

## Epigenetik

# Struktur, Funktion und Evolution von Dnmt2

SARA MÜLLER<sup>1</sup>, ALBERT JELTSCH<sup>2</sup>, WOLFGANG NELLEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ABTEILUNG GENETIK, UNIVERSITÄT KASSEL

<sup>2</sup>ABTEILUNG BIOCHEMIE, JACOBS UNIVERSITY, BREMEN

Die Funktion der am weitesten verbreiteten eukaryotischen DNA-Methyltransferase Dnmt2 erschien lange Zeit rätselhaft. Neue Ergebnisse weisen darauf hin, dass Dnmt2 möglicherweise dualspezifisch aktiv ist und neben DNA auch tRNA methylieren kann.

This article focuses on the evolutionary conserved and most widely distributed DNA methyltransferase in eukaryotes – Dnmt2. Recent findings give rise to the assumption that Dnmt2 may harbour dual specificity and acts on DNA and tRNA.

### Die modifizierte Base 5-Methylcytosin (5mC)

■ In höheren Eukaryoten wie Wirbeltieren und Pflanzen ist die DNA-Methylierung von

Cytosinen die mit Abstand am häufigsten vorkommende kovalente DNA-Modifikation (**Abb. 1A**). m5C kommt ebenfalls in einigen Pilzen, Invertebraten und Protisten vor.

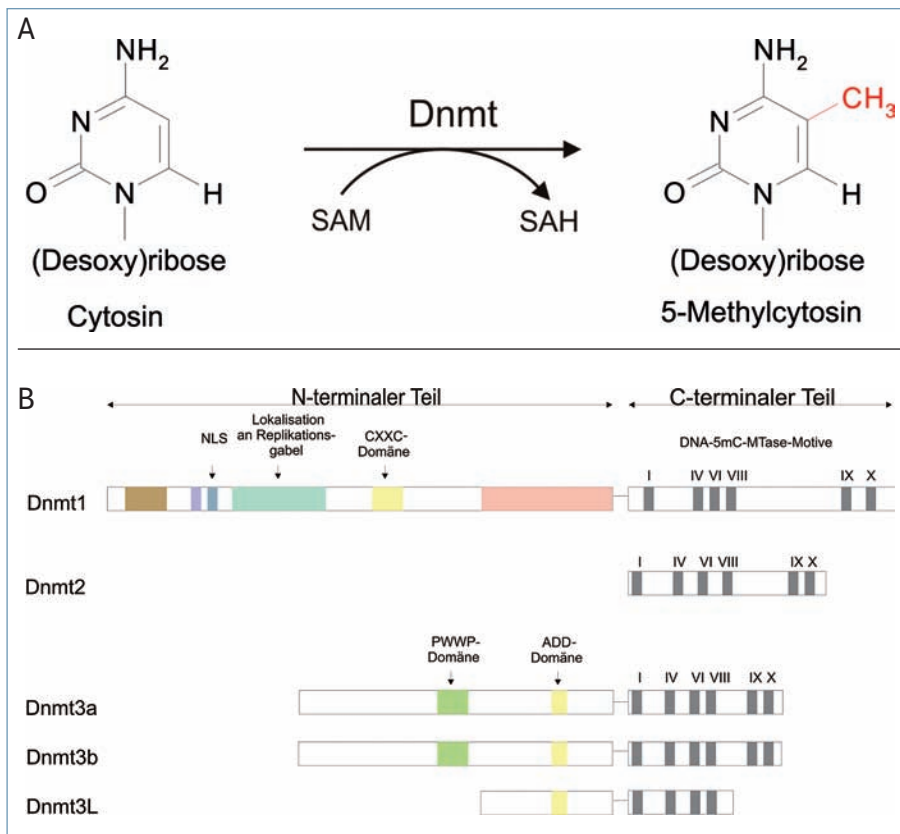
Das Ausmaß der Cytosin-Methylierung variiert sehr stark zwischen einzelnen Spezies. So kommt in Säugetieren 5mC überwiegend in symmetrischen CpG-Nukleotidabfolgen vor. Dabei sind 60 bis 90 Prozent aller CpGs methyliert, dies entspricht ca. drei bis acht Prozent aller Cytosine [1]. Beispiele für Organismen mit geringer DNA-Methylierung (< 0,1 bis ein Prozent) sind *Dictyostelium* und *Drosophila*. Im Gegensatz zu Säugetieren finden sich hier die 5-Methylcytosine auch in asymmetrischen (nicht CpG-)Nukleotidabfolgen [2, 3].

In Eukaryoten spielt Methylierung von DNA bei epigenetischer Genregulation eine Rolle, wobei mit einer Promotormethylierung meist Genrepression einhergeht. DNA-Methylierung ist außerdem an Zelldifferenzierung, Imprinting und X-Chromosom-Inaktivierung sowie der Kontrolle von Transposons beteiligt [1].

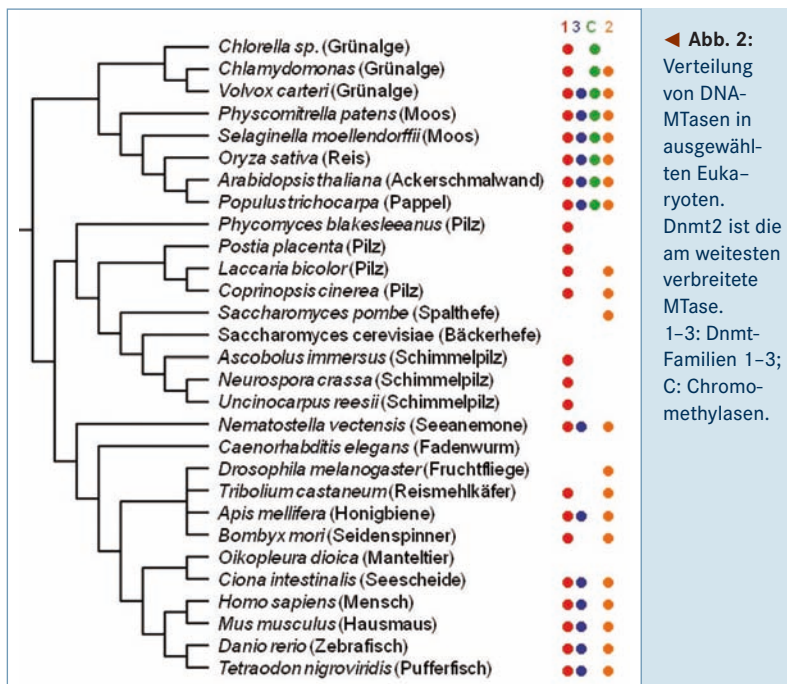
### Die Methylierungsreaktion

Die Übertragung einer Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom an der Position 5 von Cytosinen erfolgt in der Zelle enzymatisch durch 5mC-Methyltransferasen (5mC-MTasen). Als Methylgruppendonor dient der Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) (**Abb. 1A**).

Kennzeichnend für alle bakteriellen und eukaryotischen 5mC-Methyltransferasen sind zehn Motive, die an der Methylierungsreaktion beteiligt sind und von denen sechs hochkonserviert sind (**Abb. 1B** und **3A**). Die Methylierungsreaktion ist durch das Auftreten eines kovalenten Intermediats zwischen Enzym und Nukleinsäure gekennzeichnet. Dieses wird zwischen einer cysteinischen Thiolgruppe des



◀ **Abb. 1:** **A**, Schema zur Methylierung von Cytosin. Die Methyltransferase überträgt die Methylgruppe (rot) vom Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) auf das Ringkohlenstoffatom C5. SAH: S-Adosylhomocystein. **B**, Schematische Darstellung der Domänenanordnung der vier DNA-Methyltransferase-Familien Dnmt1, Dnmt2 und Dnmt3a/b sowie Dnmt3L. NLS: Kern-Lokalisationssignal (*nuclear localization signal*).



Enzyms und dem Pyrimidinring ausgebildet. Das reaktive Cystein befindet sich im Motiv IV des katalytischen Zentrums und ist Teil eines konservierten PC-Dipeptids. Substitutionen des katalytisch aktiven Cytosins führen zum Verlust der Methyltransferase-Aktivität. Motiv I und X bilden die Bindetasche für den Kofaktor SAM. Nach der Addition der Methylgruppe an das C5 wird der Enzym-DNA-Komplex aufgelöst und der Kofaktor S-Adenosylhomocystein (SAH) freigesetzt.

Eine weitere mechanistische Gemeinsamkeit der 5mC-Methyltransferasen ist das *base flipping*, denn für die Reaktion muss das Enzym den Pyrimidinring von beiden Seiten angreifen können. Deshalb lösen MTasen die Wasserstoffbrücken zwischen G und C und klappen das Cytosin aus der Doppelhelix heraus [1].

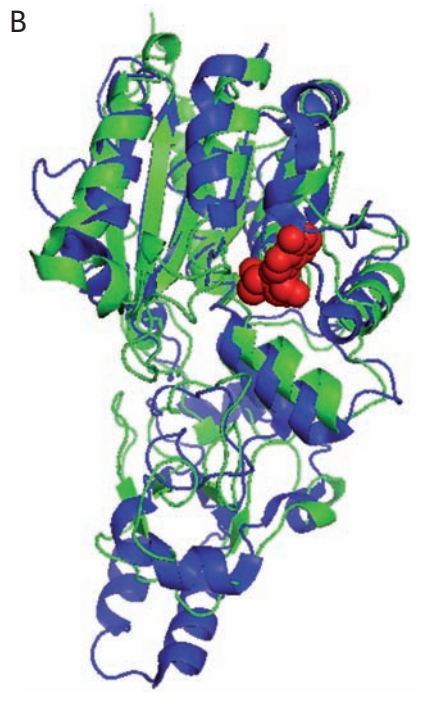
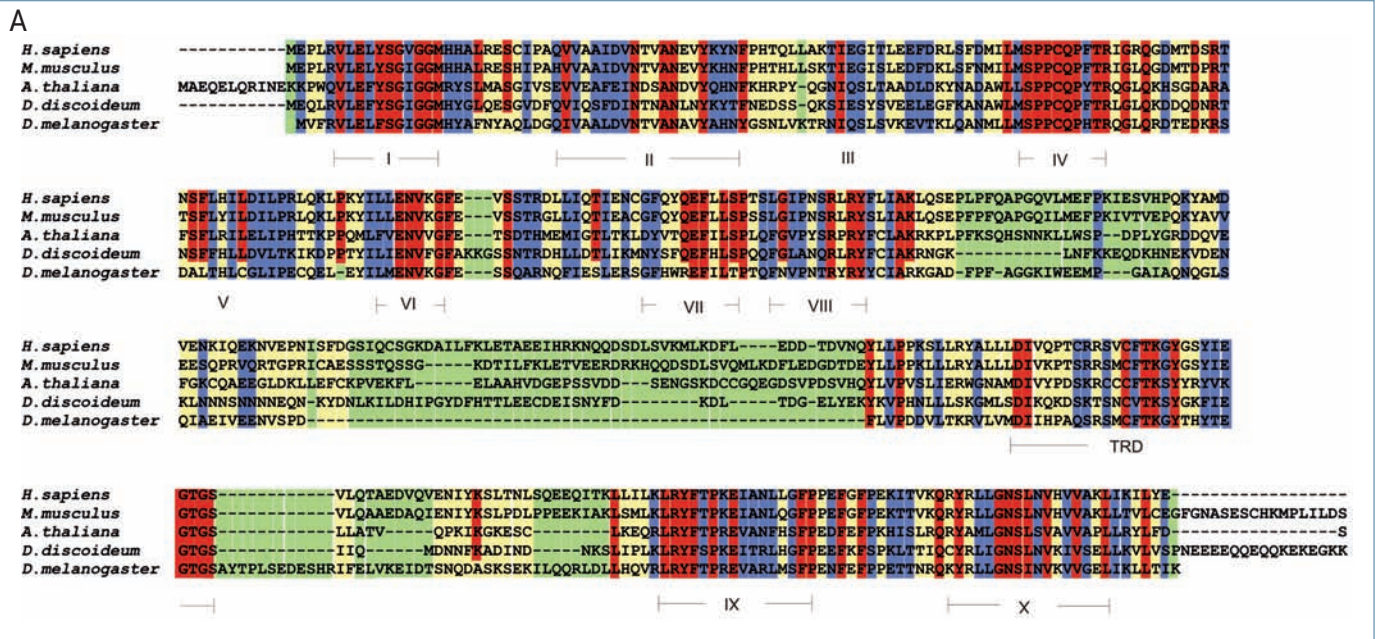
### Die DNA-Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3

In Tieren ist eine Vielzahl von DNA-Methyltransferasen (Dnmts) identifiziert worden, von denen sich die meisten in vier Familien einteilen lassen: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a und b und Dnmt3L (Abb. 1B). In Pflanzen gibt es zusätzlich die Chromomethylasen (CpNpG-Spezifität) und in Pilzen die Dim2-Familie (Methylierung von Cytosinen in asymmetrischer Umgebung) [3].

Interessanterweise ähnelt die MTAse-Domäne der Dnmt1 eher den bakteriellen MTasen der Restriktions-Modifikationssysteme als den C-terminalen Domänen von Dnmt2 und 3. Der N-terminale Teil der katalytischen Domäne von Dnmt3a und b zeigen hingegen hohe Verwandtschaft mit MTasen aus Phagen, die *Bacillus*-Spezies befallen [4].

Die Dnmt1- und Dnmt3-Familien sind durch eine N-terminale Verlängerung gekennzeichnet, die regulatorische Domänen unter anderem zur Substraterkennung, Chromatinbindung, Lokalisation an die Replikationsgabel und Import in den Zellkern enthält. Dnmt1 hat eine große Präferenz für hemimethylierte CpG-Substrate und ist daher in der Zelle hauptsächlich an der Erhaltung von Methylierungsmustern nach der Replikation beteiligt. Knock-out-Mäuse, denen Dnmt1 fehlt, sind nicht lebensfähig.

Dnmt1 kommt in fast allen Organismen vor, in denen 5mC-Methylierung gefunden wurde. Zusätzlich codieren die meisten Organismen mit Dnmt1 für mindestens ein Dnmt3-Homolog (Abb. 2). Rekombinant exprimierte Dnmt3a und b methylieren unmethylierte und hemimethylierte DNA gleichermaßen. Hieraus wurde abgeleitet, dass sie eine Rolle bei der *de novo*-Methylierung spielen. Im Gegensatz zu



▲ **Abb. 3:** A, Alignment von Proteinsequenzen der Dnmt2-Familie verschiedener Organismen. Die zehn MTase-Motive und die Zielerkennungsdomäne (TRD) sind gekennzeichnet. Rot: identische Aminosäuren (AS); blau: ähnliche AS; gelb: nicht konservierte AS; grün: Insertionen/Deletionen. B, Überlagerung der Kristallstrukturen der bakteriellen M.HhaI (grün) und der humanen hDnmt2 (blau). Rot: Kofaktor S-Adenosylhomocystein (SAH).

Methylierungsaktivität, stimuliert jedoch die Aktivität von Dnmt3a/b, mit denen es Heterodimere und -tetramere bildet [5].

**Dnmt2 – ein bifunktionelles Enzym?**

Die Dnmt2-Familie nimmt unter den eukaryotischen MTasen eine Sonderrolle ein, sie zeigt die höchste evolutionäre Konservierung (Abb. 3A), gibt aber bezüglich ihrer biologischen Funktion nach wie vor Rätsel auf. Zunächst wurde vermutet, dass Dnmt2 enzymatisch nicht aktiv sei, da *in vitro*-Experimente kaum detektierbare Methylierungsaktivität zeigten [6]. Als mögliche Erklärung hierfür diente der fehlende N-terminale Teil, der bei Dnmt1 und Dnmt3 unter anderem auch für das Targeting der MTasen an die Nukleinsäure verantwortlich ist (Abb. 1B). Auch Knock-out-Experimente in verschiedenen Organismen zeigten meist nur sehr milde Phänotypen [2, 7].

Dnmt2 kommt in allen Organismen vor, die Dnmt1 und Dnmt3 besitzen. Zusätzlich gibt es einige Organismen, die als DNA-Methyltransferase ausschließlich ein Dnmt2-Homolog beinhalten („Dnmt2-only organisms“). Beispiele hierfür sind *Drosophila*, *Entamoeba* und *Dictyostelium*, die lange als Organismen galten, denen DNA-Methylierung vollständig fehlt. In allen drei konnte mittlerweile jedoch ein geringer Anteil an m5C nachgewiesen werden, der durch Dnmt2 vermittelt wird [7]. DNA-Methylierung wurde vor allem in Retroelementen gefunden [2, 8] und mit deren Aktivität und Chromatinorganisation in Verbindung gebracht. Die DNA-Methylierungs-

aktivität von Dnmt2 *in vivo* und *in vitro* ist jedoch viel geringer als die der anderen DNA-Methyltransferasen [9]. Soweit bisher bekannt ist, tritt bei *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* keine DNA-Methylierung auf und beiden Organismen fehlen DNA-MTasen [10]. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Dnmt2-Homologen fällt eine hohe Konservierung von 35 bis 50 Prozent auf (Abb. 3A).

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur humaner Dnmt2 zeigt sich eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur bakteriellen Methyltransferase M.HhaI (Abb. 3B, [6]). Die Struktur kann in drei Bereiche unterteilt werden: die große Domäne, die das aktive Zentrum sowie die SAM-Bindetasche beinhaltet, die kleine Domäne und die variable *hinge*-Region. Üblicherweise beinhalten m5C-MTasen eine TRD (*target recognition domain*) zwischen den konservierten Motiven VIII und IX. Die TRDs sind, abgesehen von einem konservierten TL-Dipeptid, sehr variabel und bestimmen die Substratspezifität der Enzyme [6].

Im Bereich der TRD ist in Dnmt2-Homologen ein CFT-Motiv (CFTXXYXXY) zu finden, das in keiner der anderen DNA-MTasen vorkommt. Das zweite Tyrosin aus dem Motiv liegt im Vergleich mit der M.HhaI-Struktur in dem Bereich, in dem das Enzym den *nontarget*-Strang doppelsträngiger DNA binden müsste und führt so möglicherweise zu einer sterischen Hinderung. Im M.HhaI liegt dort ein Glycin, das durch keinen anderen Aminosäurerest ersetzt werden kann [6]. Das CFT-Motiv könnte deshalb erklären, warum oft

Dnmt1 zeigen die Dnmt3-Homologe keine so stark ausgeprägte CpG-Spezifität.

Dnmt3L hat aufgrund von Mutationen in der konservierten MTase-Domäne keine DNA-

keine oder eine nur sehr geringe Methylierungsaktivität auf dsDNA mit Dnmt2 gefunden wurde.

Eine überraschende Entdeckung war die Methylierungsaktivität humaner Dnmt2 auf tRNA<sup>ASP</sup> an Position C38 [10]. Diese Aktivität überstieg die bisher berichtete DNA-Methylierungsaktivität um mehrere Größenordnungen. Dnmt2 zeigt jedoch keine Homologie zu anderen m5C-RNA-MTasen und eine Mutagenesestudie zeigte, dass das Enzym den Mechanismus der DNA-Methylierung zur Methylierung der tRNA<sup>ASP</sup> benutzt und nicht den RNA-Methylierungsmechanismus, an dem andere Aminosäuremotive beteiligt sind [11]. Auch bei Dnmt2-Homologen aus anderen Organismen (z. B. *Dictyostelium*) konnte eine tRNA<sup>ASP</sup>-Methylierungsaktivität nachgewiesen werden. Mittlerweile sind in *Drosophila* und *Dictyostelium* weitere tRNA-Substrate identifiziert worden (unveröffentlichte Daten).

Es wird vermutet, dass eine Koevolution zwischen dem Anticodonloop der tRNA<sup>ASP</sup> und Dnmt2 stattgefunden hat [10], denn dieser ist in Organismen mit Dnmt2 ebenfalls hochkonserviert, hingegen zeigen Organismen ohne Dnmt2 eine größere Variabilität. Zwei Spezies des Bakteriums *Geobacter* beinhalten

ein Dnmt2-Homolog und zeigen ebenfalls eine starke Konservierung des Anticodonloops der tRNA<sup>ASP</sup> [12].

Obwohl die Beteiligung der Dnmt2 an der epigenetischen Regulation von Retroelementen inzwischen unumstritten ist, werden die biochemischen Mechanismen nach wie vor kontrovers diskutiert. Ebenso bleibt die Frage offen, ob es sich bei Dnmt2 um eine Ableitung bakterieller DNA-MTasen handelt, die ihr (Haupt-)Substrat von DNA zu RNA verändert hat. ■

## Literatur

- [1] Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem* 3:274–293
- [2] Kuhlmann M, Borisova BE, Kaller M et al. (2005) Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res* 33:6405–6417
- [3] Jeltsch A (2010) Molecular biology. Phylogeny of methylomes. *Science* 328:837–838
- [4] Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395–2402
- [5] Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X et al. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449:248–251
- [6] Dong A, Yoder JA, Zhang X et al. (2001) Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 29:439–448

- [7] Schaefer M, Lyko F (2009) Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma* 119:35–40
- [8] Phalke S, Nickel O, Walluscheck D et al. (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet* 41:696–702
- [9] Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278:31717–31721
- [10] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA et al. (2006) Methylation of tRNA<sup>ASP</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311:395–398
- [11] Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S et al. (2008) Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA* 14:1663–1670
- [12] Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481–514

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Wolfgang Nellen  
Abteilung Genetik  
Universität Kassel  
Heinrich-Plett-Straße 40  
D-34132 Kassel  
Tel.: 0561-8044805  
Fax: 0561-804-4800  
nellen@uni-kassel.de  
www.biologie.uni-kassel.de/genetics

## AUTOREN



### Sara Müller

Jahrgang 1983. 2002–2003 Studium der Biotechnologie, RWTH Aachen. 2003–2008 Studium der Fächer Biologie und Chemie, Lehramt, Universität Kassel. Seit 2008 Doktorandin in der Abteilung Genetik, Universität Kassel.



### Albert Jeltsch

Jahrgang 1966. 1986–1991 Studium der Biochemie, Universität Hannover. 1994 Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover. 1999 Habilitation für die Fächer Biochemie und Biophysikalische Chemie am Fachbereich Biologie der Universität Gießen. 1998–2003 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Biochemie, Universität Gießen. Seit 2003 Professor für Biochemie an der Jacobs University Bremen.



### Wolfgang Nellen

Jahrgang 1949. 1970–1975 Studium der Biologie, Universität Düsseldorf; 1980 Promotion. 1980–1982 Postdoc an der Universität Marburg. 1982–1986 Postdoc an der University of California, San Diego. 1986–1993 Leiter einer unabhängigen Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 1989 Habilitation an der LMU München für das Fach Zoologie. Seit 1995 Professor für Genetik an der Universität Kassel.