

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Epigenetische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Implikationen für die Reproduktionsmedizin

Haaf T

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2006; 3 (3), 136-140

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Epigenetische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Implikationen für die Reproduktionsmedizin

T. Haaf

Reversible epigenetische Modifikationen der genomischen DNA-Sequenz, insbesondere die Methylierung von CpG-Dinukleotiden, ist wichtig für die zeitlich, örtlich und elterspezifisch koordinierte Expression unserer Gene. Epigenetische Phänomene sind Grundlage der Entwicklung. Fehlerhafte DNA-Modifikationen (Epimutationen) spielen wahrscheinlich nicht nur bei der Entstehung von Krebs, sondern auch bei vielen anderen Krankheiten eine Rolle. In somatischen Zellen werden die einmal etablierten Methylierungsmuster, die zusammen genommen das Epigenom der Zelle bilden, bei jeder Teilung an die Tochterzellen weitervererbt. Dagegen werden in den primordialen Keimzellen die ererbten Methylierungsmuster komplett ausgelöscht. Anschließend wird ein für die männliche bzw. weibliche Keimbahn spezifisches Epigenom programmiert, das die individuellen väterlichen und mütterlichen Interessen bezüglich der Entwicklung der Nachkommen in der nächsten Generation durchsetzen soll. Um die sehr unterschiedlichen epigenetischen Ausgangspositionen von Ei- und Samenzelle für die somatische Entwicklung aneinander anzugleichen, findet nach der Befruchtung eine elterspezifische Reprogrammierung der beiden Keimbahngenome in ein neues diploides somatisches Genom statt. Diese genomweite Reprogrammierung ist für die Wiederherstellung der Totipotenz erforderlich. Im frühen Embryo werden die meisten Keimbahnmuster wieder ausgelöscht und identische somatische Methylierungsmuster auf beiden elterlichen Allelen erzeugt. Nur relativ wenigen geprägten Genen gelingt es, ihre Keimbahnmuster und elterspezifische Aktivität beizubehalten. Stochastische, durch Umwelt- oder elterliche Faktoren bedingte Störungen der Methylierungsreprogrammierung sind eine wichtige Ursache für den Verlust von Embryonen und Entwicklungsstörungen. Häufigkeit und Schwere der epigenetischen Defekte nehmen zumindest im Tierexperiment zu, wenn man mit assistierten Reproduktionstechniken in die Entwicklung von Gameten und frühen Embryonen eingreift oder bei der Embryoklonierung die Keimbahn komplett umgeht. Ein besseres Verständnis der Reproduktionsepigenetik ist sowohl für eine Therapie von infertilen Paaren, als auch für die Herstellung menschlicher embryonaler Stammzell-Linien für die Zellersatztherapie wichtig.

Schlüsselwörter: Assistierte Reproduktion, DNA-Methylierung, Epigenetik, Genomreprogrammierung, Imprinting, Präimplantationsphase, Schwangerschaftsverlust

Epigenetic Genome Reprogramming in the Germ Line and in the Early Embryo: Implications for Reproductive Medicine. Reversible epigenetic modifications of the genomic DNA sequence, in particular methylation of CpG dinucleotides are important for the temporally, spatially, and parent-specifically coordinated expression of our genes. Epigenetic phenomena regulate development. Aberrant DNA modifications (epimutations) may not only contribute to the development of cancer, but to many other diseases. The methylation patterns in somatic cells, which once established all together represent the epigenome of the cell, are stably inherited through cell divisions to daughter cells. In contrast, the methylation patterns in primordial germ cells are completely erased. Then a male or female germline-specific epigenome is programmed in order to control the individual paternal versus maternal interests regarding development of the offspring in the next generation. To adjust the very different epigenetic bases of sperm and egg to somatic development, parent-specific reprogramming of the two germ line genomes into a diploid somatic genome occurs after fertilisation. This genome-wide epigenetic reprogramming is essential for re-establishing totipotency. Most germ line patterns are erased again in the early embryo and equivalent somatic methylation patterns are established on both parental alleles. Only relatively few imprinted genes succeed in maintaining their germ line patterns and parent-specific activity. Stochastic or by environmental and parental factors induced disturbances of methylation reprogramming are an important cause for embryo loss and developmental defects. At least in animal experiments the frequency and severity of epigenetic defects increase after interfering with development of gametes and early embryos by assisted reproductive technologies or when completely bypassing the germ line by embryo cloning. A better understanding of reproductive epigenetics is crucial for improving human infertility treatment and the generation of human embryonal stem cell lines for cell replacement therapy. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2006; 3 (3): 136–40.**

Key words: assisted reproduction, DNA methylation, epigenetics, genome reprogramming, imprinting, preimplantation period, pregnancy loss

Sowohl die Entwicklung des menschlichen Organismus als auch die spezialisierten Funktionen von differenzierten Zellen werden durch 25.000 bis 30.000 Gene gesteuert. Zwar ist jede Zelle mit demselben Genom (Summe aller DNA-Sequenzen) ausgestattet, aber in einem bestimmten Zelltyp ist zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung nur ein spezifisches Subset der vorhandenen Gene aktiv. Die Auswahl der Gene, die in einer Zelle an- bzw. abgeschaltet sind, wird durch Methylierung der DNA und Modifikationen des Chromatins (durch Proteine funktionell verpackte DNA) gesteuert. Transkriptionell aktive Gene sind in der Regel unmethyliert und durch acetylierte Histone verpackt. Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der genomischen DNA-Sequenz (Abb. 1) führt zur Bindung einer Klasse von Protei-

nen mit Methylzytosin-Bindedomäne, die mit Histondeacetylase- und Chromatinremodellierungskomplexen assoziieren. Diese Komplexe verändern die Chromatinstruktur so, daß keine transkriptionelle Aktivität mehr stattfinden kann [1, 2]. Ähnlich der Paßwort-Kodierung von Datenbanken in einem Computer kann die Zelle nicht alle in ihrem Genom vorhandenen Informationen (Gene) nutzen, sondern nur solche, die nicht durch ein Paßwort (Methylierung) vor Zugriff geschützt sind.

Die im Entwicklungsprozeß einer somatischen Zelle gesetzten DNA-Methylierungsmuster sind in der Regel stabil und können über viele Zellteilungen weitervererbt werden (Abb. 1B). Deshalb bildet eine Leberzelle bei Teilung neue Leberzellen und eine Darmzelle neue Darmzellen. Bei Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen müssen die Zugriffsrechte auf genetische Informationen jedoch geändert werden, d. h. durch Demethylierung werden nun benötigte Gene wieder lesbar gemacht, durch Methylierung werden nicht mehr benötigte Gene stillgelegt. Diese Informationsebene oberhalb der eigentlichen Gene bezeichnet man als „Epigenetik“. DNA-

Eingegangen: 06.04.2006; akzeptiert nach Revision: 08.05.2006

Aus dem Institut für Humangenetik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. med. Thomas Haaf, Institut für Humangenetik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, D-55131 Mainz, Langenbeckstraße 1, Bau 601; E-Mail: haaf@humgen.klinik.uni-mainz.de

Methylierungsmuster sind vererbare Veränderungen des genetischen Informationsgehaltes, die ihre Grundlage in reversiblen Modifikationen der Erbinformation haben, aber keine konstanten Veränderungen der Basenabfolge in der DNA-Sequenz darstellen. Die Paßwort-Kodierung läßt sich im Gegensatz zu irreversiblen Mutationen wieder aufheben. In der Entwicklung des Menschen und anderer Säugetiere gibt es zwei kritische Phasen, in denen nicht nur einzelne Paßwörter geändert, sondern die Zugriffsrechte auf den gesamten genetischen Text (Genom) neu verteilt werden. In der Keimbahn und im frühen Embryo unmittelbar nach der Befruchtung finden genomweite epigenetische Reprogrammierungsvorgänge statt. Dabei werden durch Demethylierung nahezu alle ererbten Modifikationen beseitigt und anschließend neue Methylierungsmuster gesetzt.

Genomische Prägung („Imprinting“): Was Gregor Mendel noch nicht wissen konnte

Bevor die primordialen Keimzellen (etwa am Ende der 5. Schwangerschaftswoche) in die Urogenaden einwandern und die männliche bzw. weibliche fetale Keimzell-differenzierung beginnt, werden die großelterlichen (in bezug auf den Embryo) Methylierungsmuster in der genomischen DNA-Sequenz komplett ausgelöscht. Dies ist wahrscheinlich der einzige Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem beide Allele eines jeden Gens vollkommen äquivalent sind. Während der fetalen und postnatalen Keimzellentwicklung werden dann neue elternspezifische Modifikationen gemäß dem Geschlecht der Keimbahn gesetzt [3]. Aufgrund der unterschiedlichen genomischen Prägung („Imprinting“) in der väterlichen bzw. mütterlichen Keimbahn sind die beiden elterlichen Genome, die in der befruchteten Eizelle zusammenkommen, funktionell nicht gleichwertig. Vorkerntransferexperimente haben bereits in den 1980er Jahren gezeigt, daß für die Entwicklung von Säugetieren (im Gegensatz zu niederen

Vertebraten) sowohl ein väterliches als auch ein mütterliches Genom benötigt wird [4]. Die Geschlechterkonflikt-hypothese [5] erklärt die Evolution von Imprintingmechanismen bei Säugetieren mit unterschiedlichen elterlichen Interessen bezüglich der Bereitstellung von maternalen Ressourcen für das neue Individuum. Das epigenetische Programm des Vaters fördert die Entstehung größerer Nachkommen (auf Kosten der Mutter), während das mütterliche Epigenom das embryonale Wachstum eher einschränkt, um auch weitere Schwangerschaften (eventuell mit anderen Vätern) zu ermöglichen.

Nach der Befruchtung müssen die beiden unterschiedlich geprägten Genome von Samen- und Eizelle, die im übertragenen Sinne die „egoistischen“ väterlichen bzw. mütterlichen Interessen regulieren, in ein diploides somatisches Genom für den neuen Organismus reprogrammiert werden. Im frühen Embryo findet gewissermaßen ein „Geschlechterkampf“ auf genomischer Ebene statt, um die unterschiedlichen elterlichen Ausgangspositionen aneinander anzugleichen [6]. Im Laufe dieses Prozesses, der für die Herstellung der Totipotenz der embryonalen Zellen wichtig ist, werden die meisten keimbahn-spezifischen Modifikationen wieder ausgelöscht. Bei der Genomreprogrammierung im Präimplantations-embryo werden für die meisten (> 99 %) Gene identische epigenetische Modifikationen beider elterlichen Allele etabliert (Abb. 2). Die für die embryonale Entwicklung essentiellen „Pluripotenzgene“ und die in jeder Zelle aktiven „House-keeping“-Gene bleiben demethyliert und können transkribiert werden; alle Gene, die nicht in die frühe Entwicklung involviert sind, werden durch Remethylierung inaktiviert. Nur sehr wenige, schätzungsweise 100–200 Gene sind durch einen unbekanntenen Mechanismus vor der genomweiten Reprogrammierung in der Präimplantationsphase geschützt. Diese geprägten („imprinted“) Gene behalten während der gesamten Entwicklung ihre aus der Keimbahn ererbten epigenetischen Modifikationen und elternspezifischen Aktivitäten bei [7, 8]. Geprägte Gene sichern einen individuellen mütterlichen bzw. väterlichen epigenetischen Beitrag für die Entwicklung der Nachkommen.

Methylierungsreprogrammierung der elterlichen Genome im frühen Embryo

Da die Eizelle nicht nur das mütterliche Genom, sondern auch die zelluläre und molekulare Maschinerie für die frühe Entwicklung liefert, läuft die Genomreprogrammierung nahezu vollständig unter maternaler Kontrolle ab. Die globale Demethylierung der Keimbahngenome und die Asymmetrie der beiden elterlichen Genome in der befruchteten Eizelle können durch eine relativ einfache Methylzytosinfärbung mit spezifischen Antikörpern direkt sichtbar gemacht werden [9, 10]. Väterliches und mütterliches Genom bilden in der befruchteten Eizelle zunächst zwei separate Vorkerne aus. Beide Keimbahngenome weisen einen hohen Methylierungsgrad auf, unterscheiden sich aber auf DNA-Sequenzebene in den spezifischen Methylierungsmustern. Bei den meisten bisher analysierten Säugetierspezies (Maus, Ratte, Rind, Schwein und Mensch) wird der väterliche Vorkern innerhalb weniger Stunden nach Befruchtung noch vor der ersten DNA-Replikation aktiv demethyliert (Abb. 1B und 3A). Obwohl der mütterliche Vorkern im selben Zytoplasma vorliegt, ist das mütterliche Genom vor der (bisher unbekanntenen) Demethylierungsaktivität geschützt.

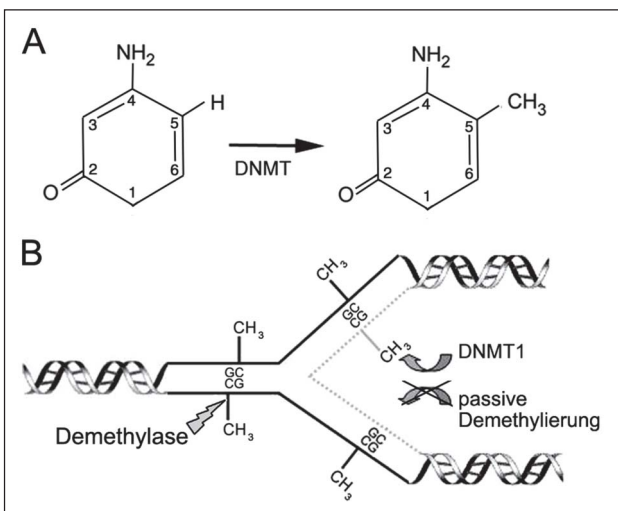


Abbildung 1: **A)** DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren den Transfer einer Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom 5 im Zytosinring. **B)** Bei der aktiven Demethylierung werden die Methylgruppen durch eine bisher unbekanntene Enzymaktivität von der nichtreplizierenden DNA entfernt. Bei der DNA-Replikation entstehen hemimethylierte DNA-Moleküle, die zunächst nur im parentalen Strang methyliert sind. DNMT1 heftet neue Methylgruppen an die neusynthetisierte DNA an. In Abwesenheit von DNMT1 bleibt der neusynthetisierte DNA-Strang unmethyliert (passive Demethylierung).

Wie die befruchtete Eizelle väterliches und mütterliches Genom unterscheidet, ist unklar. Wahrscheinlich spielen „Spermienfaktoren“ eine wichtige Rolle. Das durch Protamine verpackte Spermienchromatin muß vor Ausbildung des väterlichen Vorkerns dekondensiert werden [11]. Während des Protamin-Histon-Austausches bietet die väterliche DNA eine ideale Angriffsfläche für die maternale Demethylierungsaktivität. Auch nach der nukleosomalen Verpackung der väterlichen DNA unterscheiden sich väterliches und mütterliches Chromatin durch modifizierte Histone. Das väterliche zygotische Genom zeigt eine transiente Hyperacetylierung von Histon H4 [12], während das mütterliche Genom mit dem methylierten Histon H3 assoziiert ist [13].

Die Methylierung der mütterlichen DNA-Sequenzen bleibt von der Eizelle bis zum Zweizellstadium erhalten. Auch nach Auflösung der Vorkernmembranen im späten Einzelzellembryo und der ersten mitotischen Teilung bleiben die beiden elterlichen Genome räumlich getrennt [14]. Die resultierende Genomasymmetrie im frühen Embryo kann als zytologischer Ausdruck des Geschlechterkonfliktes nach der Befruchtung interpretiert werden. Die Kerne von Maus-Zweizellembryonen zeigen eine noch vollständig methylierte mütterliche und eine komplett demethylierte väterliche Kernhälfte (Abb. 3B). Das mütterliche Genom wird erst ab dem Zweizellstadium graduell durch einen replikationsabhängigen Mechanismus demethyliert (Abb. 3A). Methylzytosin kann nicht direkt in die replizierende DNA eingebaut werden, sondern entsteht durch postreplikative Modifikation von Zytosin (Abb. 1A). Die Vererbung von Methylierungsmustern erfolgt durch DNA-Methyltransferase I (DNMT1), die methylierte CpGs im parentalen DNA-Strang erkennt und an die komplementären Stellen im neusynthetisierten Strang wieder Methylgruppen anheftet (Abb. 1B). Da die Oozyten-spezifische Isoform von DNMT1 im frühen Embryo nicht aktiv ist [15], geht mit jeder DNA-Replikation und Zellteilung die Hälfte der Methylgruppen auf den mütterlichen Chromosomen „passiv“ verloren.

Eine Präimplantationsdiagnostik ist in Deutschland nicht möglich, weil die befruchtete entwicklungsfähige mensch-

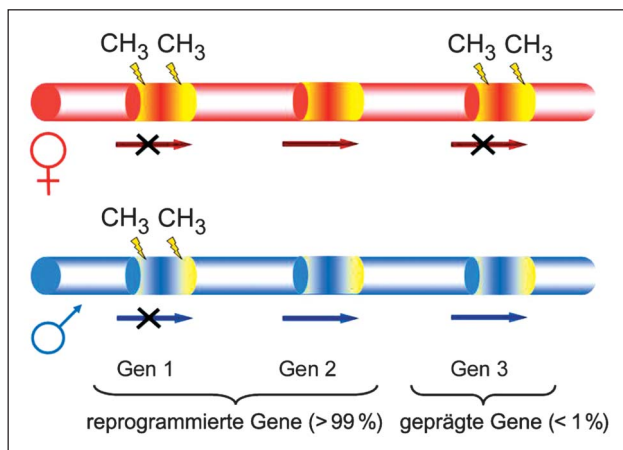


Abbildung 2: Reprogrammierte und geprägte Gene. Homologe mütterliche und väterliche DNA-Sequenzen im diploiden somatischen Genom sind als rote bzw. blaue Linie dargestellt. Die Gene 1 und 2 sind im frühen Embryo reprogrammiert worden und zeigen identische DNA-Modifikationen auf beiden elterlichen Chromosomen. Gen 1 ist durch Methylierung stillgelegt; Gen 2 ist demethyliert und transkriptionell aktiv. Das geprägte Gen 3 wurde nicht reprogrammiert und zeigt elternspezifische DNA-Methylierung und Aktivität.

liche Eizelle bereits ab dem Zeitpunkt der Kernverschmelzung als Embryo im Sinne des Embryonenschutzgesetzes gilt [16]. Der Gesetzgeber hat dabei nicht bedacht, daß das neue diploide somatische Genom nicht einfach mit Auflösung der Vorkernmembranen durch Verschmelzung von Eizell- und Samenzellgenom entsteht, sondern daß die Fähigkeit der embryonalen Zellen zur somatischen Entwicklung erst durch einen dramatischen Reprogrammierungsprozeß in der Präimplantationsphase hergestellt wird. Die Beseitigung der keimbahn-spezifischen epigenetischen Modifikationen ist beim Rind im 8- bis 16-Zellstadium, bei der Maus sogar erst in der Morula abgeschlossen [7]. Nur die wenigen keimbahn-spezifischen Methylierungsmuster von geprägten Genen bleiben nach aktiver und passiver Demethylierung erhalten (Abb. 2). Im Blastozystenstadium der Maus (beim Rind bereits etwas früher) findet dann eine genomweite Remethylierung statt (Abb. 3A), welche auf väterlichen und mütterlichen Chromosomen identische somatische Methy-

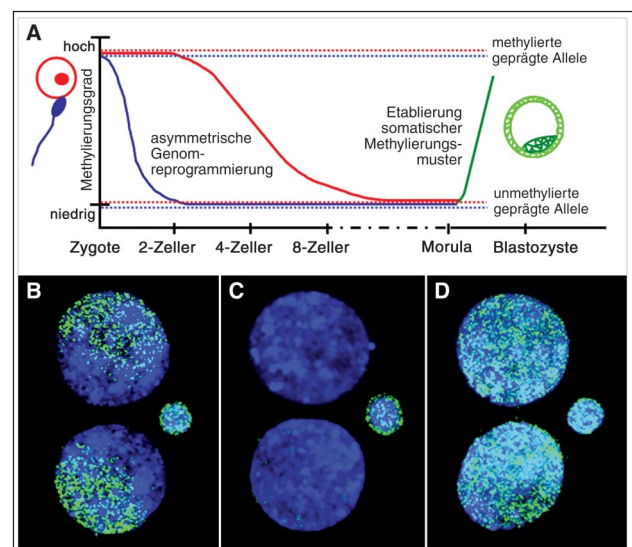


Abbildung 3: A) Schematische Darstellung der genomweiten Demethylierung und Remethylierung im frühen Mausembryo. Die Keimzellen, die bei der Befruchtung zusammenkommen, weisen unterschiedliche (rote und blaue) Methylierungsmuster in ihren genomischen DNA-Sequenzen auf. Das aus dem Spermium kommende väterliche Genom (blau) wird bereits unmittelbar nach der Befruchtung in der befruchteten Eizelle aktiv demethyliert. Das mütterliche Genom (rot) wird erst ab dem Zweizellstadium durch einen replikationsabhängigen Mechanismus demethyliert, wobei mit jeder DNA-Verdoppelung und Zellteilung die Hälfte der Methylierung in den mütterlichen DNA-Sequenzen verloren geht. Diese elternspezifische Demethylierung bedingt im frühen Embryo eine Genomasymmetrie. Im Morulastadium (der Maus) sind dann beide elterlichen Genome relativ gleichmäßig demethyliert und es werden neue somatische Methylierungsmuster (grün) gesetzt, die bis auf wenige Ausnahmen in beiden elterlichen Allelen identisch sind. Nach dieser Genomreprogrammierung sind die Keimbahnunterschiede zwischen väterlichen und mütterlichen DNA-Sequenzen weitgehend ausgelöscht und nur die wenigen geprägten Gene (gepunktete Linien) behalten ihre differentiellen Keimbahnmethylierungsmuster bei.

B–D) Durch Immunfluoreszenzfärbung (mit einem FITC-konjugierten grünfluoreszierenden Anti-Methylzytosinantikörper) können normale und pathologische Methylierungsreprogrammierung im frühen Mausembryo direkt sichtbar gemacht werden. Die Kern-DNA ist mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Kerne eines normalen Zweizellembryos (B) zeigen eine bereits demethylierte väterliche und eine noch voll methylierte mütterliche Kernhälfte (Genomasymmetrie). Der noch nicht degradierte zweite Polkörper weist ebenfalls einen hohen Methylierungsgrad auf. Störungen des Reprogrammierungsprozesses können dazu führen, daß beide elterlichen Genome vorzeitig demethyliert werden (C) oder die Demethylierung vollständig ausbleibt (D). Embryonen mit ausschließlich männlichen (androgenetischen) oder ausschließlich weiblichen (gynogenetischen) Methylierungsmustern arretieren bereits in der Präimplantationsphase die Entwicklung.

lierungsmuster erzeugt. Erst ab diesem Zeitpunkt, der etwa mit der Implantation zusammenfällt, kann man eigentlich vom somatischen Genom des neuen Organismus sprechen.

Reprogrammierungsdefekte als Ursache für Embryoverlust und Entwicklungsstörungen

Die beiden elterlichen Genome werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Befruchtung und durch unterschiedliche Mechanismen für eine somatische Entwicklung reprogrammiert. Störungen dieses hochkoordinierten Prozesses, die spontan vorkommen können, aber auch von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren abhängen, sind eine wichtige Ursache für die hohe Verlustrate von Embryonen in der Präimplantationsphase. Untersuchungen am Modellorganismus Maus haben gezeigt, daß die Superovulation mit Gonadotropinen, die ein integraler Bestandteil von assistierten Reproduktionstechniken (ART) ist, das Entwicklungspotential von Eizelle und Embryo verringert [17]. Superovulierte Mausweibchen produzieren etwa doppelt so viele (14–20 %) Embryonen mit abnormalen elternspezifischen Methylierungsmustern wie nichtsuperovulierte Weibchen (5–10 %). Embryonen, die aufgrund einer aktiven zygotischen Demethylierung des mütterlichen Genoms (Abb. 3C) oder einer ausbleibenden Demethylierung des väterlichen Genoms (Abb. 3D) keine Genomasymmetrie zeigen, werden bereits in der Präimplantationsphase im Wachstum arretiert [18]. Suboptimale Kulturbedingungen von in vitro fertilisierten Mausembryonen interferieren mit der Methylierungsreprogrammierung und erhöhen die Embryoverlustrate. Dasselbe gilt für toxische Abbauprodukte, z. B. von Alkohol, im Kulturmedium. Die Präimplantationsentwicklung ist eine äußerst sensitive Phase für die Entstehung von epigenetischen Defekten, weil das Epigenom zu diesem Entwicklungszeitpunkt extrem dynamisch und der frühe Embryo vor allem bei ART schlecht vor der Umwelt geschützt ist.

Die epigenetische Genomreprogrammierung nach der Befruchtung wird aber nicht nur von externen, sondern auch von genetischen Faktoren beeinflusst. Mausstämme mit verschiedenem genetischem Hintergrund zeigen vor allem unter suboptimalen Embryokulturbedingungen sehr unterschiedliche Embryoverlustraten. Außerdem gibt es bei der Methylierungsreprogrammierung sehr große Speziesunterschiede. Die Demethylierungsaktivität in Mauseizellen scheint größer zu sein als die in menschlichen oder Rindereizellen [19]. Einige Spezies, wie z. B. Schaf und Kaninchen, zeigen zumindest auf zytologischer Ebene überhaupt keine detektierbare Demethylierung des väterlichen Vorkerns [20, 21]. Spezies mit aktiven Demethylierungsmechanismen zeichnen sich durch eine frühe Aktivierung des embryonalen Genoms aus, das bei der Maus bereits im Zweizellstadium, beim Kaninchen dagegen erst ab dem 8- bis 16-Zellstadium transkribiert wird.

Subtile Reprogrammierungsstörungen, die nicht das gesamte Genom betreffen, sondern nur einzelne Gene, führen nicht notwendigerweise zum Embryoverlust, sondern bedingen, je nachdem, zu welchem Entwicklungszeitpunkt und in welchen Geweben die fehlerhaft programmierten Gene aktiv sind, Entwicklungsstörungen und abnormale Phänotypen. Es gibt Hinweise, daß Epimutationen, die zum Verlust der epigenetischen Regulation von Genen führen, mehrfach häufiger auftreten als somatische Mutationen [22]. Weil Epimutationen technisch schwieriger nachzuweisen sind als Veränderungen in der

Basenabfolge der DNA-Sequenz (klassische Mutationen), stellen sie wahrscheinlich eine bisher stark unterschätzte Ursache für die Entstehung von Krankheiten dar. In verschiedenen Säugetierspezies (Maus, Schaf und Rind) wurde eindrucksvoll gezeigt, daß Isolation, Manipulation und/oder Kultur von Keimzellen und frühen Embryonen mit den Methylierungsmustern und der Regulation von geprägten Genen interferieren [23, 24]. Epimutationen werden für das „Large-offspring“-Syndrom [25] und andere phänotypische Auffälligkeiten bei in vitro produzierten Lämmern und Kälbern verantwortlich gemacht.

Kinder, die durch In-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugt wurden, haben zwei- bis dreimal häufiger als erwartet ein niedriges Geburtsgewicht [26]; die Rate von angeborenen Fehlbildungen ist leicht (1,3- bis 1,4fach) erhöht [27]. Die Prävalenz von Imprintingstörungen, die das Beckwith-Wiedemann- [28] und das Angelmann-Syndrom [29] verursachen, ist drei- bis sechsfach erhöht, wobei das absolute Risiko wegen der Seltenheit dieser Erkrankungen gering bleibt. Der zugrundeliegende epigenetische Defekt scheint eine abnormale Hypomethylierung von normalerweise methylierten mütterlichen Allelen zu sein [30]. Trotz der weitverbreiteten Anwendung von ART beim Menschen werden die Ursachen der assoziierten Entwicklungsstörungen und die Frage, ob ICSI ein höheres Risiko beinhaltet als IVF, kontrovers diskutiert. Ungünstige elterliche Faktoren bei IVF/ICSI-Paaren sind eine wahrscheinliche Erklärung für genetische und epigenetische Risiken. Andererseits greift ART in äußerst sensitive Perioden der Keimzellreifung und frühen Embryogenese ein. In Analogie zum Tiermodell kann man davon ausgehen, daß ART auch beim Menschen Epimutationen induziert.

Bei der Klonierung von Säugerembryonen durch den Transfer von somatischen Zellkernen in Eizellen werden Gametogenese und frühe Embryogenese komplett umgangen. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, daß die epigenetischen Defekte bei klonierten Säugerembryonen sehr viel gravierender und häufiger sind als bei Anwendung von ART oder natürlicher Reproduktion. Die Klonierungseffizienz ist abhängig von der Spezies (am höchsten beim Rind), was wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Reprogrammierungskapazitäten der Eizellen zusammenhängt; sie ist aber generell niedrig. Die Erforschung der technischen und medizinischen Probleme bei der Embryoklonierung hat eine neue Ära der Reproduktionsepigenetik eingeleitet und unser Wissen über die zellulären und molekularen Vorgänge unmittelbar nach der Befruchtung erheblich erweitert [31, 32]. Klonierte Rinderembryonen zeigen eine inkomplette und verzögerte Methylierungsreprogrammierung des diploiden Spendergenoms durch die Eizelle [10], die in einem Gemisch von normal und abnormal methylierten Sequenzen resultiert. Chipbasierte Expressionsanalysen von neugeborenen klonierten Mäusen ergaben mindestens 4 % abnormale Genexpressionsmuster [33]. Über 95 % von klonierten Mausblastozysten wiesen Störungen der allelspezifischen Methylierung und Expressionsmuster von geprägten Genen auf [34]. Zwar kann die Eizelle die Totipotenz in einem transplantierten somatischen Zellkern wiederherstellen, aber die korrekte Reprogrammierung des gesamten Epigenoms scheint nicht möglich zu sein. Stochastisch im Genom auftretende Reprogrammierungsdefekte sind für die extrem hohe Schwangerschaftsverlustrate und die medizinischen Probleme von klonierten Tieren verantwortlich.

Transgenerationale epigenetische Effekte

Tierexperimente und epidemiologische Studien beim Menschen haben gezeigt, daß die Exposition des Feten *in utero* gegenüber bestimmten Umweltfaktoren, z. B. Diät der Mutter [35, 36], Streß [37] oder Toxine [38], nicht nur die Entwicklung und Gesundheit der nächsten Generation, sondern auch der darauffolgenden Generationen beeinflussen. Ernährung und Verhalten (z. B. Zigarettenrauchen) von präpubertären Knaben haben Auswirkungen auf den Phänotyp von Söhnen und männlichen Enkeln, während in der Pubertät keine transgenerationalen Effekte beobachtet wurden [39]. Die wahrscheinlichste Erklärung für solche transgenerationalen Phänomene ist, daß externe Faktoren epigenetische Veränderungen in der Keimbahn induzieren, die dann Auswirkungen auf die Gesundheit nachfolgender Generationen haben. Die Beobachtung, daß manche transgenerationalen Effekte vom Geschlecht abhängen [38, 39], läßt sich durch den unterschiedlichen Ablauf von weiblicher und männlicher Keimzellreifung erklären. Daß Epimutationen eine wichtige Ursache für die Entstehung von Krebs sind, ist seit langem bekannt [40]. Verbesserte technische Möglichkeiten zum Nachweis von aberranten DNA-Methylierungsmustern werden in Zukunft wahrscheinlich auch die Bedeutung von epigenetischen Veränderungen und Gen-Umwelt-Interaktionen für zahlreiche andere Volkskrankheiten zeigen.

Literatur:

1. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481–6.
2. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33: 245–54.
3. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L. Epigenetics and the germ line. *Reproduction* 2005; 129: 137–49.
4. Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308: 548–50.
5. Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 1991; 7: 45–9.
6. Haaf T. The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo. *Chromosome Res* 2001; 9: 263–71.
7. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089–93.
8. Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 2002; 79: 530–8.
9. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403: 501–2.
10. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13734–8.
11. Perreault SD. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutat Res* 1992; 296: 43–55.
12. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002; 241: 172–82.
13. Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R, Gilbert DM, Shi W, Fundele R, Morrison H, Jeppesen P, Singh P. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 2002; 111: 22–36.
14. Mayer W, Smith A, Fundele R, Haaf T. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol* 2000; 148: 629–34.
15. Cardoso MC, Leonhardt H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 1999; 147: 25–32.
16. Embryonenschutzgesetz (vom 13. Dezember 1990). Gesetz zum Schutz von Embryonen. *BGBl. I S.* 2746.
17. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2001; 16: 221–5.
18. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 329–34.
19. Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, Ptak G, Galli C, Lazzari G, Bird A, Young LE, Meehan RR. The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7636–40.
20. Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor JE, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol* 2004; 14: R266–7.
21. Shi W, Dirim F, Wolf E, Zakhartchenko V, Haaf T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2004; 71: 340–47.
22. Bennett-Baker PE, Wilkowski J, Burke DT. Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse. *Genetics* 2003; 165: 2055–62.
23. Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 3–18.
24. Mann MR, Lee S., Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 2004; 131: 3728–35.
25. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27: 153–4.
26. Schieve AA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weights in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002; 346: 731–7.
27. Hanser M, Bower C, Milne E, De Klerk N, Kurinczuk J. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects: a systematic review. *Hum Reprod* 2005; 20: 328–38.
28. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barrat CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology (ART). *J Med Genet* 2003; 40: 62–4.
29. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42: 289–91.
30. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 463–82.
31. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 199–207.
32. Shi W, Zakhartchenko V, Wolf E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 2003; 71: 91–113.
33. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12889–94.
34. Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 2003; 69: 902–14.
35. Barker D. *In utero* programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998; 95: 115–28.
36. Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low-birth-weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 2004; 180: 1–16.
37. Pinto M, Shetty P. Influence of exercise-induced maternal stress on fetal outcome in Wistar rats: intergenerational effects. *Br J Nutr* 1995; 73: 645–53.
38. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308: 1466–9.
39. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, ALSPAC Study Team. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 159–66.
40. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89–92.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)