

Genomisches Imprinting und Imprintingfehler

Genomisches Imprinting

Genomisches Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, bei dem die männliche und die weibliche Keimbahn jeweils spezielle Markierungen (Prägungen, Imprints) an bestimmten chromosomalen Regionen hinterlassen [1]. Diese Markierungen sind mitotisch stabil und bleiben während Entwicklung und Wachstum eines Organismus erhalten. Es herrscht noch einige Unklarheit bezüglich der Art des primären Imprints, jedoch unterscheiden sich die elterlichen Kopien der geprägten Regionen in Hinblick auf die Methylierung der DNA und die Modifikation der Histone. Die unterschiedlichen Chromatinmarkierungen führen zur Genexpression des einen Allels und zur Unterdrückung der Genexpression des anderen Allels. Manche Gene werden nur vom väterlichen Allel exprimiert, andere nur vom mütterlichen Allel.

Auf den ersten Blick erscheint es, als ob ein geprägtes Gen in allen Geweben und Individuen immer nur von demselben elterlichen Allel exprimiert wird; bei näherem Hinsehen erkennt man jedoch, dass die stillgelegten Allele mancher Gene nicht völlig inaktiv sind, sondern eine Restaktivität aufweisen, und dass andere geprägte Gene nur in bestimmten Geweben (gewebsspezifisches Imprinting) oder aber nur in manchen Individuen (polymorphes Imprinting) monoallelisch exprimiert werden. Es ist daher nicht nur experimentell, sondern auch konzeptionell schwierig, die exakte Anzahl der geprägten Gene zu bestimmen. Derzeit sind beim Menschen etwa 60 Gene mit Imprint bekannt, es könnten aber bis zu 1000 sein.

Die geprägten Gene sind über das Genom nicht gleichmäßig verteilt, sondern liegen häufig in Clustern vor. Beim Menschen sind solche Cluster bisher auf den Chromosomen 6, 7, 11, 14 und 15 gefunden worden. Das Auftreten in Clustern lässt vermuten, dass die primäre Kontrolle des Imprintings nicht auf der Einzelgenebene, sondern auf der Ebene einer Chromosomendomäne erfolgt. Tatsächlich fand sich in mehreren Clustern ein *cis*-aktives Element, welches „imprinting center“ (IC) oder auch „imprinting control region“ (ICR, Imprintingkontrollregion) genannt wird. Diese Elemente sind durch verschiedene epigenetische Markierungen gekennzeichnet (DNA-Methylierung und Histonmodifikation), dienen als Bindestellen für Regulationsfaktoren und bewirken eine Regulation der Genexpression in *cis* über eine gewisse Distanz hinweg. Der Verlust eines solchen Elements beeinflusst typischerweise die Expression der meisten oder aller Gene innerhalb des geprägten Genclusters [2].

Genomisches Imprinting gibt es bei den Säugetieren mit Plazenta und bei manchen Pflanzen. Viele Gene mit Imprinting sind bei der Ressourcenakquisition von Embryo und Fetus involviert. Tatsächlich wird überlegt, ob Imprinting sich in Koevolution mit der Plazenta bei Tieren und dem Endosperm bei Pflanzen entwickelt hat. Bei den Plazentariern wächst der Fetus auf Kosten der Mutter. Wie von der „genetic conflict theory“ [3] angenommen, ist das väterliche Genom daran „interessiert“, so viele Ressourcen wie möglich aus der Mutter zu ziehen, da ein männliches Individuum seine Gene über mehrere verschiedene weibliche Individuen verbreiten kann. Hingegen kann ein weibliches Individuum seine Gene nur

durch mehrfache Schwangerschaften verbreiten, sodass die mütterlich vererbten Gene die Mutter vor einer Auszehrung durch den Fetus schützen sollten. Diese Theorie wird von vielen auf diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftlern favorisiert; dennoch sollte man beachten, dass es auch alternative Hypothesen gibt.

Entsprechend der monoallelischen, elternabhängigen Expression von geprägten Genen sind väterliches und mütterliches Genom funktional nicht äquivalent; daher sind beide für die normale embryonale Entwicklung erforderlich. Das wurde zuerst an Kerntransplantationsexperimenten bei Mäusen gezeigt [4, 5], ist aber auch beim Menschen zu beobachten. So sind z. B. benigne ovariale Teratome parthenogenetische Tumoren, die aus einer einzelnen Oozyte entstehen. Sie enthalten Gewebe von allen 3 Keimblättern, aber kein Trophoblastengewebe, während ein Ei, welches durch 2 Spermien befruchtet wurde und welches das maternale Genom inaktiviert hat, keine normale Entwicklung aufweist, sondern sich zu einer Blasenmole entwickelt, also zu degeneriertem Trophoblastengewebe.

Die Un austauschbarkeit von mütterlichem und väterlichem Genom wird auch bei uniparentaler Disomie deutlich. Uniparentale Disomie bezieht sich auf das Vorhandensein zweier Kopien eines Chromosoms (oder Chromosomenteils) von einem Elternteil und Fehlen der entsprechenden anderen elterlichen Kopie [6]. Es sollte beachtet werden, dass uniparentale Disomie an sich nicht mit dem Imprintingprozess interferiert. Wenn jedoch das betroffene Chromosomenpaar ein Gen mit Imprint trägt, sind beide Allele dieses Gens aktiv oder inaktiv, je nach der elterlichen Herkunft der Chromoso-

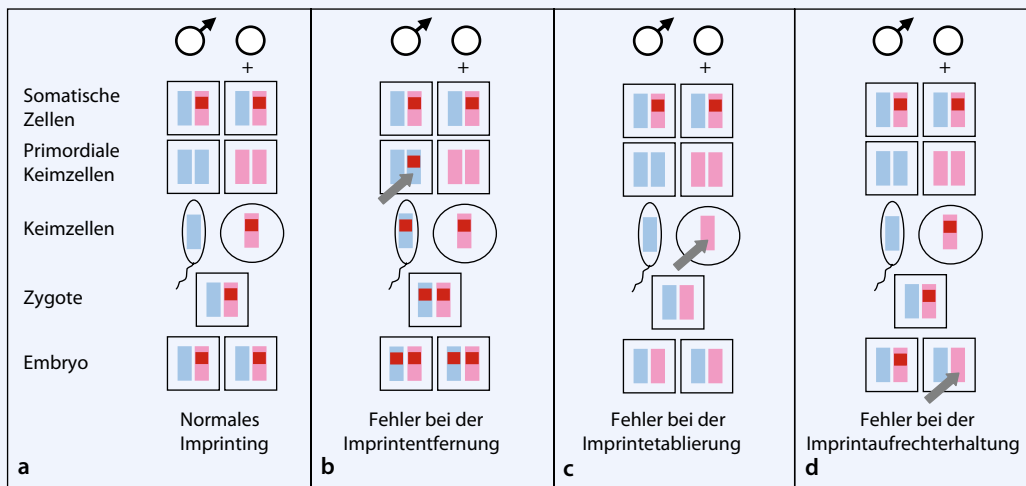


Abb. 1 ▲ Genomisches Imprinting und Imprintingfehler. **a** Genomische Imprints werden in primordiales Keimzellen entfernt, während späterer Phasen der Keimzellentwicklung neu etabliert und bei den somatischen Zellteilungen während der postzygotischen Entwicklung stabil weitergegeben. Falsche Imprints (*graue Pfeile*) resultieren aus Fehlern bei **b** der Imprintentfernung, **c** der Imprintetablierung oder **d** dem Imprinterhalt. Der Klarheit wegen ist nur ein Chromosomenpaar (*blau* paternales Chromosom, *pink* mütterliches Chromosom), ein mütterlicher Methylierungs imprint (*dunkelrot*) und nur eine von 4 möglichen Gameten gezeigt

men. Dies beeinträchtigt häufig die normale Entwicklung und das Wachstum.

Die effektive Dosis eines geprägten Gens kann auch durch eine chromosomale Deletion, Duplikation oder eine Punktmutation beeinflusst werden. In diesen Fällen bestimmt die elterliche Herkunft der Aberration die klinischen Folgen. So führt z. B. eine paternale Deletion 15q11q13 zum Prader-Willi-Syndrom (PWS), während es durch eine maternale Deletion 15q11q13 zu einem Angelman-Syndrom (AS) kommt. Da solche Läsionen aber nicht die Regulation des genomischen Imprints beeinträchtigen, werden sie in dieser Übersicht nicht weiter behandelt.

Entfernung, Etablierung und Erhaltung von Imprints

Genomische Imprints werden in primordiales Keimzellen entfernt, während späterer Phasen der Keimzellentwicklung neu etabliert und bei den somatischen Zellteilungen während der postzygotischen Entwicklung stabil weitergegeben (■ **Abb. 1a**). Da DNA-Methylierung sehr viel einfacher zu untersuchen ist als die Modifikation von Histonen, beschäftigen sich die meisten Imprintingstudien mit dem Schicksal von

DNA-Methylierungsmustern in bestimmten Entwicklungsstadien. Methylierungsprints überstehen die globalen Wellen der DNA-Demethylierung und -Remethylierung, die während der frühen Embryonalentwicklung stattfinden; allerdings ist noch unklar, was sie davor schützt. Ein solcher Schutzfaktor könnte PGC7 sein [7]. In somatischen Zellen wird das Imprint von der Transkriptionsmaschinerie gelesen und zur Regulation einer vom elterlichen Ursprung abhängigen Genexpression genutzt, sodass nur jeweils das paternale oder das maternale Allel eines geprägten Gens aktiv ist.

Über die Mechanismen, die zur Entfernung der Imprints in den primordiales Keimzellen führen, ist bisher fast nichts bekannt. Bezüglich der DNA-Methylierung sind 2 Mechanismen vorstellbar: aktive und passive DNA-Demethylierung. In Abwesenheit von DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1), welche für die Methylierung der durch die semikonservative DNA-Replikation entstandenen hemimethylierten DNA verantwortlich ist, geht die DNA-Methylierung während der Zellteilungszyklen sukzessive passiv verloren. Aktive DNA-Demethylierung hingegen würde den enzymatischen Abbau der Methylgruppe vom 5-Methylcytosin oder den Ersatz der methylierten

Base oder des Nukleotids durch eine unmethylierte Base bzw. Nukleotid bedeuten. Generell ist zwar davon auszugehen, dass die Entfernung einer Methylgruppe und die dabei nötige Spaltung einer Kohlenstoffbindung energetisch gesehen unwahrscheinlich ist, aber es gibt Hinweise, dass 5-Methylcytosin durch DNA-Reparaturenzyme entfernt werden kann [8].

Methylierungsprints werden durch die De-novo-DNA-Methyltransferase DNMT3A und ihren Kofaktor DNMT3L auf der unmethylierten DNA etabliert [9]. Da diese Proteine keinerlei Sequenzspezifität aufweisen, müssen sie durch DNA-Bindungsproteine, bestimmte Histonmodifikationen oder andere Mechanismen zu ihren Zielorten gelenkt werden. Ciccone et al. haben gezeigt, dass die Demethylierung von Histon H₃K₄ durch KDM1B wesentlich für die Etablierung der DNA-Methylierungsprints an einigen, aber nicht allen geprägten Loci während der Oogenese ist [10]. Ein anderer wichtiger Faktor scheint das KRAB-Zinc-Finger-Protein ZFP57 zu sein: In Maus-Oozyten führt die Abwesenheit von Zfp57 zu der Unfähigkeit, maternale Imprints an der *Snrpn*-Imprint-Region zu etablieren [11], allerdings ist die exakte Funktion dieses Proteins bisher noch nicht geklärt worden. Diese Befunde weisen auch darauf

hin, dass es weitere, bisher nicht bekannte Imprintingfaktoren geben muss. Es wird auch diskutiert, dass Transkription für die Etablierung von Keimbahnmethylierungsmarkierungen an geprägten Genen notwendig sein könnte [12, 13], aber andere Modelle sind ebenfalls denkbar. Tatsächlich ist das Rätsel, wie Imprints etabliert werden, noch ungelöst.

Imprints werden während der DNA-Replikation und während des Zellzyklus durch die Erhaltungsmethylase DNMT1 aufrechterhalten. Interessanterweise ist ZFP57 nicht nur für die Etablierung des mütterlichen Imprints an bestimmten Loci erforderlich, sondern auch für die Erhaltung von mütterlichen und väterlichen Imprints [11].

Fehler bei der Entfernung, Etablierung und Erhaltung von Imprints

Wie alle biologischen Prozesse weisen auch die Entfernung, Etablierung und Erhaltung von Imprints eine gewisse, wenn auch niedrige, Fehlerrate auf. Fehler in einem dieser Prozesse führen zu einem väterlichen Chromosom mit mütterlichem Imprint oder zu einem mütterlichen Chromosom mit väterlichem Imprint. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass falsche Imprints nach der Befruchtung repariert werden können. Daher liegen in der Keimbahn oder im frühen Embryo erfolgte Imprintingfehler in allen somatischen Zellen vor, die von einer fehlgeprägten Zelle abstammen. Ein falscher Imprint führt zu einer Aktivierung eines Allels, welches stillgelegt sein sollte, oder zu einer Inaktivierung eines Allels, welches aktiv sein sollte, sodass entweder beide Allele eines geprägten Gens aktiv oder beide inaktiv sind. Da die Dosis eines geprägten Gens für Entwicklung und Wachstum wesentlich ist, führen Imprintingfehler zu spezifischen Erkrankungen (■ **Tab. 1**). Dies wurde zuerst bei Patienten mit PWS und AS gezeigt [14, 15]. Der Verlust von Imprinting spielt auch eine wesentliche Rolle bei Krebskrankungen; diese Übersicht beschränkt sich jedoch aus Platzgründen auf Imprintingregulationen bei genetischen Syndromen.

medgen 2010 · 22:385–391 DOI 10.1007/s11825-010-0244-x
© Springer-Verlag 2010

B. Horsthemke

Genomisches Imprinting und Imprintingfehler

Zusammenfassung

Genomisches Imprinting ist ein epigenetischer Prozess, bei dem die männliche und die weibliche Keimbahn bestimmte Genregionen durch Histonmodifikationen und DNA-Methylierung so prägen, dass nur das väterliche oder nur das mütterliche Allel eines Gens aktiv ist. Genomische Imprints werden in primordialen Keimzellen gelöscht, während späterer Phasen der Keimzellentwicklung neu etabliert und bei den somatischen Zellteilungen während der postzygotischen Entwicklung stabil weitergegeben. Fehler in der Entfernung der Imprints, ihrer Etablierung oder ihrer Erhaltung führen zu falschen epigenetischen Mustern und Expressionsprofilen, die spezifische Erkrankungen verursa-

chen können. Imprintingfehler können spontan, ohne jegliche Änderungen in der DNA-Sequenz, auftreten (primäre Imprintingfehler) oder als Folge einer Mutation in einem *cis*-regulatorischen Element oder einem *trans*-aktiven Faktor (sekundäre Imprintingfehler). Die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Imprintingfehlern ist für die Abschätzung des Wiederholungsrisikos in betroffenen Familien wesentlich.

Schlüsselwörter

Epigenetischer Prozess · Genexpressionsregulierung · Genexpressionsprofile · Genetisches Imprinting · DNA-Methylierung

Genomic imprinting and imprinting defects

Abstract

Genomic imprinting is an epigenetic process by which specific gene regions are marked by the male and the female germ lines by histone modifications and DNA methylation, so that only the paternal allele or only the maternal allele of a gene is active. Genomic imprints are erased in primordial germ cells, newly established during later stages of germ cell development and stably inherited through somatic cell divisions during postzygotic development. Defects in imprint erasure, establishment or maintenance result in aberrant epigenetic patterns and expression profiles and can cause specific diseases.

Imprinting defects can occur spontaneously without any DNA sequence change (primary imprinting defect) or as the result of a mutation in a *cis*-regulatory element or a *trans*-acting factor (secondary imprinting defect). The distinction between primary and secondary imprinting defects is important for assessing the risk of recurrence in affected families.

Keywords

Epigenetic process · Gene expression regulation · Gene expression profiles · Genomic imprinting · DNA methylation

Tab. 1 Imprintingfehler bei genetischen Erkrankungen

Erkrankung	Häufigkeit	Relative Häufigkeit von Imprintingfehlern ^a (%)
Prader-Willi-Syndrom	1/25.000–1/10.000	~1
Angelman-Syndrom	1/20.000–1/10.000	~4
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	1/15.000	~60
Silver-Russell-Syndrom	1/10.000–1/3000	~50
Transienter neonataler Diabetes mellitus	1/800.000–1/400.000	~30
Pseudohypoparathyreoidismus Typ Ib	?	>90
Upd(14)mat-Syndrom ^b	?	?

^a Andere Ursachen sind eine chromosomale Deletion, eine uniparentale Disomie oder eine Genmutation; ^b auch Temple-Syndrom genannt [31].

Tab. 2 Klassifizierung von Imprintingfehlern

	Primäre Epimutation	Sekundäre Epimutation
Ursache	Stochastischer Methylierungsfehler (Fehlerrate evtl. erhöht durch prädisponierende SNPs und Umweltfaktoren)	DNA-Mutation in <i>cis</i> oder <i>trans</i>
Häufigkeit	Relativ häufig	Relativ selten
Betroffene Regionen	Nur eine Region	Eine (bei Mutationen in <i>cis</i>) oder mehrere Regionen (bei Mutationen in <i>trans</i>)
Wiederholungsrisiko	Niedrig	Hoch

SNP „Single nucleotide polymorphism“, Einzelnukleotidpolymorphismus.

In **Abb. 1b–d** sind die Folgen dargestellt, die bei den 3 verschiedenen Arten von Imprintingfehlern auftreten können. Ein Fehler bei der Entfernung des mütterlichen Imprints auf einem Chromosom mütterlicher Herkunft in einer männlichen primordialen Keimzelle führt zu einem Spermium mit einem väterlichen Chromosom mit maternalen Prägung (**Abb. 1b**). Die Befruchtung einer normalen Oozyte durch dieses Spermium führt zu einer Zygote mit maternalem Imprint sowohl auf dem mütterlichen als auch auf dem väterlichen Chromosom. Als Konsequenz tragen alle Zellen des Embryos diesen Imprintingfehler. Fehler bei der Entfernung von Imprints können beim Menschen nicht direkt beobachtet werden, aber PWS-Studien lassen indirekt darauf schließen, dass solche Fehler vorkommen. Auch haben verschiedene Studien gezeigt, dass Spermien von Männern mit Oligozoospermie eine abnormale Methylierung des normalerweise unmethyliert vorliegenden Locus MEST aufweisen können [16]; allerdings wurde bisher nicht nachgewiesen, dass das betroffene Chromosom mütterlichen Ursprungs ist. Grundsätzlich könnten Fehler bei der Entfer-

nung von Imprints auch bei weiblichen primordialen Keimzellen auftreten. Dabei würde ein paternales Methylierungs-imprint nicht ausgelöscht und über die Oozyte auf den Embryo übertragen. Ein derartiger Defekt könnte die Hypermethylierung einer maternalen Kopie der *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion 1 (ICR1) auf Chromosom 11 bei einigen Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) erklären.

Wie in **Abb. 1c** dargestellt, führt ein Fehler bei der Etablierung des maternalen Imprintings während der Oogenese zu einer Oozyte – und nach Befruchtung zu einem Embryo – ohne maternales Imprint auf einem maternalen Chromosom. Auch Fehler bei der Etablierung von Imprints können beim Menschen nicht direkt beobachtet werden, aber sie scheinen eine signifikante Ursache für die Imprintingfehler auf Chromosom 15q bei AS wie auch für Defekte in der Imprintingkontrollregion 2 (ICR2) auf Chromosom 11 bei BWS zu sein. Fehler bei der Etablierung von Imprints können auch bei der Spermatogenese auftreten. Spermien von Männern mit Oligozoospermie z. B. weisen häufig eine Hypomethylierung der *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion auf

[16]. Kinder, die ein solches Chromosom erben, könnten ein Risiko für die Entwicklung eines Silver-Russell-Syndroms aufweisen.

Die **Abb. 1d** zeigt einen Fehler bei der Erhaltung eines mütterlichen Imprints auf einem mütterlichen Chromosom in einer postzygotischen Zelle. Ein solcher Fehler könnte in jeder somatischen Zelle auftreten, aber vermutlich sind Zellen während des Stadiums der globalen Demethylierung besonders empfindlich. Fehler bei der Erhaltung von Imprints führen zu somatischer Mosaikbildung, wenn sowohl die normale als auch die betroffene Zelllinie zum Embryo beitragen [17]. Der postzygotische Verlust eines maternalen Imprints ist eine signifikante Ursache für AS. Der postzygotische Verlust von Methylierung kann auch einen paternalen Methylierungs-imprint betreffen. Ein gutes Beispiel dafür ist der als Mosaik vorliegende Verlust der Methylierung in der *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion bei einer signifikanten Anzahl von Patienten mit SRS. Andererseits können unmethylierte Kontrollregionen nach der Befruchtung auch fälschlich methyliert werden, wahrscheinlich während der globalen Remethylierungswelle zum Zeitpunkt des Blastenstadiums. Beispiele für diesen Mechanismus sind die familiären Imprintingfehler bei PWS.

Imprintingfehler

Ursachen

Imprintingfehler sind das Resultat einer primären oder einer sekundären Epimutation (**Tab. 2**). Der Begriff „Epimutation“ bezieht sich auf eine aberrante DNA-Methylierung oder ein aberrantes Histonmodifizierungsmuster. Eine primäre Epimutation tritt ohne eine DNA-Mutation auf, während eine sekundäre Epimutation als direkte Folge einer DNA-Mutation auftritt [18]. Die DNA-Mutation kann ein Imprintingkontrollelement an einem bestimmten Locus (in *cis* wirkende DNA-Mutation) oder einen Regulationsfaktor, der an einer anderen Stelle im Genom kodiert wird (in *trans* wirkende DNA-Mutation) betreffen.

Primäre Form

Die bisherigen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die meisten Imprintingfehler primäre Epimutationen sind. Wie oben beschrieben, benötigt genomisches Imprinting verschiedene enzymatische Schritte, von denen jeder eine bestimmte Fehlerrate aufweist. Aufgrund der Seltenheit und der stochastischen Natur dieser Fehler ist nur ein Locus betroffen, und das Wiederholungsrisiko ist nicht wesentlich erhöht.

Die Fehlerrate kann jedoch durch häufige genetische Varianten oder durch Umweltfaktoren erhöht sein. Für ein einzelnes Individuum sind solche Faktoren oft nicht bekannt, sodass ein leicht erhöhtes Wiederholungsrisiko nie ganz ausgeschlossen werden kann. In Bezug auf genetische Faktoren kann man zwischen DNA-Varianten in *cis* (am geprägten Locus) und DNA-Varianten an einem in *trans* wirkenden Locus unterscheiden. Es gibt eine überzeugende Datenlage für eine in *cis* wirkende genetische Prädisposition zu Imprintingfehlern in der BWS-Region auf Chromosom 11 [19]. In einer differenziell methylierten Region des *IGF2*-Gens treten 4 Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphisms“, SNPs) in 3 von 16 möglichen Haplotypen auf. Verglichen mit der Kontrollgruppe war bei Patienten mit BWS die Frequenz eines Haplotyps signifikant erhöht und die Frequenz eines anderen Haplotyps signifikant erniedrigt. In ähnlicher Weise scheint es einen bestimmten Haplotyp des IC auf Chromosom 15 zu geben, der das Risiko für sporadische Imprintingfehler, die zu AS führen, erhöht [20]. Das erhöhte Risiko konnte den Allen zweier Polymorphismen zugeordnet werden. Wahrscheinlich enthält das IC eine Bindungsstelle für einen *trans*-aktiven Faktor, der für die Etablierung des maternalen Imprints eine Rolle spielt und vermutlich mit unterschiedlicher Effizienz an die verschiedenen Allele bindet [21]. Darin könnte ein erhöhtes Risiko dafür liegen, dass das maternale Imprint nicht oder nicht vollständig etabliert wird.

Epigenetische Zustände können wahrscheinlich auch durch genetische Variation in *trans* beeinflusst werden, z. B. durch Variationen in den Proteinen, die direkt

oder indirekt bei der Etablierung oder dem Aufrechterhalten von Chromatinmarkierungen beteiligt sind. Hierzu gibt es aber noch keine systematischen Studien.

Die Epimutationsrate kann ebenfalls durch Umweltfaktoren erhöht sein. Ein niedriger Folsäurespiegel z. B. kann in Kombination mit genetischen Risikofaktoren zu einem erniedrigten DNA-Methylierungslevel führen [22]. Niedrige Folsäurespiegel können die Folge von Vitaminmangel oder folsäurearmer Ernährung sein. In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen assistierter Reproduktion („assisted reproduction techniques“, ART) und Imprintingfehlern diskutiert. So scheint das Risiko für das Auftreten von BWS nach ART um das 9-fache erhöht zu sein [23]. Bei Kindern mit Angelman-Syndrom, deren Eltern Fertilitätsprobleme hatten, wurden Imprintingfehler 6-mal häufiger beobachtet als bei AS-Kindern fertiler Paare [24]. Die erhöhte Rate von Imprintingfehlern bei Kindern, die durch ART gezeugt wurden, könnte mit der geringen Fruchtbarkeit der Eltern (und somit mit einer genetischen Prädisposition) zusammenhängen oder aber durch die Prozedur selbst verursacht sein. Es gibt überzeugende Argumente dafür, dass die Stimulation der Ovarien einen Risikofaktor für Imprintingfehler darstellen könnte:

- Sie könnte zu einer Reifung von Oozyten mit „schlechter Qualität“ führen, die ohne Behandlung nicht ovuliert hätten, oder
- eine zu schnelle, durch die Hormonbehandlung provozierte Reifung könnte den DNA-Methylierungsprozess in der Oozyte beeinträchtigen [24].

Sekundäre Form

Imprintingfehler können auch als Resultat einer DNA-Mutation auftreten. Dies scheint allerdings relativ selten der Fall zu sein. So ist z. B. bei nur etwa 10% der Patienten mit AS oder PWS, das durch Imprintingfehler verursacht wurde, dieser Defekt sekundär [25]. Ähnlich selten sind sekundäre Imprintingfehler bei BWS und SRS. Im Gegensatz dazu sind die meisten

Imprintingfehler beim Pseudohypoparathyreoidismus vom Typ Ib eine sekundäre Epimutation, nämlich die Folge einer Deletion stromaufwärts vom oder innerhalb des *GNAS*-Locus.

Eine DNA-Mutation kann Imprinting verhindern, wenn sie ein *cis*-aktives regulatorisches Element einer geprägten Chromosomenregion betrifft. Gegenwärtig gibt es keine Daten, die darauf schließen lassen, dass die Entfernung von Imprints durch ein in *cis* wirkendes Element reguliert wird, aber die Etablierung und die Erhaltung von Imprints sind auf solche Elemente angewiesen. So wird z. B. das AS-SRO-Element des IC auf Chromosom 15 für die Etablierung des maternalen Imprints in der mütterlichen Keimbahn benötigt. Ein Verlust dieses Elements führt zum Fehlen des maternalen Imprints auf einem maternalen Chromosom 15, sodass ein Kind, welches dieses Chromosom erbt, AS entwickeln wird. Eine Deletion des PWS-SRO-Elements des IC auf Chromosom 15 führt hingegen zu einer postzygotischen Anreicherung der DNA-Methylierung in der chromosomalen PWS/AS-Region, was dann wie ein maternales Imprint erscheint und bei einem Kind, das dieses Chromosom erbt, zu PWS führt. Dieses Element wird also dafür benötigt, den unmethylierten Zustand des väterlichen Chromosoms aufrechtzuerhalten. Sekundäre Imprintingfehler wurden auch in BWS beobachtet. In den meisten dieser Fälle ist die ICR₁ betroffen.

DNA-Mutationen, die einen Imprintingfehler verursachen, können entweder de novo in der Keimbahn entstehen oder von einem Mutationsträger auf die Nachkommen übertragen werden. De novo-Mutationen sind mit einem geringen Wiederholungsrisiko behaftet, falls der Elternteil nicht ein Keimbahnmosaik aufweist. Vererbte Mutationen gehen hingegen mit einem 50%igen Wiederholungsrisiko einher. Da solche Mutationen nur das maternale oder das paternale Imprinting (je nachdem, welches Element betroffen ist) behindern, können sie stumm durch die Keimbahn eines Geschlechts weitergegeben werden und führen nur dann zu einem Imprintingfehler, wenn sie die Keimbahn des anderen Geschlechts durchlaufen. Daher können Cousins oder weiter entfernte Verwand-

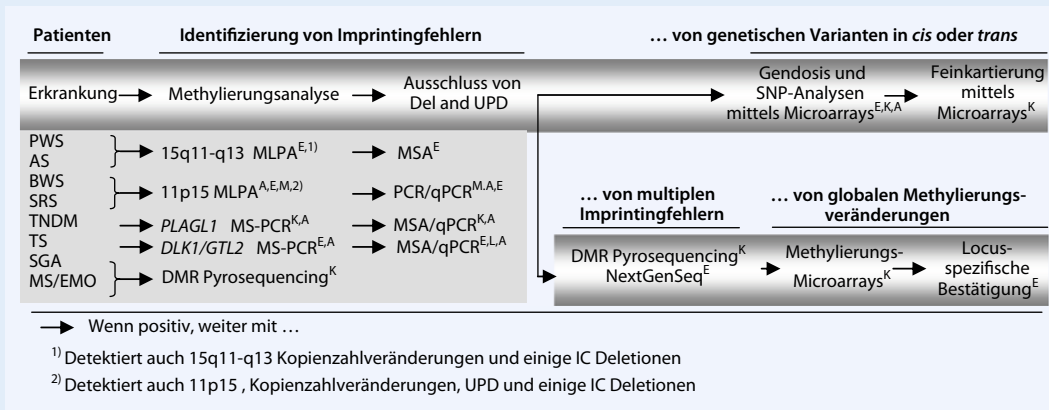


Abb. 2 ▲ Forschungspipeline des Netzwerks „Imprintingkrankungen“. *PWS* Prader-Willi-Syndrom, *AS* Angelman-Syndrom, *BWS* Beckwith-Wiedemann-Syndrom, *SRS* Silver-Russell-Syndrom, *TNDM* transienter neonataler Diabetes mellitus, *TS* Temple-Syndrom (upd(14)mat-Syndrom), *SGA* „short for gestational age“, *MS/EMO* „macrosomia/early onset obesity“. Genetische Defekte: *Del* große Deletion, *UPD* uniparentale Disomie. Techniken: *MLPA* „multiplex ligation-dependent probe amplification“, *PCR* Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“), *MS-PCR* methylierungsspezifische PCR, *qPCR* quantitative PCR, *MSA* Mikrosatellitenanalyse, *NextGenSeq* „next generation bisulfite sequencing“. *DMR* Differenziell methylierte Region, *IC* Imprinting Center. Beteiligte Standorte: *E* Essen; *L* Lübeck; *A* Aachen; *M* Mainz; *K* Kiel

te betroffen sein, obwohl ihre Eltern nicht betroffen sind. Es muss aber bedacht werden, dass Cousins nur dann betroffen sein können, wenn sie von Geschwistern gleichen Geschlechts abstammen.

Fast alle DNA-Mutationen, die in *cis* Imprintingfehler verursachen, sind Mikrodeletionen von mehreren bis zu ein paar Tausend Basenpaaren. Punktmutationen in *cis*-regulatorischen Imprintingelementen scheinen selten zu sein. Möglicherweise enthalten solche Elemente einige redundante Sequenzen, welche den Imprintingprozess gegen Punktmutationen abpuffern, oder die an sie bindenden, in *trans* wirkenden Faktoren können Punktmutationen tolerieren. Möglicherweise blieben Deletionen von nur wenigen Basenpaaren oder Punktmutationen aber auch unentdeckt, weil die kritischen Regionen bei der Routinediagnostik der Patienten oft nicht sequenziert werden. So wurden z. B. bei extensiver Analyse der ICR1 auf Chromosom 11 bei Patienten mit BWS und SRS sehr kleine Läsionen aufgedeckt [26].

Außer durch DNA-Mutationen, die ein *cis*-regulatorisches Element beeinflussen, können Imprintingfehler auch durch Mutationen in einem *trans*-aktiven Gen, das für einen Imprintingfaktor kodiert, hervorgerufen werden. Einige der Enzyme, die an der Etablierung oder Erhaltung von Imprints beteiligt sind, wurden bereits oben diskutiert. Da keins die

ser Proteine für eine besondere Imprintingregion spezifisch ist und dies wahrscheinlich auch für weitere, bisher nicht bekannte Faktoren zutrifft, ist anzunehmen, dass Mutationen in diesen Genen auf viele verschiedene geprägte Loci einwirken.

Bisher wurden 3 Gene gefunden, die bei Patienten mit multiplen Imprintingfehler mutiert vorlagen: *NLRP7*, *NLRP2*, und *ZFP57*; allerdings ist die Rolle der Genprodukte bei der Imprintingregulation unklar. NLRPs gehören zur Familie der CATERPILLER-Proteine. Trägerinnen einer biallelischen Mutation im *NLRP7*-Gen sind phänotypisch normal, erzeugen aber Oozyten, denen alle mütterlichen Imprints fehlen oder deren mütterliche Imprints in den ersten Zellteilungen verloren gehen [27]. Die Befruchtung betroffener Eizellen führt zu biparentalen Blasenmolen, die sich phänotypisch nicht von kompletten androgenen Blasenmolen unterscheiden, in denen abnormales extraembryonales Gewebe proliferiert, während eine Embryoentwicklung nicht stattfindet. Keimbahnmutationen in *NLRP2* wurden bei familiärem BWS gefunden [28]. Betroffene Kinder zeigten einen Verlust der maternalen Methylierung an der ICR2 auf Chromosom 11. Das ICR1-Imprint war nicht betroffen. Mackay et al. berichteten über *ZFP57*-Mutationen in Familien mit Verlust des maternalen Imprintings an verschiedenen

Loci, einschließlich des Locus für transienten neonatalen Diabetes mellitus [29].

Imprintlesefehler

Genomische Imprints werden von DNA- und Chromatinbindungsproteinen gelesen, welche die Transkription regulieren. Die Folgen können direkt oder indirekt sein und betreffen diverse Mechanismen, wie Stilllegung des Promoters, Transkriptionsinterferenz durch Antisensetranskription oder Enhancerblockade durch Chromatininsulatoren. Mutationen, die ein in diese Prozesse eingebundenes Protein betreffen, dürften vermutlich abnorme Genexpressionsmuster verursachen, obwohl die Imprints korrekt etabliert und erhalten wurden. Imprintlesefehler könnten so zu einer Erkrankung beitragen. Allerdings gibt es bis jetzt noch keine entsprechenden Beispiele für den Menschen. Die Annahme, dass der Verlust des Methylcytosinbindepoteins MeCP2, welches beim Rett-Syndrom mutiert vorliegt, die Expression des AS-Gens *UBE3A* beeinflusst, wurde von anderen Studien nicht bestätigt [30].

Netzwerk „Imprintingkrankungen“

Seit 2009 fördert das BMBF im Rahmen des Förderprogramms „Seltene Erkrankungen“ das Netzwerk „Imprinting-

krankungen“, das vom Autor koordiniert wird. Mitbeteiligt sind das Institut für Humangenetik in Essen (Dr. K. Buiting, Dr. A. Albrecht, Dr. A. Küchler, Prof. Dr. B. Horsthemke), das Institut für Humangenetik in Lübeck (Prof. Dr. G. Gillissen-Kaesbach), das Institut für Humangenetik in Aachen (Prof. Dr. T. Eggermann), die Kinderklinik Mainz (PD Dr. D. Prawitt) und das Institut für Humangenetik in Kiel (Prof. Dr. R. Siebert). Ziel des Netzwerks ist die Beschreibung des molekularen und klinischen Spektrums von Prader-Willi-Syndrom, Angelman-Syndrom, Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Silver-Russell-Syndrom, transientem neonatalem Diabetes mellitus und Upd(14)mat-Syndrom (Temple-Syndrom). Dabei liegt der Schwerpunkt auf Imprintingfehlern. Darüber hinaus wird auch untersucht, ob einige Kinder mit SGA („short for gestational age“) und MS/EMO („macrosomia/early onset obesity“) einen Imprintingfehler aufweisen. Teilziele des Vorhabens sind die

- Identifikation neuer Mikrodeletionen/-duplikationen geprägter Regionen,
- Identifikation neuer Imprinting-Center-Mutationen,
- Bestimmung der Häufigkeit multipler Imprintingfehler,
- Identifikation genetischer Varianten, die das Imprinting in *trans* beeinflussen,
- Identifikation neuer Imprintingkrankungen,
- Bestimmung des phänotypischen Spektrums von Imprintingkrankungen und
- Verbesserung der genetischen Diagnostik und Beratung.

Wesentlicher Bestandteil des Netzwerks ist eine Forschungspipeline (■ **Abb. 2**) und eine zentrale Datenbank.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. B. Horsthemke
 Institut für Humangenetik,
 Universitätsklinikum Essen
 Hufelandstraße 55, 45122 Essen
 bernhard.horsthemke@uni-due.de

Danksagung. Der Autor dankt Dr. Gabriele Prescher für Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts und dem BMBF für die Förderung des Netzwerks „Imprintingkrankungen“ (01GM0882-886).

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2:21–32
2. Buiting K, Saitoh S, Gross S et al (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9:395–400
3. Wilkins JF, Haig D (2003) What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet* 4:359–368
4. McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179–183
5. Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548–550
6. Engel E (1980) A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6:137–143
7. Nakamura T, Arai Y, Umehara H et al (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 9:64–71
8. Ooi SK, Bestor TH (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 134:1145–1148
9. Kaneda M, Okano M, Hata K et al (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429:900–903
10. Ciccone DN, Su H, Hevi S et al (2009) KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461:415–418
11. Li X, Ito M, Zhou F et al (2008) A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 15:547–557
12. Dittrich B, Buiting K, Korn B et al (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* 14:163–170
13. Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N et al (2009) Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev* 23:105–117
14. Glenn C, Nicholls R, Robinson W et al (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi syndrome patients. *Hum Mol Genet* 2:1377–1382
15. Reis A, Dittrich B, Greger V et al (1994) Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* 54:741–747
16. Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D et al (2009) Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19. *Int J Androl* 33:642–649
17. Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U et al (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* 13:2547–2555
18. Horsthemke B (2006) Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:45–59
19. Murrell A, Heeson S, Cooper WN et al (2004) An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 13:247–255
20. Zogel C, Böhringer S, Groß S et al (2006) Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 14:752–758
21. Kaufman Y, Heled M, Perk J et al (2009) Protein-binding elements establish in the oocyte the primary imprint of the Prader-Willi/Angelman syndromes domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10242–10247
22. Friso S, Choi SW, Girelli D et al (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5606–5611
23. Halliday J, Oke K, Breheny S et al (2004) Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 75:526–528
24. Ludwig M, Katalinic A, Groß S et al (2005) Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42:289–291
25. Buiting K, Gross S, Lich C et al (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
26. Demars J, Shmela ME, Rossignol S et al (2010) Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet* 19:803–814
27. Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT (2002) A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 416:539–542
28. Meyer E, Lim D, Pasha S et al (2009) Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann syndrome). *PLoS Genet* 5:e1000423
29. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM et al (2008) Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 40:949–951
30. LaSalle JM (2007) The Odyssey of MeCP2 and parental imprinting. *Epigenetics* 2:5–10
31. Buiting K, Kanber D, Martín-Subero JI et al (2008) Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum Mutat* 29:1141–1146