

*Inzwischen sind viele Vererbungs-Phänomene beschrieben, die sich nicht oder nicht nur mit der Vererbung von DNA erklären lassen. Angesichts der Fülle „epigenetischer“ Daten, die heutzutage erhoben werden, möchte dieser Artikel daran erinnern, dass der sich entwickelnde Organismus ein komplexes System mit emergenten Eigenschaften in einer fluktuierenden Umgebung ist.*

# Weichenstellungen im Genom

Die Epigenetik erklärt, wie uns frühe  
Entwicklungsereignisse dauerhaft prägen

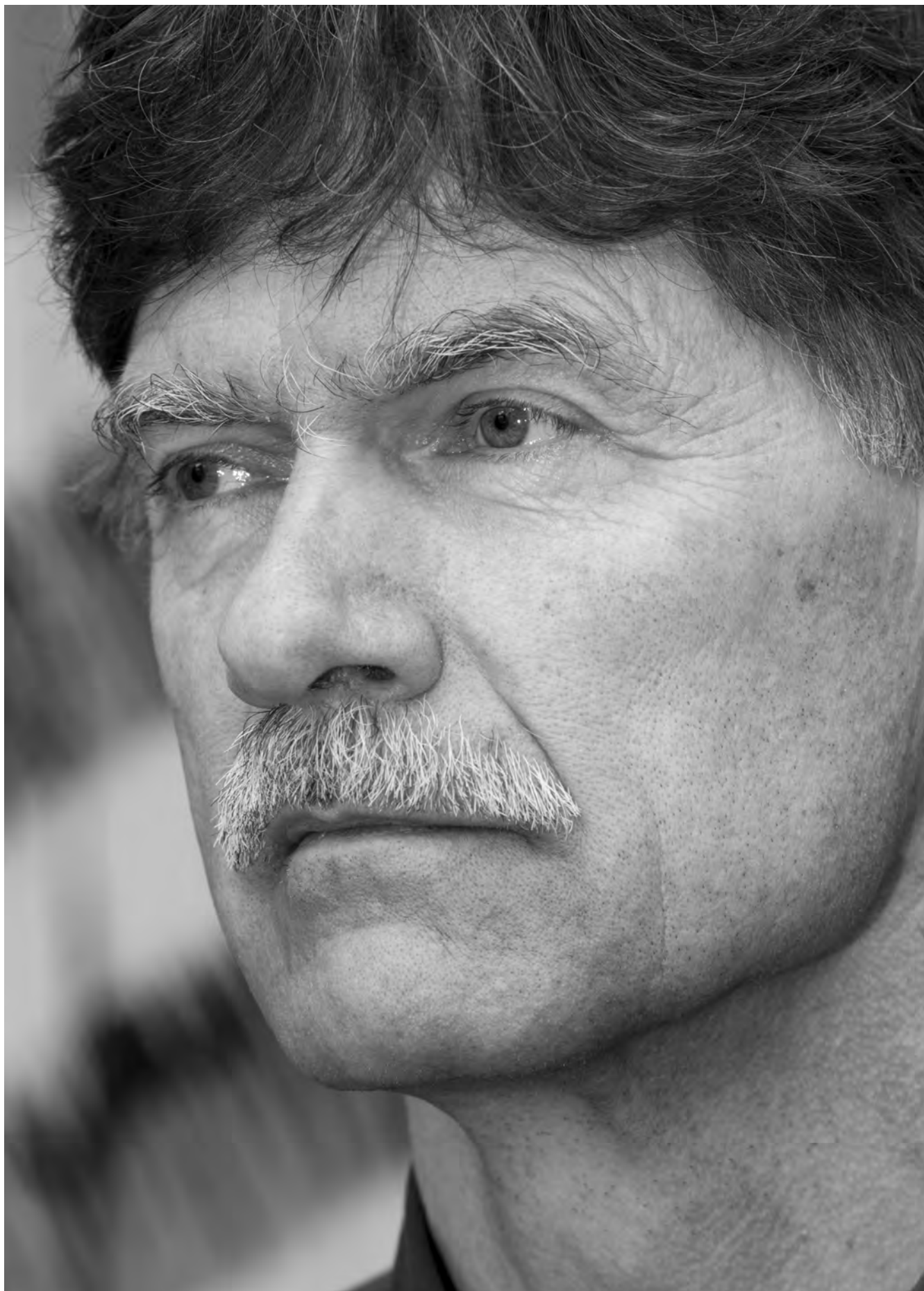
Von Bernhard Horsthemke

Vor zehn Jahren wurde die DNA-Sequenz des Menschen, die unsere Erbinformation in einer definierten Abfolge der Buchstaben A, G, T und C enthält, vollständig entschlüsselt. Sie ist drei Milliarden Zeichen lang und kodiert für ungefähr 20.000 Gene. Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und der Genome anderer Arten hat unser Verständnis der Evolution sowie der Ursachen von Erbkrankheiten enorm vorangebracht.

Die DNA-Sequenz wird oft als Bauplan des Menschen bezeichnet. In diesem Vergleich sind Mutationen in Genen für wichtige Zellstrukturen oder Stoffwechselfunktionen, die Erbkrankheiten verursachen, Bauplanfehler. Der Vergleich der DNA-Sequenz mit einem Bauplan ist aber nicht ganz richtig. Denn anders als beim Bauplan eines Architekten, aus dem das zukünftige Haus

detaillgenau ersichtlich ist und den der Bauunternehmer – hoffentlich – präzise umsetzt, lässt sich aus der Abfolge der DNA-Buchstaben (dem Genotyp) alleine nicht vorhersagen, wie sich aus der befruchteten Eizelle ein mehrzelliges Individuum entwickeln und welche genauen Merkmale (Phänotyp) es später haben wird. Selbst Erbkrankheiten, denen ein definierter Gendefekt zu Grunde liegt, weisen oft ein breites klinisches Spektrum auf. Dies liegt nicht nur daran, dass wir den Sinn der DNA-Sequenz noch nicht genau verstehen, sondern auch daran, dass der Embryo ein sich selbstorganisierendes System ist, das im zeitlichen Verlauf inneren und äußeren Einflüssen ausgesetzt ist. Kleinere Störungen können die Entwicklungsbahn eines Embryos zwar nicht beeinflussen (wir nennen das *Resilienz* oder *Kanalisation* der Entwick-

lung), größere Einflüsse aber schon. Ein- und derselbe Genotyp kann also im Prinzip zu verschiedenen Phänotypen führen. Dieser Sachverhalt wird phänotypische *Plastizität* genannt. Ein eindrucksvolles Beispiel für die Kanalisation und Plastizität der Entwicklung ist die Honigbiene: Aus genetisch identischen Larven können sich entweder Arbeiterinnen oder Königinnen entwickeln (Abb. 1). Während Arbeiterinnen untereinander und Königinnen untereinander sehr ähnlich sind (Kanalisation der Entwicklung!), unterscheidet sich die Königin von einer Arbeiterin unter anderem in Größe und Fruchtbarkeit (Plastizität der Entwicklung!). Welche Entwicklungsrichtung die Larve einschlägt, hängt von der Zusammensetzung des Futters während eines bestimmten Entwicklungsstadiums ab: Mit normalem Futter entwickelt sich eine

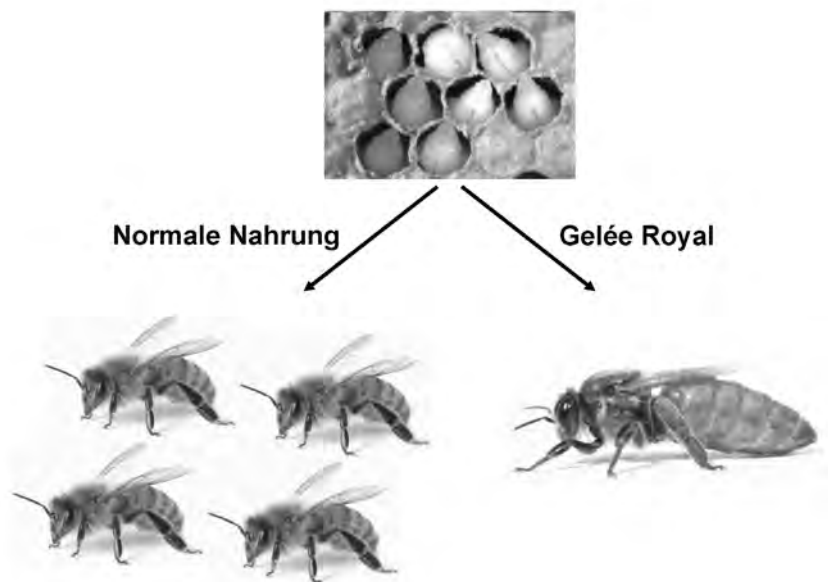


Bernhard Horsthemke. Foto: Klaus Lemke

Arbeitsbiene, mit Gelée Royale eine Königin. Verantwortlich für diese Weichenstellung in der Entwicklung ist ein Eiweiß namens „royalactin“, das durch einen Signalweg wirkt, der über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor vermittelt wird. Auch beim Menschen hat die Ernährung (zu hohe oder zu niedrige Blutzuckerspiegel der Mutter) einen prägenden Einfluss auf das werdende Leben, doch dazu später.

besagte, dass der Mensch schon im Spermium fertig ausgebildet vorliege und im Mutterleib nur noch wachse. 1651 und endgültig 1759 konnten William Harvey und Caspar Friedrich Wolf das Konzept der Epigenese experimentell bestätigen. Der Mechanismus der Entwicklung blieb aber lange Zeit unklar. Waddington postulierte, dass Gene und ihre Produkte (Eiweißstoffe) bei der Entstehung eines Phänotyps

Bemerkenswerterweise hat Waddington die Epigenetik entwickelt, bevor überhaupt die Struktur der DNA, geschweige denn ihre Sequenz und die Mechanismen der Genregulation bekannt waren. Seine wissenschaftlichen Beiträge waren daher sehr theoretisch, stützten sich aber auf genetische Experimente, insbesondere an der Fruchtfliege. Mit seinen Arbeiten gilt Waddington auch als ein Wegbereiter der Theoretischen Biologie und der evolutionären Entwicklungsbiologie (EvoDevo). Mit der Entdeckung der Doppelhelix-Struktur der DNA und der Entwicklung molekularbiologischer Techniken gewann aber eine reduktionistische, genzentrierte Denkweise in der Biologie die Oberhand, so dass Waddingtons systemtheoretische Konzepte nach 1953 mehr oder weniger in Vergessenheit gerieten.



(1) Entwicklung der Biene. Bienenlarven entwickeln sich in Abhängigkeit des Futters zu Arbeitsbienen (links) oder Königinnen (rechts).

## Epigenetik

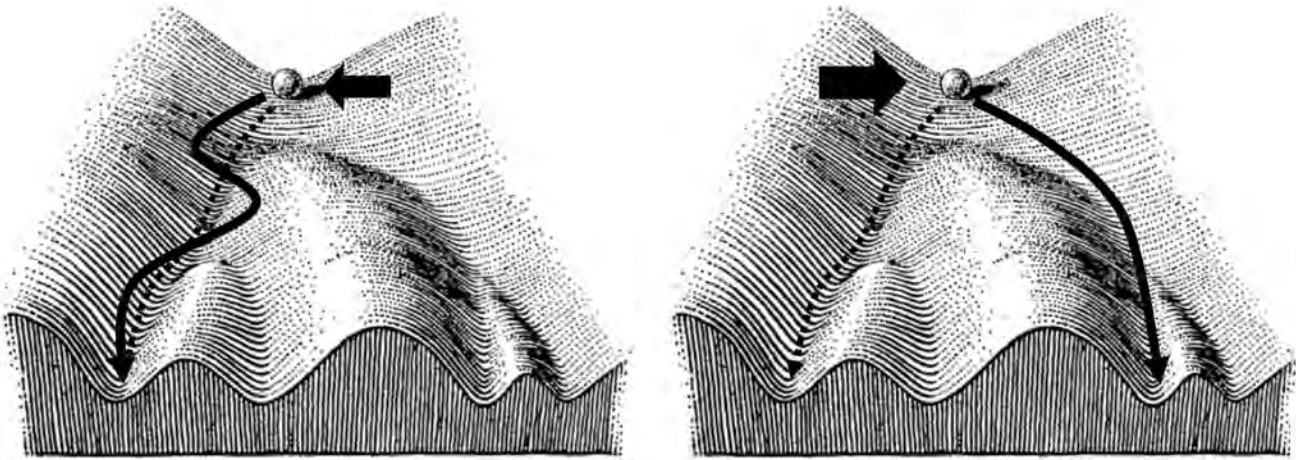
Kanalisation und Plastizität der Entwicklung sind zwei Seiten ein und derselben Medaille. Dies hat erstmals der britische Biologe Conrad Hal Waddington (1905–1975) erkannt. Waddington hat die Genetik in die Entwicklungsbiologie eingeführt und die *Epigenetik* begründet. Das Wort Epigenetik ist eine Zusammenziehung aus den Wörtern *Epigenese* und *Genetik*. Epigenese bezeichnet die Entwicklung von neuen Strukturen während der Embryonalentwicklung. Dieses Konzept wurde ursprünglich von Aristoteles (384 bis 322 v.u.Z.) entwickelt und hatte bis zum Mittelalter Bestand. Dann dominierte eine Weile die Präformationstheorie, die

interagieren und eine „epigenetische Landschaft“ aufwerfen, in der die Entwicklung einer Zelle beziehungsweise eines Organismus durch eine talwärts rollende Kugel veranschaulicht werden kann (Abb. 2). Bei kleinen Störungen wird die Kugel nur etwas ausgelenkt, verbleibt aber in ihrem Tal (Kanalisation). Bei größeren Einflüssen kann die Kugel an einer Gabelung in ein anderes Tal wechseln (Plastizität). Im Lichte der modernen Systemtheorie kann man den sich entwickelnden Organismus als ein dynamisches System mit mehreren Attraktoren (Zuständen, auf die sich das System im Lauf der Zeit zubewegt) betrachten. Die Täler der epigenetischen Landschaft wären dann die Einzugsgebiete der Attraktoren.

## Molekulare Mechanismen

Interessanterweise hat die Molekularbiologie später aber auch zur Wiederentdeckung der Epigenetik geführt und die molekulare Basis von Kanalisation und Plastizität der Entwicklung aufgeklärt. 1975 schlugen Riggs und Holliday vor, dass die Methylierung von Cytosinresten am 5'-Kohlenstoffatom in der DNA, die schon lange bekannt war, die Aktivität eines Gens beeinflusst<sup>1,2</sup>. In der Regel ist die Methylierung regulatorischer Gensequenzen mit der Inaktivität eines Gens assoziiert. Die Methylgruppe kann von Enzymen an die Cytosinreste angeheftet werden, an die Tochterzelle „vererbt“ werden, aber auch wieder verloren gehen oder aktiv entfernt werden. Damit war ein Mechanismus identifiziert, mit dem sich die Stabilität von Genaktivitätszuständen über Zellteilungen hinweg (Kanalisation) erklären lässt, aber auch ihre Veränderbarkeit (Plastizität), und das ohne Veränderung der DNA-Sequenz. Heute sind auch die Enzyme bekannt: DNA-Methyltransferasen und 5-Methylcy-





(2) Epigenetische Landschaft. Waddington hat die Entwicklung einer Zelle mit einer Kugel verglichen, die von einem Berg hinab rollt. Die gestrichelte Linie deutet eine mögliche Entwicklungsbahn an. Bei einer geringfügigen Störung (breiter Pfeil im linken Teil der Abbildung) wird die Kugel zwar etwas abgelenkt, rollt aber im selben Tal weiter (durchgezogene Schlangenlinie). Dies veranschaulicht die Resilienz oder Kanalisierung der Entwicklung. Bei einer größeren Störung (breiter Pfeil im rechten Teil der Abbildung) wird die Kugel in ein anderes Tal geworfen und kommt unten an einer anderen Stelle der Landschaft an. Dies veranschaulicht die Plastizität der Entwicklung.

tosin-Hydroxylasen. Und man kennt einen weiteren Mechanismus, wie Genaktivität oder -inaktivität reversibel stabilisiert werden können: durch die enzymatische Modifikation der Eiweißstoffe, um die die DNA gewickelt ist, den Histonen. Die Histonmodifikationen sind sehr vielfältig und schließen die Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung verschiedener Seitengruppen der Histone ein. Für alle diese Modifikationen sind Enzyme bekannt, die diese Veränderungen einfügen und auch wieder entfernen.

Da DNA-Methyltransferasen und histonmodifizierende Enzyme keine Gensequenzen lesen können, kann die Aktivierung oder Inaktivierung eines spezifischen Gens nicht von diesen Enzymen initiiert werden. Dies geschieht durch Transkriptionsfaktoren, die meistens in genregulatorischen Netzwerken eingebunden sind. Nach Bindung an ihre Zielsequenz rekrutieren die Transkriptionsfaktoren dann die genannten Enzyme, die das Chromatin (Komplex aus DNA und Histonen) in dieser Region modifizieren. Oft sind daran auch nichtkodierende RNAs beteiligt. Die Modifikationen verändern die Struktur des Chromatins. Bestimmte

Modifikationen führen zu offenem Chromatin, das das Ablesen der genetischen Information erlaubt; andere Modifikationen führen zu dicht gepacktem Chromatin, das nicht abgelesen werden kann (Abb. 3). Die Chromatinmarkierungen werden an die Tochterzellen „vererbt“, so dass Genaktivitätszustände aufrechterhalten werden, auch wenn der Transkriptionsfaktor nicht mehr wirkt. Der reduktionistischen Denkweise weiterhin verhaftet, definieren moderne Molekularbiologen die Epigenetik als die Untersuchung vererbbarer Veränderungen in der Genaktivität, die nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind. Diese Definition ist inzwischen weit verbreitet, verkürzt aber Waddingtons Konzept auf molekulare Mechanismen.

Die Arbeiten von Riggs und Holliday hatten zunächst wenig Resonanz in der wissenschaftlichen Gemeinschaft gefunden. Entscheidend für die Aufklärung der Bedeutung von Chromatinmarkierungen für die Stabilisierung von Genaktivitätsmustern war die Erforschung von drei genetischen Sonderfällen: die X-Inaktivierung, das Imprinting und die maligne Entartung von Zellen.

### X-Inaktivierung

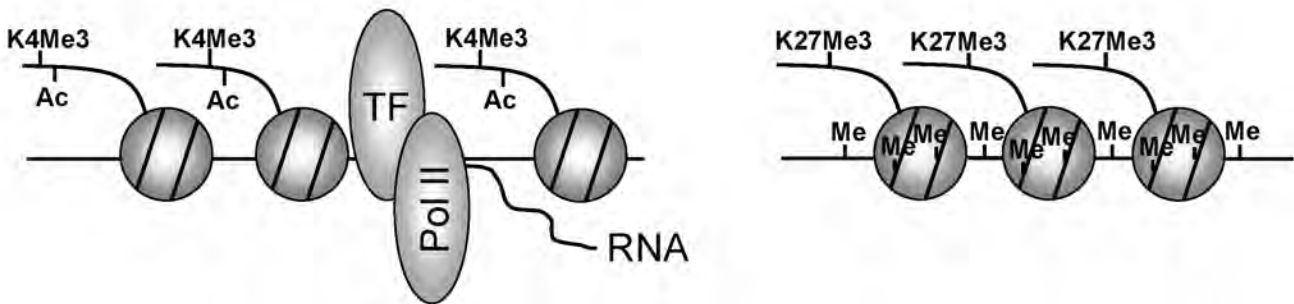
In jeder Zelle kommen fast alle Gene in zwei Kopien (Allelen) vor. Dies liegt daran, dass wir einen Satz Gene von unserer Mutter geerbt und ein Satz Gene von unserem Vater geerbt haben. In der Regel sind beide Allele eines Gens entweder aktiv oder inaktiv, je nach Zelltyp (siehe den Abschnitt Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung). Eine Ausnahme bilden die meisten X-chromosomalen Gene bei Frauen. In der frühen Embryonalentwicklung einer Frau wird in jeder Zelle ein X-Chromosom inaktiviert. Damit wird ein Zustand ähnlich wie in Zellen von Männern hergestellt, die statt zwei X-Chromosomen ein X- und ein Y-Chromosom haben (Dosiskompensierung). Die Entscheidung, ob das väterliche oder das mütterliche X-Chromosom stillgelegt wird, wird in jeder Zelle des frühen Embryos willkürlich getroffen. Die einmal getroffene Entscheidung wird in den Tochterzellen, deren Tochterzellen und so weiter aufrecht erhalten. Deshalb sind Frauen ein Mosaik aus zwei Zelllinien, die in der Regel zu je 50 Prozent vorhanden sind. In Folge der X-Inaktivierung haben zwei in

der Regel sequenzidentische Allele in derselben Zelle eine unterschiedliche Aktivität. Die unterschiedliche Aktivität kann also nicht von der DNA-Sequenz abhängig sein. Sie ist abhängig von einer unterschiedlichen Markierung des Chromatins.

### Imprintingkrankungen

Die Tatsache, dass von geprägten Genen nur ein Allel aktiv ist, macht diese Gene bei Mutationsereignissen besonders verletzlich. Eine inaktivierende Mutation oder eine

Nichtbetroffenen liegen hier nicht ein methyliertes und ein unmethyliertes Allel vor. Der Autor hat als einer der Ersten erkannt, dass sich die Bestimmung des DNA-Methylierungsmusters für die schnelle und frühe Diagnostik von Imprinting-



(3) Chromatin. Die DNA (gerade schwarze Linie) ist um Histonkomplexe (graue Kugeln) gewickelt, deren N-terminalen Schwänze (gebogene Linien) enzymatisch modifiziert werden können (K4 und K27: Lysin 4 und Lysin 27 im Histon H3, Me: Methyl, Ac: Acetyl). Auch die DNA kann methyliert sein (Me). In erster Annäherung gibt es zwei Chromatinkonfigurationen: lockeres, aktives Chromatin (links), dass die Genexpression erlaubt, und kompaktes, inaktives Chromatin, das nicht transkribiert werden kann (rechts). Die Ellipsen symbolisieren Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II, die nur an lockerem Chromatin binden können.

### Genomisches Imprinting

Auch auf den anderen Chromosomen gibt es Gene (ca. 100–200), von denen nur eine Allel aktiv ist. Durch den Prozess des genomischen Imprintings (deutsch: Prägung) werden diese Gene während der Eizellentwicklung beziehungsweise der Spermienentwicklung stillgelegt, so dass nach der Befruchtung nur das mütterliche Allel beziehungsweise nur das väterliche Allel aktiv ist. Diese Entscheidung wird in der Regel über die Embryonalentwicklung bis ins Alter aufrechterhalten. Nur bei der nächsten Keimzellbildung wird die Stilllegung der Gene rückgängig gemacht und neu durchgeführt. Molekulargenetische Untersuchungen, auch im Labor des Autors, haben gezeigt, dass das Imprinting auf unterschiedliche DNA-Methylierung beruht<sup>3,4</sup>. Im Tierreich gibt es genomisches Imprinting nur bei Tieren, die im Mutterleib heranwachsen und über die Plazenta ernährt werden. Es dient offensichtlich der Regulation der Ressourcenallokation zwischen Fötus und Mutter.

Deletion, die das eine aktive Allel eines geprägten Gens betreffen, führt nämlich zu einem vollständigen Verlust der Genaktivität. Andererseits kann auch eine Verdopplung des einen aktiven Allels zu Entwicklungsstörungen führen; offensichtlich sind diese Gene Dosis-sensitiv: Für die normale Entwicklung wird ein aktives Allel, aber auch *nur* ein aktives Allel benötigt.

Die aktive Dosis eines Gens kann auch durch eine uniparentale Disomie verändert werden; hier liegen statt eines väterlichen Chromosoms und eines mütterlichen Chromosoms zwei väterliche oder zwei mütterliche Chromosomen vor. Genmutationen, Deletionen, Duplikationen und uniparentale Disomien, die geprägte Gene betreffen, führen in Abhängigkeit der elterlichen Herkunft des betroffenen Chromosoms zu charakteristischen Krankheitsbildern, die unter der Bezeichnung „Imprintingkrankungen“ zusammengefasst werden. (siehe Tab. in Abb. 4). Die Aberrationen lassen sich leicht an einem abnormalen DNA-Methylierungsmuster erkennen, denn anders als bei

krankungen ausnutzen lässt<sup>4</sup>. Heute stellen DNA-Methylierungstests an peripherem Blut die erste Stufe in der molekularen Diagnostik dieser Erkrankungen dar, nur die Methodik hat sich im Laufe der Jahre geändert. Wenn sich der klinische Verdacht bestätigt, kann eine symptomatische Therapie sehr früh eingeleitet werden (z.B. beim Prader-Willi-Syndrom) oder, wie beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das mögliche Auftreten eines Tumors frühzeitig erkannt werden.

### Imprintingfehler

Da es sich bei der Chromatinmarkierung um einen biologischen Prozess handelt, können hierbei auch Fehler auftreten. In Folge eines solchen Fehlers kann dann ein Gen, das stillgelegt sein sollte, aktiv sein, oder ein Gen, das aktiv sein sollte, inaktiv sein. Ein solcher Fehler wird Epimutation genannt<sup>5,6</sup>. Das schließt nicht aus, dass bestimmte DNA-Sequenzvarianten die Fehlerrate erhöhen. In seltenen Fällen ist die Epimutation direkte Folge einer DNA-Mutation: Diese kann zum Beispiel verhindern,

Erkrankung	Chromosom	Häufigkeit
Prader-Willi-Syndrom	15q11q13	1/25,000 - 1/10,000
Angelman-Syndrom	15q11q13	1/20,000 - 1/12,000
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	11p15	1/15,000
Silver-Russell-Syndrom	7, 11p15	1/100,000 - 1/3,000
Transienter neonataler Diabetes Mellitus	6q24	1/400,000
Pseudohypoparathyroidismus Ib	20q13	Selten
Upd(14)mat	14q32	Selten
Upd(14)pat	14q32	Selten

(4) Imprintingkrankungen.

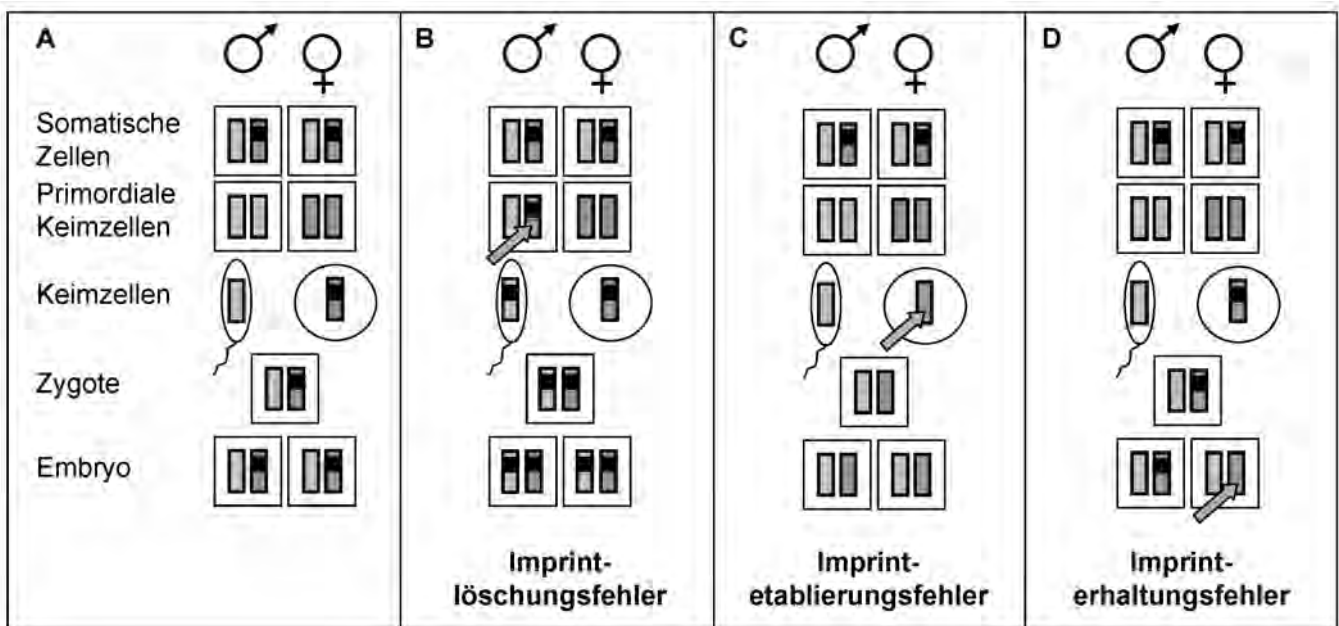
dass an einem Genort ein bestimmter Chromatinzustand hergestellt werden kann, oder ein Gen für ein chromatinmodifizierendes Enzym betreffen, so dass der Prozess der Chromatinmarkierung an mehreren Genorten gestört ist. In diesen Fällen sprechen wir von einer sekundären Epimutation, im Gegensatz zu einer primären Epimutation, bei der keine DNA-Mutation vorliegt.

Das Labor des Autors und anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass manche Patienten mit einer Imprintingkrankung strukturell normale Chromosomen von Vater und Mutter geerbt haben, aber

trotzdem ein abweichendes DNA-Methylierungsmuster aufweisen<sup>7</sup>. Offensichtlich ist hier ein Chromosom bei der Eizell- oder Samenbildung falsch geprägt worden oder die Prägung ist kurz nach der Befruchtung verlorengegangen (Abb. 5). Ein solcher Imprintingfehler stellt eine weitere Ursache für eine Imprintingkrankung dar. In der Mehrzahl der Fälle scheint es sich bei Imprintingfehlern um einen einmaligen Methylierungsfehler zu handeln, also um eine primäre Epimutation. Die betroffenen Menschen haben also eine genetische Erkrankung, obwohl sie normale Chromosomen mit einer

normalen DNA-Sequenz haben. Das Risiko für solch einen Imprintingfehler scheint nach assistierter Reproduktion erhöht zu sein.

In sehr wenigen Fällen liegt eine DNA-Mutation vor: entweder in einem regulatorischen Element, das für die Prägung einer Chromosomenregion oder die Aufrechterhaltung der Prägung verantwortlich ist, oder in einem Gen für einen Faktor, der für diese Prozesse benötigt wird. Da hier der Imprintingfehler Folge einer DNA-Mutation ist, also eine sekundäre Epimutation darstellt, gibt es in betroffenen Familien ein erhöhtes Wiederholungsrisiko. Das Labor des Autors hat erstmals bei Patienten mit Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom, bei denen das väterliche oder das mütterliche Chromosom 15 falsch geprägt ist, solche DNA-Mutationen entdeckt. Es wurden damals vorrangig betroffene Geschwisterkinder molekular-genetisch untersucht, denn in solchen Fälle musste ja eine DNA-Veränderung vorliegen. Diese Untersuchungen haben zur Identifizierung des Imprintingzentrums auf Chromosom 15 geführt<sup>8</sup>.



(5) Imprintingfehler. Die Abbildung zeigt ein Chromosomenpaar (hellgraue Balken) in einer Zelle. Das mütterliche Chromosom (rechtes Chromosom) trägt in somatischen Zellen (oben) eine Chromatinmarkierung (Prägung, dunkelgrauer Fleck), wodurch bestimmte Gene stillgelegt sind. In den primordialen Keimzellen wird diese Prägung entfernt, während der Eizellbildung neu etabliert und nach der Befruchtung aufrechterhalten (A). Wenn die Prägung nicht entfernt (B), nicht etabliert (C) oder nicht aufrechterhalten wird (D), werden Gene fälschlicherweise stillgelegt oder aktiviert, was zu charakteristischen Erkrankungen führt.



Vor ein paar Jahren wurden erstmals auch Mutationen in Genen identifiziert, die für ein Protein kodieren, das an der Etablierung oder Aufrechterhaltung der Prägung beteiligt ist (*ZFP57*, *NLRP2*, *NLRP7* und *TRIM28*). Diese Mutationen führen meist zu Imprintingfehlern auf mehreren Chromosomen. In den meisten Fällen

stärker methyliert (hypermethyliert) sein können<sup>10</sup>. Die funktionelle Bedeutung dieser Veränderungen war aber nicht klar. Das Labor des Autors konnte 1989 erstmals zeigen, dass Tumorsuppressorgene durch Hypermethylierung inaktiviert werden können<sup>11</sup>. Tumorsuppressorgene sind Gene, die die Zellproliferation regulieren. Bei einem Funk-



(6) Die Entwicklung vom Genotyp zum Phänotyp. Die Entwicklung vom Genotyp zum Phänotyp verläuft über den Epigenotyp (das Epigenom), der von äußeren und inneren Faktoren beeinflusst werden kann. Aus einem Genotyp können sich deshalb im Prinzip verschiedene stabile Phänotypen entwickeln.

ist hier die Aufrechterhaltung der Prägung betroffen. Da diese Fehler nach der Befruchtung passieren, liegen sie häufig im Mosaik vor, das heißt, ein Patient hat normale Zellen sowie Zellen mit einem Imprintingfehler. In Abhängigkeit von dem Prozentsatz der betroffenen Zellen und ihrer Verteilung im Körper kommt es hier zu mehr oder weniger schweren Krankheitsbildern, das heißt, das klinische Spektrum ist sehr groß.

### Maligne Entartung

Neben der Aufklärung der molekularen Grundlage von X-Inaktivierung und Imprinting war es die Entdeckung von DNA-Methylierungsveränderungen in Tumorzellen, die der Epigenetik zu einer (molekularen) Wiedergeburt verhalfen. Andrew P. Feinberg und Bert Vogelstein zeigten 1983, dass die DNA von Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen insgesamt weniger stark methyliert ist, dass also eine Hypomethylierung vorliegt<sup>9</sup>. 1988 fand Steve Baylin, dass trotz einer generellen der Tumor-DNA einige Sequenzabschnitte

tionsverlust vermehren sich die Zellen unkontrolliert. Bei der Mutationsanalyse von Retinoblastomen, das sind frühkindliche Augentumoren, die durch Mutationen im *RB1*-Gen ausgelöst werden, fand die Arbeitsgruppe, dass manche *RB1*-Allele nicht mutiert waren, sondern eine Hypermethylierung trugen. Die Befunde Feinbergs, Baylins und des Autors haben das Gebiet der Tumorepigenetik begründet. Inzwischen wurde für fast alle Tumorsuppressorgene gezeigt, dass sie nicht nur durch eine Mutation, sondern auch durch eine Epimutation inaktiviert werden können. Es lag daher nahe, zu versuchen, das Tumorsuppressorgen in solchen Fällen durch eine Revertierung der Chromatinveränderung zu reaktivieren. Dafür kommen kleine Moleküle in Frage, die DNA-Methyltransferasen oder Histondeacetylasen inhibieren. Für die Inhibierung der DNA-Methylierung kommt zum Beispiel Azacytidin zum Einsatz, für die Inhibierung der Histondeacetylierung Trichostatin A. Diese und ähnliche Substanzen werden inzwischen bei verschiedenen Krebserkrankungen in klinischen Studien getestet.

### Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung

Die Identifizierung von Chromatinmarkierungen als Basis der zellulären „Vererbung“ von Genexpressionszuständen konnte ein zentrales Problem der Entwicklungsbiologie und -genetik lösen: Wissenschaftler hatten sich schon lange gefragt, wie sich eine befruchtete Eizelle zu einem Organismus mit vielen verschiedenen Zelltypen entwickeln kann, wenn alle Zellen das gleiche Genom haben. Dass letzteres tatsächlich der Fall ist, konnte John B. Gurdon 1958 durch die erfolgreiche Entwicklung von Fröschen nach Transplantation eines Zellkerns aus einer Darmzelle in eine entkernte Eizelle zeigen. Das wäre nicht möglich gewesen, wenn bei der Zelldifferenzierung genetisches Material verloren gegangen wäre. Die Experimente zeigten auch, dass Entwicklung im Prinzip wieder rückgängig zu machen ist. Für diese Erkenntnisse wurde er 2012 mit dem Nobelpreis geehrt. Mit der Erzeugung des Klonschafs Dolly 1996 zeigte Ian Wilmut erstmals, dass die am Frosch gewonnenen Erkenntnisse auch für Säugetiere gelten. Überraschenderweise konnte die Arbeitsgruppe von Shin'ya Yamanaka vor ein paar Jahren zeigen, dass man für die Umwandlung einer adulten Zelle in eine Stammzelle nicht unbedingt eine Eizelle braucht: Mit nur vier Faktoren konnte er ausdifferenzierte Zellen in pluripotente Stammzellen umwandeln<sup>12</sup>. Für die Erzeugung solcher „induced pluripotent stem cells“ (iPS cells) wurde auch Shin'ya Yamanaka 2012 mit dem Nobelpreis geehrt.

Wenn also alle Zellen das gleiche Genom haben, kann der Unterschied nur darin liegen, dass von allen Genen in verschiedenen Zelltypen nur jeweils ein bestimmter Satz von Genen aktiv ist, während die anderen Gene inaktiv sind. Bei der Zelldifferenzierung entscheiden Transkriptionsfaktornetzwerke, oft angestoßen von Signalen aus benach-

barten Zellen, welche Gene aktiviert oder inaktiviert werden, und diese Entscheidung wird dann durch Chromatinmarkierungen stabilisiert, so dass das Genaktivitätsmuster und damit die Identität des Zelltyps über mehrere Zellteilungen hinweg erhalten bleibt. Die „Yamanaka-Faktoren“ sind Transkriptionsfaktoren, die adulte Genexpressionszustände und Chromatinmarkierungen „überschreiben“, so dass die Zelle wieder pluripotent wird. Im Bild der epigenetischen Landschaft heißt dies, dass die Kugel wieder nach oben geschoben wird.

### Fötale Programmierung

Am Beispiel der Biene haben wir gesehen, dass Entwicklungsbahnen durch äußere Einflüsse beeinflusst werden können. Das gilt im Prinzip auch für Säugetiere einschließlich des Menschen, die sich im Mutterleib entwickeln. Wichtige Einflussfaktoren sind hier der mütterliche Blutzuckerspiegel sowie mütterliche Stresshormone. Zwei besonders tragische, aber instruktive Fälle sind der holländische Hungerwinter und die Leningrader Blockade. Als Reaktion auf einen Streik im Westen Hollands haben die deutschen Besatzungstruppen dieses Gebiet von November 1944 bis Mai 1945 abgeriegelt. Pro Tag standen den Betroffenen nur Essenrationen mit weniger als 500 Kilokalorien zur Verfügung. Von der Hungersnot waren auch viele Frauen in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft betroffen. Nach Mai 1945 stand wieder eine normale Ernährung zur Verfügung. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die betroffenen Embryonen und Feten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter haben, insbesondere, wenn die Mutter zu Beginn der Schwangerschaft hungern musste. Heijmans und Kollegen konnten zeigen, dass die Betroffenen, im Vergleich zu ihren früher oder später geborenen Geschwisterkindern, noch 60 Jahre später in Blutzellen ein verändertes

Methylierungsmuster am *IGF2*-Gen aufweisen<sup>13</sup>. In Russland blockierten die deutschen Besatzungstruppen Leningrad von September 1941 bis Januar 1944. Auch hier mussten schwangere Frauen und, wegen der lang andauernden Hungersnot, auch ihre während der Blockade geborenen Babys hungern. Interessanterweise scheint bei diesen Betroffenen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter nicht wesentlich erhöht zu sein. Diese beiden Fälle zeigen, dass die unterkalorische Versorgung des Babys im Mutterleib das Risiko für eine Erkrankung im Alter erhöht, aber nur, wenn es in eine normale oder überkalorische Umgebung hinein geboren wird. Diesen Zusammenhang gibt es nicht nur in den geschilderten Extremfällen. Durch große epidemiologische Untersuchungen in Großbritannien hat David Barker 1989 gefunden, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter assoziiert ist<sup>14</sup>. Diese Assoziation wurde in vielen Studien repliziert. Die Hypothese, dass adulte Erkrankungen ihren Ursprung in der fötalen Entwicklung haben, wird auch als Barker-Hypothese oder „Developmental Origins of Adult Health and Diseases“ Konzept bezeichnet.

Aber auch zu viele Nährstoffe während der Entwicklung haben einen prägenden Einfluss auf die Entwicklung. Das wissen wir von Schwangeren, deren Diabetes schlecht eingestellt ist, oder die einen unerkannten Schwangerschaftsdiabetes entwickelt haben. Die Babys dieser Mütter haben ein hohes Geburtsgewicht und ein erhöhtes Risiko, später an Übergewicht und Typ II Diabetes zu erkranken.

Die geschilderten Studien zeigen, dass das Erkrankungsrisiko nicht oder nicht nur von unseren Genen abhängig ist, sondern auch von Umwelteinflüssen während unserer vorgeburtlichen Entwicklung und im ersten Lebensjahr. In dieser Zeit werden Weichen für unsere spätere

Gesundheit gestellt: Zuviel oder zu wenig Glukose z.B. führt zur bestimmten Genaktivitätsmustern, die durch Chromatinmarkierungen stabilisiert werden, so dass Zellzahlen, Rezeptordichten und Stoffwechselollwerte dauerhaft festgelegt werden. Einmal festgelegte Werte können später nur schwer geändert werden. Aus dem Konzept der fötalen Programmierung ergibt sich, die Prävention von Übergewicht und Typ II Diabetes auf den Zeitpunkt vor und um die Geburt herum vorzulegen. Aus epigenetischer Sicht ist eine Prävention im späteren Kindes- und Erwachsenenalter eine vergebliche Mühe.

### Transgenerationale epigenetische Vererbung

In etlichen Maus- und Rattenmodellen wurden die erwähnten epidemiologischen Studien an menschlichen Kohorten bestätigt. Corinna Grasemann und ihr Team konnten beispielsweise vor kurzem bei der Maus zeigen, dass genotypisch normale Nachkommen diabetischer Mütter auch eine gestörte Glukosetoleranz aufweisen<sup>15</sup>. Interessanterweise hatte auch ein väterlicher Diabetes einen Einfluss auf den Phänotyp genotypisch-normaler Nachkommen. Die molekulare Grundlage eines solchen väterlichen Effekts, der auch bei anderen Tiermodellen beobachtet wurde, ist unklar, denn der Vater steuert ja nur Spermien zum Nachwuchs bei. Offensichtlich muss ein Faktor, der unabhängig von der DNA-Sequenz ist, mit den Spermien übertragen werden. Die Natur dieses Faktors ist ein Rätsel. Eventuell könnten es kleine RNAs sein.

Noch mysteriöser wird die Geschichte, wenn man den Einfluss der großväterlichen Umgebung auf den Phänotyp ihrer Enkel untersucht. Ein solcher Einfluss wurde ebenfalls im Tiermodell beschrieben, und es gibt auch zumindest eine epidemiologische Studie dazu beim Menschen. So beschrieben Gunnar Kaati und Kollegen 2002, dass in



einer nordschwedischen Provinz der Ernährungsstand von Männern mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen der Enkel korrelierte<sup>16</sup>. Überspitzt formuliert heißt dies: „We are what our parents and grandparents ate“.

### Das Deutsche Epigenomprogramm (DEEP)

Die Gesamtheit der Chromatinmarkierungen in einer Zelle wird heutzutage als „Epigenom“ bezeichnet. Da sich die Chromatinmarkierungen während der Zelldifferenzierung verändern, hat ein Mensch ein Genom, aber mehrere hundert verschiedene Epigenome. Die genaue Kenntnis der Epigenome und der damit verbundenen Genexpressionsprofile einer Zelle im gesunden und erkrankten Menschen werden unser Verständnis von normaler Entwicklung und der Entstehung von Krankheiten weiter voranbringen. Wir werden insbesondere verstehen lernen, wann und wie sich Umwelteinflüsse während der frühen Entwicklung in unser Genom festschreiben und so die Genexpression und die Merkmale einer Zelle nachhaltig prägen (Abb. 6). Um menschliche Epigenome systematisch und umfassend zu entschlüsseln, hat sich ein internationales Konsortium von Forscherinnen und Forschern im *International Human Epigenome Consortium* (IHEC) zusammengeschlossen. Seit September 2012 beteiligen sich daran auch Essener Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler.

Schwerpunkt des Deutschen Epigenomprogramms (DEEP), das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung mit 16 Millionen Euro unterstützt wird, sind zunächst Adipozyten, Hepatozyten, gewebsspezifische Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und T-Gedächtniszellen aus normalem und erkranktem Gewebe. Die Auswahl dieser Zelltypen ergibt sich zum einen aus der Möglichkeit, diese Zelltypen in großer Menge und großer Reinheit isolieren zu können (eine

wesentliche Voraussetzung für die Erstellung zelltypspezifischer Referenzkarten), zum anderen aus den beiden inhaltlichen Schwerpunkten von DEEP: Metabolische Erkrankungen (Steatose und Adipositas) und Entzündungen (entzündliche Darmerkrankungen und rheumatoide Arthritis). Da auch bei Steatose und Adipositas Entzündungszellen eine wichtige Rolle spielen, ergibt sich ein innerer Zusammenhang zwischen beiden Schwerpunkten.

Zentrale Technik von DEEP ist das hochparallele *Next Generation Sequencing*, das in sechs Sequenzierzentren durchgeführt wird. Für die DNA-Methylierungsanalyse wird die genomweite Bisulfit-Sequenzierung (*Methyl-seq*) benutzt. Durch die Behandlung einzelsträngiger DNA wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während 5-Methylcytosin als solches erhalten bleibt. Nach der PCR steht in der DNA-Sequenz dann ein Thymin, wenn das Cytosin in der Ausgangs-DNA unmethyliert war, oder ein Cytosin, wenn es methyliert war. Durch einen Vergleich mit der Referenzsequenz kann dann genomweit das Methylierungsmuster bestimmt werden. Die Aufgabe teilen sich das Institut für Humangenetik in Essen (Bernd Horsthemke) und die Abteilung für Epigenetik in Saarbrücken (Jörn Walter). In Essen sind an der Methylierungsanalyse auch das Institut für Zellbiologie (Ludger Klein-Hitpass) und der Lehrstuhl für Genominformatik am Institut für Humangenetik (Sven Rahmann) beteiligt. In Saarbrücken werden auch die DNaseI-hypersensitive Stellen genomweit bestimmt. Die Analyse von sechs Histonmodifikationen, die aktives oder inaktives Chromatin charakterisieren (H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, H3K27ac, H3K4me1 und H3K36me3) teilen sich das Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik in Freiburg (Thomas Jenuwein) und das Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (Ho-Ryun Chung). Hier

kommen spezifische Antikörper und die CHIP-seq Technik zum Einsatz. Der Bestand von kleiner RNA und poly(A<sup>+</sup>)-RNA wird vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin (Wei Chen) und dem Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel (Philip Rosenstiel) mittels *RNA-seq* erhoben.

Aufgrund der großen Datenmenge, die in DEEP erzeugt wird, nimmt die Bioinformatik einen zentralen Platz in dem Konsortium ein. Dabei geht es sowohl um die Analyse der DEEP-Daten als auch um die Entwicklung neuer Algorithmen und Software-Pakete für die Analyse epigenetischer Daten. Hieran beteiligt sind Arbeitsgruppen aus Saarbrücken, Berlin, Heidelberg und Essen.

### Schlussbemerkung

Obwohl die Epigenetik inzwischen – wieder – zu einem *mainstream* Forschungsgebiet geworden ist, ist der Genzentrismus in der modernen Biologie noch lange nicht überwunden. Positiv zu vermerken ist, dass inzwischen viele Vererbungs-Phänomene beschrieben und auch ansatzweise gelöst worden sind, die sich nicht oder nicht nur mit der Vererbung von DNA erklären lassen. Gerade angesichts der Fülle „epigenetischer“ Daten, die jetzt erhoben werden, möchte der Autor aber im Sinne von Waddington daran erinnern, dass der sich entwickelnde Organismus ein komplexes System mit emergenten Eigenschaften in einer fluktuierenden Umgebung ist, das sich durch keine noch so große Sammlung von *-omics*-Daten erklären lässt. Was fehlt, ist eine Weiterentwicklung mathematisch-theoretischer Ansätze zur Beschreibung der Dynamik komplexer biologischer Systeme. Auf dieser Basis wäre auch die zu erstrebende Synthese von Epigenetik und moderner Evolutionstheorie möglich<sup>17</sup>.

## Summary

Some 70 years ago, the British biologist Conrad Hal Waddington (1905–1975) recognized the importance of genes for embryonic development and founded a new research area, which he called epigenetics. He defined epigenetics as “the branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being”. He recognized that development is characterized by canalization (resilience) and plasticity. This explains why on the one hand development leads to consistent outcomes and on the other hand one and the same genotype can give rise to different phenotypes. Today we understand the molecular mechanisms underlying canalization and plasticity of development: Gene activity states, established by transcription factors, are stabilized by chromatin marks, which include DNA methylation and histone modifications. The chromatin marks are cell-heritable, but can potentially be reversed. The marks explain why the two alleles of an X-linked or imprinted gene can have different activities in the same cell and why different cells in the human body, although having the same genome, use only specific sets of genes. Aberrant marks (called epimutations) contribute to human disease. Prime examples are imprinting diseases and cancer. Novel therapeutic strategies aim at correcting these epimutations. The chromatin marks can also explain why the embryo’s environment such as maternal glucose or stress hormone levels can have a long lasting effect on the health of an individual. The “development origins of adult health and diseases” hypothesis suggests that prevention for adult diseases such as type II diabetes should begin during pregnancy and in the first year of life.

## Anmerkungen/Literatur

- 1) Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; 14:9–25.
- 2) Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187:226–232.
- 3) Reik W, Collick A, Norris ML, Barton SC, Surani MA. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 1987; 328:248–251.
- 4) Dittrich B, Robinson WP, Knoblauch H, Buiting K, Schmidt K, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B. Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin specific DNA methylation in 15q11–13. *Hum Genet* 1992; 90:313–315.
- 5) Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; 238:163–170.
- 6) Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 310:45–59.
- 7) Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillissen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet*; 1994 54:741–747.
- 8) Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 1995; 9:395–400.
- 9) Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301:89–92.
- 10) de Bustros A, Nelkin BD, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin SB. The short arm of chromosome 11 is a “hot spot” for hypermethylation in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5693–7.
- 11) Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83:155–158.
- 12) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–676.
- 13) Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:17046–17049.
- 14) Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989; 2:577–80.
- 15) Grasmann C, Devlin MJ, Rzeczowska PA, Herrmann R, Horsthemke B, Hauffa BP, Grynaps M, Alm C, Bouxsein ML, Palmert MR. Parental diabetes: the akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring. *PLoS One* 2012; 7:e50210.
- 16) Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents’ and grandparents’ slow growth period. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:682–688.
- 17) Horsthemke B. Waddington’s epigenetic landscape and post-Darwinian biology. *Bioessays*. 2012 Aug;34(8):711–712.

## Der Autor

Bernhard Horsthemke studierte von 1972 bis 1978 Chemie an der Technischen Universität Berlin und promovierte dort 1982 in Biochemie. Von 1982 bis 1986 arbeitete er als Postdoktorand, zunächst in Berlin, dann als EMBO-Stipendiat am Biochemistry Department des St. Mary’s Hospital in London, England (Direktor: Prof. Dr. Bob Williamson). In England begann er mit seinen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der molekularen Humangenetik. 1986 baute er am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen (Direktor Prof. Dr. Eberhard Passarge) das molekulargenetische Labor auf. 1989 habilitierte er sich an der Universität Essen über das erbliche Retinoblastom. Nach Ablehnung mehrerer Rufe aus München und Berlin wurde er 1992 zum Professor und 2000 auf die Professur für Humangenetik an der Universität Duisburg-Essen berufen. Seit 2001 ist er Direktor des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen. Bernhard Horsthemke hat verschiedene Techniken zur Analyse des humanen Genoms und Epigenoms entwickelt und forscht über die Rolle von genetischer und epigenetischer Variation bei der Entstehung von Krankheiten. Ein langjähriger Forschungsschwerpunkt ist das genomische Imprinting. Seine Forschungsarbeiten wurden kontinuierlich von der DFG gefördert. Von 1995 bis 2001 war Bernhard Horsthemke Koordinator des DFG-Schwerpunktprogramms „Molekulare Dysmorphogenese“ und von 2002 bis 2008 Koordinator des DFG-Schwerpunktprogramms „Epigenetik“ (zusammen mit Prof. Dr. J. Walter). Seit 2009 ist er Koordinator des BMBF-Forschungsverbundes „Imprintingkrankungen“ und seit 2012 Mitglied des Lenkungsausschusses des Deutschen Epigenomprogramms (DEEP). 2012 wurde er in das Fachkollegium „Medizin“ der DFG gewählt. Von 1998 bis 2000 und von 2010 bis 2012 war er Stellvertretender Vorsitzender der Gesellschaft für Humangenetik. 2010 wurde er von der DFG in das Nationale Aktionsbündnis für Menschen mit Seltene Erkrankungen berufen. Seit 2012 ist er Sprecher des neu gegründeten Essener Zentrums für Seltene Erkrankungen. 2004 erhielt er den Wissenschaftspreis der European Society of Human Genetics. Im selben Jahr wurde er in die Nationale Akademie der Wissenschaften (Leopoldina) gewählt. 2007 erhielt er den Dr. Claudia Benton Award for Scientific Research of the Angelman Syndrome Foundation, USA. 2012 wurde er mit der Max-Delbrück Vorlesung der Gesellschaft für Genetik geehrt. Bernhard Horsthemke hat mehr als 200 Originalarbeiten und Übersichten in begutachteten Zeitschriften veröffentlicht.

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Dieser Text wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt. Die hier veröffentlichte Version der E-Publikation kann von einer eventuell ebenfalls veröffentlichten Verlagsversion abweichen.

**DOI:** 10.17185/duepublico/70490  
**URN:** urn:nbn:de:hbz:464-20190822-153555-4

Erschienen in: UNIKATE 44 (2013), S. 12-21

Alle Rechte vorbehalten.