

N⁶-Methyladenin: ein potentieller epigenetischer Marker in eukaryontischen Genomen**

Daniel Summerer*

DNA-Methylierung · Epigenetik · N⁶-Methyladenin · Transkriptionsregulation

DNA-Methylierung erhöht den Informationsgehalt von Genomen über die vier kanonischen Nukleobasen A, G, C und T hinaus. Diese epigenetische Information kann über Zellteilungszyklen vererbt werden, kann aber auch nach Bedarf durch DNA-Methyltransferasen (Dnmt) und Demethylasen neu editiert werden, was einzigartige Möglichkeiten für die dynamische Regulation DNA-assozierter Prozesse eröffnet.

DNA-Methylierung ist in allen Domänen des Lebens zu finden, aber mit unterschiedlichem Vorkommen der einzelnen Typen von methylierten Nukleobasen und mit unterschiedlichen zugehörigen biologischen Funktionen. So ist beispielsweise 5-Methylcytosin (5mC) die vorherrschende epigenetische Markierung bei Säugetieren und vielen anderen Eukaryonten und spielt als regulatorisches Schlüsselement der Genexpression eine wichtige Rolle für die Genomstabilität, in Entwicklungsprozessen und in der Entstehung von Krankheiten.^[1] Eine vorherrschende epigenetische DNA-Markierung in Bakterien ist N⁶-Methyladenin (6mA, Abbildung 1 A), die es Zellen als Teil von Restriktions-Modifikations(RM)-Systemen ermöglicht, Fremd-DNA durch 6mA-sensitive Restriktionsendonukleasen selektiv zu verdauen. 6mA hat jedoch darüber hinaus eine Vielzahl weiterer Funktionen die es zu einem echten epigenetischen Marker in Bakterien machen, mit vergleichbarer Bedeutung wie 5mC in vielen Eukaryonten: 6mA ist z. B. an der Regulation der bakteriellen Replikation, der Mismatch-Reparatur und der Transkription beteiligt und ist essentiell in mehreren Spezies.^[2] Interessanterweise wurde 6mA auch in den Genomen bestimmter eukaryontischer Organismen gefunden, wie etwa in Protisten, Pilzen und Pflanzen, teilweise ohne das Vorhandensein einer dazugehörigen Restriktionsendonuklease. Dies deutet auf biologische Funktionen jenseits der bloßen Verteidigung gegen fremde DNA hin.^[3] Allerdings schienen die genomischen Gehalte von 6mA in der Regel extrem niedrig zu sein, und eine Beteiligung von 6mA in epigeneti-

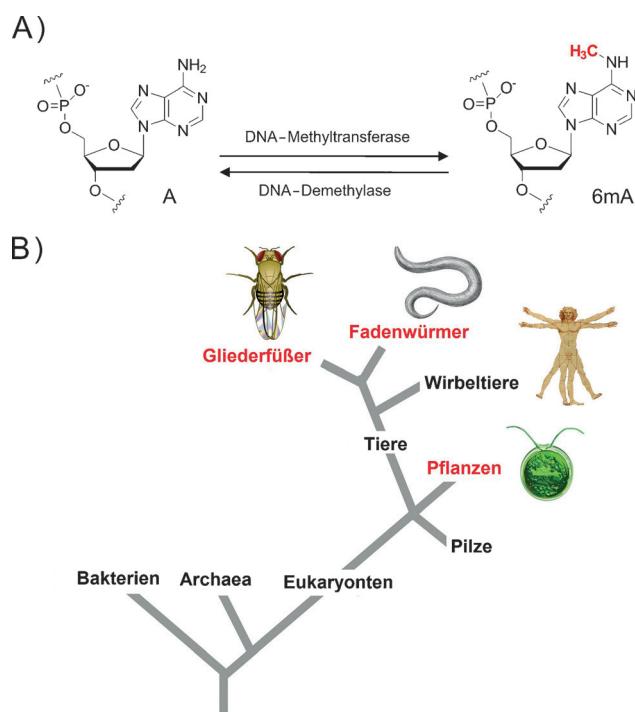


Abbildung 1. N⁶-Methylierung von Adenin. A) Chemische Strukturen von Adenosin und N⁶-Methyladenosin-Nukleotiden in DNA und ihre Umwandlung ineinander durch DNA-Methyltransferasen (Dnmt) und Demethylasen. B) Vereinfachter Stammbaum des Lebens. Organismen, in denen genomicsches 6mA in den beschriebenen Studien entdeckt und/oder charakterisiert wurde, sind als Cartoon gezeigt, und der jeweilige Stamm (oder das Reich) ist rot markiert. Der Mensch ist als Vertreter der Wirbeltiere gezeigt – diese sind noch nicht untersucht worden.

schen Regulationsprozessen in Eukaryonten wurde bisher nicht beschrieben.

In drei Studien wurde nun die Existenz von 6mA – zusammen mit Hinweisen auf potenzielle epigenetische Funktionen – in den phylogenetisch weit auseinanderliegenden Eukaryonten *Chlamydomonas reinhardtii*,^[4] *Drosophila melanogaster*^[5] und *Caenorhabditis elegans*^[6] (Abbildung 1B) nachgewiesen. Bisher war bekannt, dass sowohl 5mC als auch 6mA im Genom der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii* vorkommen, mit einem signifikanten Gehalt der letzteren Nukleobase (0.3 bis 0.5 % 6mA/A).^[7] Fu et al. verwendeten

[*] Dr. D. Summerer
 Fachbereich Chemie und Konstanzer Graduiertenschule Chemische Biologie, Universität Konstanz
 Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
 E-Mail: daniel.summerer@uni-konstanz.de

[**] Dank geht an das Zukunftskolleg der Universität Konstanz, die Konstanzer Graduiertenschule Chemische Biologie und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SU-726/5-1 in SPP 1784).

Antikörper-basierte Methoden für die Affinitätsanreicherung von 6mA-enthaltenden DNA-Fragmenten in Kombination mit Hochdurchsatz-Sequenzierung,^[8] um eine erste Verteilungskarte von 6mA im *C. reinhardtii*-Genom zu erzeugen.^[4] Diese zeigte die Anwesenheit von 6mA in >14000 Genen, was einem Anteil von ca. 84% aller Gene in diesem Organismus entspricht. 6mA wurde überwiegend in ApT-Dinukleotiden gefunden und zeigte eine Präferenz für bestimmte, häufig vorkommende Sequenzmotive, die gleichmäßig über das Genom verteilt waren. Trotz dieser gleichmäßigen Verteilung war 6mA stark an Gen-Promotoren angereichert, mit einer bimodalen Verteilung um die Transkriptionsstartstellen herum (TSS, im Gegensatz dazu wies 5mC eine Anreicherung in den kodierenden Gen-Körpern und nicht an den TSS auf). Eine hochauflösende Kartierung zeigte, dass 6mA an TSS periodische Muster aufwies, mit Maxima die komplementär zu Nukleosom-Bindungsstellen waren. Dies zeigt, dass 6mA an TSS überwiegend in DNA-Linkerregionen zwischen den Nukleosomen auftritt und daher an der Positionierung von Nukleosomen beteiligt sein könnte. Abschließend deckte eine RNA-Seq-Analyse eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von 6mA an TSS und einer hohen Transkriptionsaktivität auf, was auf eine Rolle von 6mA in der Transkriptionsregulation hindeutet.

Das *D. melanogaster*-Genom weist nur kleinste Mengen von 5mC auf,^[9] und Beweise für die Existenz von 6mA fehlten bisher vollständig. In der zweiten Studie analysierten Zhang et al. vollverdaute genomische DNA von adulten Geweben und Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* durch UHPLC-MRM-MS/MS (ultra-high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring), einem Verfahren, das den extrem empfindlichen Nachweis von Nukleobasen-Modifikationen ermöglicht.^[5] Sie fanden generell niedrige Gehalte von genomischem 6mA (ca. 0.001 % 6mA/A) in adulten Geweben und Embryonen aus späteren Entwicklungsstadien. In Embryonen von sehr frühen Stadien waren die Gehalte von 6mA jedoch 70-fach erhöht. Dies zeigt, dass 6mA im *D. melanogaster*-Genom in signifikanten Mengen vorhanden sein kann und dass es während der embryonalen Entwicklung einer dynamischen Regulation unterliegt. Um herauszufinden, ob die beobachtete Dynamik das Ergebnis einer enzymatischen (aktiven) Demethylierung war, verwendeten die Autoren einen In-vitro-Test zur Quantifizierung der 6mA-zu-A-Umwandlung in enzymatisch methylierter DNA durch embryonale Zellkerneextrakte. Tatsächlich beobachteten sie eine dosisabhängige Demethylierungsaktivität, wobei sie höhere Aktivitäten für Extrakte aus späteren Entwicklungsstadien feststellten. Allgemeinen kann Nukleobasen-Demethylierung oxidativ über Katalyse durch Fe^{II}/α-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen wie AlkB^[10] oder den Ten-Eleven-Translokation(TET)-Dioxygenasen erfolgen.^[11] Die Autoren identifizierten die mutmaßliche Dioxygenase *Drosophila*-DNA-6mA-Demethylase (DMAD) im *D. melanogaster*-Genom, die eine ähnliche Domänenstruktur wie die Säugetier-TET-Dioxygenasen aufweist. DMAD wies während der Entwicklung Expressionsstärken auf, die komplementär zum jeweiligen 6mA-Gehalt waren, und Änderungen der Expression führten zu einer erhöhten

Sterblichkeit von Embryonen. Darüber hinaus offenbarten Knockout-Studien DMAD als selektive Demethylase für 6mA in DNA, die keine signifikante Aktivität gegenüber z. B. mC, hmC oder 6mA in RNA aufwies. 6mA war zudem in verschiedenen Zelltypen einschließlich Germariumzellen des Ovars nachweisbar, mit abnehmenden Gehalten in späten Eikammern. Schließlich ergab eine 6mA-gerichtete Methyl-DNA-Immunpräzipitation und Sequenzierung (MeDIP-Seq)^[8] sowie eine Transkriptionsprofilierung eine Anreicherung von 6mA in Transposon-Körpern verbunden mit erhöhten Transkriptionsaktivitäten, was auf eine Rolle von 6mA in der Transkriptionsregulation auch in *D. melanogaster* hinweist.

In *C. elegans* fehlen sowohl 5mC als auch Enzyme, die bekannten Cytosin-Dnmt ähneln, was zu der Ansicht führte, dass das *C. elegans*-Genom keine DNA-Methylierung aufweist.^[12] Dennoch existiert ein Modell für epigenetische Vererbung in *C. elegans*, das auf einer Mutation des spr-5-Gens basiert, welches für eine Histon-3-lysin-4-dimethyl(H3K4me2, eine aktivierende Histon-Markierung)-Demethylase kodiert.^[13] Nach aufeinanderfolgenden Generationen zeigen spr-5-mutierte Würmer (obwohl sie im Prinzip identische Genome besitzen) progressiv ansteigende H3K4me2-Gehalte und eine damit verbundene Zunahme der Unfruchtbarkeit, was eine Vererbung epigenetischer Information nahelegt. In der dritten Studie analysierten Greer et al. genomische DNA aus dem Wildtyp und aus späten Generationen spr-5-mutierter Würmer und konnten 6mA detektieren, nicht aber 5mC oder 5hmC.^[6] Die Gehalte von 6mA waren in den spr-5-mutierten Würmern höher (bis zu 0.15 % 6mA/A) und erhöhten sich weiter von Generation zu Generation. Die Autoren führten zudem 6mA-Seq^[8] und Einzelmolekül-Echtzeit(SMRT)-Sequenzierung^[14] mit Würmern gemischter Entwicklungsstadien durch und fanden 6mA in ca. 0.7 % aller A-Nukleotidpositionen, die weit über das Genom verteilt waren, mit geringer Abhängigkeit von bestimmten Genomfunktionen, aber mit einer Präferenz für spezifische Sequenzmotive. Die Autoren identifizierten dann die 6mA-Demethylase NMAD-1 (eines von fünf im *C. elegans*-Genom vorhandenen dealkylierenden Enzymen der AlkB-Familie), die 6mA in DNA in vitro demethylieren konnte und deren Knockout zu einem beschleunigten Verlust der Fruchtbarkeit in vivo führte. Darüber hinaus identifizierten sie die entsprechende Dnmt DAMT-1 und zeigten, dass ihr Knockout zu verringerten 6mA-Gehalten und zu verringrigerer progressiver Unfruchtbarkeit in der spr-5-Mutante führte (jedoch nicht im Wildtyp). Obwohl die spezifische Rolle von 6mA in diesem Prozess nicht geklärt ist, deuten diese Daten auf eine gegenseitige Beeinflussung von H3K4me2 und 6mA hin, die beide als epigenetische Regulatoren agieren.

Zusammengefasst zeigen die drei Studien, dass 6mA in signifikanten Mengen in den Genomen von mehreren phylogenetisch weit auseinanderliegenden Eukaryonten existiert, und dass es genomische Verteilungen und Korrelationen mit lokalen Transkriptionsaktivitäten aufweist, die Rollen in der Genexpressionsregulation nahelegen. 6mA kann zudem über verschiedene Entwicklungsstufen hinweg variieren, und neue Dnmt und/oder Demethylasen für die

Einführung und Entfernung von 6mA sind identifiziert worden, die die Grundlage für eine dynamische Regulation bilden. Da ähnliche Enzyme in der Evolution konserviert sind, werfen die Studien die zentrale Frage auf, wie weit 6mA in der Eukaryontendomäne tatsächlich verbreitet ist, d.h., ob es z.B. auch in Wirbeltier- oder Säugergenomen vorkommt – einschließlich dem des Menschen. Greer et al. weisen darauf hin, dass das humane Gen Methyl-Transferase-like 4 (METTL4) DAMT-1 von *C. elegans* ähnelt, und Zhang et al. zeigten, dass DMAD Ähnlichkeit mit humanen TET-Dioxygenasen aufweist und in der Lage ist, 6mA zu demethylieren.^[15] Erweiterte Studien über einen größeren Bereich höherer Eukaryonten werden die tatsächliche Bedeutung dieser spannenden Ergebnisse offenbaren. Schlussendlich unterstreichen die Studien die Bedeutung der Entwicklung von fortgeschrittenen, hochempfindlichen Analysemethoden zur Untersuchung von Nukleobasenmodifikationen wie UHPLC-MRM-MS/MS. Diese werden auch in Zukunft neue und unerwartete Erkenntnisse über das Auftreten von epigenetischen Nukleobasenmodifikationen in Eukaryonten liefern, sowie über ihre funktionelle Rolle bei der Regulation biologischer Schlüsselprozesse.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10714–10716
Angew. Chem. **2015**, *127*, 10862–10864

- [1] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204–220.
- [2] D. Wion, J. Casadesus, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 183–192.
- [3] D. Ratel, J. L. Ravanat, F. Berger, D. Wion, *Bioessays* **2006**, *28*, 309–315.

- [4] Y. Fu, G. Z. Luo, K. Chen, X. Deng, M. Yu, D. Han, Z. Hao, J. Liu, X. Lu, L. C. Dore, X. Weng, Q. Ji, L. Mets, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 879–892.
- [5] G. Zhang, H. Huang, D. Liu, Y. Cheng, X. Liu, W. Zhang, R. Yin, D. Zhang, P. Zhang, J. Liu, C. Li, B. Liu, Y. Luo, Y. Zhu, N. Zhang, S. He, C. He, H. Wang, D. Chen, *Cell* **2015**, *161*, 893–906.
- [6] E. L. Greer, M. A. Blanco, L. Gu, E. Sendinc, J. Liu, D. Aristizabal-Corrales, C. H. Hsu, L. Aravind, C. He, Y. Shi, *Cell* **2015**, *161*, 868–878.
- [7] S. Hattman, C. Kenny, L. Berger, K. Pratt, *J. Bacteriol.* **1978**, *135*, 1156–1157.
- [8] a) M. J. Booth, E. A. Raiber, S. Balasubramanian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2240–2254; b) N. Plongthongkum, D. H. Diep, K. Zhang, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 647–661.
- [9] F. Lyko, R. Maleszka, *Trends Genet.* **2011**, *27*, 127–131.
- [10] a) S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174–178; b) P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178–182.
- [11] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [12] D. Wenzel, F. Palladino, M. Jedrusik-Bode, *Genesis* **2011**, *49*, 647–661.
- [13] D. J. Katz, T. M. Edwards, V. Reinke, W. G. Kelly, *Cell* **2009**, *137*, 308–320.
- [14] B. A. Flusberg, D. R. Webster, J. H. Lee, K. J. Travers, E. C. Olivares, T. A. Clark, J. Korlach, S. W. Turner, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 461–465.
- [15] L. M. Iyer, S. Abhiman, L. Aravind, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *101*, 25–104.

Eingegangen am 21. Mai 2015

Online veröffentlicht am 17. Juli 2015