

Epigenetik

Einführung

In den bisherigen Kursabschnitten haben wir uns hauptsächlich mit der Vererbung von Merkmalen zwischen einem Organismus und seinen Nachfahren beschäftigt. Vererbung findet aber auch bei jeder Zellteilung innerhalb eines Organismus statt. Wenn sich eine Zelle teilt, entstehen aus dieser Mutterzelle zwei Tochterzellen die in der Regel sehr viele Merkmale mit der Mutterzelle teilen.

Ist z.B. die Mutterzelle eine Leberzelle sind auch die Tochterzellen Leberzellen. Natürlich besitzen Mutter- und Tochterzellen die gleiche Genomsequenz, aber dies allein kann die Ähnlichkeit von Mutter- und Tochterzellen nicht erklären. Die Nerven- und Leberzellen eines Individuums besitzen ja auch die gleiche Genomsequenz!

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Organismus basieren vielmehr auf unterschiedlichen Expressionsmustern der Gene. Die Ähnlichkeit von Mutter- und Tochterzellen basiert also auf der Existenz von Mechanismen die es Zellen erlaubt, ihre Genexpressionsmuster an Tochterzellen weiterzugeben.

Die Epigenetik (die Vorsilbe "Epi-" bedeutet so viel wie "hinzu" oder "darüberhinaus") beschäftigt sich mit genau solchen Mechanismen der Vererbung, in denen die vererbte Information nicht wie in der klassischen Genetik in der DNA Sequenz der Gene, sondern in den Expressionsmustern der Gene codiert ist. Diese Veränderungen in der Genexpression werden in der Regel durch reversible chemische Modifikationen der DNA oder der Histone verursacht, die dann an die Tochterzellen weitergegeben werden.

Der Begriff Epigenetik wird von unterschiedlichen Forschern unterschiedlich benutzt, wichtig ist, dass es um relativ stabile molekulare Veränderungen geht, die nicht auf einer Veränderung der DNA Sequenz basieren. Teilweise wird der Begriff Epigenetik benutzt, um ganz generell langfristig stabile Veränderungen der Genregulation zu beschreiben, selbst wenn bisher nicht gezeigt wurde, dass diese von Mutter- auf Tochterzellen vererbt werden. Ein Beispiel ist, durch Histonmodifikationen bedingte, lokale Veränderung der Chromatin Packungsdichte und die damit gekoppelte Veränderung der Genexpression. Ein anderes Beispiel sind die Effekte von nicht-kodierenden RNAs auf die Genexpression. Manchmal werden solche Mechanismen die im strengeren Sinne weder genetisch noch epigenetisch sind auch als nicht-genetische (engl. *non-genetic*) Vererbungsmechanismen bezeichnet.

In den letzten Jahren ist klargeworden, dass epigenetische Mechanismen – über die mitotische Zellteilung hinaus - auch an der Übertragung von Eigenschaften zwischen Eltern- und Kindesgeneration beteiligt sein können (also Vererbung während meiotischer Zellteilung). Diese sogenannte transgenerationale epigenetische Vererbung wird der Gegenstand der Vorlesung dieser Lerneinheit sein.

Die Fortschritte der Epigenetik haben in den letzten Jahren viel Aufsehen erregt. Das rührt zum einen daher, dass die Epigenetik das Potential hat, neue mechanistische Einblicke und Therapien für Krankheiten zu liefern, da epigenetische Veränderungen im Gegensatz zu Veränderungen der DNA Sequenz (Mutationen) reversibel/modifizierbar sind. Zum anderen kann die transgenerationale epigenetische Vererbung möglicherweise Einblicke in Krankheiten mit bisher unverständlichen Vererbungsmustern liefern.

Allerdings wird die Epigenetik, insbesondere in der populären Presse, auch als Beispiel für einen lamarckschen Vererbungsmechanismus präsentiert, der nicht dem klassischen darwinistischen Evolutionsmechanismus (Zufallsmutation und Selektion) entspricht. Dies bedeutet natürlich nicht, dass die klassische darwinistische Evolutionstheorie durch diese Entdeckungen in Frage gestellt würde. Vielmehr bietet die Epigenetik einen Mechanismus, der parallel zur klassischen Darwinistischen Evolution die reversible Vererbung von Eigenschaften ermöglicht. Anders als bei der klassischen Darwinistischen Evolution, bei der sich eine zufällig auftretende Mutation in einem Individuum erst über mehrere Generationen in einer Population verbreiten muss, kann jeder Elternorganismus in einer Population eine epigenetische Veränderung direkt an seine Nachfahren weitergeben. Die epigenetische Veränderung kann sich also bereits innerhalb einer Generation in der ganzen Population ausbreiten. Die Eltern-generation kann so ihre Nachfahren möglicherweise auch auf molekularer Ebene, auf einer evolutionär kurzen Zeitskala, auf Umweltveränderungen vorbereiten.

Molekulare Mechanismen

Chromatinstruktur reguliert Genexpression

Die DNA im Kern einer eukaryotischen Zelle liegt nicht frei vor, sondern ist eng auf Histonproteinen aufgespult. Nur dadurch ist es überhaupt möglich, die DNA im kleinen Zellkern kompakt unterzubringen. DNA und Histone werden zusammen als Nucleosome bezeichnet. Generell gilt, je dichter die DNA um Histone gewickelt ist (je kompakter

die resultierenden Nucleosome untereinander gepackt sind), desto unwahrscheinlicher ist es, dass die entsprechenden DNA Sequenzen transkribiert werden, weil die Transkriptionsmaschinerie nicht an die DNA binden kann. Besonders dicht gepackte DNA Regionen werden dabei als Heterochromatin und wenig dicht gepackte als Euchromatin bezeichnet. Prozesse welche die Packung von DNA Regionen verdichten oder lockern werden als „chromatin remodelling“ bezeichnet.

Histon Modifikation

Das zentrale strukturelle Element des Chromatins ist das Nucleosom. Der Kern des Hockeypuck-ähnlichen Teils des Nucleosomes um den die DNA gewickelt ist, besteht aus einem Octamer von Histonproteinen (jeweils 2 Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4). Diese Histonproteine besitzen ausser diesem zentralen wohlstrukturierten Teil auch noch jeweils einen flexiblen Teil

Every cell in your body carries essentially the same DNA code, yet cells behave differently (for instance, as a blood cell or a retinal cell) depending on their function in the body. Epigenetic mechanisms play an important role in explaining why cells that all have the same DNA code use that code in different ways—various enzymatic reactions change how tightly DNA is wound around protein histones, which affects whether or not a segment of DNA that carries a gene is “exposed” to factors that trigger transcription and to transcriptional machinery.

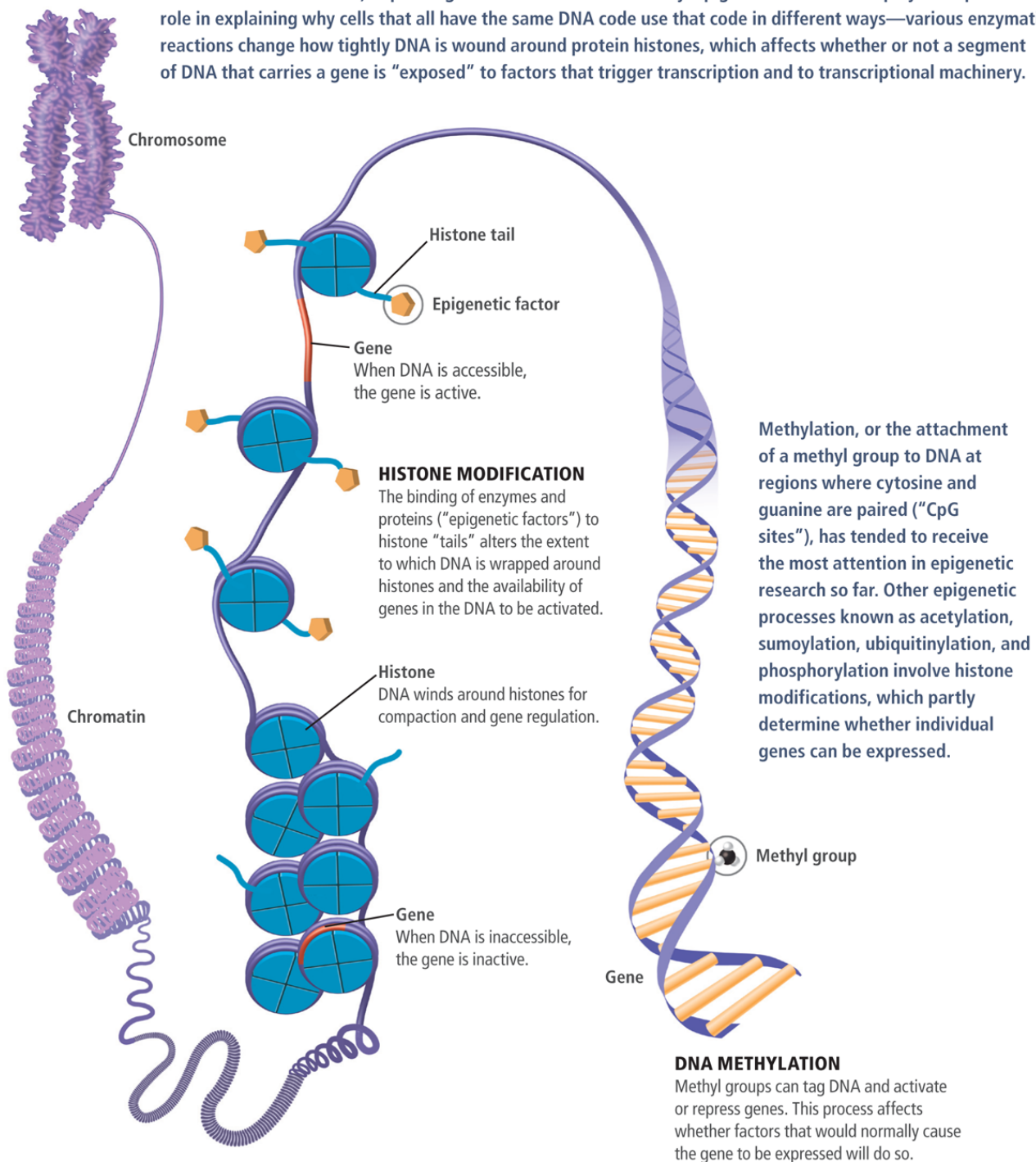


Abbildung 1 Schematischer Überblick der chemischen und strukturellen Modifikationen von DNA, die die Genaktivität beeinflussen.

(den sogenannten *histone tail*). Die sich in diesen *tails* befindenden Aminosäureseitenketten sind sehr häufig post-translational modifiziert. Zu diesen Modifikationen gehören die mono-, di- und tri-Methylierung von Lys; Methylierung von Arg, Phosphorylierung von Ser, Thr, Tyr und Acetylierung von Lys sowie Ubiquitinierung und SUMOylierung.

Die exakten Details der Zusammenhänge zwischen den chemischen Modifikationen an diesen Histon *tails*, der DNA Packung und der Genaktivität sind weiterhin Gegenstand aktiver Forschung, aber bestimmte Tatsachen gelten als etabliert:

- Histonmodifikationen wirken lokal. Auf demselben Chromosom können mehrere durch Histonmodifikation inaktivierte und aktivierte DNA Abschnitte nebeneinander existieren. Ausnahmen bestätigen aber hier die Regel. Bei der Inaktivierung eines der X-Chromosome in weiblichen Zellen wird z.B. das gesamte Chromosom dicht gepackt und transskriptional inaktiviert.
- Histonmodifikationen und deren Effekte auf DNA Packung und Genaktivität sind reversibel und sowohl die Modifikation als auch die Entfernung von Modifikationen werden durch spezifische Enzyme kontrolliert (sog. „Readers“ und „Writers“). Die Aktivität dieser Enzyme ist wiederum durch die Zelle kontrolliert.
- Die Acetylierung von Lysin Seitenketten in den Histon *tails* verändert die elektrostatischen Eigenschaften der Histone (freie Lysin Seitenketten tragen eine positive Ladung wohingegen acetyliertes Lysin ungeladen ist) und beeinflussen dadurch die Stärke der Bindung zwischen den Histonen und der DNA. Die Acetylierung schwächt diese Assoziation und acetylierte Histone sind in der Regel mit einer weniger dichten Packung und aktiveren Transkription der DNA assoziiert.
- Die Effekte der Methylierung von Lysin Seitenketten auf die Chromatindichte und Genexpression scheinen, anders als die Acetylierung, nicht auf einem generellen physico-chemischen Mechanismus zu beruhen, sondern sind sehr spezifisch für den Grad der Methylierung (mono-, di- oder tri-) und die genaue Aminosäure die modifiziert ist. Es ist daher davon auszugehen, dass der Einfluss des Methylierungsstatus von Histon *tails* auf die Chromatindichte über die Erkennung dieser Methylierungsmuster durch spezifische Erkennungsproteine funktioniert.

DNA Methylierung

Wenn man im Kontext der Epigenetik von DNA Methylierung spricht, so bezieht man sich dabei auf die spezifische Methylierung an der 5 Position des Cytosin Basenrings (Abbildung 2). Überwiegend sind dabei Cytosin Basen methyliert, die in der linearen DNA Sequenz einer Guanin Base vorausgehen. Man spricht dabei auch oft von CpG Dinukleotiden, wobei das „p“ für die Phosphatgruppe des DNA Rückgrats steht. Diese Methylierung wird durch spezifische Enzyme, sogenannte DNA Methyltransferasen (DNMTs) ausgeführt. Dabei dient der Cofaktor S-Adenosyl-Methionine (SAM) als Quelle der Methylgruppen.

Die Produktion von SAM wiederum beruht auf der Verfügbarkeit von sogenannten Methylgruppen-Donoren (z.B. Folsäure) die mit der Nahrung aufgenommen werden. Wie Sie später sehen werden, kann die Verfügbarkeit dieser Methylgruppen-Donoren den Grad der DNA Methylierung beeinflussen und so epigenetische Effekte auslösen.

Generell ist anzumerken, dass in Säugetierzellen die überwiegende Anzahl der Cytosin Basen in CpG Dinukleotiden methyliert sind. In somatischen Zellen ist die DNA Methylierung von CpGs also nicht die Ausnahme, sondern viel mehr der Regelfall.

Wichtig zu verstehen ist auch, dass die „Basisfunktionen“ einer Cytosinbase nach der Methylierung weitestgehend unverändert bleiben. Methyl-Cytosin paart sich in der DNA weiterhin mit Guanin und wird, bei der Transkription, sofern sie stattfindet, wie ein normales Cytosin transkribiert.

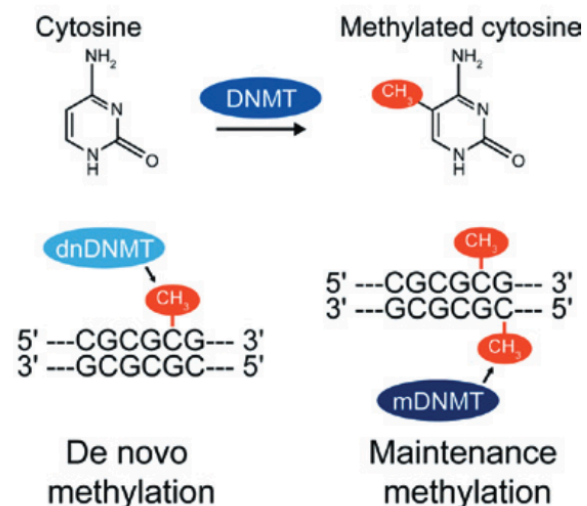


Abbildung 2 Die Methylierung von DNA ist ein ganz zentraler Mechanismus der Epigenetik. Dabei wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe an der 5 Position einer Cytosin Base eingefügt (oben). Man unterscheidet zwischen zwei Arten von DNMTs. De novo DNMTs sind in der Lage Methylierungen in bisher nicht modifizierten DNA Abschnitten einzuführen. Maintenance DNMTs hingegen sorgen dafür, dass nach der DNA Synthese das Methylierungsmuster des Mutterstrangs an den Tochterstrang weitergegeben wird.

Enzyme der DNA Methylierung

Bei der Methylierung von DNA unterscheidet man zwischen der *de novo* Methylierung (also der Methylierung eines Sequenzabschnitts der bisher nicht methyliert war) und der *maintenance* Methylierung. Letztere ist der Mechanismus, durch den Methylierungsmuster bei der DNA Replikation vom Mutterstrang (engl. *template strand*) auf den neu synthetisierten Tochterstrang übertragen werden. Dabei erkennt die für die *maintenance* Methylierung verantwortliche DNA-Methyltransferase methylierte Cytosine auf dem Mutterstrang und fügt Methylgruppen an den entsprechenden Cytosinen auf dem Tochterstrang ein.

Diese beiden Methylierungsprozesse werden von unterschiedlichen Enzymen durchgeführt. Dabei ist DNMT1 für die *maintenance* Methylierung und DNMT3A, sowie DNMT3B für die *de novo* Methylierung zuständig.

DNA Methylierung beeinflusst Protein-DNA Interaktionen

Die Methylgruppe von methylierten Cytosin Basen zeigt in die *major groove* der DNA. Diese *major groove* spielt auch in der Erkennung von DNA Sequenzen durch sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine eine wichtige Rolle. Es ist daher nicht überraschend, dass DNA-Methylierung die Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) beeinflusst. Andererseits gibt es Proteine (z.B. MECP2) die ganz gezielt methylierte CpG Dinukleotide erkennt und bindet. Diese Methyl-CpG Bindungsproteine können dann z.B. das Binden anderer Proteine verhindern oder fördern.

Muster der DNA Methylierung

Im Genom eukaryotischer Zellen sind CpG Dinukleotide nicht gleichmässig verteilt, sondern treten gehäuft in sogenannten *CpG islands* auf (Abbildung 3). *CpG islands* finden sich besonders häufig in Promotoren (ca. 60% aller Promotoren enthalten CpG *islands*.) und in auf Retro-Transposons zurückgehenden Sequenzabschnitten.

Da die Methylierung von DNA an der Weitergabe von zelltyp-spezifischen Eigenschaften von Mutter- zu Tochterzelle beteiligt ist, sollte man erwarten, dass die Methylierungsmuster in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich ausfällt. Genomweite Vergleiche der Methylierung in unterschiedlichen Zelltypen haben genau solche zelltyp-spezifischen Methylierungsmuster gefunden. Dabei stellt sich heraus, dass sehr viele CpG Dinukleotide in allen Zelltypen gleich stark methyliert sind, z.B. CpGs in Retrotransposonsequenzen. Hingegen zeigen die CpG *islands* in Promotorregionen von Genen starke zelltyp-spezifische Variationen in der Methylierung. Man bezeichnet,

```
CATTCCGCTTCTCTCCCGAGGTGGCGCGTGGGA
GGTGTCTTTTCTCCGGTCTCTGAAGAAATAGGCCAGG
CAGCTTCCCGCGGATGCGCTCATCCCTCTCCG
GGTTCCCGCTCCACCGCGCGCTTCCGGCGGTT
CAGCTGCGAGATGTTTTCGAGACAAATGATTC
CACTCTCGCGCTCCCATGTTGATCCAGCTCTCT
CTGCGCGCTAGAGACCTGGGCCCGCGCG
CTCCACTCAGTCAATTTTGTCCCGTATAAGCGG
GATTATCGGGTGGCTGGGGCGCTGATTCGCA
CGAATGCCCTTGGGGTCAACCGGAGGGAATC
CGGCTCCCGCTTGGCCAGCCCGCACCCTGCTGT
TGAGCCGGCCGAGGGCCACAGGGGGCTCG
ATGTTCTCGAGCCCGCGCAGCAGCCCACTCC
CGGCTCACCCCTCGATTGGCTGGCGCCCGAG
CTCTGTGCTGATTGGTCACAGCCCGTGTCCGT
CGCGGCCCGGGGCGGATCGAGGTGACCGCGCA
GAGGCCAGCTCGGGCGGTGTCGCGCGCGCG
GACTCGGGCGAGTTTCCCGAGGGCGAAGCG
GGGCAGTGTGACGACGCTGCTGGGAGGCGC
CGCGGGCGCTCGAGCAGCTCCCGTCTCCCA
GCGCTCACCGCGCGCTCGCGCGCTGGCC
TCGCGCTCGCGCAGCTCTGTGCGCGCCAGC
CGCCACCTCCCACTCGATGCGGTGCGCGCT
TGCGTAGGGGCTCGAGCGCGCGCGCGCG
CTCGCGCGCGCTGCTCGCTCGCGCTGAGGTGCT
CGGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GCTCTCTGTGACCGCGTCCCGCGCGCTGCTCG
AGCGCGCTGAGGTAAAGCGCGGGGCTGGCG
GGCGCTTCCCGCGGAGGAGCGCGCGCGCG
GGTCCCGCGGGGTCTGAGGGGA
```

Abbildung 3 Als *CpG islands* gezeichnet man DNA Abschnitte von einigen hundert Nukleotiden Länge in denen CpG Dinukleotide wesentlich häufiger auftreten als im übrigen Genom. Links die Sequenz einer CpG island aus einem eukaryotischen Promotor. Das Startcodon ist in rot. Rechts zum Vergleich eine typische genomische Sequenz in der ein CpG nur ca. alle 100 Basenpaare auftritt.

einen solchen, in unterschiedlichen Zelltypen, unterschiedlich stark methylierten Sequenzabschnitt als DRM (engl. *differentially methylated region*).

DNA Methylierung reduziert Transkription

Die Methylierung von CpG Dinukleotiden in regulatorischen DNA Sequenzen führt in der Regel zu einer Reduktion der Transkription (*transcriptional silencing*). Je höher der Grad der Methylierung desto geringer die Transkription.

DNA Demethylierung

Methylierte Cytosin Basen sind chemisch sehr stabil. Eine spontane Demethylierung galt lange als sehr unwahrscheinlich, obwohl neu identifizierte Enzyme (ten eleven translocation, TETs) offenbar in der Lage sind, DNA dynamisch zu regulieren. Durch sukzessive Oxidation und Deaminierung (Abbildung 4) entsteht aus Methyl-Cytosin zunächst Hydroxy-Methyl-Cytosin und dann Hydroxy-Methyl-Uracil welches dann von den generellen DNA Reparaturmechanismen der Zellen als beschädigte Base erkannt und durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt wird.

Während diese Mechanismen aber noch in der Entdeckungsphase sind, weiss man, dass die Entfernung von Methylmarkierungen auch auf Unterdrückung der Methylierung des neusynthetisierten Tochterstands nach der DNA Replikation basieren kann. Wird der Tochterstrang nicht mehr methyliert geht diese Methylierung ab der zweiten Zellteilung verloren. Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass Methyl-Cytosin von DNA-Reparatur Enzymen erkannt und entfernt wird.

Eine Rolle für nichtcodierende RNAs in der Epigenetik

In einer der letzten Kursabschnitte (RNAi & CRISPR) haben Sie schon die vielfältigen Rollen und die Entstehung von nichtcodierenden RNAs kennengelernt. Solche nichtcodierenden RNAs (z.B. siRNAs, micro RNAs und small nuclear RNAs) sind zunehmend auch in der Kontrolle der Chromatinstruktur impliziert.

Ob solche ncRNA-basierten Mechanismen aber formal als epigenetischer Mechanismus betrachtet werden sollen oder nicht, ist zurzeit noch Gegenstand aktiver Diskussion.

Der wichtigste Hinweis, dass ncRNAs an epigenetischen Mechanismen beteiligt sind, kommt dabei von Experimenten mit Zellen in denen der RNAi Mechanismus genetisch

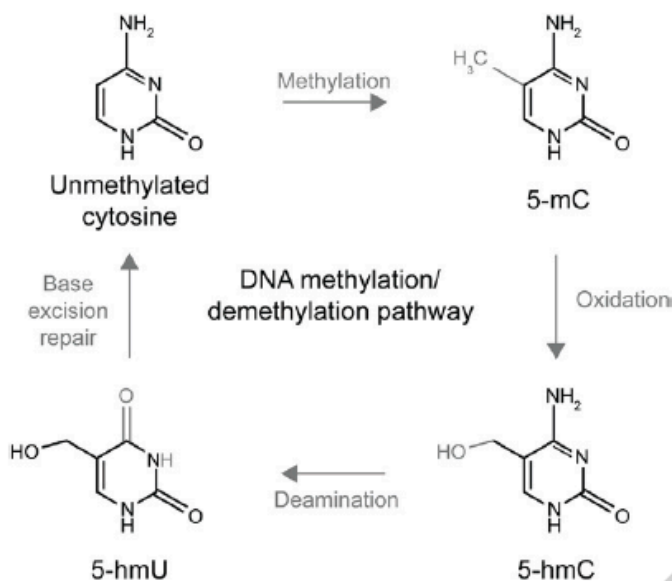


Abbildung 4 Demethylierung von Cytosin Basen über den Hydroxy-Methyl Pathway. Auf die enzymkatalysierte Oxidation von Methyl-Cytosin zu Hydroxymethyl-Cytosin folgt die Deaminierung, bei der Hydroxy-Methyl-Uracil entsteht. Dieses wird von DNA-Reperatur Enzymen als beschädigte Base erkannt und durch ein zur gegenüberliegenden Base (G) komplementäres, nicht methyliertes Cytosin ersetzt.

inaktiviert wurde. Solche Zellen zeigten die typischen mit epigenetischer Regulation assoziierten Merkmale: eine Lockerung der Heterochromatinstruktur, Veränderungen der Histonmethylierung und Gene die normalerweise nicht aktiv sind, wurden transkribiert.

Darüberhinaus gibt es erste Anzeichen dafür, dass längere ncRNAs daran beteiligt sind, die für das Chromatin Remodelling benötigten Enzyme zu bestimmten Genomregionen zu rekrutieren.

Die Agouti Maus: Ein klassisches Fallbeispiel der Epigenetik

Abbildung 5 zeigt sogenannte A^{vy}/a (Agouti) Mäuse, eine besondere Maus Zuchtlinie. Eine Besonderheit dieser Agouti Mäuse ist, dass sich der Phänotyp bezüglich Fellfarbe, Fettleibigkeit und Anfälligkeit für Krankheiten deutlich unterscheiden kann, obwohl sie die gleiche Genomsequenz besitzen und unter exakt gleichen Umweltbedingungen aufgewachsen sind. Diese Eigenschaften können zudem von der Mutter an ihre Nachfahren weitergegeben werden.

Ausserdem stellte sich heraus, dass in diesen Mäusen die Umweltbedingungen (insbesondere die Nahrung) unter denen die Elterngeneration aufgewachsen sind, einen deutlichen Einfluss auf den Phänotyp haben. Die Suche nach dem offensichtlich nicht-genetischen Mechanismus - die Mäuse sind ja alle isogen - mit dem der Phänotyp von Generation zu Generation weitergegeben wird und wie die Ernährung den Phänotyp des Nachwuchses beeinflusst, hat letztendlich zur Entdeckung der epigenetischen Mechanismen geführt.



Abbildung 5 Fünf Agouti Mäuse, die trotz identischem Genotyp und gleicher Aufzucht deutlich unterschiedliche Phänotypen zeigen.

Das Agouti Gen steuert die Fellfärbung

Wildtyp Mäuse besitzen ein Fell, das dem der am rechten Bildrand von Abbildung 5 sitzenden Maus ähnelt. Auf der Körperoberseite wachsende Haare sind an der Spitze sehr dunkel (braun bis schwarz), besitzen näher am Körper aber einen gelblichen Abschnitt. Die Haare an der Körperunterseite sind hingegen durchgehend gelblich. Dieses Farbmuster beruht auf der genauen Koordination der Expression des Agouti Gens mit dem Wachstum eines Haarfollikels. Dieses Agouti Gen produziert ein parakrines Signalprotein, welches die Haarfollikel dazu anregt die Produktion der Haarpigmente von dunkel auf gelb umzuschalten. Das so funktionierende wildtyp Allel wird mit „A“ und ein Nullallel, in dem zwar der Promotor aktiv ist, das Transkript aber kein funktionierendes Agouti Signalprotein generiert, als „a“ bezeichnet. Eine a/a Maus produzieren also nie ein Agouti Signalprotein, schaltet die Pigmentproduktion nie von dunkel auf gelb um und hat daher ein durchgehend dunkles Fell.

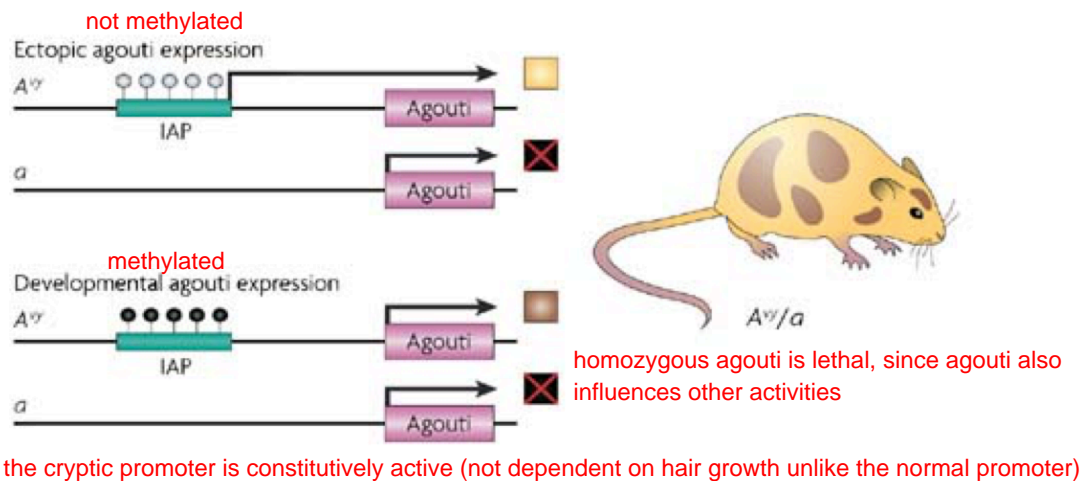


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Agouti Locus in einer A^{vy}/a Maus. Im a Allel (jeweils unten) ist das Agouti Gen zwar unter der Kontrolle des „natürlichen“ Agouti Promotors, aber das Transkript ist inaktiv und eine a/a Maus würde deshalb eine dunkelbraune bis schwarze Fellfarbe (quadratische Box) haben. Im A^{vy} Allel kann die Expression des Agouti Gens von einem, sich in der benachbarten retrotransposonalen IAP Sequenz befindlichen, kryptischen Promotor angetrieben werden. Sind die potentiellen DNA Methylierungspositionen, wie im oberen Teil der Abbildung gezeigt, nicht methyliert (weiße Kreise) ist dieser Promotor konstitutiv aktiviert. Das Agouti Gen ist also permanent exprimiert und das produzierte Fell ist gleichmässig gelb. Ist die IAP Sequenz, wie im unteren Teil gezeigt, methyliert (schwarze Kreise) ist der kryptische Promotor inaktiv. Dadurch steht das Agouti Gen wieder unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, die Expression des Agouti Signal Proteins ist also mit dem Wachstumszyklus der Haarfollikel koordiniert und die Haare haben die wild-typartigen dunklen Spitzen mit dem gelben Ring, welche die klassische hellbraune wildtyp Fellfärbung ergibt. Das Fell einer A^{vy}/a Maus ist oft ein Mosaik aus wildtypfarbigen Bereichen in denen die IAP Sequenz methyliert ist und gelb gefärbten Bereichen in denen die IAP Sequenz demethyliert ist.

Im A^{vy} Allel des Agoutigens kann eine benachbarte Transposon Sequenz die Aktivität des Agouti Gens beeinflussen

Zusätzlich zu dem „A“ und „a“ Allelen ist für diese Untersuchungen noch ein drittes Allel das A^{vy} Allel wichtig. In diesem A^{vy} Allel befindet sich upstream des Agouti Promotors eine als IAP (engl. *intracisternal A particle*) bezeichnete Retrotransposonsequenz (Abbildung 6). Diese Retrotransposonsequenz enthält einen kryptischen Promotor der auch die Expression des benachbarten Agouti Gens antreiben kann. Im Gegensatz zum „natürlichen“ Promoter des Agouti Gens wird dieser kryptische Promoter aber nicht von den regulatorischen Feedbackloops des Haarwuchses kontrolliert, sondern ist konstitutiv aktiv.

Homozygot ist das A^{vy} Allel zwar lethal (das Agouti Gen ist auch noch an anderen Prozessen als der Regulation der Haarfarbe beteiligt) aber man kann durch Kreuzung von A^{vy}/a mit a/a Mäusen Mäuselinien propagieren, in denen das Agouti Signal Protein nur von dem A^{vy} Allel produziert wird. In solchen Mäusen sollte das Agouti Signalprotein ständig exprimiert werden und die Haarfollikel sollten immer und überall auf dem Körper das gelbe Pigment produzieren (Abbildung 6 obere Illustration).

Die Methylierung der benachbarten Transposonsequenz kann die Expression des Agouti Gens beeinflussen.

Manche A^{vy}/a Mäuse haben in der Tat ein komplett gelbes Fell. Aber es gibt auch A^{vy}/a Mäuse die ein geflecktes Fellmuster haben und sogar solche deren Fell einer wildtyp Maus gleicht. Wie ist dies möglich?

Es stellt sich heraus, dass die IAP Sequenz CpG Dinukleotide enthält, deren Methylierung den kryptischen Promotor deaktiviert (Abbildung 6 untere Illustration). Wird der kryptische Promoter methyliert, befindet sich das Agouti Gen also wieder unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und die Genfunktion ist wildtyp-ähnlich (dunkelbraune Haare mit einem schmalen gelben Band). Die Fellfärbung ist also ein Indikator für den Methylierungsstatus des kryptischen Promotors in der IAP Sequenz.

Interessant dabei ist, dass die Fleckenmuster auf dem Fell der Mäuse über die adulte Lebensdauer der Mäuse stabil sind. Anscheinend wird also in einer frühen Entwicklungsphase in einigen der Hautvorgängerzellen die IAP Sequenz methyliert und diese Methylierung wird dann jeweils an die nachfolgende Zellgeneration weitergegeben.

A^{vy}/a Mütter können die epigenetischen Markierungen die den Fellfärbungsphänotyp kodieren an ihre Nachfahren weitergeben

Vor den Untersuchungen an A^{vy}/a Mäusen ging man davon aus, dass alle epigenetischen Markierungen wie z.B. die Methylierung von DNA Sequenzen während der Meiose eliminiert würden. Die Gameten wären somit epigenetisch betrachtet ein „unbeschriebenes Blatt“ auf dem dann im Laufe der Zelldifferenzierung die entsprechenden epigenetischen Modifikationen registriert werden könnten.

Bei A^{vy}/a Mäusen wurde aber beobachtet, dass Muttertiere, die eine fast ausschliesslich gelbe Fellfärbung haben auch verstärkt Nachwuchs mit ausschliesslich gelbem Fell generieren und Muttertiere mit wildtyp-ähnlicher Fellfärbung auch vorwiegend Nachfahren mit wild-typ ähnlichem Fell generieren. Mit anderen Worten, die epigenetische Markierung (Methylierung der IAP Sequenz) die den Fellfärbungsphänotyp determiniert, schien während der Meiose nicht gelöscht zu werden.

Alternativ hätte es aber auch sein können, dass diese epigenetischen Markierungen während der Meiose zunächst gelöscht und dann Aufgrund von *in utero* Einflüssen/Faktoren erneut eingeführt wurden.

In Experimenten in denen Eizellen *in vitro* befruchtet und dann von einer anderen Maus ausgetragen wurden zeigte sich aber, dass der Fellfärbungsphänotyp der so entstandenen Mäuse dem Phänotyp der „Eispenderin“ und nicht dem des austragenden Tiers entsprach.

Diese Experimente demonstrierten also, dass die epigenetischen Markierungen während der Meiose nicht vollständig gelöscht werden, sondern, dass bestimmte epigenetische Markierungen an die Nachfolgeneration weitergegeben werden können.

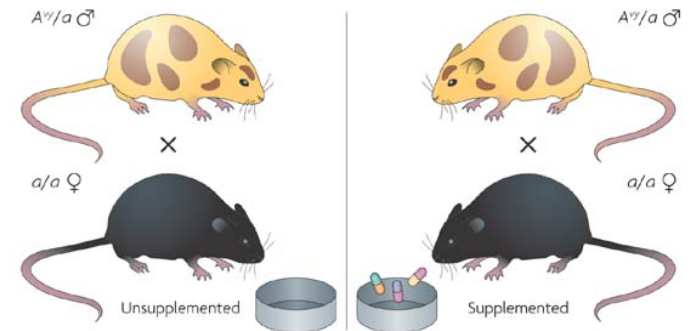
In A^{vy}/a Mäusen kann die Ernährung der Mutter den Fellfärbungs Phänotyp der Nachfolgeneration beeinflussen

Wie bereits beschrieben, stammen die für die Methylierung der DNA verwendeten Methylgruppen aus Vitaminen die mit der Nahrung aufgenommen werden (z.B. Folsäure) und es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an solchen Methylgruppen-liefernden Vitaminen zu einer insgesamt geringeren Methylierung der DNA führt wohingegen eine reiche Verfügbarkeit dieser selben Vitamine zu einer stärkeren DNA Methylierung führt. Basierend auf den grossflächigen Fellmustern der A^{vy}/a Mäuse ist auch klar, dass die Entscheidung, ob die IAP Retrotransposonsequenz methyliert wird oder nicht, bereits sehr früh in der Entwicklung im Uterus der Mutter stattfindet.

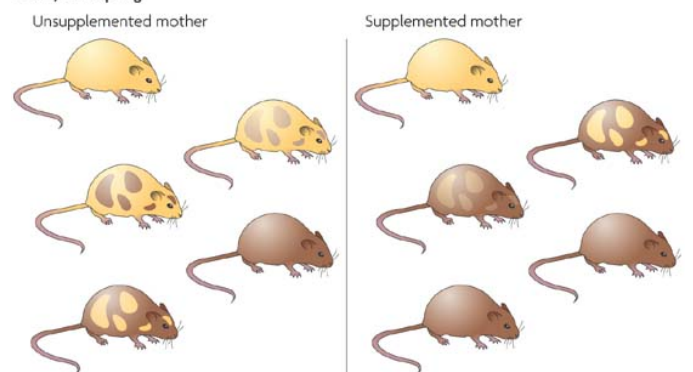
Könnte eine besonders hohe Verfügbarkeit von methylliefernden Vitaminen während dieser entscheidenden Entwicklungsphase das Gleichgewicht zwischen der methylierten und nichtmethylierten Form der IAP Retrotransposonsequenz verschieben und so den Fellphänotyp des Nachwuchses beeinflussen?

Um diese Frage zu beantworten hat man das in Abbildung 7 gezeigte Experiment durchgeführt. Dabei wurden A^{vy}/a Väter mit a/a Müttern gekreuzt. Während der Schwangeren-

a Dietary supplementation during pregnancy



b A^{vy}/a offspring



c Agouti expression

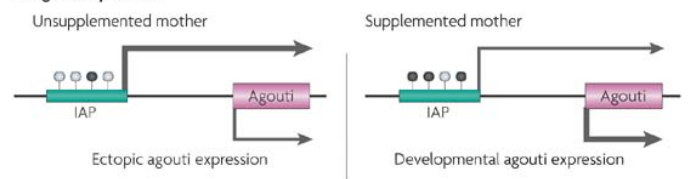


Abbildung 7 Um den Einfluss der mütterlichen Ernährung auf den Phänotyp von A^{vy}/a Mäusen zu untersuchen hat man A^{vy}/a Väter mit a/a Müttern gekreuzt. Die Hälfte der Mütter wurden dann mit einer an Methylendonoren armen Nahrung und die andere Hälfte mit einer mit Methylendonoren angereicherten Nahrung gefüttert. Im Nachwuchs der mit der angereicherten Nahrung gefütterten Muttertiere waren wesentlich mehr Tiere mit wildtyp-artigem Fellphänotyp als im Nachwuchs der mit der Muttertiere die während der Schwangerschaft nicht-angereichertes Futter erhielten. Passend zu diesem Phänotyp waren die IAP Sequenzen im Nachwuchs der mit angereichertem Futter versorgten Muttertiere stärker methyliert.

schaft wurden eine Gruppe der Muttertiere mit einer besonders mit Methylendonor Vitaminen (Folsäure etc.) angereicherten Nahrung gefüttert, während die andere Gruppe eine an diesen Vitaminen arme Nahrung erhielt. (Man verwendete in diesen Studien a/a Muttertiere, um sicherzustellen, dass ein eventuell auftretender Effekt der Nahrung nicht durch eine Veränderung des Methylierungsstatus des mütterlichen Gens bereits in der Eizelle erfolgt.)

Die Resultate dieses Experiments zeigten, dass der Nachwuchs der während der Schwangerschaft mit methyl-liefernden Vitaminen versorgten Muttertiere wesentlich häufiger einen wildtypartigen Fellphänotyp zeigten und dass die IAP Retrotransposonsequenzen in diesen Tieren auch stärker methyliert waren.

Diese Experimente zeigten also, dass die Nahrung des Muttertiers während der Schwangerschaft den epigenetischen Status des Nachwuchses beeinflussen kann.

Genomic Imprinting (Genprägung)

In einem diploiden Organismus besitzt jede somatische Zelle zwei Kopien des Genoms: eines davon wurde vom Vater das andere von der Mutter geerbt. Bis auf die Gene die auf den Geschlechtschromosomen liegen besitzen also diese Zelle von jedem Gen zwei Kopien. Für die meisten Gene sind beide dieser Kopien aktiv, d.h. sowohl die von der Mutter als auch die vom Vater geerbte Kopie des Gens wird, dem Zelltyp entsprechend, exprimiert.

Es gibt aber auch Gene bei denen nur die Kopie eines Elternteils (z.B. die Kopie der Mutter) exprimiert wird, während die Kopie des anderen Elternteils (z.B. des Vaters) überhaupt nicht exprimiert wird. Man redet dann von einem geprägten Gen (engl. *imprinted gene*). Die Anzahl der Gene, die so klar geprägt sind, ist vermutlich relativ klein ($\ll 1\%$). Neuere Untersuchungen lassen aber vermuten, dass die Anzahl der Gene bei denen zumindest geringfügige elternabhängige (*parent of origin*) Unterschiede in der Genexpression bestehen wesentlich größer ist.

In der klassischen Sichtweise der Genprägung geht man davon aus, dass der Prägungseffekt über das ganze Leben des Nachwuchses hinweg und in allen Zelltypen gleich ist. Inzwischen gibt es aber Beispiele dafür, dass sich der Grad der Prägung eines Gens über die Entwicklung des Organismus verändert und dass sich sogar in unterschiedlichen Zelltypen die Richtung des Prägungseffekts umkehren kann.

Genprägung basiert primär auf DNA Methylierung

Der Molekulare Mechanismus der Genprägung fast aller geprägten Gene die bisher eingehend untersucht wurden, basiert auf DNA Methylierung, ist also eng mit anderen

transgenerationalen epigenetischen Markierungen verwandt. Auch hier gilt, dass eine Methylierung in der Regel mit einer Inaktivierung einhergeht.

Es gibt neuerdings aber auch Anzeichen, dass eventuell andere Mechanismen (z.B. Histonmodifikationen) an der Genprägung beteiligt sein könnten.

Anders als die anderen epigenetischen Markierungen die wir vorhergehend besprochen haben, basiert die Methylierung des geprägten Gens nicht zwangsläufig auf dessen Grad der Methylierung im Elterntier, sondern kann z.B. auch darauf basiert sein, ob das Gen in einer männlichen oder weiblichen Keimzelle liegt. So wird z.B. bei der Produktion eines Spermiums, ein ursprünglich über die Eizelle geerbtes Allel, das zu diesem Zeitpunkt mütterlich geprägt war (z.B. stark methyliert), nun so modifiziert wird, dass es männlich geprägt wird (z.B. schwach methyliert). Diese geschlechtsspezifische Reprogrammierung findet während der Entstehung der Keimzellen statt.

Evolutionäre Ursprünge der Genprägung: die Parental Conflict Hypothese

Die zurzeit von vielen Forschern bevorzugte (aber nicht unumstrittene) Hypothese über den evolutionären Ursprung der Genprägung leitet sich aus der Beobachtung ab, dass Genprägung in Tieren besonders häufig in placentalen Säugetieren auftritt. Diese „*Parental Conflict*“ Hypothese basiert darauf, dass in diesen Tieren ein fundamentaler Konflikt zwischen dem Muttertier und dem Vattertier besteht.

Das Muttertier investiert ungleich mehr Energie in den Nachwuchs als das Vattertier. Für das Muttertier ist es daher, insbesondere bei polygamen Tieren, nicht von grossem Interesse alle Ressourcen in den Nachwuchs eines Vattertiers zu investieren. Stattdessen wäre es für das Muttertier von Vorteil, mit den eigenen körperlichen Ressourcen so zu haushalten, dass das eigene Überleben sichergestellt ist und auch noch die Möglichkeit besteht, mit anderen Männchen Nachwuchs zu generieren. Man würde also erwarten, dass im Sinne des *selfish gene* Gedanken ein Gen dadurch einen evolutionären Vorteil erreichen könnte, wenn es bei väterlicher Vererbung maximal die Ressourcen der Mutter für sich beansprucht, aber bei mütterlicher Vererbung diese mütterlichen Ressourcen schont.