

Zusammenfassung

Nach Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens durch einen Transkriptionsfaktor wird der Genexpressionszustand in der Regel durch mitotisch stabile Chromatinveränderungen fixiert. Fehlerhafte Chromatinzustände (Epimutationen), die mit einem fehlerhaften Genexpressionsmuster einhergehen, spielen eine wichtige Rolle bei bestimmten genetischen Erkrankungen und bei Krebs. Epimutationen können Folge einer DNA-Mutation eines in cis- oder in trans-wirkenden Faktors sein (sekundäre Epimutationen) oder ohne eine DNA-Sequenzveränderung auftreten (primäre Epimutationen). Primäre Epimutationen treten in der Regel nach der Befruchtung auf und führen daher meist zu einem somatischen Mosaik. Die Bedeutung von Epimutationen bei menschlichen Erkrankungen wird wahrscheinlich unterschätzt.

Schlüsselwörter

Epigenetik, Epimutation, DNA-Methylierung, Chromatin

Summary

Gene expression states are set by transcriptional activators and repressors and locked in by cell-heritable chromatin states. Aberrant chromatin states leading to aberrant gene expression patterns (epimutations) have been detected in several recognizable syndromes as well as in cancer. Epimutations can occur secondary to a DNA mutation in a cis-acting element or a trans-acting factor (secondary epimutation), or as a „true“ or primary epimutation in the absence of any DNA sequence change. Primary epimutations often occur after fertilization and can lead to somatic mosaicism. The contribution of epimutations to human disease is probably underestimated.

Keywords

Epigenetics, Epimutation, DNA methylation, Chromatin

1. Einleitung

Wenn Gene durch einen Transkriptionsfaktor an- oder abgeschaltet werden, persistiert der neue Aktivitätszustand in der Regel über mehrere Zellteilungen hinweg, selbst wenn das primäre Signal abgeklungen ist. Grundlage dieser somatischen Vererbung von Genaktivitätszuständen sind DNA-Methylierung- und Histonmodifikationsmuster. Es ist offensichtlich, dass Fehler in der Etablierung oder Replikation dieser Muster die Funktion eines Gens beeinflussen. Solche Epimutationen (Holliday, 1987) können zur fälschlichen Aktivierung eines stummen Gens oder zur fälschlichen Inaktivierung eines aktiven Gens führen.

2. Klassifikationen von Epimutationen

Im Folgenden spreche ich von einer primären Epimutation, wenn eine Epimutation ohne eine vorher aufgetretene DNA-Sequenzveränderung entstanden ist. Als sekundäre Epimutation bezeichne ich eine Epimutation, die direkte Folge einer DNA-Mutation ist (Tabelle 1).

2.1 Sekundäre Epimutationen

Sekundäre Epimutationen sind meist das Ergebnis einer erblichen DNA-Sequenzveränderung und liegen in allen Zellen eines Patienten vor. Der zugrunde liegende genetische Defekt kann in der Nähe des betroffenen Gens liegen (*cis*) oder kann die Funktion eines Proteins beeinflussen, das die epigenetischen Zustände steuert (*trans*).

Tab 1 Klassifikation von Epimutationen

Sekundäre Epimutation (als Folge einer DNA-Mutation)

De novo oder ererbt
cis oder *trans*

Primäre Epimutation (ohne eine zugrundeliegende DNA-Mutation)

Epimutationsrate erhöht durch Sequenzvarianten *in cis*
Epimutationsrate erhöht durch Sequenzvarianten *in trans*

2.1.1. Sekundäre Epimutationen, die Folge einer *cis*-wirkenden DNA-Mutation sind

Es gibt mindestens zwei genetische Erkrankungen, bei denen sekundäre Epimutationen den hauptsächlich pathogenetischen Mechanismus darstellen. Dies sind das Fragile X-Syndrom (*FMR1*) und die Fazio-Skapulo-Humerale Muskuläre Dystrophie (FSHD).

– *FMR1* ist eine X-chromosomal dominante Erkrankung, die durch eine Expansion einer instabilen Trinukleotid-Wiederholung (CGG) innerhalb von Exon 1 des *FMR1*-Gens verursacht wird. Sie ist eine der häufigsten genetischen Ursachen der mentalen Retardierung. Die Anzahl der Wiederholungen ist polymorph. Wiederholungen mit mehr als 58 Kopien sind instabil und können auf bis zu mehrere hundert Kopien während der Proliferationsphase der diploiden Oogonie im fetalen Ovar expandieren. Nach der Befruchtung einer Oozyte, die ein expandiertes *FMR1*-Allel trägt, werden die CGG-Wiederholungen und der *FMR1*-Promoter methyliert. Die DNA-Methylierung, Histondeacetylierung und der Aufbau von repressivem Chromatin in dieser Region inaktivieren das *FMR1*-Gen.

– FSHD ist eine autosomal dominante Erkrankung, die mit der Kopienzahl einer 3.3 kb großen Sequenzwiederholung (*D4Z4*) in der Subtelomerregion des langen Arms von Chromosom 4 in Zusammenhang steht. In gesunden Individuen vari-

iert die Anzahl der *D4Z4*-Wiederholungen zwischen 11 und 150 Einheiten, wohingegen Patienten mit FSHD weniger als 11 Wiederholungen aufweisen. Gabellini et al. haben gezeigt, dass ein Sequenzelement innerhalb von *D4Z4* einen Multiproteinkomplex bindet, der aus dem transkriptionalen Repressor YY1 sowie MHGB2 und Nukleolin besteht (Gabellini et al. 2002). Dieser Multiproteinkomplex bewirkt eine Repression angrenzender Gene in 4q35, wahrscheinlich durch Etablierung einer repressiven Chromatinstruktur über eine sehr große Distanz. Die Autoren gehen davon aus, dass Deletionen von *D4Z4* mit einer offenen Chromatinstruktur in 4q35 und einer fälschlichen Expression von einer Reihe von Genen in dieser Region assoziiert sind. Diese Ergebnisse sind jedoch umstritten.

Imprintingdefekte, die aus einer Mutation in einem *cis*-wirkenden Imprintingkontrollelement resultieren, stellen ein weiteres Beispiel für sekundäre Epimutationen dar. Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, durch den in der männlichen und weiblichen Keimbahn spezifische Chromosomenregionen markiert werden, so dass entweder nur das mütterliche oder nur das väterliche Allel eines bestimmten Gens aktiv ist. Die Imprintetablierung und die Imprintaufrechterhaltung unterliegen der Kontrolle von Imprintingzentren (ICs). Sehr gut verstanden ist das IC des menschlichen Chromosom 15, das zwei kritische Elemente aufweist (Buiting et al. 1995).

– Ein Element ist für die Etablierung des mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn notwendig. Eine Deletion dieses Elements verhindert das mütterliche Imprinting der betroffenen Chromosomenregion. Ein Kind, das dieses Chromosom erbt, entwickelt Angelman-Syndrom (AS). AS ist eine neurogenetische Erkrankung, die durch eine ausgeprägte mentale Retardierung, fehlende Sprache, ruckartige Bewegungen und einem freundlichen Verhalten des Betroffenen charakterisiert ist. Verursacht wird die Erkrankung durch den Funktionsverlust des *UBE3A*-Gens, das ein Enzym kodiert, welches am gezielten Proteinabbau beteiligt ist. Im Gehirn ist dieses Gen nur auf dem mütterlichen Chromosom aktiv. In AS-Patienten mit einem Imprintingdefekt, der in 3-4 % der Fälle ursächlich für das AS ist, ist das mütterliche *UBE3A*-Allel stumm. Von diesen Patienten haben aber nur 10% eine IC-Deletion, während 90% eine primäre Epimutation aufweisen (Buiting et al., 2003; siehe auch unten). Die meisten AS-Patienten haben eine große chromosomale Deletion auf dem mütterlichen Chromosom, eine Mutation des mütterlichen *UBE3A*-Allels, oder eine väterliche uniparentale Disomie 15.

– Das zweite Element ist für die postzygotische Aufrechterhaltung des väterlichen Imprints notwendig. Eine väterliche Deletion dieses Elementes führt zu einem epigenetischen Zustand, der dem mütterlichen Imprint ähnelt. Ein Kind, das

ein solches Chromosom erbt, entwickelt Prader-Willi-Syndrom (PWS). PWS ist durch neonatale muskuläre Hypotonie, Hypogonadismus, Hyperphagie, Adipositas und Kleinwuchs sowie kleine Hände und Füße, Schlafapnoe, Verhaltensauffälligkeiten und eine milde bis mässige geistige Behinderung charakterisiert. PWS wird durch den Funktionsverlust von Genen verursacht, die nur auf dem väterlichen Chromosom aktiv sind. Obwohl alle Gene in der kritischen Region bekannt sind, ist unklar, welche dieser Gene ursächlich für die Entstehung des Phänotyps sind. Bei Patienten mit einem Imprintingdefekt, der bei etwa 1 % der Fälle ursächlich für die Erkrankung ist, sind alle väterlich exprimierte Gene stumm. Von diesen Patienten weisen ca. 10% eine IC-Deletion auf, während bei ca. 90% eine primäre Epimutation vorliegt (Buiting et al., 2003, siehe auch unten). Fast alle übrigen PWS-Patienten haben eine große chromosomale Deletion auf dem väterlichen Chromosom oder eine mütterliche uniparentale Disomie.

Im Gegensatz zu AS und PWS weisen mehr als 50% der Patienten mit transientem neonatalen Diabetes mellitus oder einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) einen Imprintingdefekt auf. Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist ein Großwuchs-Syndrom, das durch ein hohes Geburtsgewicht, Hypoglykämie, Makroglossie, Nabelhernie und ein erhöhtes Risiko, an Wilms-Tumoren zu erkranken, charakterisiert ist. Das BWS wird durch eine Überexpression des väterlich aktiven *IGF2*-Gens und der Inaktivierung des mütterlich exprimierten *H19*-Gens oder aber durch eine Inaktivierung des mütterlich aktiven *CDKN1C*-Gens verursacht. Diese Gene sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert, werden aber von zwei unterschiedlichen ICs kontrolliert, dem *IGF2/H19* IC (IC1) und dem *LIT1/KCNQ10T1* (IC2), das das Imprinting von *CDKN1C* kontrolliert. IC1- und IC2-Deletionen wurden bislang nur in Einzelfällen beobachtet.

Eine bislang einzigartige Epimutation, die das α Globin-Gen *HBA2* beein-

flusst, ist kürzlich von Tufarelli und Kollegen beschrieben worden (Tufarelli et al. 2003). Die Autoren untersuchten einen Patienten mit einer Form der alpha-Thalassämie. Der Patient weist eine Deletion auf, die das ubiquitär exprimierte Gen *LUC7L* verkürzt und in Nachbarschaft zum normalen α Globin-Gen *HBA2* bringt. Obwohl die Deletion keine lokalen oder entfernt liegenden *cis*-regulierenden Elemente von *HBA2* betrifft, ist das Gen abgeschaltet. *LUC7L* wird vom Gegenstrang der Globin-Gene transkribiert. In dem Patienten läuft das RNA-Transkript der verkürzten *LUC7L*-Kopie als Antisense-Transkript durch das *HBA2* CpG-Island. Die Antisense RNA-Transkripte bewirken eine Methylierung des *HBA2* CpG-Island während der frühen embryonalen Entwicklung und eine Inaktivierung des *HBA2*-Gens.

Der epigenetische Zustand eines Gens kann auch durch chromosomale Translokationen beeinflusst werden. Dies kommt insbesondere bei Translokationen vor, die das X-Chromosom betreffen. Ein sehr aufschlussreicher Fall wurde von Jones und Kollegen publiziert (Jones et al. 1997). Die Autoren untersuchten einen männlichen Betroffenen mit einer unbalancierten X;13-Translokation [46,XY,der(13)t(X;13)(q10q10)] und einem bilateralen Retinoblastom. Studien zur DNA-Replikation und DNA-Methylierung zeigten, dass die zusätzliche Kopie von Xq, die an dem langen Arm eines Chromosoms 13 angelagert ist, inaktiviert wurde. Die X-Inaktivierung hat auf das Chromosom 13 übergreifen und das *RB1*-Gen in 13q14 ausschaltet. Diese Epimutation ist funktionell äquivalent mit einer heterozygoten *RB1*-Inaktivierung und erklärt die Entwicklung von bilateralen Tumoren bei diesem Patienten.

2.1.2. Sekundäre Epimutationen, die Folge einer trans-wirkenden DNA-Mutation sind

In den vergangenen Jahren konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die eine zentrale Rolle bei epigenetischen Prozessen spielen. Dies sind DNA-Methyltransferasen, Methyl-CpG-bindende Proteine, Hi-

ston-modifizierende Proteine und Chromatin-modellierende Proteine. Der Funktionsverlust dieser Proteine hat eine beträchtliche Auswirkung auf die epigenetische Kontrolle der Genexpression. Im Gegensatz zu Epimutationen, die durch *cis*-wirkende DNA-Mutationen verursacht sind, können bei Epimutationen, die durch *trans*-wirkende DNA-Mutationen entstanden sind, unterschiedliche Gene auf verschiedenen Chromosomen betroffen sein. Beim Menschen werden eine Reihe genetischer Syndrome mit Mutationen in Genen in Verbindung gebracht, die epigenetische Regulatoren kodieren.

- Mutationen in der *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3a* verursachen das autosomal rezessive ICF-Syndrom (Immundefizienz, Zentromerinstabilität und faciale Auffälligkeiten). Die Patienten sterben an schweren, immer wieder auftretenden Infektionen. Die Chromosomeninstabilität korreliert mit einer ausgeprägten Hypomethylierung der Satelliten-DNA.

- Das X-gekoppelte alpha-Thalassämie-Syndrom mit geistiger Behinderung (*ATRX*) ist eine Entwicklungsstörung, die durch eine mentale Retardierung, faciale Dismorphien, auffälliges Genital und Anämie in Folge einer reduzierten Expression der α -Globulin-Gene gekennzeichnet ist. Es wird durch eine Mutation im *ATRX*-Gen verursacht, das ein Mitglied der SWI/SNF-Familie von Chromatin-remodellierenden Faktoren kodiert.

- Das Rett-Syndrom (RTT) ist eine X-chromosomal dominante neurologische Erkrankung. Mädchen mit Rett-Syndrom zeigen während der ersten sechs Lebensmonate eine scheinbar normale Entwicklung, bevor sie die zuvor erlangten Fähigkeiten wieder verlieren und eine Mikrozephalie, Handstereotypen, autistische Züge, epileptische Anfälle und eine Gangunsicherheit entwickeln. RTT wird durch eine Mutation im *MECP2*-Gen verursacht, das das Methyl-CpG-Bindeprotein 2 enkodiert. Eine Funktion von *MECP2* ist die Rekrutierung des Sin3A-Kore-

pressorkomplexes, der Histondeacetylase beinhaltet, und der Aufbau repressiven Chromatins. Zunächst wurde vermutet, dass der Verlust von *MeCP2* zu einer genomweiten Aktivierung sonst reprimierter Gene führt. Diese Annahme hat sich jedoch als nicht richtig herausgestellt.

2.2. Primäre Epimutationen

Wie oben erwähnt werden bei Patienten mit AS und PWS ca. 90 % der Imprintingdefekte nicht durch eine IC-Mutation verursacht, sondern stellen eine primäre Epimutation dar. Beim BWS sind sogar fast alle Fälle von Imprintingdefekten primäre Epimutationen. Epimutationen, die genomische Imprints betreffen, können während der Auslöschung genomischer Imprints in primordialen Keimzellen, während der Etablierung der Imprints in späteren Stadien der Gametogenese oder aber während der Aufrechterhaltung der Imprints nach der Fertilisation auftreten. Wenn sie in der Keimbahn auftreten, sind sämtliche Zellen des Patienten betroffen; treten sie nach der Fertilisation auf, kann ein somatisches Mosaik entstehen. Nazlican et al. schätzen, dass mindestens 30% der AS-Patienten mit einem primären Imprintingdefekt ein somatisches Mosaik haben (Nazlican et al. 2004). Einige Patienten mit einem Mosaik haben ein „atypisches Angelman-Syndrom“, das durch Adipositas, muskuläre Hypotonie und die Fähigkeit zum Sprechen gekennzeichnet ist (Gillissen-Kaesbach et al. 1999).

Primäre Epimutationen kommen nicht nur bei „Imprintingstörungen“, sondern auch bei Tumorerkrankungen vor. Im Jahre 1983 haben A. Feinberg und B. Vogelstein eine veränderte DNA-Methylierung in Tumorzellen gefunden (Feinberg und Vogelstein 1983). Nachfolgend haben diese und andere Autoren demonstrieren können, dass eine Hypomethylierung zu einer Aktivierung von Onkogenen führen kann. 1986 identifizierten S. Baylin und Kollegen eine Hypermethylierung des Calcitoningens in menschlichen Lungentumoren und Lymphomen (Baylin et al. 1986), wobei jedoch nicht bekannt war, welche Rolle diese Veränderungen bei der Tumorent-

stehung spielen. Kurz nach Entdeckung des ersten Tumorsuppressorgens (das Retinoblastomgen *RB1*) konnte meine Arbeitsgruppe zeigen, dass der *RB1*-Promoter in Retinoblastomen methyliert sein kann (Greger et al. 1989). Dies deutete darauf hin, dass die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auch epigenetisch erfolgen kann. Inzwischen wurde die Methylierung von Tumorsuppressorgenen bei fast allen Tumorarten gefunden und das Gebiet der Tumorepigenetik wächst seitdem rapide.

Tumor-assoziierte Epimutationen werden in der Regel ausschließlich in prä malignen oder malignen Zellen gefunden. Bisher wurde nur ein Fall mit einer ererbten Epimutation bei einer Krebserkrankung beschrieben. Suter et al. haben über zwei Individuen berichtet, die eine allelspezifische Hypermethylierung des DNA-Mismatch-Reparaturgens *MLH1* in allen untersuchten Körperzellen aufwiesen (Suter et al. 2004). Obwohl beide Individuen multiple Primärtumoren mit einem Mismatch-Reparaturdefekt aufwiesen, konnte keine DNA-Sequenzmutation in den Mismatch-Reparaturgenenachgewiesen werden. Die Epimutation fand sich auch in den Spermatozoen eines der Individuen, was auf einen Keimbahndefekt hinweist und somit ein Wiederholungsrisiko für Nachkommen darstellt.

Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen scheinen primäre Epimutationen eine Rolle zu spielen. Ähnlich wie bei Tumoren sind Zellen in atherosklerotischen Plaques durch eine globale DNA-Hypomethylierung und eine lokale Hypermethylierung gekennzeichnet. Diese Ähnlichkeiten sollten nicht überraschen, da die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen eine Schlüsselfunktion im atherosklerotischen Prozess haben. Nach Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima wechselt ihr Phänotyp von kontraktile zu „entdifferenziert“. Die Methylierung des Östrogen-Rezeptor- α -Gens (*ESR1*) könnte zu diesen Prozessen beitragen (Ying et al. 2000).

3. Ursachen primärer Epimutationen

Während sekundäre Epimutationen eine Folge von DNA-Mutationen sind, stellen primäre Epimutationen wahrscheinlich stochastisch auftretende Fehler im Aufbau oder der Aufrechterhaltung des epigenetischen Zustands dar. Die spontane Epimutationsrate kann durch intrinsische (genetische) und extrinsische Faktoren modifiziert werden.

3.1 Intrinsische Faktoren

Es ist anzunehmen, dass bestimmte DNA-Sequenzvarianten anfälliger für Epimutationen sind als andere. Murrel et al. haben kürzlich berichtet, dass bestimmte Sequenzvarianten in der Beckwith-Wiedemann-Syndrom Region auf Chromosom 11 mit einer erhöhten Epimutationsrate assoziiert sind (Murrel et al. 2004). Die Autoren identifizierten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der differentiell methylierten Region des *IGF2*-Gens, die in drei von 16 möglichen Haplotypen auftraten. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zeigte sich bei BWS-Patienten eine erhöhte Frequenz eines Haplotyps sowie eine erniedrigte Frequenz eines anderen Haplotyps. Ähnliche Befunde haben wir in der IC-Region auf Chromosom 15 bei Patienten mit Angelman-Syndrom und einem Imprintingdefekt erhoben (Zogel, Böhringer, Buiting und Horsthemke, unpubliziert).

Der epigenetische Zustand kann auch durch Sequenzvariationen in Genen beeinflusst werden, die epigenetische Faktoren kodieren. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Sequenzvariationen des *MTHFR*-Gens, das die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase kodiert, mit Unterschieden im Grad der DNA-Methylierung assoziiert sind (Castro et al. 2004). Die Reduktase ist das Schlüsselenzym des Methylgruppenstoffwechsels. Veränderungen der *MTHFR*-Aktivität beeinflussen den Grad von S-Adenosyl-Methionin (SAM), das als Methylgruppenpendler sowohl für die DNA-Methyltransferase als auch für die Histone-Methyltransferase fungiert.

3.2. Extrinsische Faktoren

Der SAM-Spiegel ist auch abhängig von der Zufuhr an Folsäure, und die Enzyme, die am Methylgruppenstoffwechsel beteiligt sind, nutzen Vitamin B als Kofaktoren. Da Folsäure und Vitamin B mit der Nahrung zugeführt werden, sollte es nicht überraschen, dass der epigenetische Zustand über die Ernährung beeinflusst werden kann. Veränderungen der DNA-Methylierung in Abhängigkeit von Folsäurespiegel sind in verschiedenen Tumoren und auch an Tiermodellen untersucht worden. Imprints scheinen allerdings sehr stabil gegenüber Folsäurespiegel in der Nahrung zu sein.

In 2002 wiesen Cox et al. darauf hin, dass assistierte Reproduktion (ART) mit einem erhöhten Auftreten von Imprintingdefekten verbunden sein könnte. Die Autoren beschrieben zwei Kinder mit Angelman-Syndrom und einem Imprintingdefekt, die durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) gezeugt worden waren. In beiden Fällen konnte eine IC-Deletion ausgeschlossen werden. Folglich konnten die Imprintingdefekte als spontan aufgetretene primäre Epimutationen klassifiziert werden. Kurz danach berichteten andere Gruppen, dass das Risiko für Beckwith-Wiedemann Syndrom nach ART erhöht sei.

Die Anbetracht tierexperimenteller Befunde sowie epidemiologischer Daten beim Menschen ist es inzwischen wahrscheinlich, dass ART mit einem erhöhten Risiko von Imprintingstörungen assoziiert ist, wobei es jedoch unklar bleibt, ob das Risiko von Imprintingstörungen auf die Unfruchtbarkeit an sich (intrinsische Faktoren) und/oder auf das technische Vorgehen (extrinsische Faktoren) zurückzuführen ist. Um diese Frage besser zu beleuchten, haben Ludwig et al. (2005) kürzlich eine Kohortenstudie an Patienten mit Angelman-Syndrom durchgeführt. Die Autoren fanden ein erhöhtes Vorkommen von Imprintingdefekten bei Kindern mit Angelman-Syndrom, die von subfertilen Paaren geboren wurden (definiert als Paare, die mehr als zwei Jahre Zeit auf eine Schwangerschaft gewartet hatten und/oder sich einer Unfruchtbarkeitsbehandlung unterzogen hatten). Inter-

essanterweise lag das relative Risiko von unbehandelten Paaren, die mehr als zwei Jahre Zeit auf eine Schwangerschaft gewartet hatten, und bei Paaren, die sich einer ICSI-Behandlung oder ausschließlich einer hormonellen Stimulation unterzogen hatten, auf dem gleichen Niveau. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Imprintingdefekte und Subfertilität einen gemeinsamen, möglicherweise genetischen Ursprung haben, und dass die hormonelle Stimulation das Risiko erhöhen könnte, ein Kind mit einem Imprintingdefekt zu bekommen. Die hormonelle Stimulation könnte zur Reifung epigenetisch fehlerhafter Oozyten führen, die ohne Behandlung nicht zur Ovulation gekommen wären, oder den Prozess der DNA-Methylierung in den Oozyten stören bzw. unterbrechen. Wie tierexperimentelle Studien gezeigt haben, könnte ein weiteres Risiko in der Kultur der Gameten und des frühen Embryos liegen. Nichtsdestotrotz ist das absolute Risiko, ein Kind mit BWS oder AS nach ART zu bekommen als zu gering einzustufen, um ohne positive Familienanamnese als Indikation für eine spezifische Pränataldiagnose in dieser Hinsicht nach ART angesehen zu werden.

4. Epigenetische Kandidatenerkrankungen

Treten primäre Epimutationen nur bei Imprintingstörungen und Krebserkrankungen auf? Ich glaube, nein. Das scheinbar auf Imprintingstörungen und Tumoren begrenzte Auftreten primärer Epimutationen ist meiner Meinung nach auf einen *ascertainment bias* zurückzuführen. Sobald klar wurde, dass die PWS- und AS-Gene dem genomischen Imprinting unterliegen, lag es auf der Hand, dass bei einer Subgruppe von Patienten die Krankheit auf einen Fehler im Imprintingprozess zurückzuführen sein sollte (Reis et al. 1994). Ähnlicherweise war es nach der Identifizierung des ersten Tumorsuppressor-Gens (*RB1*) reizvoll zu spekulieren, ob das Gen in einigen Tumoren durch DNA-Methylierung inaktiviert sein könnte (Greger et al. 1989). Diese Untersuchungen wurden durch die Tatsache erleichtert, dass entsprechendes Gewebe für die Analysen zur Verfügung

stand. Primäre Epimutationen, die oftmals in Mosaikform auftreten, sind schwierig zu finden, es sei denn, sie führen zu einem selektiven Wachstumsvorteil für die betroffene Zelle. Hyperplastisches Gewebe und Tumorgewebe wird oft biopsiert oder vollständig entfernt, so dass man für Analysen eine relativ homogene Gewebeprobe erhält. Falls eine Epimutation aber zu einem selektiven Wachstumsnachteil führt, ist es sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, Material aus dem betroffenen Sektor zu erhalten. Aus diesem Grund werden epigenetische Störungen nicht entdeckt, die zu einer Dysgenese/Dysplasie oder Agenesie/Aplasie führen. Ich glaube, es ist nicht abwegig anzunehmen, dass ein Entwicklungsgen ähnlich einem Tumorsuppressorgen durch eine Epimutation abgeschaltet werden kann. Dasselbe trifft natürlich auch für somatische DNA-Mutationen zu; es ist aber wahrscheinlich, dass die Rate primärer Epimutationen größer ist als die Rate somatischer DNA-Mutationen. Dies wiederum legt nahe, dass die Beteiligung von Epimutationen an der Entstehung von menschlichen Erkrankungen unterschätzt wird.

Epigenetische Kandidatenerkrankungen sind Erkrankungen, die nicht mendeln. In Frage kommen solche Erkrankungen, die eine oder mehrere der folgenden Kriterien aufweisen:

- die Erkrankung tritt vorwiegend sporadisch auf,
- es besteht ein breites Spektrum im Phänotyp mit hauptsächlich unilateraler Manifestation,
- es gibt diskordante monozygotische Zwillinge.

Die aufgeführten Kriterien treffen auch für die sogenannten komplexen Erkrankungen zu und diese sind in der Tat als gute Kandidaten für eine epigenetische Beteiligung anzusehen. Last, but not least, haben wahrscheinlich viele Alterungsprozesse eine epigenetische Beteiligung.

Danksagung

Die im Labor des Autors durchgeführten Arbeiten sind von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt worden. Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern meiner Forschungsgruppe Epigenetik für die gute

Zusammenarbeit, sowie M. Zeschnigk, K. Buiting und D. Lohmann für kritische Anmerkungen zum Manuskript.

Literatur

Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD (1986) DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 46:2917-2922

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

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9:395-400

Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, de Almeida IT (2004) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 41:454-458

Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71:162-164

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92

Gabellini D, Green MR, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110:339-348

Gillissen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B (1999) A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* 7:638-644

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83:155-158

Holliday R (1987) The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238:163-170

Jones C, Booth C, Rita D, Jazmines L, Brandt B, Newlan A, Horsthemke B (1997) Bilateral retinoblastoma in a male patient with an X; 13 translocation: evidence for silencing of the RB1 gene by the spreading of X inactivation. *Am J Hum Genet* 60:1558-1562

Ludwig M, Katalinic A, Groß S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B (2005) Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* (in press)

Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W

(2004) An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 13:247-255

Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillissen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* 13:2547-2555

Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillissen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994) Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* 54:741-747

Suter CM, Martin DI, Ward RL (2004) Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 36:497-501

Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayub H, Wood WG, Higgs DR (2003) Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 34:157-165

Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, Smiraglia DJ, Issa JJ, Michler RE, Caligiuri M, Plass C, Goldschmidt-Clermont PJ (2000) Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 46:172-179

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Horsthemke
Institut für Humangenetik
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55
45122 Essen
Tel. 0201-723 4556
Fax 0201-723 5900
b.horsthemke@uni-essen.de

GfH-Tagung
2006
Heidelberg

Abstract
Deadline

30.11.2005