

Karin Buiting

Institut für Humangenetik
Universitätsklinikum Essen

Zusammenfassung

Der Epigenotyp wird in der Regel während der Keimzellentwicklung oder im frühen Embryonalstadium ausradiert, es gibt aber einige Beispiele für die Vererbung epigenetischer Muster. Eine solche transgenerationale Vererbung eines epigenetischen Status bezeichnet man als epigenetische Vererbung. Epigenetische Vererbung von Genen, die mit einem Phänotyp assoziiert sind, kann zu ungewöhnlichen Vererbungsmustern von einer Generation zur nächsten führen. Es ist ebenfalls bekannt, dass die Etablierung eines Epigenotyps durch extrinsische Faktoren beeinflusst werden kann und dass daraus resultierende Modifizierungen auch weitervererbt werden können.

Schlüsselwörter

Epigenotyp, epigenetische Vererbung

Summary

Epigenetic modifications are normally erased in the germline, but there is increasing evidence that epigenetic marks are not always completely cleared between generations. The occurrence that at some loci the epigenetic state could be transmitted unchanged through the germline is termed epigenetic inheritance. Incomplete erasure at genes associated with a measurable phenotype can result in unusual patterns of inheritance from one generation to the next. It is also becoming clear that the establishment of epigenetic marks during development can be influenced by environmental factors and that resulting modifications can be inherited from one generation to the next.

Keywords

Epigenetic modifications, epigenetic inheritance

Einleitung

Es ist bereits seit langem bekannt, dass der Phänotyp eines Organismus nicht allein durch den Genotyp bestimmt wird. Durch die Entwicklung von Methoden, die es erlauben, den Methylierungsstatus und auch die Chromatinstruktur an einzelnen Loci zu untersuchen, konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass nicht nur die von den Eltern ererbte DNA-Sequenz den Phänotyp der Nachkommen bestimmt, sondern dass auch der epigenetische Status der DNA den Phänotyp der Nachkommen beeinflusst. Der epigenetische Status oder Epigenotyp wird durch die Struktur des Chromatins bestimmt, die wiederum durch DNA-Methylierung und Histonmodifikation beeinflusst wird. Ein charakteristisches Merkmal, das epigenetische Modifikationen von genetischen Unterschieden oder Mutationen unterscheidet, ist ihre Reversibilität. Epigenetische Modifikationen werden zwar mitotisch vererbt, sind aber potentiell reversibel. Sie werden in der Regel in der Keimbahn ausradiert. Ein unvollständiges Ausradiieren des epigenetischen Status und eine daraus resultierende Vererbung eines Epigenotyps von einer Generation zur nächsten nennt man transgenerationale epigenetische Vererbung. Ein unvollständiges Ausradiieren epigenetischer Modifikationen bei Genen, die mit einem erkennbaren Phänotyp assoziiert sind, kann zu einem unüblichen Vererbungsmuster von einer Generation zur nächsten führen. Dass an einzelnen Loci der epigenetische Status unverändert auf die nächste Generation weiterver-

erbt werden kann, konnte bisher für einzellige Organismen, Pflanzen und einige höhere Organismen, wie Nematoden und Insekten, nachgewiesen werden. Für Säugetiere hingegen wurden Beobachtungen, die in das Konzept der epigenetischen Vererbung passen, bisher nur selten beschrieben. Es ist ebenfalls unumstritten, dass die Etablierung epigenetischer Modifikationen durch Umweltfaktoren beeinflusst werden kann. Hinweise darauf, dass die Vererbung erworbener Eigenschaften beim Menschen, d.h. die Übertragung einer epigenetischen Veränderung auf die nächste Generation, durch Umwelteinflüsse induziert wurde, kommen von epidemiologischen Untersuchungen.

Experimentelle Beispiele für epigenetische Vererbung bei der Maus und Ratte

Die ersten Hinweise für epigenetische Vererbung bei Mäusen erhielt man durch Kerntransplantationsexperimente. In den Arbeitsgruppen von Joachim Klose und Wolf Reik wurde der mütterliche Vorkern einer Mauszygote einem Zytoplasma ausgesetzt, das genetisch durch ein anderes Genom vorgeprägt war (Roemer et al., 1997). Die so erhaltenen Kernplasmahybride (Nucleocytoplasmic hybrids, NCHs) wurden in eine Gastmutter übertragen und im adulten Zustand untersucht. Die NCH-Mäuse, die im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant reduziertes Körpergewicht aufwiesen, zeigten ein drastisch vermindertes Expressionsniveau für das „Major Urinary Protein“ (MUP) und das „Olfactory Marker Protein“ (OMP). Die Reduktion der Proteinmengen und der Anstieg der DNA-Methylierung der Mup-Gene blieb während der gesamten Lebenszeit der NCHs erhalten und wurde genauso wie die Gewichtsreduktion in die nächste Generation übertragen.

Transgenerationale epigenetische Vererbung konnte ebenfalls in verschiedenen transgenen Mäusen beobachtet werden. Morgan et al. (1999) und Rakyán et al. (2003) aus der Arbeitsgruppe von Emma Whitelaw beschrieben transgene Mäuse, die abhängig von der elterlichen Herkunft

eine unvollständige Penetranz und eine variable Expressivität aufwiesen. Ein gutes Beispiel ist die epigenetische Vererbung des *agouti viable yellow*-Allels (A^{vy}). Das *Agouti*-Genprodukt ist ein parakrin wirkendes Protein, das die Fellfärbung der Mäuse bestimmt. Das A^{vy} -Allel resultiert aus der Insertion eines IAP (intracisternal-A particle) Retrotransposons stromaufwärts des *Agouti*-Gens. Diese Insertion bewirkt eine ektopische Expression des *Agouti*-Proteins, was zu einer Gelbfärbung des Fells, aber auch zu Adipositas, Diabetes und einer erhöhten Prädisposition für Tumoren führt. Genetisch identische Mäuse, die ein A^{vy} -Allel besitzen, können ein breites Spektrum von Fellfarben aufweisen. Die Variation der Fellfarbe von gelb über gelb-braun gescheckt bis hin zu braun (*agouti*) korreliert mit dem epigenetischen Status des A^{vy} -Allels. Die variable Expressivität korreliert mit der differentiellen DNA-Methylierung an dem kryptischen Promoter im *long terminal repeat* (LTR) des IAP. Die Hypomethylierung ist assoziiert mit der ektopischen Genexpression und einer gelben Fellfärbung, während eine Hypermethylierung mit der normalen *Agouti*-Expression korreliert, was in einer *agouti*-Fellfärbung resultiert. Mäuse mit gelb-braun geschecktem Fell repräsentieren Mosaiken für die ektopische Expression. Interessanterweise wird der Phänotyp der Nachkommen von dem Phänotyp des Muttertiers beeinflusst, wobei Mütter mit einer gelben Fellfärbung mehr Nachkommen mit einem gelben Fell haben als Mütter mit einer *agouti*-Fellfarbe.

Transgenerationale epigenetische Vererbung nach maternalen als auch paternalen Transmission wurde ebenfalls für das *axin-fused*-Gen ($Axin^{Fu}$) beschrieben, einem anderen Gen, dass ebenfalls durch die Transkription von einem IAP-Retrotransposon initiiert wird (Rakyán et al. 2003). Es wird vermutet, dass das unvollständige Ausradieren des epigenetischen Status bei diesen Genen zu einer Art „Erinnerung“ an den epigenetischen Status führt, was dann zur epigenetischen Vererbung führt, wobei zusätzlich noch eine stochastische Re-Etablierung des Epigenotyps an diesen

Loci stattfindet. Aufgrund der ungewöhnlich labilen Natur der Transkription dieser Allele bezeichnet man sie als „metastabile Epi-Allele“.

Für einige transgenerationale Effekte, die man bei Ratten beobachtet hat, vermutet man ebenfalls, dass hier eine transgenerationale epigenetische Vererbung der zugrundeliegende Mechanismus ist. Eine Exposition mit Glucocorticoiden während der Schwangerschaft führt bei Ratten zu Nachkommen mit einer erhöhten hepatischen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK-1)-Aktivität. Dieser Effekt ist nicht nur auf die Nachkommen der exponierten Mutter beschränkt; sowohl männliche als auch weibliche F1-Tiere können eine Steigerung der PCK1-Genexpression an ihre Nachkommen weitervererben (Drake et al., 2005).

Eine Voraussetzung für transgenerationale Effekte von Umweltgiften sind chromosomale oder epigenetische Veränderungen in der Keimbahn. Durch eine transiente Exposition mit den endokrinen Modulatoren Methoxychlor (mit östrogenen Wirkung) und Vinclozolin (mit antiandrogenen Wirkung) von schwangeren Ratten in der Phase der gonadalen Sex-Determination konnte ein adulter Phänotyp in der F1-Generation induziert werden, der sich in einer Reduktion der Anzahl und Entwicklungsfähigkeit der Spermatozoen sowie einem gehäuften Auftreten von männlicher Infertilität manifestierte (Anway et al., 2005). Diese Effekte wurden durch die männliche Keimbahn über vier Generationen an nahezu alle männlichen Nachkommen vererbt und korrelierten mit einer veränderten DNA-Methylierung in der männlichen Keimbahn. Diese Arbeit zeigt, dass Umweltfaktoren, wie z.B. die hier eingesetzten endokrinen Modulatoren in der Lage sind, die Reprogrammierung in der Keimbahn zu beeinflussen, wobei es zu einer stabilen Weitergabe eines Phänotyps über Generationen kommen kann.

Epigenetische Vererbung beim Menschen

Die ersten Hinweise auf epigenetische Vererbung stammen aus epidemiologischen Studien. In einer Studie aus der Universitätsklinik in Umeå (Schweden) untersuchten Kaati et al. (2002) in der Gemeinde Överkalix in Schweden die Nahrungsaufnahme der 1890, 1905 und 1920 geborenen in der vorpubertären Wachstumsphase. Ziel der Studie war es, herauszufinden, inwiefern übermäßiges Essen während dieser Wachstumsphase das Risiko der Nachkommen für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes erhöht. Wenn den Vätern in dem kritischen Alter wenig Nahrung zur Verfügung stand, dann war die Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen der Nachkommen niedrig. Die Mortalitätsrate durch Diabetes war signifikant erhöht, wenn den Großvätern väterlicherseits während ihrer präpubertären langsamen Wachstumsphase ein Übermaß an Nahrung zur Verfügung stand.

Eine weitere epidemiologische Studie aus den Niederlanden, die allerdings wegen der genetischen Heterogenität der untersuchten Population umstritten ist, beschreibt einen transgenerationalen epigenetischen Effekt durch Mangelernährung in bestimmten Stadien der Schwangerschaft (Roseboom et al., 2001). Nachdem die Alliierten im September 1944 in den Niederlanden einmarschiert waren, verhängten die deutschen Besatzungstruppen ein Embargo für die Niederlande. Von Dezember 1944 bis April 1945 wurden Kalorienraten von 400–800 kcal/Person offiziell zugeteilt. In der Studie wird beschrieben, dass die Nachkommen von Müttern, die einer Mangelernährung im dritten Trimester der Schwangerschaft ausgesetzt waren, durch ein geringes Geburtsgewicht auffielen. Ein Grund für das geringe Geburtsgewicht war sicherlich ein verzögertes fetales Größenwachstum aufgrund der schlechten Ernährungssituation der Mutter. Interessanterweise zeigten jene Kinder eine erhöhte perinatale Mortalität und ein geringes Geburtsgewicht deren Mütter selbst vorgeburtlich im ersten oder zweiten Trimester einer Unterernährung ausgesetzt waren, die

aber selber bei der Geburt ein normales Geburtsgewicht hatten. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre eine epigenetische Deregulation als Reaktion auf die Unterernährung in der fetalen Keimbahn.

Ein mögliches Beispiel für eine transgenerationale epigenetische Vererbung stellen Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (PWS) und einem primären Imprintingdefekt dar. Etwa 1% aller Patienten mit PWS hat einen Imprintingdefekt. Diese Patienten haben einen mütterlichen Epigenotyp auf ihrem väterlichen Chromosom. In 15% dieser Patienten ist der falsche Epigenotyp Folge einer sekundären Epimutation, einer Deletion des Imprinting Centers. In der Mehrzahl der Patienten mit PWS und einem Imprintingdefekt ist die Epimutation ohne eine vorherige DNA-Sequenzveränderung entstanden. In allen untersuchten informativen Fällen mit einer primären Epimutation zeigte sich, dass bei diesen Patienten das betroffene Chromosom immer von der Großmutter väterlicherseits abstammt (Buiting et al., 2003). Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass der (groß)mütterliche Imprint in der väterlichen Keimbahn nicht ausradiert werden konnte. Dadurch ererbt das Kind ein väterliches Chromosom 15 mit einem mütterlichen epigenetischen Status, was letztendlich zur Erkrankung führt. Ist diese Schlussfolgerung richtig, so wäre dies ein überzeugendes Beispiel dafür, dass auch beim Menschen epigenetische Muster in der Keimbahn nicht immer vollständig ausradiert werden und somit durch die Keimbahn vererbt werden können.

Zwischen 1947 und 1971 wurden mehr als 1 Millionen amerikanische Frauen mit Diethylstilbesterol (DES) behandelt. Dieses oral stark wirksame Oestrogen wurde schwangeren Frauen in der Annahme verabreicht, es könne zum Erhalt der Schwangerschaft beitragen und Fehlgeburten verhindern. Bei jungen Frauen traten als Folge einer vorgeburtlichen DES-Behandlung Fehlbildungen des Uterus, der Vagina sowie der Zervix auf. Zusätzlich zeigten diese Frauen ein erhöhtes Risiko für eine seltene Form von Krebs, dem Klarzellkarzinom der

Zervix und Vagina (Li et al., 2003). Diese Beobachtungen konnten in Tierexperimenten bestätigt werden. Weitergehende Untersuchungen bei Mäusen, Ratten und Hamstern zeigten, dass auch eine perinatale Behandlung mit DES zu Fehlbildungen des Genitaltraktes führen kann. Interessanterweise konnten Fehlbildungen des Uterus auch in den weiblichen Nachkommen der neonatal mit DES exponierten Mäuse nachgewiesen werden und ebenfalls in den weiblichen F2-Tieren der perinatal behandelten Mäuse. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch in einer weiteren Generation beim Menschen, nämlich den weiblichen Nachkommen der vorgeburtlich mit DES exponierten Frauen, ein erhöhtes Risiko für Fehlbildungen der Geschlechtsorgane und für ein Klarzellkarzinom besteht. Obwohl bislang die Mechanismen für die transgenerationalen Effekte von DES nicht geklärt sind, ist bekannt dass DES eine Veränderung der CpG-Methylierungsmuster bei verschiedenen Schlüsselgenen, die bei der Entstehung von Gebärmutterkrebs involviert sind, bewirkt. Zum Beispiel ist bekannt, dass eine Exposition von DES bei Mäusen zu einer Erhöhung der *c-fos* mRNA-Expression und ebenfalls zu einer Hypomethylierung spezifischer Enhancer-Bindungsstellen führt. Die Veränderung der DNA-Methylierung durch DES ist eventuell ein genspezifisches Phänomen, da eine Veränderung der CpG Methylierung der *Hox-a10*- und *Hox-a11*-Gene nach neonataler Exposition nicht verändert wird, obwohl DES eine deutliche Reduktion der Expression dieser beiden Gene bewirkt. Eine Erklärung der transgenerationalen Effekte von DES auf die Entwicklung des Uterus wäre, dass die Veränderungen der CpG-Methylierung in den Genen, die in der Entstehung von Gebärmutterkrebs involviert sind, durch die Keimbahn weitervererbt werden (Ruden et al., 2005).

Epigenetische Vererbung ist ein Phänomen, das in Hefen, Pflanzen und in der Drosophila seit langem bekannt ist. Mittlerweile gibt es aber verstärkt Hinweise darauf, dass auch bei Säugern epigenetische Modifikationen, die zum Teil exogen verursacht sind,

aufgrund einer fehlenden oder unvollständigen Reprogrammierung des Epigenotyps weitervererbt werden können. Die Weitervererbung eines epigenetischen Status könnte zu Problemen in der Entwicklung oder auch zu einer frühen Mortalität führen. Wird aber solch eine „epigenetische Störung“ während der Entwicklung toleriert, dann kann dies den adulten Phänotyp mitbestimmen. Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität ist es allerdings schwer einzuschätzen, welchen Beitrag die transgenerationale epigenetische Vererbung zum Phänotyp des Menschen leistet. Allerdings lassen sich einige phänotypische Variationen, die mit der konventionellen Genetik nicht oder nur sehr schlecht zu erklären sind, wie z.B. phänotypische Unterschiede bei diskordanten monozygoten Zwillingen, u.a. durch die Vererbung epigenetischer Modifikationen erklären.

Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 185:93-98

Ruden DM, Xiao L, Garfinkel MD, Lu X (2005) Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbesterol on uterine development and cancer. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1:R149-155

Waterland RA, Jirtle RL (2003) Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:5293-5300

Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA (1998) Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *A^y/a* mice. *Faseb J* 12:949-957

Korrespondenzadresse

Dr. Karin Buiting
 Institut für Humangenetik
 Universitätsklinikum Essen
 Hufelandstrasse 55
 D-45122 Essen
 Tel. 49 201 723 4555
 Fax 49 201 723 5900
 karin.buiting@uni-essen.de
<http://www.uni-essen.de/humangenetik/>

Literatur

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1469

Buiting K, Gross S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B(2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 72:571-577

Drake AJ, Walker BR, Seckl JR (2005) Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R34-38

Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S(2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 10:682-688

Li S, Hurstin SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC (2003) Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: Lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci* 983: 161-169

Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23:314-318

Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KV, Whitelaw E (2003) Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin(Fu)* allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2538-2543

Roemer I, Reik W, Dean W, Klose J (1997) Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol* 7:277-280