (12 mA für 45 – 60 min). Proben auf SDS Gelen wurden zunächst mit 50 % SDS Auftragspuffer gemischt und in 1x TRIS/Glycin/SDS Puffer (*Bio-Rad*) bei 120 V für 45 – 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nicht fluoreszenzmarkierte DNA wurde zunächst mit SYBR Green II bzw. SYBR Gold (*Invitrogen*) behandelt (20 min Inkubation der Gele bei RT in einer 1:10.000 Lösung von SYBR Reagenz in 1 x TBE Puffer) und anschließend mit einem LAS3000 *imaging* System (*Fujifilm/RayTest*) detektiert. Fluoreszenzmarkierte DNA konnte direkt mit dem *imaging* System detektiert werden; abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff wurden entsprechende *cutoff* Filter verwendet (515 nm für SYBR Green II/SYBR Gold und Fluoreszein, 605 nm für Cy3). Proteine wurden per Coomassiefärbung detektiert. Es ist zu beachten, dass die SYBR Farbstoffe zu einem erheblichen Grad auch Proteine anfärben, was zu Problemen bzw. falschen Ergebnissen bei EMSA Studien führen kann.

Rezepturen zur Herstellung der PAA/SDS Gele*Denaturierende PAA Gele (Angaben je für 2 Gele).*

Acrylamid-konz.	Rotiphorese Seq.gelkonz. [mL]	Gel Verdünner [mL]	10 x TBE Puffer [mL]	APS Lösung [µL]	TEMED [µL]
3.75 %	1.5	7.5	1	50	5
6 %	2.4	6.6	1	50	5
8 %	3.2	5.8	1	50	5
12 %	4.8	4.2	1	50	5
16 %	6.4	2.6	1	50	5
20 %	8	1	1	50	5

Bei 12, 16 und 20 % Trenngelen wurden 8 % Sammelgele, bei 6 % Trenngelen wurden 3.75 % Sammelgele verwendet.

Native PAA Gele (Angaben für 2 Gele).

Acrylamid-konz.	Rotiphorese 30 [mL]	Wasser [mL]	10 x TBE Puffer [mL]	APS Lösung [µL]	TEMED [µL]
6 %	2.4	6.6	1	50	5

SDS Protein Gele (Angaben je für 2 Gele): Sammelgele

Acrylamid-konz.	Rotiphorese 30 [mL]	Wasser [mL]	TRIS (1 M, pH 6.8) [mL]	SDS Lösung [µL]	APS Lösung [µL]	TEMED [µL]
3.75 %	0.5	2.45	1	40	40	4

SDS Protein Gele (Angaben je für 2 Gele): Trenngele

Acrylamid-konz.	Rotiphorese 30 [mL]	Wasser [mL]	TRIS (1.5 M, pH 8.8) [mL]	SDS Lösung [µL]	APS Lösung [µL]	TEMED [µL]
6 %	2.4	6.6	1	100	50	5
12.5 %	3.8	5	3	120	50	5

Häufig verwendete Puffer

10 x TBE: 0.89 M TRIS, 0.89 M Borsäure, 32 mM EDTA (108, 55 und 9.3 g/L).

2 x PAA Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin, 0.2 % (w/v) SDS, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 0.05 (w/v) % Xylencyanol.

2 x SDS Auftragspuffer: 62.5 mM TRIS, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) β -Mercaptoethanol, pH 6.8.

10 x SDS Laufpuffer: 0.25 M TRIS, 1.29 M Glycin, 1 % (w/v) SDS.

APS Lösung: 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Gelverdünner: 7.0 M Harnstofflösung (500 g/L).

SDS Lösung: 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat.

SDS Trenngelpuffer: 1.5 M TRIS-HCl, pH 8.8

SDS Sammelgelpuffer: 0.5 M TRIS-HCl, pH 6.8

Coomassie Färbelösung: 0.25 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 9.2 % (v/v) Essigsäure, 45.5 % (v/v) Ethanol.

Coomassie Entfärbelösung: 12 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure.

NEBuffer 1 (New England Biolabs): 10 mM Bis-TRIS-Propan-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.0.

NEBuffer 2 (New England Biolabs): 10 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9.

NEBuffer 3 (New England Biolabs): 100 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9.

NEBuffer 4 (New England Biolabs): 50 mM KOAc, 20 mM TRIS-OAc, 10 mM $MgOAc_2$, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.5.

T4 Ligase Puffer (New England Biolabs): 50 mM TRIS-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 25 μ g/mL BSA, pH 7.5.

ThermoPol Puffer (New England Biolabs): 20 mM TRIS-HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 % Triton X-100, pH 8.8.

6.2.2 Synthese der zirkularen, hantelförmigen DNA Konstrukte (*dumbbells*).

Doppelstränge wurden in Hybridisierungspuffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl) durch Erhitzen auf 90 °C (5 min) im Thermomixer (*Eppendorf*) und langsames Abkühlen auf RT hybridisiert. Im Folgenden wird die Synthese der Dumbbells **DB7 - 9** beschrieben;

für die genauen Reaktionsbedingungen zur Herstellung der übrigen Konstrukte siehe auch die Ausführungen in den Kapiteln 4.2 und 5.5.

Zur Elongation von **OL7** wurden 180 pmol hybridisierte DNA mit 200 μM 5-Aza-dCTP, 100 μM dGTP und 2 U Klenow Fragment (3'→5' Exo-) in 1x ThermoPol Puffer (*New England Biolabs*) in einem Volumen von 10 μL für 6 h bei 30 °C inkubiert. Kontrolle der Reaktionsprodukte auf denaturierenden PAA Gelen (12 mA, 20 %). Die Proben wurden auf Membranfiltern (Porengröße 0.025 μm , *Millipore*) für 1 h entsalzt und anschließend vollständig lyophilisiert. Für die Ligation wurden 900 pmol DNA (elongierter Strang **OL7'** bzw. **DB8** oder **DB9**) mit 2000 U T4 Ligase (2000 U/ μL , *New England Biolabs*) in 1x T4 Ligase Puffer (*New England Biolabs*), versetzt mit zusätzlich 1mM ATP, in einem Volumen von 10 μL für 3 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 90 °C erhitzt, zentrifugiert (10min/13.000min⁻¹) und mit Biospin 6 Gelfiltrationssäulen behandelt (10 mM TRIS, pH 7.4, *Bio-Rad*), um überschüssige Nukleotide abzutrennen und den Puffer auszutauschen. Falls notwendig, wurde die DNA durch *reversed phase* HPLC (0 → 40 % Puffer B (0.1 M TEAA in 80% Acetonitril) in 45 min; Puffer A: 0.1 M TEAA in Wasser) weiter aufgereinigt. Die Reaktionsprodukte wurden auf denaturierenden PAA Gelen (12 mA, 20 %) sowie durch ESI-FTICR Massenspektrometrie analysiert.

6.2.3 Stabilitätstests

A Zelllysataassay: HCT116 Zellen wurden mit nicht denaturierendem NP40 *solubilization buffer* (150 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 % (v/v) NP40, 5 mM EDTA), versehen mit Proteaseinhibitor, lysiert. Das Zelllysate enthielt etwa 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Protein. 18 pmol DNA wurden mit 3 μL Zelllysate in 1x NEBuffer 1 (*New England Biolabs*) für 3.5 h bei 37 °C inkubiert; die Reaktion wurde per denaturierendem PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.

B Exonuklease Verdauassay: 18 pmol DNA wurden mit 20 U Exonuklease III in NEBuffer 1 (*New England Biolabs*) für 1 h bei 37 °C inkubiert; die Reaktionen wurden per denaturierendem PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.

6.2.4 EMSA Studien (*electrophoretic mobility shift assays*)

A Versuche mit DNMT1. 4 pmol DNA wurden mit 5.5 U (4 pmol) Protein und 160 μ M SAM in DNMT1 Reaktionspuffer (50 mM TRIS-HCl, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, pH 7.8, *New England Biolabs*) für 1.5 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per SDS-PAGE analysiert (6 %, 120 V). Das Protein wurde per Coomassiefärbung detektiert.

B Versuche mit bakteriellen Methyltransferasen. M.SssI: 3.2 pmol DNA wurden mit 8 U Protein und 160 μ M SAM in NEBuffer 2 (*New England Biolabs*) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per denaturierendem PAGE (12 %, 12 mA) analysiert. M.HhaI: 3.2 pmol DNA wurden mit 50 U Protein und 80 μ M SAM in M.HhaI Reaktionspuffer (50 mM TRIS-HCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, pH 7.5, *New England Biolabs*) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per denaturierendem PAGE (12 %, 12 mA) analysiert.

Bindung von DB7 bei Anwesenheit überschüssiger hemimethylierter DNA.

Um zu untersuchen, ob der DNA Inhibitor **DB7** als ein kompetitives Substrat bei Anwesenheit eines Überschusses an unmodifizierter, hemimethylierter DNA fungieren kann, wurden 4, 10, 20 und 200 pmol (= 1x, 2x, 5x, und 50x Überschuss) eines hemimethylierten 30mer Doppelstrangs **DS4** mit 4 pmol DNMT1 für 10 min bei 37°C unter den oben beschriebenen Bedingungen vorinkubiert; dann wurden 4 pmol **DB7** zugefügt und eine weitere Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde per SDS PAGE analysiert (6%, 120 V). Auch in Anwesenheit eines 50fachen Überschusses an unmodifizierter, hemimethylierter DNA konnte keine signifikante Reduktion der Bindung von **DB7** to DNMT1 festgestellt werden.

Versuche zur Verdrängung von bereits gebundenem DB7.

Um zu untersuchen, ob bereits an Protein gebundener Inhibitor **DB7** von einem Überschuss an nicht fluoreszenzmarkierter DNA wieder verdrängt werden kann, wurden zunächst 4 pmol **DB7** unter den oben beschriebenen Bedingungen für 1 h mit dem Enzym inkubiert; dann wurden 0, 40 und 400 pmol **DB1** (gleiche Sequenz wie **DB7**, aber ohne Cy3 Markierung) zugefügt, die Inkubation wurde 1 h fortgesetzt und die Reaktion wie beschrieben analysiert. Der gebildete DNA-Protein Komplex erwies sich auch bei einem 50fachen Überschuss an nicht fluoreszenzmarkierten

Strang als stabil, eine Reduktion des Fluoreszenzsignals des Komplexes konnte nicht beobachtet werden.

Bei dem umgekehrten Experiment wurde das Enzym zunächst mit 30 pmol **DB1** (1 h/37 °C) und anschließend mit 4 pmol **DB7** (ebenfalls 1 h/ 37 °C). Hier konnte nunmehr bei Fluoreszenzdetektion kein DNA-Protein Komplex beobachtet werden.

6.2.5 *In vitro* Aktivitätsassays

A Versuche mit DNMT1. 7.2 pmol hantelförmiger Inhibitor DNA wurden mit 12 U (8.8 pmol) DNMT1 in DNMT1 Reaktionspuffer (*New England Biolabs*, versehen mit 1.6 mM SAM und 100 µg/mL BSA) in einem Volumen von 25 µL bei 37 °C für 100 min inkubiert. Die folgende Beschreibung folgt größtenteils einer kürzlich veröffentlichten Methode.^[256] 10 pmol DNA **DS5** wurden zur obigen Reaktionsmischung gegeben, die Reaktion für 5 h bei 37 °C fortgesetzt und durch Erhitzen auf 60 °C für 20 min gestoppt. Ein großer Überschuss an unmethyliertem Einzelstrang (**SS13**, 2.5 mmol), komplementär zum fluoreszenzmarkierten Strang **SS11** in **DS5**, wurde zugegeben und die DNA wurde durch Erhitzen auf 90 °C für 5 min und Abkühlen auf Raumtemperatur rehybridisiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit BioSpin 6 Gelfiltrationssäulen behandelt (10 mM TRIS, pH 7.4, *Bio-Rad*) und mit 20 U HpaII und 5.8 µL NEBuffer 1 (*New England Biolabs*) versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 2 h und anschließendem Entsalzen für 30 min auf Membranfiltern (Porengröße 0.025 µm, *Millipore*) wurde die Reaktionslösung komplett lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 µL Wasser aufgenommen und per denaturierendem PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.

B Versuche mit bakteriellen Methyltransferasen. 18 pmol hantelförmige Inhibitor DNA wurden mit 25 U oder 6.7 pmol M.HhaI (8 U oder 8.7 pmol M.SssI) und 80 µM (160 µM) SAM in M.HhaI Reaktionspuffer (NEBuffer 2, beide *New England Biolabs*) in einem Reaktionsvolumen von 10 µL für 75 min bei 37 °C inkubiert. λ DNA (0.5 µg) wurde zugefügt, die Inkubation für 4 h fortgesetzt und anschließend durch 15minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt. 40 µL *HhaI Mix* (10 µL *BstUI Mix*) wurden zugegeben (*HhaI Mix*: 10 U HhaI, 100 µg/mL BSA, 1 mM MgCl₂, 1 x NEBuffer 4; *BstUI Mix*: 10 U BstUI, 1 x NEBuffer 2) und die Reaktion wurde bei 37 °C für 30 min (60 °C für 1 h) fortgeführt. Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch denaturierende PAGE (6 %, 12 mA).

6.2.6 Zellkultur; Transfektion von DNA

HCT116 Zellen (humane Darmkrebszellen) wurden in Gibco DMEM + GlutaMAX-I Medium ((-) Pyruvat, (+) 4.5 g/L Glucose, *Invitrogen*) mit 10 % FKS (*Invitrogen*, hitzeinaktiviert: 10min/56 °C) in T25 Zellkulturflaschen (25 cm², für 5 mL Medium, *Greiner bio-one*) bzw. LabTek Kammerdeckgläser (für 3 mL Medium, *Nunc*) bei 37 °C/5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % bis maximal 90 % wurden die Zellen passagiert; für T25 Flaschen: Medium abnehmen, Zellen mit 3 mL PBS Puffer (*Invitrogen*) waschen, 3 min bei 37 °C mit 1 mL Trypsin (*Invitrogen*) inkubieren, mit 10 mL Medium abstoppen, zentrifugieren (10min/1000xg); Split in der Regel 1:15. Zur Transfektion von DNA wurden 5x10⁵ Zellen pro T25 Flasche eingesät (LabTek Kammerdeckgläser: 1x10⁵ Zellen) und 1 Nacht (LabTek Kammerdeckgläser: 2 Nächte) anwachsen gelassen. Bei einem finalen Volumen von 5 mL Medium (T25 Flaschen; LabTek: 3 mL) wurde 1 µM DNA (LabTek: 0.6 µM) in 500 µL Medium (ohne FKS) durch Umschütteln (nicht vortexen!) mit 10 µL Transfectin Reagenz (*Bio-Rad*) in 500 µL Medium (ohne FKS) gemischt, 30 min bei RT inkubiert und dann zu den Zellen in 4 mL Medium (mit FKS) gegeben. Finale DNA Konzentration somit 100 nM. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt. Die Aufnahme der DNA in die Zellen/Zellkerne wurde mit Hilfe von Konfokaler *laser-scanning* Mikroskopie (KLSM) überprüft. Für hochwertige KLSM Aufnahmen wurde die Transfektion in LabTek Kammerdeckgläsern durchgeführt.

6.2.7 Inkubation von HCT116 Zellen mit Nukleosiden

1 x 10⁵ Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen in 5 mL DMEM Medium eingesät und über Nacht anwachsen gelassen (Tag 1). In der Regel wurden die Zellen dann an den Tagen 2,3,5 und 6 mit Nukleosiden verschiedener Konzentration inkubiert; an Tag 4 mussten die Zellen in der Regel umgesetzt werden (Split 1:15). Die Zellyse und DNA Extraktion erfolgte an Tag 7 (siehe unten). Im Falle stark zytotoxischer Nukleoside wurde dieser Plan derart angepasst, dass am letzten Tag genügend Zellen zur Extraktion zur Verfügung standen. Dies war beispielsweise bei der Positivkontrolle notwendig: hierzu wurden Zellen mit 1 µM oder 2 µM 5-Aza-dC (5) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit Medium (ohne Nukleosid) inkubiert wurden. Zur Herstellung der Stocklösungen der Nukleoside (25

mM; 5-Aza-dC: 1 mM) wurden diese in Medium (ohne FKS) aufgenommen und steril filtriert.

6.2.8 DNA Extraktion aus humanen HCT116 Krebszellen.

Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits von *Qiagen* extrahiert. Die Zellen wurden zunächst bei 70 – 80 % Konfluenz abtrypsiniert (s.u.) und, im Falle von T25 Zellkulturflaschen, in 400 µL PBS Puffer resuspendiert. Dann wurden 40 µL Proteinase K (*Qiagen*), 8 µL RNase A (100 µg/µL, 100 U/mg, in 50 % Glycerin, 10 mM TRIS-HCl, pH8, *Fluka Biochemika*) und 400 µL AL Puffer zugegeben; zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben gevortext. Die weitere Behandlung erfolgte gemäß *Qiagen* Protokoll;^[450] schließlich folgte die Elution mit 2 x 200 µL AE Puffer. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei RT mit 4 µL *RNase, DNase free* (0.5 µg/µL, *Roche*) inkubiert. Nach Zugabe von 600 µL NH₄OAc (0.3 M) wurde die DNA mit 9 mL EtOH ausgefällt und die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde abzentrifugiert (10min/13.000min⁻¹), an der Luft getrocknet, mit 70 µL AE Puffer (*Qiagen*) aufgenommen und mit Biospin 6 Gelelutionssäulen (10 mM TRIS, pH 7.4, *Bio-Rad*) weiter aufgereinigt. Pro T25 Zellkulturflasche konnten in der Regel 30 – 40 µg reine genomische DNA isoliert werden.

6.2.9 Enzymatischer DNA Totalverdau; Bestimmung des globalen dC^{Me} Gehalts.

Der Verdau genomischer DNA wurde, mit einigen Modifikationen, wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.^[376, 380] Hierzu wird eine wässrige Lösung von 3.5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µL für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Probe sofort auf Eis gekühlt (Kühlung für insg. 5 min). Dieser Schritt ist notwendig, da die als erstes verwendete Nuklease P1 bevorzugt einzelsträngige DNA abbaut. 4.4 µL NH₄OAc (0.1 M) und 10.0 µL Nuklease P1 (0.2 U/µL in 10 mM NH₄OAc, *Sigma*) werden zugegeben und die Reaktion wird für 2 h bei 45 °C inkubiert. Dann gibt man 5.0 µL NH₄HCO₃ (1 M) und 1 µL *Snake Venom* Phosphodiesterase I (0.002 U/µL in 100 mM TRIS-HCl, pH 8.9 100 mM NaCl, 14 mM MgCl₂, *Sigma*) zu und setzt die Reaktion für 2.5 h bei 37 °C fort. Nach Zugabe von 1 µL Antarctic Phosphatase (5 U/µL, *New England Biolabs*) zusammen mit 5.6 µL des entsprechenden

Reaktionspuffers inkubiert man eine weitere Stunde bei 37 °C und stoppt die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C (5 min). Man zentrifugiert ausgefallenes Protein ab ($13.000\text{min}^{-1}/10\text{ min}$) und analysiert die komplette Reaktionsmischung per *reversed phase* HPLC. Hierzu wurde ein *Waters Alliance* Gerät mit einer Nucleosil C-18 Säule bei einem Fluss von 0.5 ml/min benutzt. Als Puffer wurden 0.1 M HNEt₃OAc in Wasser (Puffer A) und 0.1 M HNEt₃OAc in 20 % Wasser/80 % Acetonitril (Puffer B) verwendet, mit einem linearen Gradienten von 0 to 20 % Puffer A in 30 min. Die Chromatogramme wurden mit einem *photodiodearray* Detektor aufgenommen und die Integrale bei 278 nm bestimmt (bei dieser Wellenlänge haben dC und dC^{Me} die gleichen Extinktionskoeffizienten). Der 5-Methyl-dC Gehalt wird als Verhältnis von dC^{Me} zur Gesamtmenge an Cytidin angegeben: 5-Me-dC in [%] = $5\text{-Me-dC}/(5\text{-Me-dC} + \text{dC}) \times 100$.

6.2.10 Zellproliferationsassay.

Dumbbells: In 96-*well* Platten (*Greiner bio-one*, transparenter Boden) wurden 2500 HCT116 Zellen pro *well* in 100 µL DMEM Medium eingesät (Tag 1). Die Zellen wurden an Tag 2 und an Tag 4 mit **DB7**, **DB8** and **DB9** transfiziert. Für die Transfektion wurden 0.2 µM DNA mit 0.4 µL Transfectin Reagenz (*Bio-Rad*) in einem Gesamtvolumen von 100 µL Medium (ohne FKS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (siehe oben). Diese Lösung wurde zu den Zellen gegeben und es wurde über Nacht inkubiert (finales Volumen 200 µL); eine erfolgreiche Transfektion und das Eintreten der DNA Konstrukte in die Zellkerne wurde durch Konfokale *Laser-Scanning* Mikroskopie sichergestellt. Als Negativkontrolle diente ausschließlich mit Transfectin (aber keiner DNA) versehenes Medium. An Tag 5 sowie an Tag 7 (zweite Messreihe) wurde die Zellproliferation quantifiziert (siehe unten). **Nukleoside:** In 96-*well* Platten (*Greiner bio-one*, transparenter Boden) wurden 2500 HCT116 Zellen pro *well* in 100 µL DMEM Medium eingesät (Tag 1). An den Tagen 2, 3 und 4 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Nukleosiden versetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit Medium versetzt wurden. An Tag 5 wurde die Zellproliferation quantifiziert. **WST-1 Assay:** Hierbei wird die Lebensfähigkeit der Zellen mit einem kolorimetrischen Assay, basierend auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (Zellproliferationsreagenz, *Roche*) durch mitochondriale Dehydrogenasen, entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

Hierzu wurden die Zellen mit 100 μL PBS Puffer gewaschen, mit 100 μL frischem Medium sowie 10 μL WST-1 versetzt und bei 37 °C inkubiert. OD_{450} - und OD_{630} -Werte wurden mit einem *Tecan* Multiwellphotospektrometer gemessen; die Absorption korreliert hierbei direkt mit der Lebensfähigkeit der behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind prozentual in Relation zur Negativkontrolle angegeben (Negativkontrolle = 100 %). Alle Ansätze wurden dreifach (Dumbbells) bzw. sechsfach (Nukleoside) ausgeführt.

6.2.11 Kolokalisationsstudien.

Die Kolokalisationsstudien wurden von *Lothar Schermelleh*, Arbeitskreis Prof. *H. Leonhardt* (Department für Biologie II, LMU München), durchgeführt.^[370]

Zellkultur, Transfektion und Mikroinjektion. C2C12 Mäuse Myoblasten wurden in DMEM Medium mit 20% FKS und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamycin kultiviert. Zur Transfektion wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 40 % gezogen und mit HiPerFect Transfektionsmittel (*Qiagen*) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Für die Mikroinjektion wurden die Zellen auf μ -Platten (*Ibidi*) kultiviert, und eine 20 μM Inhibitor DNA Lösung wurde mit Hilfe eines InjectMan NI2 Mikroinjektors (*Eppendorf*), angeschlossen an ein Axiovert 200 Epifluoreszenzmikroskop (*Zeiss*), injiziert.

Antikörperfärbung und Fluoreszenzmikroskopie. 16 h nach der Transfektion oder 1 h nach Mikroinjektion wurden die Zellen mit 3.7 % Formaldehyd in PBS fixiert (10 min bei Raumtemperatur) und mit 0.5 % Triton X-100 in PBS für 3 min permeabilisiert. Endogenes DNMT1 mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Antiserum gegen die N-terminale Domäne von Mäuse-DNMT1 und sekundären Antikörpern mit Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes/Invitrogen*) detektiert. Die Zellen wurden ausserdem mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt und in Vectashield Medium (*Vector Labs*) eingebettet. Mikroskopiert wurde mit einem Axiophot 2 Epifluoreszenzmikroskop (*Zeiss*), ausgestattet mit entsprechenden Bandpassfiltersets, einem 63x/1.4 NA Plan-Apochromatobjektiv und einer MicroMax gekühlten 14-bit CCD Kamera (*Roper Scientific*).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	2'-Desoxyadenosin (in DNA Strängen)
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AdoMet	S-Adenosylmethionin (auch: SAM)
AdoHcy	S-Adenosylhomocystein
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	Berechnet
bp	Basenpaare (<i>Base Pairs</i>)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BuLi	Butyllithium
Bz	Benzoyl
C	2'-Desoxycytidin (in DNA Strängen)
CE	Kapillargelelektrophorese
C ^N	5-Azacytidin; in DNA Strängen: 2'-Desoxy-5-azacytidin
CpG	dC, am 3'-OH über einen Phosphatrest (-PO ₂ -) verknüpft mit dem 5'OH von dG
Δ	NMR: chemische Verschiebung; Reaktionsbedingungen: Erwärmung
d	Tage
dA	2'-Desoxyadenosin
Da	Dalton
DB	Dumbbell (Engl. für Hantel)
dC	2'-Desoxycytidin
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dC ^{Me}	2'-Desoxy-5-methylcytidin
dC ^N	2'-Desoxy-5-azacytidin
dC ^N TP	2'-Desoxy-5-azacytidin-5'-triphosphat
DCM	Dichlormethan
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNMT	DNA Methyltransferase
dU	2'-Desoxyuridin
dZeb	2'-Desoxyzebularin
dZebTP	2'-Desoxyzebularin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Electron Impact Ionisation
Em.	Emission
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
eq	Äquivalent(e)
ESI	Elektronensprayionisierung
ESZ	Embryonische Stammzelle

<i>et al.</i>	und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
Ex.	Anregung (<i>Excitation</i>)
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
Fl	Fluoreszenzmarkierung (<i>hier</i> : Cy3 oder Fluoreszein)
FKS	Fötale Kälber Serum
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> (Massenspektrometrie)
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	in DNA Strängen: 2'-Desoxyguanosin; in Peptiden: Glycin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
I	Intensität
<i>J</i>	Kopplungskonstante (Angabe in Hz)
K	Lysin
KF	Klenow Fragment
λ	Wellenlänge (Angabe in nm)
M bzw. m	Molekulargewicht; Masse; MS: Molekülion
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mRNA	Boten RNA (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
Nu	Nukleophil
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
quant	quantitativ
R	Rest
R_f	Retentionsfaktor
rflx	Rückfluss
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin (auch: AdoMet)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
T	Temperatur; in DNA Strängen: Thymidin
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TF	Transkriptionsfaktor
T.F.	Transfectin

THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluoyl
T.p.	Thermopol (= DNA Polymerase von <i>NEB</i>)
TPS	2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin, bzw. in DNA: 2'-Desoxyuridin; Enzyme: <i>Units</i>
UV	ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
z	MS: Ladungszahl
Z	2'-Desoxyzebularin (in DNA Strängen)
Zeb	Zebularin

7.2 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 7.1: Einfache Einzel- und Doppelstränge.

Name	Sequenz	Molekulargewicht	Exakte Masse
ES1	SS1 5'-TACGTGACTATT-3'	3635.40	3633.6620
	SS2 3'-ATGCACTCATAAXGXGXG-5'	5510.64	5508.0304
DS1	SS1' 5'-TACGTGACTATTGYGYGY-3'	5493.52	5490.9521
	SS2 3'-ATGCACTCATAAXGXGXG-5'	5510.64	5508.0304
ES2	SS3 5'-Cy3-TACGTGACTGGT-3'	4469.33	4465.9353
	SS4 3'-ATGCACTGACCAXGXGXG-Cy3-5'	6304.55	6300.2977
DS2	SS3' 5'-Cy3-TACGTGACTGGTGYGYGY-3'	6327.45	6323.2254
	SS4 3'-ATGCACTGACCAXGXGXG-Cy3-5'	6304.55	6300.2977
DS2ref	SS5 5'-Cy3-TACGTGACTGGTGCGCGC-3'	6324.49	6320.2401
	SS4 3'-ATGCACTGACCAXGXGXG-Cy3-5'	6304.55	6300.2977
ES3	SS6 5'-Cy3-CTGAACTACGTGACTG-3'	5674.10	5670.1485
	SS7 3'-GACTTGATGCACTGACGXATGXATGXATTA-5'	9248.03	9243.6545
DS3	SS6' 5'-Cy3-CTGAACTACGTGACTGACYTACYTACYTAAT-3'	9881.76	9875.8466
	SS7 3'-GACTTGATGCACTGACGXATGXATGXATTA-5'	9248.03	9243.6545
DS3ref	SS8 5'-Cy3-CTGAACTACGTGACTGCCTACCTACCTAAT-3'	9878.79	9872.8613
	SS7 3'-GACTTGATGCACTGACGXATGXATGXATTA	9248.03	9243.6545
DS4	SS9 5'-CTTGAGGCATTGGCGCGCACCAGTCCAGCT-3'	9183.90	-
	SS10 3'-GAACTCCGTAACCGCGXGTGGTCAGGTCTGA-5'	9246.96	-
DS5	SS11 5'-GAAGCTGGGACTTCCGGGGAGGAGAGTGCAA-Fluo-3'	10313.23	-
	SS12 3'-CTTCGACCCTGAAGGGXCTCCTCTCACGTT-5'	9373.03	-
	SS13 3'-CTTCGACCCTGAAGGGCCCTCCTCTCACGTT-5'	9359.01	-

Legende: Massenangaben in [Da]; X = 5-Me-dC, Y = 5-Aza-dC, Fluo = Fluoreszeinmarkierung.

Tabelle 7.2: Dumbbell Konstrukte.

Name	Sequenz	Molekulargewicht	Exakte Masse
OL1	5'-Pho-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTTTTGGAGT-3'	10448.75	10523.7802
DB1	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTTTTGGAGTYGYGYG-3'	12368.84	12363.0595
OL2	5'-Pho-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTTTTGGAGTCGCGCG-3'	12383.99	12378.0850
DB2	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTTTTGGAGTCGCGCG-3'	12365.97	12360.0742
OL3	5'-Pho-ACTAGGTTTTCCTAGTTTACTGGACATTTTGTCCAGTAA-3'	12336.97	12331.0621
DB3	5'-ACTAGGTTTTCCTAGTTTACTGGACATTTTGTCCAGTAA-3'	12318.95	12313.0513
OL4	5'-Pho-AGAGCTTZTGCTCTCGCGCGACTCCTZTTGGAGT-3'	12020.68	12014.3552
DB4	5'-AGAGCTTZTGCTCTCGCGCGACTCCTZTTGGAGTYGYGYG-3'	13902.89	13895.6819
OL5	5'-Pho-AGAGCTTZTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTCGCGCG-3'	13917.94	13910.7074
DB5	5'-AGAGCTTZTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTCGCGCG-3'	13899.93	13892.6966
OL6	5'-Pho-ACTAGGTTZCCTAGTTTACTGGACATZTTTGTCCAGTAA-3'	13870.92	13863.6845
DB6	5'-ACTAGGTTZCCTAGTTTACTGGACATZTTTGTCCAGTAA-3'	13852.91	13845.6737
OL7	5'-Pho-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGT-3'	13153.93	13147.3815
DB7	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTYGYGYG-3'	13135.91	13129.3707
OL8	5'-Pho-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTCGCGCG-3'	13150.96	13144.3962
DB8	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTCGCGCG-3'	13132.95	13126.3854
OL9	5'-Pho-ACTAGGTTTTCCTAGTTTACTGGACATZTTTGTCCAGTAA-3'	13103.95	13097.3733
DB9	5'-ACTAGGTTTTCCTAGTTTACTGGACATZTTTGTCCAGTAA-3'	13085.93	13079.3625
DB10	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTZ*GZ*GZ*G-3'	13087.91	13081.3527
DB11	5'-AGAGCTTTTGCTCTXGXGXGACTCCTZTTGGAGTZ ^{Me} GZ ^{Me} GZ ^{Me} G-3'	13129.99	13123.4001

Legende: Massenangaben in [Da]; X = 5-Me-dC, Y = 5-Aza-dC, Z* = dZeb, Z^{Me} = 4-Me-dZeb, Z = Cy3-markiertes dT, Pho = Phosphat.

7.3 Wertetabellen mit den Ergebnissen der Zellassays

7.3.1 Zellproliferations Assays

Tabelle 7.3: Wirkung der Dumbbells auf die HCT116 Zellproliferation (siehe Kapitel 4.4.3).

Ansatz	1. Messung			2. Messung		
	Zellviabilität [%]	Fehler (+)	Fehler (-)	Zellviabilität [%]	Fehler (+)	Fehler (-)
DB7	28.7	6.8	6.3	11.5	2.5	1.8
DB8	47.6	7.2	4.1	21.7	3.0	2.9
DB9	42.2	12.7	6.2	56.1	4.6	4.2

Tabelle 7.4: Wirkung der neuen Nucleoside auf die HCT116 Zellproliferation (siehe Kapitel 5.5.4).

Nucleosid	Konzentration [μM]	Zellviabilität [%]	Fehler (+)	Fehler (-)
5-Aza-dC, 5	0.5	57.8	8.1	5.5
	1	50.8	5.7	4.5
	2	44.4	6.4	5.8
6-CN-dC, 29	20	98.0	7.2	7.5
	300	92.0	8.6	7.4
	1000	81.5	8.6	7.6
Zeb, 6	20	66.9	5.3	6.1
	300	32.6	4.4	2.4
	1000	18.6	1.4	1.3
dZeb, 32	20	96.0	4.6	6.4
	300	83.7	9.5	6.8
	1000	72.4	7.2	7.8
5-Me-dZeb, 33	20	101.1	5.0	6.5
	300	99.0	11.3	8.2
	1000	101.8	10.6	7.9
4-Me-dZeb, 34	20	99.8	10.4	9.9
	300	84.5	10.2	9.1
	1000	60.8	6.7	6.0
4-Et-dZeb, 35	20	108.7	7.6	8.1
	300	101.0	9.4	8.7
	1000	90.6	7.4	10.2
4,5-DiMe-dZeb, 35	20	103.0	8.7	8.7
	300	95.5	10.3	8.6
	1000	93.0	12.3	8.0

Legende: Zellviabilitätswerte angegeben in Relation zum Wachstum der unbehandelten Kontrollzellen.

7.3.2 Bestimmung des globalen Methylierungsgrads

Tabelle 7.5: Wirkung der neuen Nucleoside auf den 5-Me-dC Gehalt von HCT116 Zellen (siehe Kapitel 5.5.3).

Nucleosid	Konzentration [μM]	dC ^{Me} Gehalt [%]		
		Absolut	In Relation zur Kontrolle	Fehler (+/-)
5-Aza-dC, 5	2	0.84	21.4	2.3
6-CN-dC, 29	20	4.6	100.0	5.4
	300	4.4	97.1	5.2
	1000	4.6	100.0	5.4
Zeb, 6	20	4.2	93.3	5.0
	300	4.1	91.1	4.9
	1000	3.3	72.2	3.9
dZeb, 32	20	4.3	95.6	5.2
	300	4.5	100.0	5.4
	1000	4.2	98.4	5.3
5-Me-dZeb, 33	20	4.5	98.9	5.3
	300	4.4	96.7	5.2
	1000	4.3	96.1	5.2
4-Me-dZeb, 34	20	4.5	98.4	5.3
	300	4.6	99.5	5.4
	1000	4.6	101.1	5.5
4-Et-dZeb, 35	20	4.6	102.2	5.5
	300	4.5	99.3	5.4
	1000	4.4	97.1	5.2
4,5-DiMe-dZeb, 35	20	4.6	99.5	5.4
	300	4.5	98.4	5.3
	1000	4.7	102.7	5.5

Legende: „Absolut“ = Gesamtgehalt an 5-Me-dC in den Zellen nach Gleichung 4.1. „In Relation zur Kontrolle“ = Gesamtgehalt an 5-Me-dC der behandelten Zellen in Relation zum 5-Me-dC Gehalt der unbehandelten Zellen (deren Wert wurde als 100 % gesetzt).

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Thieme, Stuttgart, **2001**.
- [2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1953**, *18*, 123-131. The structure of DNA.
- [3] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid.
- [4] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.
- [5] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, New York, **2004**.
- [6] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.
- [7] A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398. Perceptions of epigenetics.
- [8] C. B. Yoo, P. A. Jones, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 37-50. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future.
- [9] K. E. Bachman, B. H. Park, I. Rhee, H. Rajagopalan, J. G. Herman, S. B. Baylin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 89-95. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene.
- [10] A. P. Feinberg, B. Tycko, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 143-153. The history of cancer epigenetics.
- [11] M. Spivakov, A. G. Fisher, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 263-271. Epigenetic signatures of stem-cell identity.
- [12] A. Sparmann, M. van Lohuizen, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 846-856. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer.
- [13] E. Bernstein, C. D. Allis, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1635-1655. RNA meets chromatin.
- [14] N. Tsankova, W. Renthal, A. Kumar, E. J. Nestler, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 355-367. Epigenetic regulation in psychiatric disorders.
- [15] M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 286-298. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.
- [16] S. M. Frisch, J. S. Mymryk, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 441-452. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm.
- [17] M. R. Montminy, G. A. Gonzalez, K. K. Yamamoto, *Trends Neurosci.* **1990**, *13*, 184-188. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB.
- [18] E. Li, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 662-673. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.
- [19] G. I. Dellino, Y. B. Schwartz, G. Farkas, D. McCabe, S. C. Elgin, V. Pirrotta, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 887-893. Polycomb silencing blocks transcription initiation.
- [20] N. J. Francis, R. E. Kingston, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 409-421. Mechanisms of transcriptional memory.
- [21] L. Wang, J. L. Brown, R. Cao, Y. Zhang, J. A. Kassis, R. S. Jones, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 637-646. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes.
- [22] T. Klymenko, B. Papp, W. Fischle, T. Kocher, M. Schelder, C. Fritsch, B. Wild, M. Wilm, J. Muller, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1110-1122. A Polycomb group

- protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities.
- [23] R. Cao, Y. Tsukada, Y. Zhang, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 845-854. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing.
- [24] S. Daujat, U. Zeissler, T. Waldmann, N. Happel, R. Schneider, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38090-38095. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding.
- [25] E. Vire, C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit, F. Fuks, *Nature* **2006**, *439*, 871-874. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation.
- [26] M. Szyf, *Ageing Res. Rev.* **2003**, *2*, 299-328. Targeting DNA methylation in cancer.
- [27] P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068-1070. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.
- [28] A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6-21. DNA methylation patterns and epigenetic memory.
- [29] O. Mortusewicz, L. Schermelleh, J. Walter, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 8905-8909. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites.
- [30] K. D. Robertson, *Oncogene* **2002**, *21*, 5361-5379. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web.
- [31] K. D. Robertson, *Oncogene* **2001**, *20*, 3139-3155. DNA methylation, methyltransferases, and cancer.
- [32] L. Zhou, X. Cheng, B. A. Connolly, M. J. Dickman, P. J. Hurd, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 591-599. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases.
- [33] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 274-293. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases.
- [34] Y. Wang, M. Jorda, P. L. Jones, R. Maleszka, X. Ling, H. M. Robertson, C. A. Mizzen, M. A. Peinado, G. E. Robinson, *Science* **2006**, *314*, 645-647. Functional CpG methylation system in a social insect.
- [35] A. Brero, H. P. Easwaran, D. Nowak, I. Grunewald, T. Cremer, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 733-743. Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation.
- [36] R. Singal, G. D. Ginder, *Blood* **1999**, *93*, 4059-4070. DNA methylation.
- [37] W. Reik, *Nature* **2007**, *447*, 425-432. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.
- [38] C. Beard, E. Li, R. Jaenisch, *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2325-2334. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells.
- [39] B. Panning, R. Jaenisch, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 1991-2002. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes.
- [40] E. Li, C. Beard, R. Jaenisch, *Nature* **1993**, *366*, 362-365. Role for DNA methylation in genomic imprinting.
- [41] J. Goffin, E. Eisenhauer, *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 1699-1716. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art.
- [42] J. A. Yoder, C. P. Walsh, T. H. Bestor, *Trends Genet.* **1997**, *13*, 335-340. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.
- [43] S. Gonzalo, I. Jaco, M. F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, M. A. Blasco, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 416-424. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells.

- [44] G. G. Wilson, N. E. Murray, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, *25*, 585-627. Restriction and modification systems.
- [45] D. A. Low, N. J. Weyand, M. J. Mahan, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 7197-7204. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence.
- [46] Y. Q. Li, P. Z. Zhou, X. D. Zheng, C. P. Walsh, G. L. Xu, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 390-400. Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair.
- [47] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
- [48] M. L. Gonzalgo, G. Liang, C. H. Spruck, 3rd, J. M. Zingg, W. M. Rideout, 3rd, P. A. Jones, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 594-599. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR.
- [49] R. Jaenisch, A. Bird, *Nat. Genet.* **2003**, *33 Suppl*, 245-254. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.
- [50] F. Antequera, A. Bird, *EXS* **1993**, *64*, 169-185. CpG islands.
- [51] F. Antequera, A. Bird, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11995-11999. Number of CpG islands and genes in human and mouse.
- [52] M. T. Morgan, M. T. Bennett, A. C. Drohat, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 27578-27586. Excision of 5-halogenated uracils by human thymine DNA glycosylase. Robust activity for DNA contexts other than CpG.
- [53] H. R. Schoeler, *Naturwiss. Rundsch.* **2003**, *56*, 525-539. The potential of stem cells.
- [54] S. H. Cross, A. P. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1995**, *5*, 309-314. CpG islands and genes.
- [55] J. P. Issa, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 988-993. CpG island methylator phenotype in cancer.
- [56] K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 597-610. DNA methylation and human disease.
- [57] A. El-Osta, *BioEssays* **2003**, *25*, 1071-1084. DNMT cooperativity--the developing links between methylation, chromatin structure and cancer.
- [58] A. Hermann, H. Gowher, A. Jeltsch, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2571-2587. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases.
- [59] M. G. Goll, T. H. Bestor, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 481-514. Eukaryotic cytosine methyltransferases.
- [60] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 1-10. The DNA (cytosine-5) methyltransferases.
- [61] S. Pradhan, A. Bacolla, R. D. Wells, R. J. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33002-33010. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.
- [62] Z. M. Svedruzic, N. O. Reich, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9472-9485. DNA cytosine C5 methyltransferase Dnmt1: catalysis-dependent release of allosteric inhibition.
- [63] R. Goyal, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1182-1188. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase.

- [64] H. Leonhardt, A. W. Page, H. U. Weier, T. H. Bestor, *Cell* **1992**, *71*, 865-873. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.
- [65] L. Schermelleh, F. Spada, H. P. Easwaran, K. Zolghadr, J. B. Margot, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 751-756. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells.
- [66] J. Flynn, J. F. Glickman, N. O. Reich, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7308-7315. Murine DNA cytosine-C5 methyltransferase: pre-steady- and steady-state kinetic analysis with regulatory DNA sequences.
- [67] J. Flynn, J. Y. Fang, J. A. Mikovits, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8238-8243. A potent cell-active allosteric inhibitor of murine DNA cytosine C5 methyltransferase.
- [68] A. Bacolla, S. Pradhan, J. E. Larson, R. J. Roberts, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18605-18613. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence.
- [69] A. Bacolla, S. Pradhan, R. J. Roberts, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33011-33019. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna.
- [70] S. Pradhan, R. J. Roberts, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2103-2114. Hybrid mouse-prokaryotic DNA (cytosine-5) methyltransferases retain the specificity of the parental C-terminal domain.
- [71] W. M. Lindstrom, Jr., J. Flynn, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4912-4919. Reconciling structure and function in HhaI DNA cytosine-C-5 methyltransferase.
- [72] S. Pradhan, P. O. Esteve, *Clin. Immunol.* **2003**, *109*, 6-16. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression.
- [73] R. Lauster, T. A. Trautner, M. Noyer-Weidner, *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 305-312. Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains.
- [74] J. A. Yoder, N. S. Soman, G. L. Verdine, T. H. Bestor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 385-395. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe.
- [75] T. Bestor, A. Laudano, R. Mattaliano, V. Ingram, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 971-983. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.
- [76] J. Posfai, A. S. Bhagwat, G. Posfai, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2421-2435. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases.
- [77] L. S. Chuang, H. I. Ian, T. W. Koh, H. H. Ng, G. Xu, B. F. Li, *Science* **1997**, *277*, 1996-2000. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.
- [78] M. Fatemi, A. Hermann, S. Pradhan, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1189-1199. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA.
- [79] T. H. Bestor, *EMBO J.* **1992**, *11*, 2611-2617. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain.

- [80] C. Zimmermann, E. Guhl, A. Graessmann, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 393-405. Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the catalytic domain display neither de novo nor maintenance methylation activity in vivo.
- [81] J. B. Margot, A. M. Aguirre-Arteta, B. V. Di Giacco, S. Pradhan, R. J. Roberts, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 293-300. Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure.
- [82] L. S. Chuang, H. H. Ng, J. N. Chia, B. F. Li, *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 935-948. Characterisation of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N terminus of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase: modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs.
- [83] G. Pedrali-Noy, A. Weissbach, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7600-7602. Mammalian DNA methyltransferases prefer poly(dI-dC) as substrate.
- [84] M. R. Rountree, K. E. Bachman, S. B. Baylin, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 269-277. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.
- [85] K. D. Robertson, S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, A. P. Wolffe, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 338-342. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.
- [86] F. Fuks, P. J. Hurd, R. Deplus, T. Kouzarides, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2305-2312. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.
- [87] H. Kimura, K. Shiota, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4806-4812. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1.
- [88] I. Callebaut, J. C. Courvalin, J. P. Mornon, *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 189-193. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation.
- [89] C. Qiu, K. Sawada, X. Zhang, X. Cheng, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 217-224. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds.
- [90] T. H. Bestor, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 380-389. DNA methyltransferases.
- [91] X. Cheng, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3784-3795. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping.
- [92] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, *76*, 357-369. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix.
- [93] R. J. Roberts, X. Cheng, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 181-198. Base flipping.
- [94] M. O'Gara, S. Klimasauskas, R. J. Roberts, X. Cheng, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 634-645. Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: mechanistic implications of new crystal structures for HhaI methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes.
- [95] K. M. Reinisch, L. Chen, G. L. Verdine, W. N. Lipscomb, *Cell* **1995**, *82*, 143-153. The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing.
- [96] S. Gabbara, A. S. Bhagwat, *Biochem. J.* **1995**, *307* (Pt 1), 87-92. The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5-)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor.

- [97] S. Mi, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2459-2464. The DNA binding affinity of HhaI methylase is increased by a single amino acid substitution in the catalytic center.
- [98] J. C. Wu, D. V. Santi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4778-4786. Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase.
- [99] C. Taylor, K. Ford, B. A. Connolly, D. P. Hornby, *Biochem. J.* **1993**, *291* (Pt 2), 493-504. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor.
- [100] L. Chen, A. M. MacMillan, W. Chang, K. Ezaz-Nikpay, W. S. Lane, G. L. Verdine, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11018-11025. Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase.
- [101] S. Gabbara, D. Sheluho, A. S. Bhagwat, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8914-8923. Cytosine methyltransferase from *Escherichia coli* in which active site cysteine is replaced with serine is partially active.
- [102] L. Chen, A. M. MacMillan, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5318-5319. Mutational separation of DNA binding from catalysis in a DNA cytosine methyltransferase.
- [103] R. J. Klose, A. P. Bird, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 89-97. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.
- [104] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2536-2540. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells.
- [105] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247-257. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.
- [106] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 219-220. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.
- [107] W. Reik, W. Dean, J. Walter, *Science* **2001**, *293*, 1089-1093. Epigenetic reprogramming in mammalian development.
- [108] D. Jia, R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, X. Cheng, *Nature* **2007**, *449*, 248-251. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation.
- [109] C. Brenner, R. Deplus, C. Didelot, A. Lorient, E. Vire, C. De Smet, A. Gutierrez, D. Danovi, D. Bernard, T. Boon, P. G. Pelicci, B. Amati, T. Kouzarides, Y. de Launoit, L. Di Croce, F. Fuks, *EMBO J.* **2005**, *24*, 336-346. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor.
- [110] I. Rhee, K. W. Jair, R. W. Yen, C. Lengauer, J. G. Herman, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Nature* **2000**, *404*, 1003-1007. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.
- [111] P. M. Vertino, R. W. Yen, J. Gao, S. B. Baylin, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4555-4565. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase.
- [112] K. W. Jair, K. E. Bachman, H. Suzuki, A. H. Ting, I. Rhee, R. W. Yen, S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 682-692. De novo CpG island methylation in human cancer cells.
- [113] Y. W. Leu, F. Rahmatpanah, H. Shi, S. H. Wei, J. C. Liu, P. S. Yan, T. H. Huang, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6110-6115. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation.
- [114] I. Rhee, K. E. Bachman, B. H. Park, K. W. Jair, R. W. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin, B. Vogelstein,

- Nature* **2002**, *416*, 552-556. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.
- [115] L. Y. Tang, M. N. Reddy, V. Rasheva, T. L. Lee, M. J. Lin, M. S. Hung, C. K. Shen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33613-33616. The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases.
- [116] A. Hermann, S. Schmitt, A. Jeltsch, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31717-31721. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity.
- [117] I. Suetake, F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, S. Tajima, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27816-27823. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction.
- [118] D. Bourc'his, G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, T. H. Bestor, *Science* **2001**, *294*, 2536-2539. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints.
- [119] M. S. Kareta, Z. M. Botello, J. J. Ennis, C. Chou, F. Chedin, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25893-25902. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L.
- [120] S. K. Ooi, C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng, T. H. Bestor, *Nature* **2007**, *448*, 714-717. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA.
- [121] F. Watt, P. L. Molloy, *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1136-1143. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter.
- [122] P. H. Tate, A. P. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 226-231. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression.
- [123] X. Nan, F. J. Campoy, A. Bird, *Cell* **1997**, *88*, 471-481. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin.
- [124] P. A. Wade, *BioEssays* **2001**, *23*, 1131-1137. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression.
- [125] B. Hendrich, A. Bird, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 6538-6547. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins.
- [126] X. Nan, H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, A. Bird, *Nature* **1998**, *393*, 386-389. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.
- [127] M. C. Lorincz, D. R. Dickerson, M. Schmitt, M. Groudine, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1068-1075. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells.
- [128] F. Fuks, W. A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, T. Kouzarides, *EMBO J.* **2001**, *20*, 2536-2544. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription.
- [129] F. Fuks, W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 88-91. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.
- [130] S. U. Kass, N. Landsberger, A. P. Wolffe, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 157-165. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation.
- [131] V. Colot, J. L. Rossignol, *BioEssays* **1999**, *21*, 402-411. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device.
- [132] N. Puget, D. Torchard, O. M. Serova-Sinilnikova, H. T. Lynch, J. Feunteun, G. M. Lenoir, S. Mazoyer, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 828-831. A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17.

- [133] F. Rouyer, M. C. Simmler, D. C. Page, J. Weissenbach, *Cell* **1987**, *51*, 417-425. A sex chromosome rearrangement in a human XX male caused by Alu-Alu recombination.
- [134] K. Small, J. Iber, S. T. Warren, *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 96-99. Emerin deletion reveals a common X-chromosome inversion mediated by inverted repeats.
- [135] R. J. Wozniak, W. T. Klimecki, S. S. Lau, Y. Feinstein, B. W. Futscher, *Oncogene* **2007**, *26*, 77-90. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation.
- [136] L. Lande-Diner, J. Zhang, I. Ben-Porath, N. Amariglio, I. Keshet, M. Hecht, V. Azuara, A. G. Fisher, G. Rechavi, H. Cedar, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12194-12200. Role of DNA methylation in stable gene repression.
- [137] K. M. McGarvey, E. Greene, J. A. Fahrner, T. Jenuwein, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5097-5102. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2.
- [138] P. A. Reynolds, M. Sigaroudinia, G. Zardo, M. B. Wilson, G. M. Benton, C. J. Miller, C. Hong, J. Fridlyand, J. F. Costello, T. D. Tlsty, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24790-24802. Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells.
- [139] A. P. Feinberg, H. Cui, R. Ohlsson, *Semin. Cancer Biol.* **2002**, *12*, 389-398. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms.
- [140] W. Reik, J. Walter, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 21-32. Genomic imprinting: parental influence on the genome.
- [141] Y. G. Ko, K. Nishino, N. Hattori, Y. Arai, S. Tanaka, K. Shiota, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9627-9634. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development.
- [142] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, *Nature* **2000**, *403*, 501-502. Demethylation of the zygotic paternal genome.
- [143] J. Lee, K. Inoue, R. Ono, N. Ogonuki, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura, F. Ishino, *Development* **2002**, *129*, 1807-1817. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells.
- [144] P. Hajkova, S. Erhardt, N. Lane, T. Haaf, O. El-Maarri, W. Reik, J. Walter, M. A. Surani, *Mech. Dev.* **2002**, *117*, 15-23. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells.
- [145] K. Hata, M. Okano, H. Lei, E. Li, *Development* **2002**, *129*, 1983-1993. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice.
- [146] A. H. Peters, D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, T. Jenuwein, *Cell* **2001**, *107*, 323-337. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability.
- [147] M. Monk, M. Boubelik, S. Lehnert, *Development* **1987**, *99*, 371-382. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development.
- [148] T. Kafri, M. Ariel, M. Brandeis, R. Shemer, L. Urven, J. McCarrey, H. Cedar, A. Razin, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 705-714. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.
- [149] M. Szyf, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 350-354. Towards a pharmacology of DNA methylation.

- [150] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* **1992**, *69*, 915-926. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
- [151] J. Oswald, S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, J. Walter, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 475-478. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote.
- [152] S. K. Howlett, W. Reik, *Development* **1991**, *113*, 119-127. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development.
- [153] N. Rougier, D. Bourc'his, D. M. Gomes, A. Niveleau, M. Plachot, A. Paldi, E. Viegas-Pequignot, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2108-2113. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development.
- [154] G. Keller, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1129-1155. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine.
- [155] R. Lovell-Badge, *Nature* **2001**, *414*, 88-91. The future for stem cell research.
- [156] B. V. Johnson, J. Rathjen, P. D. Rathjen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2006**, *16*, 447-454. Transcriptional control of pluripotency: decisions in early development.
- [157] S. A. Noggle, D. James, A. H. Brivanlou, *Stem Cell Rev.* **2005**, *1*, 111-118. A molecular basis for human embryonic stem cell pluripotency.
- [158] K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Nature* **2007**, *448*, 313-317. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.
- [159] J. Ohgane, N. Hattori, M. Oda, S. Tanaka, K. Shiota, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 701-706. Differentiation of trophoblast lineage is associated with DNA methylation and demethylation.
- [160] J. Fronk, R. Magiera, *Biochem. J.* **1994**, *304* (Pt 1), 101-104. DNA methylation during differentiation of a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*.
- [161] S. M. Taylor, P. A. Jones, *Cell* **1979**, *17*, 771-779. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine.
- [162] P. G. Constantinides, P. A. Jones, W. Gevers, *Nature* **1977**, *267*, 364-366. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment.
- [163] S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa, S. Ogawa, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 697-705. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.
- [164] P. A. Jones, *Pharmacol. Ther.* **1985**, *28*, 17-27. Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation.
- [165] F. Creusot, G. Acs, J. K. Christman, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2041-2048. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [166] P. A. Jones, S. M. Taylor, T. Mohandas, L. J. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 1215-1219. Cell cycle-specific reactivation of an inactive X-chromosome locus by 5-azadeoxycytidine.
- [167] P. A. Jones, S. M. Taylor, *Cell* **1980**, *20*, 85-93. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.
- [168] N. Ogonuki, K. Inoue, Y. Yamamoto, Y. Noguchi, K. Tanemura, O. Suzuki, H. Nakayama, K. Doi, Y. Ohtomo, M. Satoh, A. Nishida, A. Ogura, *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 253-254. Early death of mice cloned from somatic cells.
- [169] K. Hochedlinger, R. Jaenisch, *Nature* **2006**, *441*, 1061-1067. Nuclear reprogramming and pluripotency.

- [170] T. Wakayama, A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson, R. Yanagimachi, *Nature* **1998**, *394*, 369-374. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei.
- [171] D. Bourc'his, D. Le Bourhis, D. Patin, A. Niveleau, P. Comizzoli, J. P. Renard, E. Viegas-Pequignot, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1542-1546. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos.
- [172] Y. K. Kang, D. B. Koo, J. S. Park, Y. H. Choi, A. S. Chung, K. K. Lee, Y. M. Han, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 173-177. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos.
- [173] W. Dean, F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf, W. Reik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 13734-13738. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos.
- [174] Y. K. Kang, J. S. Park, D. B. Koo, Y. H. Choi, S. U. Kim, K. K. Lee, Y. M. Han, *EMBO J.* **2002**, *21*, 1092-1100. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos.
- [175] M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, T. Tada, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1553-1558. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.
- [176] J. Hanna, M. Wernig, S. Markoulaki, C. W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L. C. Wu, T. M. Townes, R. Jaenisch, *Science* **2007**, *318*, 1920-1923. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.
- [177] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663-676. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.
- [178] M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, *Nature* **2007**, *448*, 318-324. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.
- [179] M. Tada, T. Tada, L. Lefebvre, S. C. Barton, M. A. Surani, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6510-6520. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells.
- [180] J. P. Jost, E. J. Oakeley, B. Zhu, D. Benjamin, S. Thiry, M. Siegmann, Y. C. Jost, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4452-4461. 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation.
- [181] G. Barreto, A. Schafer, J. Marhold, D. Stach, S. K. Swaminathan, V. Handa, G. Doderlein, N. Maltry, W. Wu, F. Lyko, C. Niehrs, *Nature* **2007**, *445*, 671-675. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation.
- [182] J. P. Jost, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 4684-4688. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine.
- [183] J. P. Jost, M. Siegmann, L. Sun, R. Leung, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 9734-9739. Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase.
- [184] B. Zhu, D. Benjamin, Y. Zheng, H. Angliker, S. Thiry, M. Siegmann, J. P. Jost, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5031-5036. Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene.

- [185] A. Weiss, I. Keshet, A. Razin, H. Cedar, *Cell* **1996**, *86*, 709-718. DNA demethylation in vitro: involvement of RNA.
- [186] S. K. Bhattacharya, S. Ramchandani, N. Cervoni, M. Szyf, *Nature* **1999**, *397*, 579-583. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA.
- [187] S. W. Chan, I. R. Henderson, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 351-360. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*.
- [188] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 9821-9826. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.
- [189] Z. Xiong, P. W. Laird, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2532-2534. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.
- [190] M. Karimi, S. Johansson, D. Stach, M. Corcoran, D. Grander, M. Schalling, G. Bakalkin, F. Lyko, C. Larsson, T. J. Ekstrom, *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 1989-1995. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation.
- [191] M. Karimi, S. Johansson, T. J. Ekstrom, *Epigenetics* **2006**, *1*, 45-48. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation.
- [192] C. A. Eads, K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg, P. W. Laird, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E32. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation.
- [193] C. Pompeia, D. R. Hodge, C. Plass, Y. Z. Wu, V. E. Marquez, J. A. Kelley, W. L. Farrar, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3465-3473. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line.
- [194] B. H. Ramsahoye, *Methods* **2002**, *27*, 156-161. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
- [195] A. S. Yang, M. R. Estecio, K. Doshi, Y. Kondo, E. H. Tajara, J. P. Issa, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e38. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements.
- [196] M. F. Fraga, E. Uriol, L. Borja Diego, M. Berdasco, M. Esteller, M. J. Canal, R. Rodriguez, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1677-1681. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues.
- [197] A. Okamoto, K. Tainaka, T. Kamei, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1638-1640. Sequence-selective osmium oxidation of DNA: efficient distinction between 5-methylcytosine and cytosine.
- [198] T. Ushijima, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 223-231. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells.
- [199] A. D. Riggs, Z. Xiong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4-5. Methylation and epigenetic fidelity.
- [200] R. L. Mompalmer, V. Bovenzi, *J. Cell. Physiol.* **2000**, *183*, 145-154. DNA methylation and cancer.
- [201] C. I. Stains, J. L. Furman, D. J. Segal, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9761-9765. Site-Specific Detection of DNA Methylation Utilizing mCpG-SEER.
- [202] U. Lehmann, H. Kreipe, *Methods Mol. Biol.* **2004**, *287*, 207-218. Real-time PCR-based assay for quantitative determination of methylation status.
- [203] K. H. Taylor, R. S. Kramer, J. W. Davis, J. Guo, D. J. Duff, D. Xu, C. W. Caldwell, H. Shi, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8511-8518. Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing.

- [204] S. Bareyt, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 181-184. Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA.
- [205] I. Yang, I. Y. Park, S. M. Jang, L. H. Shi, H. K. Ku, S. R. Park, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e61. Rapid quantification of DNA methylation through dNMP analysis following bisulfite-PCR.
- [206] I. Hatada, M. Fukasawa, M. Kimura, S. Morita, K. Yamada, T. Yoshikawa, S. Yamanaka, C. Endo, A. Sakurada, M. Sato, T. Kondo, A. Horii, T. Ushijima, H. Sasaki, *Oncogene* **2006**, *25*, 3059-3064. Genome-wide profiling of promoter methylation in human.
- [207] P. Schatz, J. Distler, K. Berlin, M. Schuster, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e59. Novel method for high throughput DNA methylation marker evaluation using PNA-probe library hybridization and MALDI-TOF detection.
- [208] K. S. Guerrero, A. R. Vazquez, B. Segura-Pacheco, A. Duenas-Gonzalez, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1057-1062. Determination of 5-methyl-cytosine and cytosine in tumor DNA of cancer patients.
- [209] R. Tetzner, D. Dietrich, J. Distler, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e4. Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA.
- [210] V. L. Boyd, G. Zon, *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 278-280. Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput.
- [211] 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. U. S. A.* **1992**, *89*, 1827-1831. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.
- [212] J. M. Dupont, J. Tost, H. Jammes, I. G. Gut, *Anal. Biochem.* **2004**, *333*, 119-127. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology.
- [213] A. Olek, J. Oswald, J. Walter, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 5064-5066. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis.
- [214] A. Meissner, A. Gnirke, G. W. Bell, B. Ramsahoye, E. S. Lander, R. Jaenisch, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5868-5877. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis.
- [215] S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul, M. Frommer, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2990-2997. High sensitivity mapping of methylated cytosines.
- [216] M. Ehrich, S. Zoll, S. Sur, D. van den Boom, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e29. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment.
- [217] M. Shiraishi, H. Hayatsu, *DNA Res.* **2004**, *11*, 409-415. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation.
- [218] R. Paulin, G. W. Grigg, M. W. Davey, A. A. Piper, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5009-5010. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA.
- [219] P. W. Laird, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 253-266. The power and the promise of DNA methylation markers.
- [220] P. M. Das, R. Singal, *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4632-4642. DNA methylation and cancer.
- [221] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415-428. The fundamental role of epigenetic events in cancer.

- [222] M. Szyf, *Drug Resist. Updat.* **2003**, *6*, 341-353. DNA methylation and cancer therapy.
- [223] V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 5583-5586. Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers.
- [224] A. P. Feinberg, *Nature* **2007**, *447*, 433-440. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.
- [225] A. Murrell, V. K. Rakyan, S. Beck, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14 Spec No 1*, R3-R10. From genome to epigenome.
- [226] F. Eckhardt, S. Beck, I. G. Gut, K. Berlin, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2004**, *4*, 609-618. Future potential of the Human Epigenome Project.
- [227] <http://www.epigenome.eu>.
- [228] <http://www.epigenome.org>.
- [229] S. B. Baylin, J. E. Ohm, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 107-116. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?
- [230] J. G. Herman, S. B. Baylin, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2042-2054. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.
- [231] J. M. Teodoridis, J. Hall, S. Marsh, H. D. Kannall, C. Smyth, J. Curto, N. Siddiqui, H. Gabra, H. L. McLeod, G. Strathdee, R. Brown, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8961-8967. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer.
- [232] C. J. Marsit, E. A. Houseman, B. C. Christensen, K. Eddy, R. Bueno, D. J. Sugarbaker, H. H. Nelson, M. R. Karagas, K. T. Kelsey, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10621-10629. Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors.
- [233] A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Nature* **1983**, *301*, 89-92. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.
- [234] M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, M. Ehrlich, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 6883-6894. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.
- [235] C. Lengauer, *Science* **2003**, *300*, 442-443. Cancer. An unstable liaison.
- [236] M. Ehrlich, *Oncogene* **2002**, *21*, 5400-5413. DNA methylation in cancer: too much, but also too little.
- [237] M. Widschwendter, G. Jiang, C. Woods, H. M. Muller, H. Fiegl, G. Goebel, C. Marth, E. Muller-Holzner, A. G. Zeimet, P. W. Laird, M. Ehrlich, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4472-4480. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology.
- [238] M. Ehrlich, N. E. Hopkins, G. Jiang, J. S. Dome, M. C. Yu, C. B. Woods, G. E. Tomlinson, M. Chintagumpala, M. Champagne, L. Dillerg, D. M. Parham, J. Sawyer, *Cancer Genet. Cytogenet.* **2003**, *141*, 97-105. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors.
- [239] A. O. Chan, R. R. Broaddus, P. S. Houlihan, J. P. Issa, S. R. Hamilton, A. Rashid, *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1823-1830. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum.
- [240] M. Serrano, G. J. Hannon, D. Beach, *Nature* **1993**, *366*, 704-707. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.
- [241] W. H. Liggett, Jr., D. Sidransky, *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1197-1206. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.
- [242] G. A. Otterson, S. N. Khleif, W. Chen, A. B. Coxon, F. J. Kaye, *Oncogene* **1995**, *11*, 1211-1216. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA

- hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'deoxyctidine.
- [243] N. Ohtani-Fujita, T. Fujita, A. Aoike, N. E. Osifchin, P. D. Robbins, T. Sakai, *Oncogene* **1993**, *8*, 1063-1067. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene.
- [244] I. P. Pogribny, S. J. James, *Cancer Lett.* **2002**, *176*, 169-174. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation.
- [245] K. M. McGarvey, J. A. Fahrner, E. Greene, J. Martens, T. Jenuwein, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3541-3549. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state.
- [246] B. N. Kim, H. Yamamoto, K. Ikeda, B. Damdinsuren, Y. Sugita, C. Y. Ngan, Y. Fujie, M. Ogawa, T. Hata, M. Ikeda, M. Ohue, M. Sekimoto, T. Monden, N. Matsuura, M. Monden, *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 1217-1226. Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues.
- [247] J. Y. Fang, Y. X. Chen, J. Lu, R. Lu, L. Yang, H. Y. Zhu, W. Q. Gu, L. G. Lu, *Cell Res.* **2004**, *14*, 217-226. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116.
- [248] G. Shao, J. Berenguer, A. C. Borczuk, C. A. Powell, T. K. Hei, Y. Zhao, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4566-4573. Epigenetic inactivation of Betaig-h3 gene in human cancer cells.
- [249] H. C. Chang, C. Y. Cho, W. C. Hung, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8413-8420. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation.
- [250] P. Cairns, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 531-543. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead.
- [251] M. Ehrlich, G. Jiang, E. Fiala, J. S. Dome, M. C. Yu, T. I. Long, B. Youn, O. S. Sohn, M. Widschwendter, G. E. Tomlinson, M. Chintagumpala, M. Champagne, D. Parham, G. Liang, K. Malik, P. W. Laird, *Oncogene* **2002**, *21*, 6694-6702. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors.
- [252] M. Ehrlich, C. B. Woods, M. C. Yu, L. Dubeau, F. Yang, M. Campan, D. J. Weisenberger, T. Long, B. Youn, E. S. Fiala, P. W. Laird, *Oncogene* **2006**, *25*, 2636-2645. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors.
- [253] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, C. C. Harris, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4855-4878. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.
- [254] E. M. Klenova, H. C. Morse, 3rd, R. Ohlsson, V. V. Lobanenkov, *Semin. Cancer Biol.* **2002**, *12*, 399-414. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer.
- [255] V. Valinluck, H. H. Tsai, D. K. Rogstad, A. Burdzy, A. Bird, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4100-4108. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2).
- [256] V. Valinluck, P. Liu, J. I. Kang, Jr., A. Burdzy, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3057-3064. 5-halogenated pyrimidine lesions within a CpG sequence context mimic 5-methylcytosine by enhancing the binding of the methyl-CpG-binding domain of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2).

- [257] V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 946-950. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1.
- [258] M. Esteller, *Curr. Opin. Oncol.* **2005**, *17*, 55-60. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations.
- [259] J. A. Beisler, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 204-208. Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine.
- [260] C. B. Yoo, J. C. Cheng, P. A. Jones, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 910-912. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy.
- [261] C. M. Bender, M. M. Pao, P. A. Jones, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 95-101. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines.
- [262] W. G. Alleman, R. L. Tabios, G. V. Chandramouli, O. N. Aprelikova, C. Torres-Cabala, A. Mendoza, C. Rogers, N. A. Sopko, W. M. Linehan, J. R. Vasselli, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7011-7021. The in vitro and in vivo effects of re-expressing methylated von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in clear cell renal carcinoma with 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [263] V. Santini, H. M. Kantarjian, J. P. Issa, *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 573-586. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications.
- [264] F. Lyko, R. Brown, *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 1498-1506. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies.
- [265] C. Stresemann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, F. Lyko, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2794-2800. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines.
- [266] J. P. Issa, *Curr. Opin. Oncol.* **2003**, *15*, 446-451. Decitabine.
- [267] S. Kumar, J. R. Horton, G. D. Jones, R. T. Walker, R. J. Roberts, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2773-2783. DNA containing 4'-thio-2'-deoxycytidine inhibits methylation by HhaI methyltransferase.
- [268] J. K. Christman, *Oncogene* **2002**, *21*, 5483-5495. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.
- [269] S. D. Gore, C. Jones, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 891-892. Decitabine.
- [270] X. Lin, K. Asgari, M. J. Putzi, W. R. Gage, X. Yu, B. S. Cornblatt, A. Kumar, S. Piantadosi, T. L. DeWeese, A. M. De Marzo, W. G. Nelson, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8611-8616. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide.
- [271] B. Brueckner, R. G. Boy, P. Siedlecki, T. Musch, H. C. Kliem, P. Zielenkiewicz, S. Suhai, M. Wiessler, F. Lyko, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6305-6311. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases.
- [272] W. J. Lee, B. T. Zhu, *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 269-277. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols.
- [273] M. Z. Fang, Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh, C. S. Yang, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7563-7570. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-

- gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines.
- [274] J. C. Chuang, C. B. Yoo, J. M. Kwan, T. W. Li, G. Liang, A. S. Yang, P. A. Jones, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1515-1520. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [275] P. Siedlecki, R. G. Boy, T. Musch, B. Brueckner, S. Suhai, F. Lyko, P. Zielenkiewicz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 678-683. Discovery of two novel, small-molecule inhibitors of DNA methylation.
- [276] B. H. Lee, S. Yegnasubramanian, X. Lin, W. G. Nelson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40749-40756. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1.
- [277] A. H. Ting, K. W. Jair, H. Suzuki, R. W. Yen, S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 582-584. CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1.
- [278] M. Suzuki, N. Sunaga, D. S. Shames, S. Toyooka, A. F. Gazdar, J. D. Minna, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3137-3143. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells.
- [279] G. K. Reid, J. M. Besterman, A. R. MacLeod, *Curr Opin Mol Ther* **2002**, *4*, 130-137. Selective inhibition of DNA methyltransferase enzymes as a novel strategy for cancer treatment.
- [280] M. F. Robert, S. Morin, N. Beaulieu, F. Gauthier, I. C. Chute, A. Barsalou, A. R. MacLeod, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 61-65. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells.
- [281] M. Fournel, P. Sapiha, N. Beaulieu, J. M. Besterman, A. R. MacLeod, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24250-24256. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms.
- [282] S. Ramchandani, A. R. MacLeod, M. Pinard, E. von Hofe, M. Szyf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 684-689. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide.
- [283] T. Chen, S. Hevi, F. Gay, N. Tsujimoto, T. He, B. Zhang, Y. Ueda, E. Li, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 391-396. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells.
- [284] A. Piskala, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2060-2076. Nucleic acids components and their analogs. LI. Synthesis of 1-glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine.
- [285] F. Sorm, J. Vesely, *Neoplasma* **1968**, *15*, 339-343. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice.
- [286] J. Pliml, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2576-2578. Synthesis of 2-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine.
- [287] T. Haaf, *Pharmacol. Ther.* **1995**, *65*, 19-46. The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes.
- [288] R. Schneider-Stock, M. Diab-Assef, A. Rohrbeck, C. Foltzer-Jourdainne, C. Boltze, R. Hartig, P. Schonfeld, A. Roessner, H. Gali-Muhtasib, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 525-536. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms.

- [289] J. P. Issa, H. M. Kantarjian, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 275-276. Azacitidine.
- [290] R. L. Momparler, *Pharmacol. Ther.* **1985**, *30*, 287-299. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [291] R. Brown, J. A. Plumb, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, *4*, 501-510. Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy.
- [292] A. J. Murgo, *Semin. Oncol.* **2005**, *32*, 458-464. Innovative approaches to the clinical development of DNA methylation inhibitors as epigenetic remodeling drugs.
- [293] P. Fenaux, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2 Suppl 1*, S36-44. Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes.
- [294] J. C. Cheng, D. J. Weisenberger, F. A. Gonzales, G. Liang, G. L. Xu, Y. G. Hu, V. E. Marquez, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1270-1278. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells.
- [295] J. C. Cheng, C. B. Matsen, F. A. Gonzales, W. Ye, S. Greer, V. E. Marquez, P. A. Jones, E. U. Selker, *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 399-409. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine.
- [296] M. Herranz, J. Martin-Caballero, M. F. Fraga, J. Ruiz-Cabello, J. M. Flores, M. Desco, V. Marquez, M. Esteller, *Blood* **2006**, *107*, 1174-1177. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma.
- [297] J. L. Holleran, R. A. Parise, E. Joseph, J. L. Eiseman, J. M. Covey, E. R. Glaze, A. V. Lyubimov, Y. F. Chen, D. Z. D'Argenio, M. J. Egorin, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3862-3868. Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine.
- [298] M. L. Eidinoff, M. A. Rich, A. G. Perez, *Cancer Res.* **1959**, *19*, 638-642. Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluorocytidine and 5-fluoro-2'-deoxycytidine: reversal studies.
- [299] D. G. Osterman, G. D. DePillis, J. C. Wu, A. Matsuda, D. V. Santi, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5204-5210. 5-Fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of HhaI methylase.
- [300] T. Ben-Kasus, Z. Ben-Zvi, V. E. Marquez, J. A. Kelley, R. Agbaria, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 121-133. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells.
- [301] A. Cihak, *Oncology* **1974**, *30*, 405-422. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes.
- [302] D. V. Santi, A. Norment, C. E. Garrett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 6993-6997. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.
- [303] M. Karon, L. Sieger, S. Leimbrock, J. Z. Finklestein, M. E. Nesbit, J. J. Swaney, *Blood* **1973**, *42*, 359-365. 5-Azacytidine: a new active agent for the treatment of acute leukemia.
- [304] C. G. Moertel, A. J. Schutt, R. J. Reitemeier, R. G. Hahn, *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *56*, 649-652. Phase II study of 5-azacytidine (NSC-102816) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer.
- [305] B. Brueckner, F. Lyko, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 551-554. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy.
- [306] M. Lubbert, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2000**, *249*, 135-164. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic

- syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action.
- [307] E. Kaminskas, A. Farrell, S. Abraham, A. Baird, L. S. Hsieh, S. L. Lee, J. K. Leighton, H. Patel, A. Rahman, R. Sridhara, Y. C. Wang, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3604-3608. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes.
- [308] A. J. Weiss, G. E. Metter, T. F. Nealon, J. P. Keanan, G. Ramirez, A. Swaminathan, W. S. Fletcher, S. E. Moss, R. W. Manthei, *Cancer Treat. Rep.* **1977**, *61*, 55-58. Phase II study of 5-azacytidine in solid tumors.
- [309] R. Nitschke, V. Land, C. P. Steuber, A. H. Ragab, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **1981**, *3*, 307-309. Low response rate to 5-aza-cytidine, vincristine, and prednisone therapy in previously treated childhood acute nonlymphocytic leukemia: a Southwest Oncology Group Study.
- [310] P. L. Lomen, P. Khilanani, D. Kessel, *Neoplasma* **1980**, *27*, 101-106. Phase I study using combination of hydroxyurea and 5-azacytidine (NSC-102816).
- [311] L. R. Silverman, J. F. Holland, R. S. Weinberg, B. P. Alter, R. B. Davis, R. R. Ellison, E. P. Demakos, C. J. Cornell, Jr., R. W. Carey, C. Schiffer, et al., *Leukemia* **1993**, *7 Suppl 1*, 21-29. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes.
- [312] A. B. Kornblith, J. E. Herndon, 2nd, L. R. Silverman, E. P. Demakos, R. Odchimar-Reissig, J. F. Holland, B. L. Powell, C. DeCastro, J. Ellerton, R. A. Larson, C. A. Schiffer, J. C. Holland, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2441-2452. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study.
- [313] A. Aparicio, C. A. Eads, L. A. Leong, P. W. Laird, E. M. Newman, T. W. Synold, S. D. Baker, M. Zhao, J. S. Weber, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *51*, 231-239. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [314] V. Zagonel, G. Lo Re, G. Marotta, R. Babare, G. Sardeo, V. Gattei, V. De Angelis, S. Monfardini, A. Pinto, *Leukemia* **1993**, *7 Suppl 1*, 30-35. 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) induces trilineage response in unfavourable myelodysplastic syndromes.
- [315] W. E. Samlowski, S. A. Leachman, M. Wade, P. Cassidy, P. Porter-Gill, L. Busby, R. Wheeler, K. Boucher, F. Fitzpatrick, D. A. Jones, A. R. Karpf, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 3897-3905. Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation.
- [316] L. Jackson-Grusby, P. W. Laird, S. N. Magge, B. J. Moeller, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4681-4685. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase.
- [317] R. L. Momparler, J. Samson, L. F. Momparler, G. E. Rivard, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1984**, *13*, 191-194. Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [318] H. K. Kuo, J. D. Griffith, K. N. Kreuzer, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8248-8254. 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo.
- [319] K. T. Lin, R. L. Momparler, G. E. Rivard, *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1228-1232. High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine.

- [320] R. E. Notari, J. L. DeYoung, *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 1148-1157. Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions.
- [321] P. J. Hurd, A. J. Whitmarsh, G. S. Baldwin, S. M. Kelly, J. P. Waltho, N. C. Price, B. A. Connolly, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 389-401. Mechanism-based inhibition of C5-cytosine DNA methyltransferases by 2-H pyrimidinone.
- [322] J. J. Barchi, Jr., S. Musser, V. E. Marquez, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5802. The decomposition of 1-beta -(D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one (zebularine) in alkali: mechanism and products [Erratum to document cited in CA116(5):41960v].
- [323] C. M. Bender, M. L. Gonzalgo, F. A. Gonzales, C. T. Nguyen, K. D. Robertson, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6690-6698. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands.
- [324] W. G. Zhu, G. A. Otterson, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2003**, *3*, 187-199. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells.
- [325] E. E. Cameron, K. E. Bachman, S. Myohanen, J. G. Herman, S. B. Baylin, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 103-107. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.
- [326] K. Yamashita, S. Upadhyay, M. Osada, M. O. Hoque, Y. Xiao, M. Mori, F. Sato, S. J. Meltzer, D. Sidransky, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 485-495. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma.
- [327] S. Jahangeer, R. M. Elliott, R. C. Henneberry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 1434-1440. beta-Adrenergic receptor induction in HeLa cells: synergistic effect of 5-azacytidine and butyrate.
- [328] S. A. Belinsky, D. M. Klinge, C. A. Stidley, J. P. Issa, J. G. Herman, T. H. March, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7089-7093. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer.
- [329] M. Vives, R. Eritja, R. Tauler, V. E. Marquez, R. Gargallo, *Biopolymers* **2004**, *73*, 27-43. Synthesis, stability, and protonation studies of a self-complementary dodecamer containing the modified nucleoside 2'-deoxyzebularine.
- [330] 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. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells.
- [331] 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. U. S. A.* **2006**, *103*, 14080-14085. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival.
- [332] A. H. Ting, K. W. Jair, K. E. Schuebel, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 729-735. Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation.
- [333] L. P. McIntosh, W. S. Zielinski, B. W. Kalisch, G. P. Pfeifer, M. Sprinzl, D. Drahovsky, J. H. van de Sande, T. M. Jovin, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4806-4814. Synthesis and characterization of poly[d(G-z5C)]. B-Z transition and inhibition of DNA methylase.
- [334] P. D. Cook, *Anticancer. Drug Des.* **1991**, *6*, 585-607. Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides--future opportunities.

- [335] P. S. Eder, R. J. DeVine, J. M. Dagle, J. A. Walder, *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 141-151. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma.
- [336] I. Lebedeva, C. A. Stein, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 403-419. Antisense oligonucleotides: promise and reality.
- [337] C. A. Stein, Y. C. Cheng, *Science* **1993**, *261*, 1004-1012. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?
- [338] P. S. Miller, *Biotechnology. (N. Y.)* **1991**, *9*, 358-362. Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents.
- [339] M. D. Matteucci, R. W. Wagner, *Nature* **1996**, *384*, 20-22. In pursuit of antisense.
- [340] S. D. Patil, D. G. Rhodes, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2439-2445. Influence of divalent cations on the conformation of phosphorothioate oligodeoxynucleotides: a circular dichroism study.
- [341] R. Guimil Garcia, A. S. Brank, J. K. Christman, V. E. Marquez, R. Eritja, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 369-378. Synthesis of oligonucleotide inhibitors of DNA (Cytosine-C5) methyltransferase containing 5-azacytosine residues at specific sites.
- [342] J. D. Ahn, R. Morishita, Y. Kaneda, H. S. Kim, Y. C. Chang, K. U. Lee, J. Y. Park, H. W. Lee, Y. H. Kim, I. K. Lee, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1682-1692. Novel E2F decoy oligodeoxynucleotides inhibit in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and in vivo neointimal hyperplasia.
- [343] C. Clusel, E. Ugarte, N. Enjolras, M. Vasseur, M. Blumenfeld, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3405-3411. Ex vivo regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides.
- [344] B. C. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5857-5858. The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts.
- [345] B. C. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6958. Binding of hairpin and dumbbell DNA to transcription factors.
- [346] D. E. Wemmer, A. S. Benight, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8611-8621. Preparation and melting of single strand circular DNA loops.
- [347] D. A. Erie, R. A. Jones, W. K. Olson, N. K. Sinha, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1989**, *28*, 268-273. Melting behavior of a covalently closed, single-stranded, circular DNA.
- [348] G. W. Ashley, D. M. Kushlan, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2927-2933. Chemical synthesis of oligodeoxynucleotide dumbbells.
- [349] Y. Padia, M. Ariatti, P. A. Jones, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 1091-1092. 5-Methylcytosine and 5-azacytosine containing 25mer duplexes: synthesis and investigation of their interaction with HeLa nuclear protein extracts.
- [350] J. Bouchard, R. L. Momparler, *Mol. Pharmacol.* **1983**, *24*, 109-114. Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase.
- [351] M. M. Senior, R. A. Jones, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 6242-6246. Influence of loop residues on the relative stabilities of DNA hairpin structures.
- [352] M. Kuntz, J. H. Weil, A. Steinmetz, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 5037-5047. Nucleotide sequence of a 2 kbp BamH I fragment of *Vicia faba* chloroplast DNA containing the genes for threonine, glutamic acid and tyrosine transfer RNAs.

- [353] T. Kovacs, L. Otvos, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525-4528. Simple synthesis of 5-vinyl- and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates.
- [354] J. Clark, T. Shevchuk, M. R. Kho, S. S. Smith, *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 50-64. Methods for the design and analysis of oligodeoxynucleotide-based DNA (cytosine-5) methyltransferase inhibitors.
- [355] J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1869-1915. Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids.
- [356] D. Erie, N. Sinha, W. Olson, R. Jones, K. Breslauer, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7150-7159. A dumbbell-shaped, double-hairpin structure of DNA: a thermodynamic investigation.
- [357] K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1637-1645. Time-of-flight mass spectrometry of underivatized single-stranded DNA oligomers by matrix-assisted laser desorption.
- [358] F. Kirpekar, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2334-2339. Detection of double-stranded DNA by IR- and UV-MALDI mass spectrometry.
- [359] M. E. Sanborn, B. K. Connolly, K. Gurunathan, M. Levitus, *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 11064-11074. Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA.
- [360] J. B. Randolph, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2923-2929. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes.
- [361] D. Kuch, L. Schermelleh, S. Manetto, H. Leonhardt, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 1515-1518. Synthesis of DNA dumbbell based inhibitors for the human DNA methyltransferase Dnmt1.
- [362] A. P. Null, L. T. George, D. C. Muddiman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 338-344. Evaluation of sample preparation techniques for mass measurements of PCR products using ESI-FT-ICR mass spectrometry.
- [363] J. C. Hannis, D. C. Muddiman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 954-962. Accurate characterization of the tyrosine hydroxylase forensic allele 9.3 through development of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.
- [364] D. C. Muddiman, A. P. Null, J. C. Hannis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1201-1204. Precise mass measurement of a double-stranded 500 base-pair (309 kDa) polymerase chain reaction product by negative ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.
- [365] R. A. Estabrook, N. Reich, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37205-37214. Observing an induced-fit mechanism during sequence-specific DNA methylation.
- [366] A. S. Brank, R. Eritja, R. G. Garcia, V. E. Marquez, J. K. Christman, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 53-67. Inhibition of HhaI DNA (Cytosine-C5) methyltransferase by oligodeoxyribonucleotides containing 5-aza-2'-deoxycytidine: examination of the intertwined roles of co-factor, target, transition state structure and enzyme conformation.
- [367] D. V. Santi, C. E. Garrett, P. J. Barr, *Cell* **1983**, *33*, 9-10. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs.
- [368] S. S. Smith, B. E. Kaplan, L. C. Sowers, E. M. Newman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 4744-4748. Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation.
- [369] <http://www.neb.com>.

- [370] Dr. L. Schermelleh, Prof. Dr. H. Leonhardt, Department für Biologie II, LMU München, Großhadernerstraße 2, 82152 Martinsried (Deutschland)
- [371] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413-7417. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
- [372] <http://www.bio-rad.com>.
- [373] M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang, *Biochemica* **1996**, *4*, 15-19. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts.
- [374] O. Shimelis, X. Zhou, G. Li, R. W. Giese, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 143-149. Phenolic extraction of DNA from mammalian tissues and conversion to deoxyribonucleoside-5'-monophosphates devoid of ribonucleotides.
- [375] C. W. Gehrke, R. A. McCune, M. A. Gama-Sosa, M. Ehrlich, K. C. Kuo, *J. Chromatogr.* **1984**, *301*, 199-219. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA.
- [376] L. Song, S. R. James, L. Kazim, A. R. Karpf, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 504-510. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.
- [377] S. Friso, S. W. Choi, G. G. Dolnikowski, J. Selhub, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4526-4531. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.
- [378] D. Stach, O. J. Schmitz, S. Stilgenbauer, A. Benner, H. Dohner, M. Wiessler, F. Lyko, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, E2. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels.
- [379] M. Wirtz, D. Stach, H. C. Kliem, M. Wiessler, O. J. Schmitz, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 839-845. Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.
- [380] P. F. Crain, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 782-790. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry.
- [381] A. H. Bolden, C. M. Nalin, C. A. Ward, M. S. Poonian, A. Weissbach, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 1135-1140. Primary DNA sequence determines sites of maintenance and de novo methylation by mammalian DNA methyltransferases.
- [382] L. Pichat, J. P. Guilbert, *C. R. Acad. Sci. Ser. C* **1973**, *277*, 1157-1158. Lithiation of silyl derivatives of cytosine nucleosides. Preparation of 6-methylcytidine 6-carboxycytidine, and 6-iodocytidine.
- [383] C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497-2507. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.
- [384] S. Mao, M. Bouygues, C. Welch, M. Biba, J. Chilenski, R. F. Schinazi, D. C. Liotta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4991-4994. Synthesis of enantiomerically pure D-FDOC, an anti-HIV agent.
- [385] M. Adamczyk, S. R. Akireddy, P. G. Mattingly, R. E. Reddy, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5749-5761. Synthesis of hapten-phosphoramidites from 2'-deoxyuridine.
- [386] S. L. Gibson, J. J. Holt, M. Ye, D. J. Donnelly, T. Y. Ohulchanskyy, Y. You, M. R. Detty, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6394-6403. Structure-activity studies

- of uptake and phototoxicity with heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine in vitro in chemosensitive and multidrug-resistant cells.
- [387] J. Shi, J. Du, T. Ma, K. W. Pankiewicz, S. E. Patterson, P. M. Tharnish, T. R. McBrayer, L. J. Stuyver, M. J. Otto, C. K. Chu, R. F. Schinazi, K. A. Watanabe, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1641-1652. Synthesis and anti-viral activity of a series of d- and l-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system.
- [388] A. Matsuda, K. Takenuki, M. Tanaka, T. Sasaki, T. Ueda, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 812-819. Nucleosides and nucleotides. 97. Synthesis of new broad spectrum antineoplastic nucleosides, 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine (DMDC) and its derivatives.
- [389] H. Tanaka, H. Hayakawa, S. Iijima, K. Haraguchi, T. Miyasaka, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 861-866. Lithiation of 3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-deoxyuridine: synthesis of 6-substituted 2'-deoxyuridines.
- [390] A. San-Felix, S. Velazquez, M. J. Perez-Perez, J. Balzarini, E. De Clercq, M. J. Camarasa, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 453-460. Novel series of TSAO-T derivatives. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4-, 5-, and 6-substituted pyrimidine analogues.
- [391] M. von Janta-Lipinski, B. Costisella, H. Ochs, U. Hubscher, P. Hafkemeyer, E. Matthes, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2040-2046. Newly synthesized L-enantiomers of 3'-fluoro-modified beta-2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphates inhibit hepatitis B DNA polymerases but not the five cellular DNA polymerases alpha, beta, gamma, delta, and epsilon nor HIV-1 reverse transcriptase.
- [392] M. D. Sorensen, L. Kvaerno, T. Bryld, A. E. Hakansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2164-2176. alpha-L-ribo-configured locked nucleic acid (alpha-L-LNA): synthesis and properties.
- [393] A. Krug, S. Schmidt, J. Lekhschas, K. Lemke, D. Cech, *J. Prakt. Chem.* **1989**, *331*, 835-842. Transformation of uridine derivatives into cytidines via selective amination.
- [394] N. Bischofberger, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2821-2824. Synthesis of 4-C substituted pyrimidine nucleosides.
- [395] H. Vorbrueggen, C. Ruh-Pohlenz, *Handbook of nucleoside synthesis*, Wiley-Interscience, **2001**.
- [396] H. Aoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2073-2077. Stereoselective synthesis of anomers of 5-substituted 2'-deoxyuridines.
- [397] E. Colacino, G. Sindona, G. Gosselin, C. Mathe, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 2013-2026. Synthesis and biological evaluation of some 5-nitro- and 5-amino derivatives of 2'-deoxycytidine, 2',3'-dideoxyuridine, and 2',3'-dideoxycytidine.
- [398] Z. X. Wang, W. Duan, L. I. Wiebe, J. Balzarini, E. De Clercq, E. E. Knaus, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 11-40. Synthesis of 1-(2-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2,4-difluoro-5-substituted-benzene thymidine mimics, some related alpha-anomers, and their evaluation as antiviral and anticancer agents.
- [399] B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub, *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 631-637. Puromycin. Synthetic studies. I. Synthesis of 6-dimethylaminopurine, a hydrolytic fragment.
- [400] D. G. Bartholomew, P. Dea, R. K. Robins, G. R. Revankar, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3708-3713. Imidazo(1,2-c)pyrimidine nucleosides. Synthesis of N-

- bridgehead inosine monophosphate and guanosine monophosphate analogues related to 3-deazapurines.
- [401] T. Ueda, H. Inoue, A. Matsuda, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 121-130. Synthesis and reaction of some 6-substituted pyrimidine nucleosides.
- [402] A. Matsuda, H. Inoue, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 2340-2345. Nucleosides and nucleotides. XX. Synthesis of 6-cyanocytidine and its derivatives.
- [403] C. H. Hwang, J. S. Park, J. H. Won, J. N. Kim, E. K. Ryu, *Arch. Pharmacol Res.* **1992**, *15*, 69-72. The oxidative iodination of pyrimidine bases and their nucleosides using iodine/dimethylformamide/m-chloroperbenzoic acid.
- [404] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386. Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetrabiotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases.
- [405] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives.
- [406] Y. Kaburagi, Y. Kishi, *Org Lett* **2007**, *9*, 723-726. Operationally simple and efficient workup procedure for TBAF-mediated desilylation: application to halichondrin synthesis.
- [407] R. Funakoshi, M. Irie, C. Ukita, *Chem. & Pharm. Bull (Tokyo)* **1961**, *9*, 406-409. Syntheses of unnatural pyrimidine nucleosides.
- [408] A. Holy, A. Ludzisa, I. Votruba, K. Sediva, H. Pischel, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1985**, *50*, 393-417. Preparation of analogs of cytosine and 2-pyrimidinone nucleosides and their effect on bacterial (Escherichia coli A19) cytidine aminohydrolase.
- [409] A. Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 902-908. Nucleic acid components and their analogs. CLXXXVIII. Preparation of acyl derivatives of 2-pyrimidinone nucleosides by the silyl variant of the Hilbert-Johnson reaction.
- [410] J. S. Driscoll, V. E. Marquez, J. Plowman, P. S. Liu, J. A. Kelley, J. J. Barchi, Jr., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3280-3284. Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) and its fluorinated analogues.
- [411] L. Frick, C. Yang, V. E. Marquez, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9423-9430. Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity.
- [412] L. Betts, S. Xiang, S. A. Short, R. Wolfenden, C. W. Carter, Jr., *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 635-656. Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex.
- [413] C. H. Kim, V. E. Marquez, D. T. Mao, D. R. Haines, J. J. McCormack, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1374-1380. Synthesis of pyrimidin-2-one nucleosides as acid-stable inhibitors of cytidine deaminase.
- [414] J. J. Barchi, Jr., D. A. Cooney, Z. Hao, Z. H. Weinberg, C. Taft, V. E. Marquez, H. Ford, Jr., *J. Enzyme Inhib.* **1995**, *9*, 147-162. Improved synthesis of zebularine [1-(beta-D-ribofuranosyl)-dihydropyrimidin-2-one] nucleotides as inhibitors of human deoxycytidylate deaminase.
- [415] B. Gildea, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2261-2281. The synthesis of 2-pyrimidinone nucleosides and their incorporation into oligodeoxynucleotides.
- [416] D. T. Hurst, *An introduction to the Chemistry and Biochemistry of Pyrimidines, Purines and Pteridines*, John Wiley and sons, New York, **1980**.

- [417] S. Klimasauskas, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1388-1395. M.HhaI binds tightly to substrates containing mismatches at the target base.
- [418] A. S. Yang, J. C. Shen, J. M. Zingg, S. Mi, P. A. Jones, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1380-1387. HhaI and HpaII DNA methyltransferases bind DNA mismatches, methylate uracil and block DNA repair.
- [419] L. S. Jeong, G. Buenger, J. J. McCormack, D. A. Cooney, Z. Hao, V. E. Marquez, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2572-2578. Carbocyclic analogues of the potent cytidine deaminase inhibitor 1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one (zebularine).
- [420] V. E. Marquez, R. Eritja, J. A. Kelley, D. Vanbommel, J. K. Christman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1002*, 154-164. Potent inhibition of HhaI DNA methylase by the aglycon of 2-(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) at the GCGC recognition domain.
- [421] U. Hennecke, D. Kuch, T. Carell, *Synthesis* **2007**, 929-935. A general route to 4-C-substituted pyrimidine nucleosides.
- [422] U. Hennecke, *Dissertation*, LMU München, Dept. f. Chemie u. Biochemie, **2007**.
- [423] S. M. N. Efange, A. K. Dutta, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 1451-1463. Synthesis and biological activity 5-halo-2-pyrimidinone 3'-azido-2,3'-dideoxyribosides.
- [424] M. Krecmerova, H. Hrebabecky, A. Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 645-655. Synthesis of 5-phenylcytosine nucleoside derivatives.
- [425] R. Altermatt, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 475-483. Nucleosides and nucleotides. Part 22. Synthesis of a tridecanucleoside dodecaphosphate containing the unnatural base 2(1H)-pyrimidinone.
- [426] F. Seela, U. Bindig, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 895-901. Glycosylations of ambident anions of 2(1H)- and 4(1H)-pyridone and stereoselective synthesis of 2(1H)-pyrimidinone N-(2'-deoxy-alpha -D-ribofuranoside).
- [427] B. A. Connolly, P. C. Newman, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 4957-4974. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4-thiothymidine, 5-methyl-2-pyrimidinone-1-beta-D(2'-deoxyribose) and 2-thiothymidine.
- [428] H. J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 924-931. Synthesis and properties of fluorescent cycloSal nucleotides m5K and its 2',3'-dideoxy analog dm5K.
- [429] S. F. Singleton, F. Shan, M. W. Kanan, C. M. McIntosh, C. J. Stearman, J. S. Helm, K. J. Webb, *Org Lett* **2001**, *3*, 3919-3922. Facile synthesis of a fluorescent deoxycytidine analogue suitable for probing the RecA nucleoprotein filament.
- [430] D. Cech, A. Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 2246-2260. Nucleic acid components and their analogs. CXC. Preparation of 2-pyrimidinone nucleosides from uracil nucleosides.
- [431] R. S. Klein, I. Wempen, K. A. Watanabe, J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2330-2334. Nucleosides. LXVII. The chemistry of 4-methyl-2-pyrimidinone ribonucleosides.
- [432] M. Maeda, C. Kaneko, N. A. Uchida, T. Sasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1985**, 77-80. Synthesis of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2-dihydropyrimidin-2-one derivatives and their biological activities.
- [433] R. Wightman, A. Holy, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1973**, *38*, 1381-1396. Nucleic acid components and their analogs. CLIX. Synthesis of some 2-pyrimidinone nucleosides.

- [434] S. G. Laland, G. Serck-Hanssen, *Biochem. J.* **1964**, *90*, 76-81. Synthesis of pyrimidin-2-one deoxyribosides and their ability to support the growth of the deoxyriboside-requiring organism *Lactobacillus acidophilus* R 26.
- [435] K. Gao, L. E. Orgel, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 935-940. A convenient synthesis of a novel nucleoside analogue: 4-(alpha-diformyl-methyl)-1-(beta-D-ribofuranosyl)-2-pyrimidinone.
- [436] H. Berber, M. Soufyane, C. Mirand, S. Schmidt, A. M. Aubertin, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7369-7375. Synthesis of some cyclic and acyclic nucleoside analogues derived from 4-(trifluoromethyl)pyrimidines.
- [437] E. Wittenburg, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1971**, *36*, 246-261. Nucleosides and related compounds. VII. Alkylation and glycosylation of the silyl derivatives of 6-substituted uracils.
- [438] J. Cadet, *J Carbohydr, Nucleosides, Nucleotides* **1975**, *2*, 459-464. Direct synthesis of alpha and beta anomers of (2-deoxy-D-ribofuranosyl)-6-methyluracil.
- [439] R. S. Coleman, E. A. Kesicki, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11636-11642. Synthesis and Postsynthetic Modification of Oligodeoxynucleotides Containing 4-Thio-2'-deoxyuridine (ds4U).
- [440] R. P. Hodge, C. K. Brush, C. M. Harris, T. M. Harris, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1553-1564. Synthesis of 1- and 1,2,2'-deuteriated deoxyribose and incorporation into deoxyribonucleosides.
- [441] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635. Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one.
- [442] O. M. Subach, A. V. Khoroshaev, D. N. Gerasimov, V. B. Baskunov, A. K. Shchylkina, E. S. Gromova, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2391-2399. 2-Pyrimidinone as a probe for studying the EcoRII DNA methyltransferase-substrate interaction.
- [443] P. J. Hurd, *Dissertation*, University of Sheffield, **1996**.
- [444] A. Bergerat, W. Guschlbauer, G. V. Fazakerley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 6394-6397. Allosteric and catalytic binding of S-adenosylmethionine to *Escherichia coli* DNA adenine methyltransferase monitored by ³H NMR.
- [445] J. Michel, S. Moreau, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1633-1637. Use of C5-diamino-substituted-uridine in triple helix forming oligonucleotides.
- [446] D. R. Coulson, *Inorg. Synth.* **1990**, *28*, 107-109. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0).
- [447] <http://www.glenres.com>.
- [448] J. J. Fox, D. Van Praag, I. Wempen, I. L. Doerr, L. Cheong, J. E. Knoll, M. L. Eidinoff, A. Bendich, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 178-187. Thiation of nucleosides. II. Synthesis of 5-methyl 2'-deoxycytidine and related pyrimidine nucleosides.
- [449] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
- [450] <http://www.qiagen.com>.

9 Danksagung

Prof. Dr. Thomas Carell möchte ich für eine interessante Aufgabenstellung danken, der immer ein führender roter Faden zugrunde lag, die aber gleichzeitig angenehm flexibel war und eigene Gestaltungsspielräume ermöglichte. Trotz seines meist gut gefüllten Terminplaners und den damit verbundenen Abwesenheiten verstand er es stets, den nötigen Optimismus und die Zuversicht in die eigene Arbeit zu vermitteln, auch wenn die Ergebnisse an der Bench gerade eher zu Trübsal Anlass zu geben schienen. Die gebotenen Arbeitsbedingungen waren hervorragend und sicherlich alles andere als selbstverständlich.

Prof. XXXXXX danke ich für die Übernahme des Koreferats und den Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit haben freundlicherweise *Melanie Maul, Ralf Strasser, Simon Warncke, Sabine Schneider, Markus Müller, Andreas Glas, Malte Winnacker, Uli Hennecke* und *Guido Clever* ihre Zeit geopfert: Danke!

Slava Gärtner möchte ich für die Unterstützung in organisatorischen Belangen danken, *Sabine Voß* und *Claudia Gräf* für ihren Beitrag zum reibungslosen Ablauf des Laboralltags. Den Mitarbeitern der Abteilungen für NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie der Fakultät danke ich für die Aufnahme von NMR- und Massenspektren.

Meinen Kooperationspartnern *Lothar Schermelleh* und *Fabio Spada* aus der Arbeitsgruppe *Leonhardt* gilt mein Dank für die fruchtbare und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Beim Kochen, Säulen, Spülen, Putzen, Abrotieren, Wiegen und Messen wurde ich von *Julica Nöth, Michael Pangerl* und vor allem von *Matthias Rasp* tatkräftig unterstützt - auf diesem Wege sei ihnen noch einmal für ihre Mitarbeit gedankt.

Nadja Lehr sowie meinen Heidelberger Studienkollegen *Klaus Hempel, Jochen Kurz, Sören Schilp* und nicht zuletzt *Eva Jahn* und *Guido Clever* danke ich für ihre

Unterstützung und ihre tatkräftigen Beiträge zum Ausgleich der *Work-Life-Balance* während meiner Studienzeit am Neckar - beste Grüße nach Baden! (bzw. in die Schweiz und nach Japan)

Für die entsprechende Ablenkung von der Laborarbeit in München sorgte ein bunt gemischter Arbeitskreis mit vielen sympathischen Charakteren: Neben einem angenehmen Arbeitsumfeld war unter anderem in Form von Wanderausflügen, Kanutouren, Wiesnbesuchen, Cocktailparties, KPO-Exkursionen und zahllosen Grilladen für die nötige Abwechslung vom wissenschaftlichen Alltag gesorgt: Ich danke Euch allen für eine sehr unterhaltsame Zeit! Einige Kollegen müssen dennoch besonders hervorgehoben werden: *Uli Hennecke* und „*Paule*“ *Breeger* danke ich für ihr offenes Ohr bei Fragen zur organischen Synthese - diverse sinnlose Versuche dürften mir durch Euch erspart worden sein. *Johannes Gierlich* danke ich für seine Hilfsbereitschaft und umfassende Unterstützung bei IT-Problemen jeglicher Art. Nach seinem Ausscheiden kam glücklicherweise nicht der vielseitig befürchtete organisatorische Zusammenbruch, sondern ein (mindestens) angemessener Nachfolger aus dem hohen Norden: *Markus Müller* danke ich ausdrücklich für hilfreiche, kritische Diskussionen sowie Rat & Tat in biochemischen Fragen und bei technischen Problemen. Ebenso gebührt *Carsten Pieck* Dank dafür, dass er mir als stupidem Organiker die Welt der Enzyme und Polyacrylamidgele versucht hat näher zu bringen. Pauschal danke ich jenen gutmütigen Seelen, die ihre gebrauchten Kaffetassen während der vergangenen Jahre stets eigenhändig ihrer eigentlichen Bestimmung (der maschinellen oder manuellen Reinigung vor Pilzbefall) zugeführt haben, und wünsche gleichzeitig dem neuen (nunmehr weiblichen) Kaffeeraum-Sheriff ein gutes Durchhaltevermögen - vielleicht schreibe ich auch hin und wieder eine tadelnde Mail aus dem „Off“, nicht dass was fehlt...

Hervorzuheben sind natürlich auch meine (permanenten) Laborkollegen in der „AK Carell Großraumdisse“: Mit *Simon Warncke* verbinden mich nicht nur das gemeinsame Thema und die bewusstseinserweiternden Momente vor seinem Auaqarium, auch bei der Musikwahl während der Arbeit war er immer ein zuverlässiger Verbündeter (*Long live true metal!*). Vor allem in diesem Zusammenhang danke ich *Ralf Strasser* für seine Kompromiss- (und Leidens-) Fähigkeit; darüber hinaus gebührt ihm meine Dankbarkeit für das engagierte

Vermitteln der bayerischen Kulturgepflogenheiten (*Mir kannst no' a Weißbier bringa!*). Dem Ex-F4.045-Mitglied *Philipp Gramlich* (a.k.a. *Dr. Litzka* oder einfach *Pfarrer Lotz*) danke ich ausdrücklich und von Herzen für die zahllosen musikalischen Hommagen - ich bezweifle, in meinem weiteren Arbeitsleben jemals wieder von solch ambitionierter Kleinkunst profitieren zu können.

Besonders bedanke ich mich natürlich bei meiner Freundin *Melanie Maul* (a.k.a. *Der Ästling*) für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und unzählige Nackenmassagen nach nächtlichen Schreibexzessen. Unter anderem durch kulinarische Zuwendungen oder gemeinsame Bergtouren sorgte sie maßgeblich für den nötigen geistigen wie körperlichen Ausgleich beim Erstellen dieser Arbeit.

Tiefe Dankbarkeit gebührt aber vor allem meinen Eltern: Meiner Mutter, die mich über die ganzen Jahre vorbehaltlos unterstützt und wirklich alles ihren Möglichkeiten stehende getan hat, um mir auch in den schwierigen Zeiten des Studiums das Leben zu erleichtern. Meinem Vater, dem es nicht vergönnt war, mich in dieser Phase meines Lebens zu begleiten, ohne den ich aber nie geworden wäre, was ich bin.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: David Kuch Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 27.01.1977 Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsort: Weinheim

Schulbildung

08/83 – 06/87 Grundschule in Weinheim/Bergstr.
08/87 – 06/96 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Weinheim, Abschluss
Abitur (\emptyset 1.4)

Wehrdienst

09/96 – 06/97 Grundwehrdienst in Oberviechtach/Oberpfalz

Hochschulstudium

10/97 – 01/04 Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität in
Heidelberg
12/99 Diplom-Vorprüfung (\emptyset 1.25)
09/01 – 03/02 Auslandssemester im Rahmen des ERASMUS-Austausch-
Programms in Montpellier/Frankreich
05/03 Diplom-Hauptprüfung (\emptyset 1.25)
07/03 – 01/04 Diplomarbeit bei *Prof. Dr. R. Gleiter* zur „Synthese von
cyclischen Bis(1,3-butadiinen) über Platin-Acetylid-
Komplexe“ (Note 1.0)
01/04 Diplom (Gesamtnote 1.2)

Promotion

seit 07/04 Doktorand in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. T. Carell* an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München