

Vorträge zur Jahrestagung der DGfZ 2013 in Göttingen

Zur Bedeutung der Epigenetik für Nutztierwissenschaft und Tierzucht

H. NIEMANN¹

Zusammenfassung

Epigenetik beinhaltet biochemische Veränderungen an der DNA und den Histonproteinen, die mit Veränderungen in der Genexpression verbunden sind, vererbbar sind, aber die DNA-Basenabfolge nicht verändern. Wesentliche Mechanismen sind die DNA-Methylierung und die biochemische Veränderung der Histonproteine durch Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen oder Carboxylierungen. Ferner werden zu den epigenetischen Mechanismen in der Embryonalentwicklung die X-Chromosom-Inaktivierung und die Ausbildung der physiologischen Telomerenlänge gezählt. Die DNA-Methylierung spielt beim Säuger eine wesentliche Rolle in der frühen Embryonalentwicklung, da die spezifischen Genexpressionsmuster durch entsprechende DNA-Methylierungsveränderungen, in Form einer De- und Remethylierung in der Präimplantationsphase sichergestellt werden. Inzwischen liegen ausreichend Daten vor, die zeigen, dass die assistierten Reproduktionstechniken (ARTs) mit einem erhöhten Risiko für epigenetische Veränderungen verbunden sind, die wiederum mit Aberrationen in der Entwicklung einhergehen können. Epigenetische Phänomene können auch zur Ausbildung eines spezifischen Phänotyps im erwachsenen Tier beitragen (z.B. Callipyge). Im Gegensatz zu Nutztieren sind im Humanbereich epigenetisch bedingte Erkrankungen gut bekannt; epigenetisch wirksame Arzneimittel befinden sich bereits in der Entwicklung. Die Erforschung epigenetischer Mechanismen kann wesentlich zur Verbesserung der Nutztierzucht beitragen.

Schlüsselwörter: DNA Methylierung, Genexpression, Imprinting, assistierte Reproduktionstechniken, somatisches Klonen, transgenerationale Effekte

Summary

The role of epigenetics in animal science and animal breeding

Epigenetics include biochemical modifications of the DNA and the core histone proteins that are associated with changes in gene expression that can be passed on to progeny, but do not involve structural changes of the DNA sequence. The important mechanisms are DNA methylation and specific biochemical changes of the histone proteins by acetylation, methylation, phosphorylation and carboxylation. X-chromosome inactivation and telomere length regulation are further important epigenetic mechanisms that occur during early mammalian development. The DNA methylation profile plays a critical role in mammalian preimplantation development. The specific gene expression patterns are

¹ Institut für Nutztiergenetik, FLI, Mariensee, 31535 Neustadt, E-Mail: heiner.niemann@fli.bund.de

regulated by waves of de- and remethylation of the embryonic DNA. A growing number of studies shows that assisted reproductive technologies (ARTs) such as *in vitro* fertilization of oocytes and *in vitro* culture of embryos are associated with an increased risk of epigenetic changes that in turn may result in developmental deficiencies and aberrations. Epigenetic effects may contribute to a specific phenotype in adult animals (f. ex. Callipyge gene). Several human diseases have been identified as being epigenetic in nature; epigenetic drugs are currently in clinical development for treatment of patients. Research into the role of epigenetic mechanisms will yield significant clues towards the improvement of livestock breeding.

Keywords: DNA methylation, gene expression, imprinting, assisted reproductive technologies, somatic cloning, transgenerational effects

1 Einleitung

Unter Epigenetik werden im wesentlichen biochemische Veränderungen an der DNA und den Histonproteinen verstanden, die mit Änderungen in der Genexpression verbunden sein können, vererbbar sein können, aber die Basensequenz in der DNA nicht verändern. Die primäre epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung, die durch das Anheften einer Methylgruppe an die Cytosinbase im GC-Dinukleotid erfolgt (ANTEQUERA, 2003). Im Säuger genom mit ~22.000 Genen sind die Regionen mit DNA-Methylierung nicht gleichmäßig verteilt, sondern liegen in 30–40.000 sogenannten CpG-Inseln vor, d.h. genomischen Bereichen mit einer Größe von 200–2.000 Nukleotiden, in denen der G+C-Anteil mehr als 50% beträgt und das Verhältnis von tatsächlich beobachteten zur erwarteten Anzahl von CpGs höher als 0,6 ist. Diese CpG-Inseln sind besonders in Promoterregionen von Genen nachgewiesen worden (ANTEQUERA, 2003). Ein korrektes Muster dieser Cytosinmethylierung an den CpG-Dinukleotiden ist essenziell für die normale Entwicklung beim Säuger (LI, 2002). Aberrationen vom physiologischen DNA-Methylierungsmuster können mit einem Absterben der Embryonen oder Feten verbunden sein.

Die DNA-Methylierung spielt darüber hinaus eine wesentliche Rolle bei der Unterdrückung parasitärer Promoter, z.B. von Viren, und ist Teil des Gensilencing Mechanismus in eukaryontischen Zellen (JONES, 1999). In den meisten Fällen ist die DNA-Methylierung mit dem Abschalten der Genexpression verbunden; jedoch ist in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an Genen gefunden worden, die durch Methylierung aktiviert werden kann, insbesondere Tumorsuppressor Gene (JONES, 1999; LI, 2002). Die epigenetische Regulation wird als wesentlich für die Ausbildung der biologischen Komplexität multizellulärer Organismen angesehen, und die Komplexität der epigenetischen Regulation nimmt mit der Größe des Genoms zu (MAGER und BARTHOLOMEI, 2005). Epigenetische Mechanismen spielen bei der Regulation der abgelesenen Gene, die nur ~5% des Säuger genoms repräsentieren, eine herausragende Rolle. Dies ist durch die Ergebnisse des ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) Projekts deutlich geworden (PENNISI, 2012).

Epigenetische Mechanismen und Phänomene haben in den letzten Jahren stark an wissenschaftlichem und medizinischem Interesse gewonnen, besonders im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und der Entwicklung der assistierten Reproduktionstechniken (ART), sowohl bei Nutztieren als auch beim Menschen. Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über wesentliche epigenetische Mechanismen in der frühen Embryonalentwicklung beim Säuger gegeben. Im Anschluss daran wird auf die Bedeutung der Epigenetik für die moderne Tierzucht und Tierzuchtforschung, mit Schwerpunkt bei der Embryonenproduktion *in vitro* und somatischem Klonen, eingegangen.

2 DNA-Methyltransferasen (DNMT)

Die DNA-Methylierung hängt im Wesentlichen von der Aktivität bestimmter Enzyme, den DNA-Methyltransferasen (DNMTs) ab. Die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT-1) ist ein Enzym, das die Methylierung der hemi-methylierten CpG-Dinukleotide nach der DNA-Replikation wieder herstellt; es ist also ein Unterhaltungsenzym (BESTOR, 1992). Die oozytenspezifische Isoform DNMT-1 α ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der maternalen Imprints in weiblichen Gameten. DNMT-3a und 3b sind Enzyme, die die de novo-Methylierung der DNA katalysieren und damit für das Setzen neuer DNA-Methylierungsstellen in der Entwicklung entscheidend sind (OKANO et al., 1999). Die Aktivität der DNA-Methyltransferasen ist eng mit der von Histon De-acetylasen (HDAC), Histon-Methyltransferasen (HMTs) und mehreren ATPasen verbunden; alle Enzyme sind also Teil eines komplexen Systems, das die Chromatinstruktur reguliert und damit die Genexpression wesentlich beeinflusst (BURGERS et al., 2002).

3 Genom-Reprogrammierung durch DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung

Während der frühen Embryonalentwicklung beim Säuger wird die DNA kurz nach der Bildung der Zygote (frisch befruchtete Oozyte) durch massive Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster reprogrammiert. Die paternale DNA wird unmittelbar nach der Fertilisierung aktiv demethyliert, während die maternale DNA etwas später durch passive Mechanismen demethyliert wird (DEAN et al., 2003). Diese Mechanismen scheinen hoch konserviert zu sein und sind bei einer Reihe von Spezies gefunden worden, wie Maus, Rind, Schwein, Ratte, Kaninchen und Mensch (LEPIKOV et al., 2008). Zu speziesspezifischen Zeitpunkten in der Entwicklung beginnt dann die Remethylierung der embryonalen DNA; der Beginn der Remethylierung fällt meist zusammen mit dem Start der embryonalen genomischen Aktivität (Maus: 2-Zellstadium, Schwein: 4-Zellstadium, Rind: 8–16-Zellstadium, Mensch: 8–16-Zellstadium). Diese komplexen Mechanismen stellen sicher, dass entscheidende Schritte in der frühen Embryonalentwicklung, wie der Beginn der ersten Zellteilung, die Kompaktierung der embryonalen Zellen bei der Morulabildung, die Blastozystenentwicklung mit der Ausbildung der beiden Zellkompartimente ICM (Innere Zellmasse) und Trophoblast sowie Expansion und Schlüpfen der Blastozyste, durch eine fein regulierte Abfolge im Genexpressionsmuster ungestört ablaufen können.

4 Imprinting

Das Imprinting stellt eine besondere Funktion der DNA-Methylierung dar. Charakteristisch für das Imprinting ist, dass die beiden Allele eines bestimmten Gens unterschiedlich exprimiert werden. Üblicherweise wird durch das Imprinting entweder das maternale oder das paternale Allel während der Entwicklung durch Anfügen von Methylgruppen an das Cytosin in CpG-Dinukleotiden abgeschaltet. Das Gen wird dann nur von dem einen nicht-methylierten Allel exprimiert. Die DNA-Methylierung geschieht insbesondere an den Imprinting Control Regions (ICRs) und wird im Wesentlichen durch die de novo Methyltransferase DNMT-3a sichergestellt. Typisch für die dem Imprinting unterliegenden Gene ist, dass sie in sogenannten Clustern gefunden werden und dass die ICRs eine regionale Kontrolle der Genexpression ausüben (REIK und WALTER, 2001). Bei der Maus sind bisher etwa 50, beim Menschen etwa 80 Gene, die dem Imprinting unterliegen,

identifiziert worden (DEAN et al., 2003; CONSTANCIA et al., 2004); beim Rind sind bisher ~10 imprinted Gene gefunden worden. Das Imprinting ist ein epigenetischer Mechanismus, der Anforderungen, Zuteilung und Nutzung der Ressourcen für den sich entwickelnden Fetus regelt, und deshalb in der fetalen und neonatalen Entwicklung beim Säuger aktiv ist. In den meisten Fällen erhöhen Gene, die vom paternal vererbten Allel exprimiert werden, den Ressourcenverbrauch von der Mutter zum Fetus, während maternal exprimierte Gene diesen Transfer reduzieren, um das Überleben der Mutter sicher zu stellen (CONSTANCIA et al., 2004). Die Imprint-Markierungen werden während der Entwicklung der Keimzellen zu reifen Gameten (Spermien und Oozyten) gesetzt. In der Keimbahn werden die Imprintmarks so angelegt, dass die reifen Gameten das Geschlecht der jeweiligen Keimbahn widerspiegeln, bedingt durch die Abfolge von Löschen und Wiedereinsetzen der jeweiligen DNA-Methylierungsmarks (REIK und WALTER, 2001).

5 Histonmodifikationen

Die Histone sind die Hauptproteinbestandteile des Chromatins; die vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 bilden das Nukleosom. Post-transnationale Modifikationen der Histone spielen bei der Fähigkeit des Genoms, biologische Informationen zu speichern, freizusetzen und weiter zu vererben, eine entscheidende Rolle (FISCHLE et al., 2003). Zahlreiche Histon-assoziierte regulatorische Veränderungen sind bekannt, wie die Histon-Acetylierung, -Phosphorylierung, -Carboxylierung und -Methylierung. Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysieren die Methylierung an spezifischen Positionen des Nukleosoms in Säugerzellen. Die Deacetylierung der Histonproteine wird durch Isoformen der Histon De-acetylase (HDAC) durchgeführt. Die Histonacetyltransferasen (HATs) sind an verschiedenen biologischen Prozessen, wie transkriptionelle Aktivierung, Genabschaltung, DNA-Reparatur und Zellzyklus beteiligt und spielen deshalb in Wachstum und Entwicklung eine entscheidende Rolle (CAROZZA et al., 2003).

6 Epigenetik und assistierte Reproduktionstechniken

Neben der *In-vivo*-Produktion von Embryonen über Superovulation und Gebärmutter-spülung sind in den letzten zwei Jahrzehnten verschiedene *In-vitro*-Verfahren zur Erzeugung von Embryonen, insbesondere beim Rind, bis zur Praxisreife entwickelt worden (KUES et al., 2008b). Die *In-vitro*-Produktion von Embryonen beinhaltet die Gewinnung von Oozyten entweder aus Schlachthofmaterial oder von lebenden Tieren mit Hilfe der ultraschallgeleiteten Follikelpunktion (OROPEZA et al., 2007), die anschließende Reifung der Oozyten *in vitro* bis zu befruchtungsfähigen Metaphase II (MII) Oozytenstadien, die *In-vitro*-Fertilisation durch eine etwa 20-stündige Ko-inkubation mit den vorbereiteten Spermien sowie die anschließende 6–8 Tage dauernde *In-vitro*-Kultur bis zu transfer-tauglichen Stadien, d.h. späten Morulae und Blastozysten (WRENYCKI et al., 2001). Im Jahre 2011 sind beim Rind weltweit etwa 572.000 *in vivo* produzierte Embryonen und 374.000 *in vitro* produzierte Embryonen übertragen worden (STROUD, 2012).

Trotz vielfältiger und intensiver Forschungsanstrengungen bestehen teilweise noch große Unterschiede zwischen *in vitro* produzierten und *in vivo* erzeugten Rinderembryonen. Die Unterschiede können die Morphologie (Farbe, Dichte, Zellzahl und Größe), den exakten Zeitpunkt der Zellteilungen in der Entwicklung, den Triglyceridgehalt, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber tiefen Temperaturen, verminderte Stabilität der Zona pellucida, Unterschiede im embryonalen Metabolismus sowie häufig eine erhöhte embryonale und fetale Mortalität, betreffen (WRENYCKI et al., 2005b). In einer eigenen Studie betrug das

Geburtsgewicht von Kälbern, die aus Embryonen produziert worden waren, die in Kulturmedium bis zu Blastozysten entwickelt wurden, 53–57 kg, während bei den Kälbern aus Kontrollembryonen, die nach Superovulation bzw. künstlicher Besamung (*In-vivo*-Produktion) gewonnen wurden, durchschnittliche Geburtsgewichte von 43–45 kg festgestellt wurden (LAZZARI et al., 2002). Nach 3–4 Monaten waren keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Kälbern mehr festzustellen. Es wurden Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen im Expressionsprofil entwicklungsrelevanter Gene gefunden, wahrscheinlich bedingt durch epigenetische Modifikationen (LAZZARI et al., 2002).

Neben der *In-vitro*-Produktion können entwicklungsfähige Embryonen auch durch somatisches Klonen erstellt werden. Dabei wird eine intakte somatische Zelle, zumeist Fibroblasten, in eine entkernte, *in vitro* gereifte Oozyte übertragen, beide Komponenten werden durch kurze elektrische Impulse miteinander fusioniert, die erstellten Komplexe werden chemisch und/oder elektrisch aktiviert und anschließend bis zu transfertauglichen Stadien *in vitro* kultiviert. Bei Rind und Schwein liegen bereits ausreichende Daten zur Produktion entwicklungsfähiger geklonter Blastozysten vor (NIEMANN und LUCAS-HAHN, 2012). Beim Rind können inzwischen durch Klonen mit ähnlicher Häufigkeit (30–35% der befruchteten Oozyten) entwicklungsfähige Blastozysten erstellt werden wie durch *In-vitro*-Fertilisation und Kultur (NIEMANN und LUCAS-HAHN, 2012).

Nach Übertragung von geklonten Embryonen sind bei den daraus geborenen Kälbern teilweise stärkere Veränderungen beobachtet worden, insbesondere zu Beginn der Untersuchungen zum somatischen Klonen. Dabei wurden neben der Übergröße verschiedene pathologische Veränderungen festgestellt, die unter dem Überbegriff Large Offspring Syndrome (LOS) zusammengefasst werden und besonders Klone von Rind, Schaf und Maus betrafen. Durch verbesserte Protokolle des Klonvorgangs und vertiefte Kenntnisse der epigenetischen Reprogrammierung ist das Auftreten von LOS in den letzten Jahren stark zurückgegangen. Die nach dem Klonen beobachteten Entwicklungsstörungen werden mit Fehlern in der epigenetischen Reprogrammierung in Verbindung gebracht (NIEMANN et al., 2008; NIEMANN et al., 2012). Beim somatischen Klonen kommt es zur größtmöglichen epigenetischen Reprogrammierung, indem das Expressionsprofil der differenzierten Zelle komplett gelöscht wird und das neue embryonalspezifische Expressionsprofil etabliert werden muss, um eine ungestörte embryonale und fetale Entwicklung sicher zu stellen (NIEMANN et al., 2008; NIEMANN et al., 2012). Dies beinhaltet die Abschaltung von ~8.000–10.000 gewebespezifischen Genen in der somatischen Zelle und den Beginn des embryonalspezifischen Programms der Genexpression mit mehr als 10.000–12.000 Genen (KUES et al., 2008a).

Die Embryonalentwicklung beim Rind wird vielfach als Modell für die humane Embryonalentwicklung, insbesondere im Zusammenhang mit den zunehmend eingesetzten ARTs verwendet. Die ARTs (*In-vitro*-Fertilisation, intracytoplasmatische Spermieninjektion, ICSI, etc.) werden angewendet, um Patienten mit Fertilitätsstörungen zu einem Kind zu verhelfen. Es wird geschätzt, dass bereits ~5–10% der Kinder in den Industrieländern nach ARTs geboren werden. Inzwischen liegen gesicherte Befunde vor, die für ein erhöhtes Risiko von Entwicklungsabnormalitäten bei Kindern aus ART sprechen. Nach ICSI wurde eine erhöhte Frequenz im Auftreten des Imprinting Defekts Angelmann Syndrom gegenüber entsprechenden Kontrollen beobachtet. Nach Anwendung von *In-vitro*-Fertilisation und ICSI war das Auftreten von Beckwith-Wiedemann-Syndrom, einem epigenetisch bedingten Defekt mit Ähnlichkeiten zum LOS, von durchschnittlich 1–2 auf 4–5% verdoppelt. Ferner wurde ein erhöhtes Auftreten von Retinoblastoma festgestellt. Nach Übertragung von IVF/ICSI produzierten Embryonen traten darüber hinaus häufiger monozygote Zwillinge auf, die wiederum ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen. Eine umfassende Analyse der vorliegenden Daten hat ergeben, dass zwei Drittel der publizierten Studien ein um etwa 25% erhöhtes Risiko für Geburts-

fehler nach ART zeigen (HANSEN et al., 2005). In einer Metaanalyse wurde ein statistisch gesichertes erhöhtes Risiko von 30–40% für epigenetische Defekte in Zusammenhang mit ART nachgewiesen (HANSEN et al., 2005). Bei Kindern aus ART mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom wurde der Verlust der Methylierung an einer ICR festgestellt (LIM et al., 2009). Zudem ist nachgewiesen worden, dass sich das Kulturmedium, in dem *in vitro* fertilisierte Embryonen für einige Tage kultiviert werden, auf das Geburtsgewicht der Neugeborenen auswirken kann (DUMOULIN et al., 2010). Diese Befunde sprechen eindeutig für epigenetische Effekte während der Entwicklung, bedingt durch die extrakorporale *In-vitro*-Phase. Da grundlegende Studien an Humanembryonen auf Grund ethischer Erwägungen und gesetzlicher Begrenzungen nur in sehr geringem Umfang möglich sind, wird das Rindermodell zunehmend zur Aufklärung epigenetischer Störungen herangezogen (WRENZYCKI et al., 2005a).

7 Genspezifische DNA-Methylierungsmuster in bovinen Embryonen unterschiedlicher Herkunft

Wir haben die Veränderungen in der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit der Anwendung assistierter Reproduktionstechniken, wie somatischen Kerntransfer und *In-vitro*-Produktion, bei Rinderembryonen untersucht (NIEMANN et al., 2010). Dafür wurden 25 entwicklungsrelevante Gene, lokalisiert auf 15 verschiedenen Chromosomen, ausgewählt, die tieferen Einblick in die Regulation der frühen Embryonalentwicklung geben. Insgesamt haben wir dazu eine Gruppe von 41 Amplikons, die 1079 CpG-Stellen beinhalteten, mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung auf Änderungen im DNA-Methylierungsmuster untersucht. Die Methylierungsanalyse wurde an DNA aus Pools von jeweils 80 Blastozysten durchgeführt, die entweder *in vivo* gewonnen, d.h. aus den Uterushörnern superovulierter Spenderkühe ausgespült, oder durch *In-vitro*-Produktion erstellt (*In-vitro*-Reifung, -Fertilisation, -Kultur) oder durch somatischen Kerntransfer mit weiblichen und männlichen Fibroblasten erzeugt worden waren. Die einzelnen Gene waren dabei durch eine unterschiedliche Anzahl (~10–40) an CpG-Stellen repräsentiert. Die embryonalen DNA-Methylierungsmuster wurden mit denen der somatischen Komponenten, Blutzellen und männliche und weibliche Fibroblasten, aus denen die Embryonen geklont wurden, verglichen (NIEMANN et al., 2010).

Nach Kerntransfer wurde eine massive epigenetische Reprogrammierung gefunden, die als erheblich reduzierte Methylierung in den Embryonen erkennbar war (NIEMANN et al., 2010). Es wurde ferner gefunden, dass nicht alle Gene und Amplikons gleich empfindlich auf den Klonvorgang reagierten. Bei einer Reihe von Amplikons blieb das Methylierungsmuster nach somatischem Kerntransfer unverändert. Durch eine weiter gehende Analyse von 28 besonders informativen Amplikons (s.g. Hotspot Loci), die 523 individuelle CpG-Stellen repräsentieren, wurden Amplikons mit Methylierungsmustern identifiziert, die charakteristisch für eine bestimmte Kategorie an Embryonen waren.

Damit wurde erstmals die weitgehende Demethylierung der DNA differenzierter somatischer Zellen nach somatischem Klonen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden durch die Ergebnisse dieser Studie erstmals spezifische CpGs/Amplikons identifiziert, die zur Beurteilung der Blastozystenqualität herangezogen werden können und Aussagen zum Reprogrammierungszustand nach somatischem Klonen machen können.

8 Reprogrammierung im DMR des IGF2-Gens in bovinen Blastozysten

Das IGF2-Gen (Insulin-like growth factor 2) kodiert für einen Wachstumsfaktor, der für eine reguläre embryonale und fetale Entwicklung von essenzieller Bedeutung ist.

Wir hatten in einer vorangegangenen Studie im letzten Exon des IGF2 Gens eine Differentially Methylated Region (DMR) identifiziert (GEBERT et al., 2006). Dieser DMR war im paternalen Allel methyliert, d.h. er wurde vom maternalen Allel exprimiert. Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung haben wir eine Analyse des Methylierungsmusters in diesem DMR in bovinen Blastozysten aus verschiedenen Produktionssystemen vorgenommen (GEBERT et al., 2009). Diese Analyse ergab, dass der DMR in Zygoten zu 30% methyliert war. Der Methylierungsgrad ging bis auf 5% im 4-Zellstadium zurück und stieg dann bis zum Blastozystenstadium auf 10% wieder an, wobei zwischen *in vivo* und *in vitro* produzierten Blastozysten keine Unterschiede bestanden. Bei *in vivo* produzierten Embryonen war die DNA-Methylierung in weiblichen Blastozysten signifikant niedriger als in männlichen Blastozysten; dieser Geschlechtsdimorphismus blieb auch in geklonten Embryonen erhalten, was zeigt, dass an diesem DMR die epigenetische Reprogrammierung in geschlechtsspezifischer Weise auch nach somatischem Klonen stattfand, was für einen intakten Reprogrammierungsmechanismus spricht. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass die Methylierungsmuster von der Herkunft der Embryonen abhängig sind und damit die Methylierung ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel zur Ermittlung der Embryonenqualität vor dem Transfer sein kann (GEBERT et al., 2009).

9 Epigenetik und tierzüchterischer Phänotyp

In einigen Fällen ist nachgewiesen worden, dass epigenetische Mechanismen auch einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps bei landwirtschaftlichen Nutztieren ausüben können. Ein prominentes Beispiel dafür ist das Callipyge Gen. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Phänotyp im Skelettmuskel mit der Folge einer erheblich stärkeren Muskelausbildung an den Hinterbeinen bei Merinoschafen. Dieser Phänotyp tritt nur auf, wenn die Kopie des paternalen Gens mit der Callipyge Variante zusammen mit der normalen Kopie des maternalen Gens vererbt worden ist. Es handelt sich also um ein klassisches Beispiel für einen epigenetischen Mechanismus (GEORGES et al., 2003).

Epimutationen, die in der Keimbahn etabliert sind, können über mehrere Generationen weiter vererbt werden, was zu transgenerationalen Effekten führen kann (STRINGER et al., 2013). Um über mehrere Generationen vererbt zu werden, müssen diese Epimutationen die Reprogrammierung der Keimbahn überstehen. Dies kann durch zwei Wege geschehen, einmal in dem die Epimutation in der Keimbahn gegenüber dem Reprogrammierungsmechanismus resistent ist, oder in dem eine dauerhafte Veränderung im s.g. Memory Mechanismus dazu führt, dass spezifische Epimutationen in den sich entwickelnden Keimzellen erhalten bleiben. Auf diese Weise können transgenerationale Epimutationen in signifikanter Weise zu einem spezifischen Phänotyp beitragen (STRINGER et al., 2013). Epigenetische Mechanismen reagieren sensitiv auf bestimmte Umweltfaktoren und beeinflussen nicht die DNA-Sequenz, können deshalb auch wieder zurückgesetzt werden. Solche Epimutationen können also zu instabilen Vererbungsmustern führen, die über mehrere Generationen anhalten und ohne erkennbaren Grund zum ursprünglichen Merkmal revertieren können. Für den Nachweis einer epigenetischen Vererbung ist die Gewinnung des richtigen Zelltyps erforderlich, da epigenetische Veränderungen an den Zelltyp gebunden sind. Dies kann im Einzelfall schwierige Untersuchungen erforderlich machen. Prominente Beispiele für epigenetische Transgenerationseffekte betreffen die Einflüsse der Mutter (Ernährung, bestimmte Erkrankungen) auf die Nachkommen und die Konsequenzen von ARTs.

Im humanen Bereich ist inzwischen nachgewiesen worden, dass epigenetische Mechanismen bei der Ausbildung bestimmter Erkrankungen eine herausragende Rolle spielen. Dies betrifft insbesondere die Entstehung bestimmter Tumoren, neurologische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen (PORTELA und ESTELLER, 2010). Als Wirkungsmechanismen sind Aberrationen vom physiologischen DNA-Methylierungsmuster, aberrante Histonmodifikationen und Nukleosomveränderungen nachgewiesen worden. Inzwischen befinden sich mehrere epigenetisch wirksame Moleküle, wie HDAC-Inhibitoren oder DNA-Methylierungsinhibitoren in der klinischen Prüfung zur Zulassung als epigenetische Pharmaka. Damit sollen verschiedene Erkrankungen, wie multiple Myelome, Hodgkin-Lymphoma, B-Zell-Lymphom, andere Leukämieformen, Atherosklerose, Brustkrebs sowie neurodegenerative Erkrankungen behandelt werden (DEWOSKIN und MILLION, 2013). Ähnliche Studien zur Beteiligung epigenetischer Mechanismen an Erkrankung von Nutztieren sind bisher nicht bekannt.

Schlussfolgerungen und zukünftige Entwicklung

Epigenetische Phänomene sind essenziell in der frühen Embryonalentwicklung bei Nutztieren und die Ausbildung der physiologischen DNA-Methylierungsmuster ist essenziell für eine ungestörte Embryonal- und Fetalentwicklung. Epigenetische Mechanismen spielen zudem eine zentrale Rolle bei der Anwendung von ARTs, insbesondere beim somatischen Klonen, der *In-vitro*-Produktion von Embryonen oder bei induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen). Dabei kann es in manchen Fällen zu aberranten epigenetischen Veränderungen kommen (Epimutationen), die im Einzelfall mit Entwicklungsstörungen verbunden sein können. In Einzelfällen ist nachgewiesen worden, dass epigenetische Phänomene in beträchtlichem Umfang zur Ausbildung eines Phänotyps auch bei Nutztieren beitragen können.

Die Aufklärung der DNA-Methylierungsprofile im gesamten Genom ist wesentlich für das Verständnis der physiologischen Bedeutung der Epigenetik in der embryonalen, fetalen und postnatalen Phase. In den letzten Jahren hat es große methodische Fortschritte in der Analyse der DNA-Methylierung gegeben (BAKER, 2010). Nachdem viele Jahre nur einzelne Gene, besonders mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung in Bezug auf die DNA-Methylierung untersucht werden konnten, stehen heute Verfahren zur genomweiten Analyse der DNA-Methylierung zur Verfügung; damit kann das gesamte Epigenom dargestellt werden (LAIRD, 2010). Ferner haben verschiedene Grundlagenarbeiten nachgewiesen, dass neben den bekannten Regulationsmechanismen, wie den DNMT-Enzymen, weitere regulative Mechanismen von Seiten der small-RNAs (smRNAs), Proteinen mit Domänen, die an methylierte DNA binden können, sowie DNA-Glykolasen, an der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Epigenoms beteiligt sind. In dieser Hinsicht bestehen große Ähnlichkeiten zwischen Säugerorganismen und Pflanzen (LAW und JACOBSEN, 2010).

Studien zur embryonalen Entwicklung bei Modellorganismen, wie Maus und Rind, im wesentlichen im Zusammenhang mit der Entwicklung der *In-vitro*-Produktion von Embryonen und dem somatischen Klonen, sowie bei der Produktion von Humanembryonen im Zusammenhang mit den ARTs haben ergeben, dass die frühe Entwicklungsphase besonders empfindlich auf Mängel in der Umwelt reagiert, in dem tiefgreifende epigenetische Veränderungen mit der Folge von unphysiologischen Genexpressionsmustern auftreten können. Eine intensive interdisziplinäre Forschung zur Aufklärung epigenetischer Mechanismen ist deshalb erforderlich, um Entwicklungsabnormalitäten zu reduzieren oder vollständig zu vermeiden. Die Präimplantationsentwicklung beim Rind kann in diesen Forschungsarbeiten als Modell eine wichtige Rolle spielen.

Literatur

- ANTEQUERA, F., (2003): Structure function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and Molecular Life Sci.* **60**, 1647–1658.
- BAKER, M., (2010): Epigenome: mapping in motion. *Nature Methods* **7**, 181–185.
- BESTOR, Th., (1992): Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* **11**, 2611–2617.
- BURGERS, W.A., F. FUKS und T. KOUZARIDES, (2002): DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet.* **18**, 275–277.
- CAROZZA, M.J., R.-T. UTLEY, J.-L. WORKMAN und J. COTE, (2003): The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321–329.
- CONSTANCIA, M., G. KELSEY und W. REIK, (2004): Resourceful imprinting. *Nature* **432**, 53–57.
- DEAN, W., F. SANTOS und W. REIK, (2003): Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **14**, 93–100.
- DUMOULIN, J.C., J.-A. LAND, A.-P. VAN MONTFOORT, E.-C. NELISSEN, E. COONEN, J.-G. DERHAAG, I.-L. SCHREURS, G.-A. DUNSELMAN, A.-D. KESTER, J.-P. GERAEDTS und J.-L. EVERS, (2010): Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum. Reprod.* **25**, 605–612.
- DEWOSKIN, V.-A. und R.-P. MILLION, (2013): The epigenetics pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 661–662.
- FISCHLE, W., Y. WANG und C.-D. ALLIS, (2003): Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475–479.
- GEBERT, C., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, D. GROEGER, R. REINHARDT, P. HAJKOVA, A. LUCAS-HAHN, J.-W. CARNWATH, H. LEHRACH und H. NIEMANN, (2006): The bovine *IGF2* gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genomics* **88**, 222–229.
- GEBERT, C., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, D. GRÖGER, J. THIEL, R. REINHARDT, H. LEHRACH, P. HAJKOVA, A. LUCAS-HAHN, J.-W. CARNWATH und H. NIEMANN, (2009): DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* **94**, 63–69.
- GEORGES, M., C. CHARLIER und N. COCKETT, (2003): The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends Genet.* **19**, 248–252.
- HANSEN, M., C. BOWER, E. MILNE, N. DE KLERK und J.-J. KURINCZUK, (2005): Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review. *Human Reproduction* **20**, 328–338.
- JONES, P.-A., (1999): The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**, 34–37.
- KUES, W., S. SUDHEER, D. HERRMANN, J.-W. CARNWATH, V. HAVLICEK, U. BESENFELDER, H. LEHRACH, J. ADJAYE und H. NIEMANN, (2008a): Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19768–19773.
- KUES, W.A., D. RATH und H. NIEMANN, (2008b): Reproductive biotechnology in farm animals goes genomics. *CAB Rev.* **3**, 1–18.
- LAIRD, P.W., (2010): Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 191–203.
- LAW, J.A. und St.-E. JACOBSEN, (2010): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 204–220.
- LAZZARI, G., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, R. DUCHI, T. KRUIP, H. NIEMANN und C. GALLI, (2002): Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* **67**, 767–775.

- LEPIKOV, K., V. ZAKHARTCHENKO, R. HAO, F. YANG, C. WRENZYCKI, H. NIEMANN, E. WOLF und J. WALTER, (2008): Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics & Chromatin*, 1–8.
- LI, E., (2002): Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–673.
- LIM, D., S.-C. BOWDIN, L. TEE, G.-A. KIRBY, E. BLAIR, F. FRYER, W. LAM, C. OLEY, T. COLE, L.-A. BRUETON, W. REIK, F. MACDONALD und E.-R. MAHER, (2009): Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* **24**, 741–747.
- MAGER, J. und M.-S. BARTHOLOMEI, (2005): Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nature Genetics* **37**, 1194–1199.
- NIEMANN, H. und A. LUCAS-HAHN, (2012): Somatic cell nuclear transfer cloning: practical application and current legislation. *Reprod. Dom. Anim. (Suppl. 5)*, 2–10.
- NIEMANN, H., X.-C. TIAN, W.-A. KING und R.-S.-F. LEE, (2008): Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* **135**, 151–163.
- NIEMANN, H., J.-W. CARNWATH, D. HERRMANN, G. WIECZOREK, E. LEMME, A. LUCAS-HAHN und S. OLEK, (2010): DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. *Cellular Reprogramming* **12**, 33–42.
- NIEMANN, H., W.-A. KUES, A. LUCAS-HAHN und J.-W. CARNWATH, (2012): Somatic cloning and epigenetic reprogramming in mammals. In: Atala A, Lanza R (eds.): *Handbook of Stem Cells. Volume 1, Pluripotent Cells. 2nd Edition*, Elsevier, ISBN 978-0-12-385942-6, 101–124.
- OKANO, M., D.-W. BELL, D.-A. HABER und E. LI, (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–257.
- OROPEZA, A., K.-G. HADELER und H. NIEMANN, (2007): Application of ultrasound-guided follicular aspiration (OPU) in prepubertal and adult cattle. *J. Reprod. Dev.* **52**, 31–38.
- PORTELA, A. und M. ESTELLER, (2010): Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **10**, 1057–1068.
- PENNISI, E., (2012): Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science* **337**, 1159–1161.
- REIK, W. und J. WALTER, (2001): Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 21–32.
- STRINGER, J.-M., S. BARRAND und P. WESTERN, (2013): Fine-tuning evolution: germ-line epigenetics and inheritance. *Reproduction* **146**, 37–48.
- STROUD, B., (2012): IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2012 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *IETS-Newsletter*, **30**, 16–26.
- WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, L. KESKINTEPE, A. MARTINS, S. SIRISATHIEN, B. BRACKETT und H. NIEMANN, (2001): Effects of basic culture medium and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Hum. Reprod.* **16**, 893–901.
- WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, A. LUCAS-HAHN, C. GEBERT, K. KORSawe, E. LEMME, J.-W. CARNWATH und H. NIEMANN, (2005a): Epigenetic reprogramming throughout pre-implantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **75**, 1–9.
- WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, A. LUCAS-HAHN, K. KORSawe, E. LEMME und H. NIEMANN, (2005b): Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod.Fertil.Dev.* **17**, 23–35.