

Neue S-Adenosyl-L-methionin-Analoga
mit Modifikationen im Methionin-Teil
für Transalkylierungen
mit DNA-Methyltransferasen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Christian Dalhoff

aus

Dortmund

Berichter:

Universitätsprofessor Dr. Elmar Weinhold

Universitätsprofessor Dr. Carsten Bolm

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2005

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	VIII
DREI- UND EINBUCHSTABEN-CODE FÜR L-AMINOSÄUREN	XII
A EINLEITUNG	1
A.1 S-Adenosyl-L-methionin: Ein vielseitiger Cofaktor in Biosynthesen . . .	1
A.1.1 Funktion und Vorkommen in biologischen Systemen	1
A.1.1.1 AdoMet als Donor von 3-Amino-3-carboxypropyl- und 3- Aminopropyl-Gruppen	2
A.1.1.2 AdoMet als Donor für 5'-Desoxyadenosyl-Radikale	4
A.1.1.3 AdoMet als Donor von Methylgruppen	6
A.1.2 Synthese von AdoMet und seinen Derivaten	6
A.1.2.1 Enzymatische Synthese von AdoMet	6
A.1.2.2 Enzymatische Synthese von AdoMet-Derivaten	9
A.1.2.3 Chemische Synthese von AdoMet	10
A.1.2.4 Chemische Synthese von AdoMet-Derivaten	10
A.1.3 Zerfallswege von AdoMet	12
A.1.4 Medizinische Bedeutung von AdoMet	13
A.2 DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen)	15
A.2.1 Mechanismus der DNA-Methylierung	17
A.2.1.1 Katalytischer Mechanismus der C5-Cytosin-DNA-MTasen	19
A.2.1.2 Katalytischer Mechanismus der N-DNA-MTasen	20
A.2.2 Biologische Bedeutung der DNA-Methylierung	21
A.2.2.1 Funktionen der DNA-Methylierung in Prokaryonten	21
A.2.2.2 Funktionen der DNA-Methylierung in Eukaryonten	22
A.2.3 Die DNA-MTase aus <i>Thermus aquaticus</i> (M.TaqI)	25

A.2.4	Die DNA-MTase aus <i>Haemophilus haemolyticus</i> (M.HhaI)	26
A.2.5	Die DNA-MTase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (M.RsrI)	27
A.2.6	Die DNA-MTase aus <i>Spiroplasma sp.</i> Stamm MQ1 (M.SssI)	28
A.2.7	Die DNA-MTase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> (M.BseCI)	28
A.2.8	Die DNA-MTase aus <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i> Dam)	28
A.3	Kovalente Modifikation von DNA	29
A.3.1	Enzymatische und chemische Modifikation von DNA	29
A.3.2	Sequenzspezifische Modifikation von DNA	30
A.3.3	Sequenzspezifische DNA-Markierung	35
B	ZIELSETZUNG	40
C	ADOMET-ANALOGA MIT MODIFIKATIONEN AN DER CAR-	
	BOXYLGRUPPE	42
C.1	Eingesetzte Dipeptide	42
C.2	Entwicklung eines Aktivitätstests für die eMAT	44
C.3	Enzymatische Umsetzung der Dipeptide	46
C.3.1	Zeitverlauf der Synthesereaktion von AdoMetMet	49
C.3.2	Synthesen mit erneuter eMAT-Zugabe	51
C.3.3	pH-Abhängigkeit der Synthesereaktion von AdoMetGly	54
C.3.4	Synthesen mit HPLC-gereinigten Dipeptiden	55
C.4	Isolierung und Charakterisierung von AdoMetGly	58
C.5	Stabilität von AdoMet und AdoMetGly	60
C.5.1	Stabilität bei pH 8.4	60
C.5.2	Stabilität bei pH 2.0	63
C.6	Cofaktoreigenschaften von AdoMetGly	67
C.6.1	Prinzip des Aktivitätstests für DNA-MTasen mit λ -DNA	67
C.6.2	Aktivität von DNA-MTasen mit AdoMetGly	68

D	ADOMET-ANALOGA MIT VERLÄNGERTER AKTIVIERTER SEITENKETTE	71
D.1	Synthese von Cofaktor-Analoga mit verlängerter aktivierter Alkylseitenkette	72
D.1.1	Chemische Synthese von <i>S</i> -Adenosyl-L-ethionin	72
D.1.2	Chemische Synthese von <i>S</i> -Adenosyl-L-propionin	76
D.2	Cofaktoreigenschaften von AdoEth und AdoProp in DNA-MTase-katalysierten Reaktionen	78
D.2.1	Modifikation kurzer Duplex-ODN mit AdoEth und AdoProp	78
D.2.2	Modifikation von langer DNA mit AdoEth und AdoProp	81
D.2.2.1	M.TaqI-katalysiert	81
D.2.2.2	M.TaqI V21G-katalysiert	83
D.2.2.3	M.BseCI-katalysiert	86
D.2.2.4	M.RsrI-katalysiert	87
D.2.2.5	Cytosin-DNA-MTasen-katalysiert	88
D.2.3	(<i>R</i>)-konfigurierte Cofaktor-Analoga	89
D.3	Design von AdoMet-Analoga mit Doppelaktivierung	90
D.3.1	Synthese von AdoMet-Analoga mit ungesättigter aktivierter Seitenkette	91
D.3.1.1	Chemische Synthese von AdoPropen	91
D.3.1.2	Chemische Synthese von AdoPropin	92
D.3.1.3	Doppelt aktivierte AdoMet-Analoga mit C4- und C5-Ketten	93
D.4	AdoPropen und AdoPropin in DNA-MTase-katalysierten Reaktionen	94
D.4.1	Modifikation von Duplex-ODN mit AdoMet-Analoga mit ungesättigter aktivierter Seitenkette	94
D.4.2	Modifikation von langer DNA mit AdoMet-Analoga mit ungesättigter aktivierter Seitenkette	96
D.4.3	Kinetik der M.TaqI-katalysierten Übertragung der Propargylgruppe von AdoPropen auf DNA	99
D.5	Stabilität der Cofaktor-Analoga	101

F.6	Untersuchung der Stabilität von AdoMetGly	141
F.6.1	Stabilität in SAS-Puffer	141
F.6.2	Stabilität in wässriger Lösung bei pH 2	141
F.7	Synthese von AdoMet-Analoga mit verlängerter Alkyl-Seitenkette	142
F.7.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	142
F.7.1.1	Analytischer Maßstab	142
F.7.1.2	Präparativer Maßstab	142
F.7.2	C-2 Kette	143
F.7.2.1	Chemische Synthese	143
F.7.2.1.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen	143
F.7.2.1.2	Chemische Synthese von <i>S</i> -Adenosyl-L-ethionin	144
F.7.2.2	Enzymatische Synthese von <i>S</i> -Adenosyl-L-ethionin	145
F.7.3	C-3 Ketten	146
F.7.3.1	Synthese von Trifluormethylsulfonsäure-propylester	146
F.7.3.2	Synthese von <i>S</i> -Adenosyl-L-propionin	147
F.7.3.3	Synthese von 5'-[(<i>S</i>)-[3(<i>S</i>)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin	147
F.7.3.4	Synthese von Trifluormethylsulfonsäure-propargylester	148
F.7.3.5	Synthese von 5'-[(<i>S</i>)-[3(<i>S</i>)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-nylsulfonio]-5'-desoxyadenosin	148
F.7.4	Aromatische-Substituenten	150
F.7.4.1	Synthese von 5'-[(<i>S</i>)-[3(<i>S</i>)-3-Amino-3-carboxypropyl]benzylsulfonio]-5'-desoxyadenosin	150
F.8	Restriktions-Modifikations-Tests mit λ DNA	151
F.8.1	M.TaqI/R.TaqI	151
F.8.2	M.TaqI V21G/R.TaqI	152
F.8.3	M.RsrI/EcoRI	153
F.8.4	M.SssI/Hin6I	154
F.8.5	SspDam/MboI	155
F.8.6	M.BseCI/Bsu15I	156

F.9	DNA-MTase-katalysierte Reaktionen mit Duplex-ODN	157
F.9.1	Vorbereitung des Duplexoligodesoxynucleotids	157
F.9.2	Enzymatische Modifikation	157
F.9.3	Enzymatische Fragmentierung	157
F.10	Kinetische Untersuchungen	159
F.10.1	K_M -Wert Bestimmungen	159
F.10.1.1	K_M -Wert von M.TaqI für AdoPropen	159
F.10.1.2	K_M -Wert von M.TaqI für AdoBenz	159
F.10.2	Stabilitätsuntersuchungen	159
LITERATUR		160
ANHANG		171
Gleichungen		171
Programme		171
Danksagung		173
Lebenslauf		175