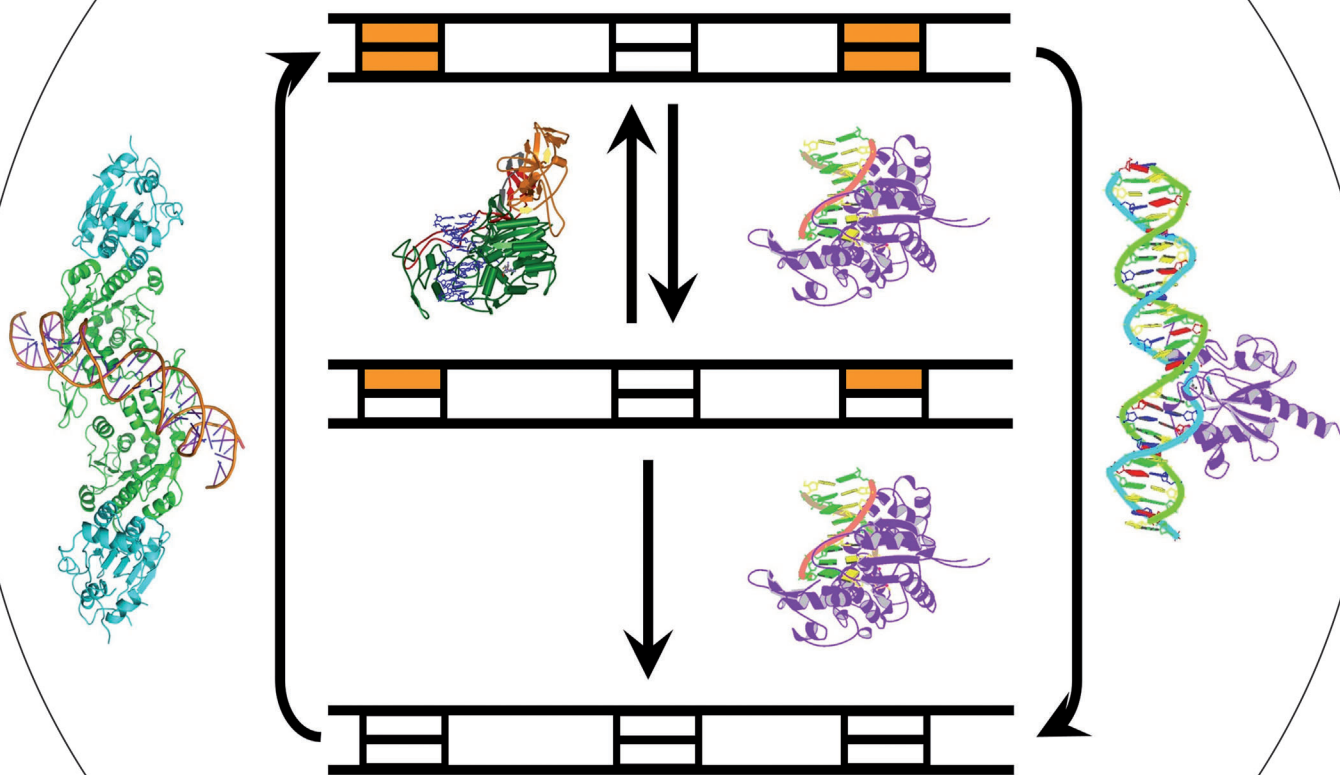


Genomic Imprinting – der Kampf der Geschlechter auf molekularer Ebene

Renata Z. Jurkowska und Albert Jeltsch*

Stichwörter:

DNA-Methylierung · Genomik ·
Menschliche Entwicklung ·
Molekulare Epigenetik ·
Molekulare Evolution



Genomic Imprinting (genomische Prägung) – die unterschiedliche Expression von maternal und paternal vererbten Genen – wurde als ein faszinierendes Beispiel für die Kontrolle der Genexpression durch epigenetische Prozesse im menschlichen Körper entdeckt. Es betrifft etwa 100 Gene, die oft an der Steuerung von Wachstum und Entwicklung beteiligt sind. In diesem Aufsatz diskutieren wir die Mechanismen, die zur Erzeugung von geschlechtsspezifischen Imprints in Form von DNA-Methylierungsmustern führen, ihre Erhaltung während des Wachstums und der Entwicklung des Organismus und die Prozesse, welche die elterlichen Imprints in eine monoallelische Genexpression umsetzen. Wir diskutieren die geschlechtsspezifische, dimorphe Natur von Imprints aus evolutionärer Sicht und präsentieren das vorherrschende Modell, dass molekulare Prägung in einem Interessenskonflikt zwischen den Eltern vermittelt, der in lebendgebärenden Tieren auftritt. Abschließend fassen die Relevanz dieses Vorgangs für die menschliche Gesundheit zusammen.

1. Entdeckung des Imprinting als nichtmendelsche Form der Vererbung

Säugetiere sind diploid, wobei jede Zelle zwei Kopien der Erbinformation trägt, jeweils eine von der Mutter über die Eizelle vererbt und die andere vom Vater über die Spermien. Trotz dieser scheinbar „einfachen“ Konstellation wurden Beispiele für nichtmendelsche, elternabhängige Vererbung in den 1970er Jahren entdeckt, was darauf hindeutet, dass an einigen Genorten eine der beiden Genkopien eine Prägung trägt, die die Expression des Gens unterdrückt.^[1] 1984 wurde der erste molekulare Beweis dafür erbracht, dass die beiden Kopien der elterlichen Genome nicht gleichwertig sind. Kerntransplantationsexperimente an Mäusen zeigten, dass jeweils ein mütterliches Genom und ein väterliches Genom für eine erfolgreiche Entwicklung erforderlich sind (Abbildung 1).^[2–4] In diesen Experimenten wurde der väterliche Pronucleus in befruchteten Mauseizellen entfernt und durch einen mütterlichen Pronucleus ersetzt, wodurch eine bimaternalne (gynogenetische oder parthenogenetische) Zygote erzeugt wurde. Umgekehrt wurde der mütterliche Pronucleus

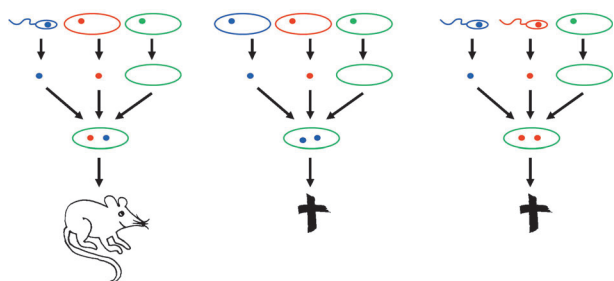


Abbildung 1. Entdeckung der Prägung in Kerntransplantationsexperimenten. Die Übertragung von einem männlichen und einem weiblichen Pronucleus in eine entkernte Eizelle ermöglicht eine normale Embryonalentwicklung, während die Übertragung von zwei männlichen oder weiblichen Pronuclei dies nicht erlaubt.

Aus dem Inhalt

1. Entdeckung des Imprinting als nichtmendelsche Form der Vererbung 13767
2. Molekulare Mechanismen der DNA-Methylierung und -Demethylierung 13769
3. Die Rolle der DNA-Methylierung als epigenetische Modifikation, die vererbbar, aber auch reversibel ist 13769
4. Mechanismus der Erzeugung von Imprints in Keimzellen von Dnmt3a/Dnmt3L und Dnmt1 13771
5. Mechanismus der Vererbung der DNA-Methylierung und -Imprints mithilfe von Dnmt1 13773
6. Geschlechtsunterschiede von DMRs und Gen-Silencing-Mechanismen 13775
7. Imprinting und der evolutionäre Konflikt zwischen männlich und weiblich in der Entwicklung von Säugetieren 13776
8. Medizinische Implikationen: Imprinting-Fehler und der Verlust der Prägung in Krebszellen 13777

durch einem zweiten väterlichen ersetzt und so eine bipaternale (androgenetische) Zygote erzeugt. Diese so manipulierten uniparentalen Zygoten konnten die Embryogenese nicht abschließen. Kontrollen zeigten, dass der Abbruch der Entwicklung nicht durch die Manipulation selbst hervorgerufen wurde, was klar dafür spricht, dass die Gegenwart eines mütterlichen und eines väterlichen Genoms zwingend erforderlich ist, um die Embryonalentwicklung zu durchlaufen. Dies wurde auf das Vorhandensein von geprägten Genen zurückgeführt, die ausschließlich entweder vom mütterlichen oder vom väterlichen Allel exprimiert werden und somit in den uniparentalen Zygoten nicht aktiv sind. Erste Beispiele geprägter Gene, die für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Typ 2 (Igf2; vom väterlichen Allel exprimiert), den Igf2-Rezeptor (Igf2r) und die nichtkodierende H19-RNA

[*] R. Z. Jurkowska, Prof. Dr. A. Jeltsch
Institut für Biochemie, Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 55, 70569 Stuttgart (Deutschland)
E-Mail: albert.jeltsch@ibc.uni-stuttgart.de

(beide vom mütterlichen Allel exprimiert) codieren, wurden 1991 in Mäusen identifiziert.^[5–8] Später wurde gefunden, dass der molekulare Marker, der zu einer Allel-spezifischen Expression von geprägten Genen führt, eine spezifische DNA-Methylierung ist, die auf einem Allel, aber nicht auf dem anderen auftritt.^[9–11]

In eukaryotischen Zellkernen wird die DNA in Chromatin verpackt, wobei etwa 147 Basenpaare der DNA um ein Histon-Oktamer aus zwei Kopien von jedem der vier Histon-Proteine H3, H4, H2A und H2B gewickelt sind. Wir wissen heute, dass die genomische Prägung ein epigenetischer Prozess ist, der sowohl DNA-Methylierung als auch Histon-Modifikationen umfasst und so eine monoallele Genexpression von einem elterlichen Locus bewirkt, ohne dessen DNA-Sequenz zu verändern. Diese epigenetischen Markierungen werden in der Keimbahn etabliert und in der Regel während der Entwicklung in allen somatischen Zellen eines Organismus aufrechterhalten, wenngleich Beispiele für den gewebe-spezifischen Verlust oder eine Modulation der Prägung beschrieben wurden.^[12] Über 100 der rund 20 000 menschlichen Gene oder Mausgene tragen einen Imprint.^[12,3] Angesichts der Tatsache, dass in den letzten Jahren mehrere genomweite DNA-Methylierungsstudien durchgeführt wurden, die Allel-spezifische Methylierungen identifiziert hätten, ist es unwahrscheinlich, dass diese Zahl in Zukunft stark anwächst. Geprägte Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Wachstums des Embryos, der Entwicklung von Zelllinien sowie beim Verhalten und Stoffwechsel.^[13] Sie treten häufig in Clustern auf, die in der Regel sowohl väterlich als auch mütterlich exprimierte Gene enthalten, in denen aber auch andere nicht geprägte Genen liegen. Die Cluster werden durch eine Imprinting-Kontrollregion (ICR) gesteuert, die eine differentiell methylierte Region (DMR) enthält, in der die Eltern-spezifische DNA-Methylierung auftritt. Normalerweise regelt eine ICR alle Gene in diesem Cluster, manchmal in großen genomischen Abständen.^[12,14] Ein bekanntes Beispiel für die Regulation der Expression von geprägten Genen in Mäusen ist das *Igf2r*-Gen (Abbildung 2), bei dem eine große nichtkodierende RNA genannt Airn (Antisense-RNA *Igf2r* non-coding) vom väterlichen Allel exprimiert wird. Airn verläuft in einer Antisense-Richtung zu *Igf2r* und verhindert die Expression von *Igf2r* auf dem väterlichen Chromosom.^[15] Im mütterlichen Allel verhindert eine Methylierung der DMR die Expression der nichtkodie-

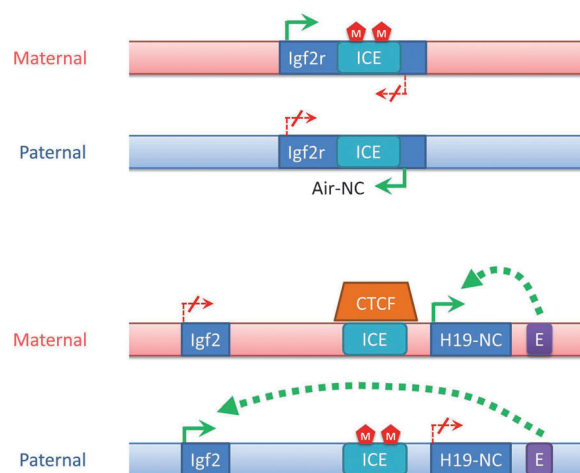


Abbildung 2. Etablierung der Allel-spezifischen Genexpression an den geprägten *Igf2*- und *Igf2r*-Loci. Das Imprinting Control Element (ICE), einschließlich der differentiell methylierten Region (DMR), liegt im *Igf2r*-Locus innerhalb des *Igf2r*-Gens (angezeigt durch ein blaues Rechteck). Im *Igf2*-Locus befindet sich das ICE zwischen den *Igf2*- und *H19*-Genen. Das ICE des *Igf2r*-Locus ist im väterlichen Allel unmethyliert. Dies ermöglicht die Expression der Airn nichtkodierenden Antisense-RNA von einem Antisense-Promotor, die zur Repression des *Igf2r*-Gens führt. Methylierung der ICE im mütterlichen Allel verhindert die Aktivität des Antisense-Promotors und ermöglicht so die Expression von *Igf2r*. Am *Igf2*-Locus ist das ICE im mütterlichen Allel unmethyliert. Dies ermöglicht die Bindung des CTCF-Insulator-Proteins, das die Wirkung eines stromaufwärts gelegenen Enhancers auf dem *H19*-NC-Gen beschränkt. Im väterlichen Allel verhindert die Methylierung des ICE die Aktivität des *H19*-NC-Gens und die Bindung von CTCF, und dies ermöglicht es dem Enhancer, die Expression des *Igf2*-Gens anzukurbeln. Methylierung ist durch rote Fünfecke dargestellt. Aktive Allele werden durch grüne Pfeile, inaktive durch rote Pfeile angezeigt.

renden RNA, sodass das *Igf2r*-Gen transkribiert wird. Imprinting kann kompliziertere Formen der Regulierung umfassen, wie am Beispiel des *Igf2/H19*-Locus illustriert werden kann (Abbildung 2). Hier regelt die Methylierung der DMR die Bindung des CTCF (Zincfinger Protein CCCTC-binding factor)-Insulator-Proteins. Die DMR ist im mütterlichen Genom nicht methyliert, was die Bindung von CTCF ermöglicht, die anschließend die Wirkung eines stromabwärts gelegenen Enhancers auf das *Igf2*-Gen verhindert und so zu einer Verringerung der *Igf2*-Expression führt. Der Enhancer



Renata Z. Jurkowska studierte Biotechnologie an der Universität Warschau (Polen) und arbeitete auch an der Universität Montpellier. Sie promovierte unter Anleitung von Prof. A. Jeltsch an der Jacobs University Bremen über DNA-Methyltransferasen in Säugern. Danach wechselte sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin an das Institut für Biochemie der Universität Stuttgart. Ihre Forschungen befassen sich mit epigenetischen Enzymen und Chromatin.



Albert Jeltsch studierte Biochemie an der Universität Hannover, wo er bei Prof. A. Pingoud über Restriktionsendonucleasen promovierte. Nach seiner Habilitation an der Universität Gießen über DNA-Methyltransferasen wechselte er zur Jacobs University Bremen. Seit 2011 ist er Professor für Biochemie an der Universität Stuttgart. Er wurde mit dem Gerhard Hess-Förderpreis der DFG und dem BioFuture-Preis des BMBF ausgezeichnet. Seine Forschungsbereiche sind die molekulare Epigenetik, die Methylierung von DNA und Proteinen sowie das Design von Enzymen und künstlichen Genregulationssystemen.

treibt stattdessen die Expression der nichtkodierenden H19-RNA an. Im väterlichen Genom ist die DMR methyliert. Daher kann CTCF nicht binden, und die *Igf2*-Expression wird durch den Enhancer direkt stimuliert.^[16–18] Für weitere detaillierte Beschreibungen der Genetik und Molekularbiologie von Imprinting können mehrere ausgezeichnete Übersichtsartikel herangezogen werden.^[1,12,14,19]

2. Molekulare Mechanismen der DNA-Methylierung und -Demethylierung

Die Methylierung der C5-Position von Cytosin wird durch eine Klasse von Enzymen namens DNA-(Cytosin C5)-Methyltransferasen (MTase) eingeführt, die alle einen gemeinsamen katalytischen Mechanismus haben. Da das Cytosin ein elektronenarmes, heterocyclisches aromatisches System ist, ist seine C5-Position nicht nucleophil, sodass eine spontane Übertragung der Methylgruppe von *S*-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) auf die C5-Position von Cytosin nicht möglich ist. Die enzymatische Katalyse folgt dem Mechanismus einer Michael-Addition (Abbildung 3). Sie wird durch den nucleophilen Angriff eines Cystein-Thiols auf die C6-Position des Cytosins initiiert, der zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Enzym und der Nucleobase führt. Dadurch wird die negative Ladungsdichte am C5-Atom des Cytosins gesteigert, sodass es die Methylgruppe des Cofaktors nucleophil angreifen kann. Das katalytische Cystein liegt in einem charakteristischen PCQ-Aminosäuremotiv, das in DNA-(Cytosin C5)-MTasen konserviert ist. Der nucleophile Angriff des Cysteins kann durch eine vorübergehende Protonierung des Cytosins an seinem endocyclischen N3-Stickstoffatom durch ein katalytisches Glutamat unterstützt werden, das in einer konservierten ENV-Aminosäuresequenz liegt. Dieser Aminosäurerest kontaktiert außerdem das N4 des Cytosins und trägt dadurch zur Positionierung der Nuc-

leobase im aktiven Zentrum bei. Der Addition der Methylgruppe folgt eine Deprotonierung des C5-Atoms durch einen bislang nicht identifizierten Protonenakzeptor, wodurch die kovalente Bindung zwischen dem Enzym und der Nucleobase in einer Eliminierungsreaktion gelöst wird.^[20,21] Dieser Mechanismus erfordert einen Zugang des Enzyms zur gesamten Watson/Crick-Seite des Cytosins, was eine Methylierung von in einer B-DNA befindlichen Basen ausschließt. Daher rotieren DNA-Methyltransferasen während der Katalyse ihre Zielbase aus der DNA heraus und binden sie in einer hydrophoben Tasche ihres aktiven Zentrums in einem Vorgang, der „Basenausschlagen“ genannt wird und für alle DNA-Methyltransferasen charakteristisch ist.^[20,21] Zu beachten ist, dass der Mechanismus der Methylierung der exocyclischen Aminogruppen durch DNA-(Cytosin N4)- und DNA-(Adenin N6)-Methyltransferasen auch ein Basenausschlagen umfasst, sich aber ansonsten von dem hier beschriebenen Ablauf unterscheidet.^[21]

Drei verschiedene enzymatische Reaktionen wurden bislang mit DNA-Demethylierung – der Umwandlung von Methylcytosin nach Cytosin – verbunden: 1) die Entfernung der Base durch Deglucosylierung, 2) die Desaminierung des Methylcytosins und 3) die Oxidation von Methylcytosin zu Hydroxymethylcytosin und höher oxidierten Produkten.^[22,23] Diese Schritte schließen sich nicht gegenseitig aus und können kombiniert werden, z.B. kann Methylcytosin zu Thymin desaminiert werden, und dieses kann anschließend aus dem T:G-Basenfehlpaar von der Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) ausgeschnitten werden. Oxidative Demethylierungswege können auch von TDG abhängig sein, das auch Hydroxymethylcytosin umsetzt, aber eine direkte enzymatische Decarboxylierung von Carboxycytosin wäre ebenso möglich.

3. Die Rolle der DNA-Methylierung als epigenetische Modifikation, die vererbbar, aber auch reversibel ist

Wegen ihrer Stabilität, aber auch Reversibilität ist DNA-Methylierung ein ideales Signal, um geprägte Loci zu markieren, deren Modifikationszustand sich während der Keimzellentwicklung ändern muss, um an das Geschlecht des Organismus angepasst zu werden. DNA-Methylierung in Menschen erfolgt an der C5-Position von Cytosinresten, überwiegend innerhalb von CpG-Dinucleotiden, und nur selten an Nicht-CpG-Stellen. Allerdings sind nicht alle CpG-Stellen im Genom methyliert, und es existiert somit ein spezifisches Muster aus methylierten und unmethylierten CpGs. Im menschlichen Genom sind etwa 60–80 % aller CpGs in einem Zelltyp-spezifischen Muster methyliert. Die restlichen Stellen sind unmethyliert (Hemimethylierung ist ein seltener Zustand^[24–27]). Die epigenetische Natur der DNA-Methylierung, die gleichzeitig erblich und flexibel ist, kann anhand der Zyklen der DNA-Methylierung während der Zellteilung und Entwicklung (Abbildung 4) dargestellt werden. Wie von Riggs^[28] sowie von Holliday und Pugh^[29] bereits vor fast 40 Jahren vorgeschlagen wurde, besteht die molekulare Grundlage für die Vererbung der DNA-Methylierungsmuster

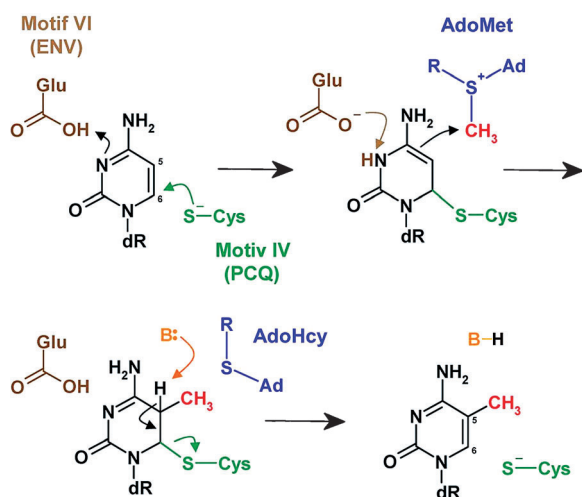


Abbildung 3. Katalytischer Mechanismus der DNA-(Cytosin C5)-Methyltransferasen. Einzelheiten hierzu sind im Text erläutert. Die Cytosinbase ist schwarz, AdoMet blau und die zu übertragende Methylgruppe rot dargestellt. Die katalytischen Aminosäuren sind braun und grün und eine noch nicht identifizierte Base ist orange gezeichnet.

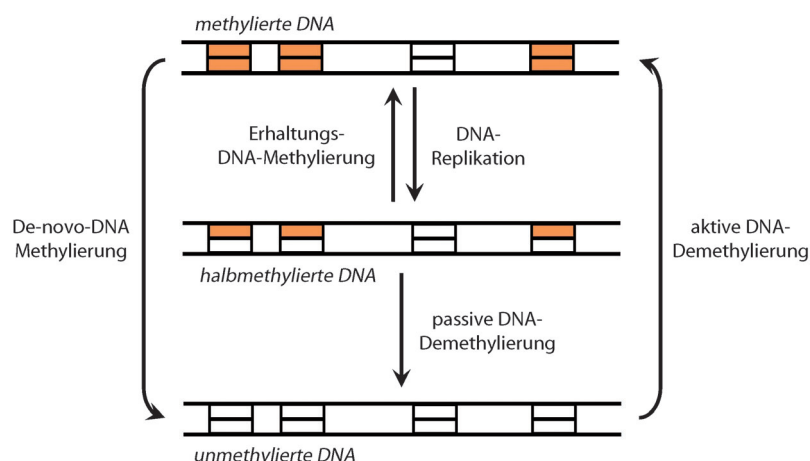


Abbildung 4. DNA-Methylierungsänderungen in Säugerzellen. DNA-Methylierungsmuster bestehen aus unmethylierten (weiß) und methylierten CpG-Stellen (orange). Sie werden nach der DNA-Replikation durch die Erhaltungsmethylierung aufrechterhalten und können entweder durch aktive, von der Replikation unabhängige Prozesse oder passiv im Zuge der Replikation verloren gehen. Erhaltungsmethylierung erfolgt hauptsächlich durch Dnmt1, während De-novo-DNA-Methylierung zunächst durch die Dnmt3-Enzyme eingeführt wird.

in der palindromen Natur der CpG-Stellen. Typischerweise liegt ein CpG entweder in einem vollständig methylierten Zustand vor, in dem die Cytosine in beiden DNA-Strängen des CpG methyliert sind, oder in einem unmethylierten Zustand, in dem beide Stränge unmodifiziert sind. Während der Replikation von methylierter DNA werden transient hemimethylierte CpGs erzeugt, in denen der elterliche Strang die Methylierung trägt, während der neu synthetisierte Tochterstrang unmethyliert ist. Somit ist das ursprüngliche Methylierungsmuster der DNA im parentalen Strang noch vorhanden. Der Tochterstrang wird anschließend von einer so genannten Erhaltungsmethylierung wieder methyliert, die als molekulare Kopiermaschine wirkt und das ursprüngliche Muster der Methylierung wiederherstellt. Diese Funktion wird durch ein Enzym übernommen, das spezifisch für hemimethylierte DNA ist, aber keine Methylierung an zuvor unmethylierten Stellen einbaut und dadurch das Methylierungsmuster über Zellteilungen bewahrt. Die Methylierung von CpG-Stellen in der Promotor-Region von Genen führt in der Regel zur Unterdrückung der Genexpression. Die regulatorische Funktion von DNA-Methylierung ist an einer Vielzahl von wichtigen biologischen Prozessen in Menschen, einschließlich dem genomischen Imprinting, beteiligt.

Während der Entwicklung beobachtet man bei Säugetieren zwei Zyklen der DNA-Methylierung.^[30–32] Nach der Befruchtung werden die Keimzell-spezifischen DNA-Methylierungsmuster in den Genomen der Ei- und Samenzellen global durch DNA-Demethylierung gelöscht, wodurch Totipotenz erreicht wird. Warum trotz der fast vollständigen genomweiten Demethylierung geprägte Gene in dieser Phase (Abbildung 5, Schritt 1) methyliert bleiben, ist eine der wichtigsten offenen Fragen in der Imprinting-Forschung. Dem Löschen der Methylierung folgt eine Welle der De-novo-DNA-Methylierung. Zum Zeitpunkt der Implantation übertragen De-novo-DNA-Methyltransferasen Methylgruppen auf beide

Stränge der DNA innerhalb von CpG-Stellen, wodurch das anfängliche embryospezifische Methylierungsmuster geschaffen wird, das anschließend mittels Erhaltungsmethylierung über Zellteilungen hinweg aufrechterhalten bleibt. Während der Entwicklung können kleinere Veränderungen der DNA-Methylierung auftreten, die zu Zelltyp-spezifischen Methylierungsmustern führen. Die Weitergabe dieser speziellen Muster trägt zur Entwicklung von Zelllinien bei. Ein zweites drastisches Zurücksetzen der DNA-Methylierung erfolgt in der Gametogenese, der Differenzierung der Keimzellen, in den direkten Vorläufern von Eizellen und Spermien. In dieser Phase wird die DNA-Methylierung ebenfalls global entfernt, um das Entwicklungspotenzial wiederherstellen und vorhandene Imprints zu löschen (Abbildung 5, Schritt 2). Dieser Prozess ist sehr wichtig, denn er stellt sicher, dass die von den Eltern geerbten Imprints nicht auf die nächste Generation übertragen werden.

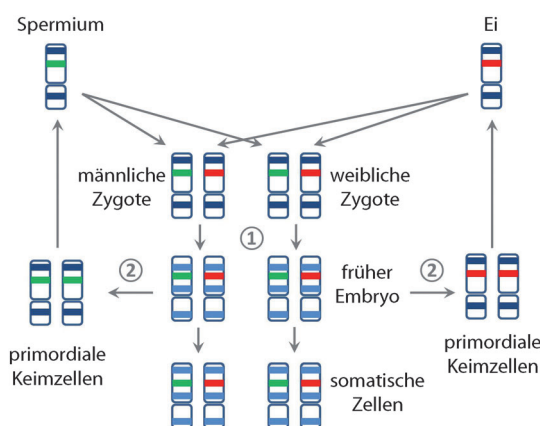


Abbildung 5. Imprinting-Zyklus in Säugetieren. Spermien und Eizellen enthalten gewebsspezifische DNA-Methylierung (dunkelblau) und Imprints (grün und rot). Nach der Befruchtung werden die Keimzell-spezifischen DNA-Methylierungsmuster gelöscht und durch neue Embryo-spezifische Muster ersetzt (hellblau). Imprints bleiben in diesem Schritt erhalten (Schritt ①). In Keimzell-Vorläuferzellen werden die DNA-Methylierungsmuster abermals gelöscht und neu gesetzt. Die Imprints werden dabei ebenfalls gelöscht und in einem geschlechts-spezifischen Muster neu erzeugt (Schritt ②).

Danach werden neue DNA-Methylierungsmuster einschließlich der Imprints an den DMRs in einer Eizellen- und Spermium-spezifischen Weise hergestellt. Konzeptionell kann die Erzeugung der Imprints in dieser Phase mit der Generierung von Gewebe-spezifischen DNA-Methylierungsmustern verglichen werden. Da Spermien und Eizellen spezialisierte Zelltypen sind, die nur in einem Geschlecht auftreten, sind zu diesem Zeitpunkt generierte Methylierungsmuster automatisch auch geschlechtsspezifisch.

4. Mechanismus der Erzeugung von Imprints in Keimzellen von *Dnmt3a/Dnmt3L* und *Dnmt1*

Geschlechtsspezifische DNA-Methylierungs-Imprints werden von De-novo-DNA-Methyltransferasen in sich entwickelnden Keimzellen erzeugt. Die wichtigsten De-novo-DNA-MTasen in Säugetieren sind *Dnmt3a* und *Dnmt3b*, die stark in weiblichen und männlichen Keimbahnzellen und auch in embryonalen Geweben exprimiert werden.^[33–36] Beide Enzyme wurden 1998 entdeckt, und es wurde gezeigt, dass sie De-novo-DNA-Methylierungsaktivität haben.^[34,37–39] Genetische Studien haben gezeigt, dass sowohl *Dnmt3a* als auch *Dnmt3b* essenziell für die Embryonalentwicklung bei Mäusen sind.^[34] Insbesondere zeigten konditionelle Knockout-Experimente, dass *Dnmt3a* für die korrekte Etablierung der Imprints während der Gametogenese erforderlich ist, während *Dnmt3b* für diesen Schritt entbehrlich ist.^[40–42] Später wurde ein drittes Mitglied der *Dnmt3*-Familie, *Dnmt3L* (*Dnmt3*-like), entdeckt, das auch während der Gametogenese und in frühen embryonalen Stadien exprimiert wird.^[1,43–45] Obwohl katalytisch inaktiv, colokalisiert *Dnmt3L* mit beiden *Dnmt3*-Enzymen und interagiert direkt mit den katalytischen Domänen von *Dnmt3a* und *Dnmt3b* und stimuliert ihre Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo.^[40,46–49] Daher wirkt *Dnmt3L* als positiver Regulator für die De-novo-Methylierung. Während die gezielte Zerstörung des *Dnmt3a*- oder *Dnmt3b*-Gens in Mäusen letal ist, sind Mäuse ohne *Dnmt3L* lebensfähig.^[40,44] Allerdings gebären weibliche Mäuse, denen *Dnmt3L* fehlt, obwohl sie fruchtbar sind, keine lebensfähigen Jungtiere. Der Entwicklungsdefekt in den Jungtieren liegt an einem fehlenden weiblichen Imprint, was deutlich zeigt, dass *Dnmt3L* für die korrekte Etablierung von Imprints in der weiblichen Keimbahn notwendig ist. Dieser Phänotyp ähnelt dem von weiblichen Mäusen mit einem keimbahnspezifischen Verlust von *Dnmt3a*,^[40,41] was darauf schließen lässt, dass sowohl *Dnmt3a* als auch *Dnmt3L* bei der Etablierung von DNA-Methylierung und Imprints während der Gametogenese kooperieren.

Weitere Hinweise auf den molekularen Mechanismus der Stimulation von *Dnmt3a* durch *Dnmt3L* kamen aus strukturellen und biochemischen Studien. Die Struktur der C-terminalen katalytischen Domäne von *Dnmt3a* im Komplex mit der C-terminalen Domäne von *Dnmt3L* offenbarte, dass beide Proteine ein lineares Heterotetramer bilden, das aus zwei *Dnmt3L*-Untereinheiten (an den Enden des Tetramers) und zwei *Dnmt3a*-Untereinheiten (in der Mitte) aufgebaut ist.^[50] Diese Struktur zeigte, dass die C-terminale Domäne von *Dnmt3a* zwei Protein/Protein-Interaktionsstellen aufweist: eine hydrophobe, durch die Wechselwirkung von zwei Phenylalaninresten gebildete (genannt FF), die *Dnmt3a*/*Dnmt3a*- und *Dnmt3a*/*Dnmt3L*-Wechselwirkungen vermittelt, und eine zweite, polare, durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk zwischen Arginin und Aspartatresten gebildete (genannt RD), die nur *Dnmt3a*/*Dnmt3a*-Wechselwirkungen vermitteln kann, da der entsprechende Bereich in *Dnmt3L* nicht vorhanden ist.^[51] Wichtig ist, dass Aminosäurereste aus der FF-Interaktionsstelle direkt mit wichtigen katalytischen oder AdoMet-bindenden Resten interagieren, was die stimulierende Wirkung von *Dnmt3L* auf die AdoMet-Bindung

und Katalyse von *Dnmt3a* erklären kann. Die RD-Interaktionsstelle der beiden *Dnmt3a*-Untereinheiten bildet die DNA-Bindungsstelle. Die Anordnung der beiden *Dnmt3a*-Untereinheiten im *Dnmt3a*/*Dnmt3L*-Heterotetramer positioniert die aktiven Zentren der beiden *Dnmt3a*-Moleküle in einem Abstand von etwa zehn Basenpaaren (bp) auf der DNA,^[50,52] was darauf schließen lässt, dass zwei CpGs getrennt durch 10 bp von *Dnmt3a* in einer konzertierten Reaktion methyliert werden können. Zusätzlich polymerisiert *Dnmt3a* auf der DNA und bildet *Dnmt3a*-DNA-Filamente, die eine Methylierung von mehreren CpGs durch ein *Dnmt3a*-Oligomer ermöglichen.^[52,53] In der Tat zeigten In-vitro-Methylierungsexperimente, dass es eine Korrelation von Methylierungseignissen an CpG-Stellen gibt, die in einem Abstand von ca. 10 bp liegen.^[50,52,53] Interessanterweise enthalten DMRs, die in der weiblichen Keimbahn durch *Dnmt3a*/*Dnmt3L* methyliert werden, eine Anreicherung von CpG-Stellen in diesem Abstand, wodurch diese Sequenzen zu guten Substraten für den *Dnmt3a*/*Dnmt3L*-Komplex werden.^[50]

Das Vorhandensein von zwei Interaktionsstellen für eine homotrophe Protein/Protein-Wechselwirkung in *Dnmt3a* führt zu der Möglichkeit, dass *Dnmt3a* lineare Proteinoligomere bildet, die in verschiedenen Studien beobachtet wurden.^[48,51] Da jede RD-Interaktionsstelle eine DNA-Bindungsstelle darstellt, können solche Proteinoligomere mehrere DNA-Moleküle binden, die ungefähr parallel zueinander ausgerichtet sind.^[51] Diese Fähigkeit spielt im Zellkern eine wichtige Rolle bei der Bindung von *Dnmt3a* an Heterochromatin, möglicherweise weil heterochromatische DNA dicht gepackt ist und dadurch mehrere DNA-Stränge zur Interaktion mit *Dnmt3a*-Oligomeren in passender Geometrie zur Verfügung stellt. *Dnmt3L* fehlt die RD-Interaktionsstelle, die Zugabe von *Dnmt3L* zu *Dnmt3a*-Oligomeren führt deshalb zur Auflösung der *Dnmt3a*-Oligomere und der Bildung von stabilen *Dnmt3a*/*Dnmt3L*-Heterotetrameren. In vivo wurde gezeigt, dass *Dnmt3L* Bindung von *Dnmt3a* an Heterochromatin reduziert. Daher kann die Expression von *Dnmt3L* die Verfügbarkeit von *Dnmt3a* für die Methylierung von DMRs und anderen Zielen in Gen-Promotoren, die in der Regel euchromatisch sind, erhöhen.^[51] Diese Daten implizieren, dass *Dnmt3L* die Verteilung von *Dnmt3a* im Zellkern ändert, zusätzlich zu seiner stimulierenden Wirkung auf *Dnmt3a*. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass in differenzierten Zellen, denen *Dnmt3L* fehlt, *Dnmt3a* und *Dnmt3b* stark an kondensiertes Chromatin binden, das methylierte DNA enthält.^[54,55]

Die De-novo-Generierung der DNA-Methylierung wird durch die Tatsache verkompliziert, dass die *Dnmt3*-Enzyme starke Unterschiede in der Aktivität je nach den flankierenden Sequenzen der Ziel-CpG-Stelle zeigen.^[56–58] An den meisten CpGs führt dies zu einer bevorzugten Einführung der Methylierung in einen der beiden DNA-Stränge, der Generierung eines hemimethylierten CpG. Nur wenige CpG-Stellen tragen in beiden Strängen eine günstige flankierende Sequenz, sodass die *Dnmt3*-Enzyme direkt ein vollständig methyliertes CpG generieren können. Allerdings sind durch *Dnmt3*-Enzyme erzeugte, hemimethylierte CpG-Stellen ideale Substrate für *Dnmt1*. Deshalb ergibt die Zusammenarbeit von *Dnmt3*-Enzymen mit *Dnmt1* ein leistungsfähiges

System für die Einführung einer DNA-Methylierung in beide Stränge der DNA,^[59,60] was darauf hindeutet, dass alle diese Enzyme für eine effiziente De-novo-Methylierung von DNA benötigt werden.

Das spezifische DNA-Methylierungsmuster einer menschlichen Zelle ist das Ergebnis der gezielten und kontrollierten DNA-Methylierung und -Demethylierung. Derzeit ist nicht genau bekannt, wie De-novo-DNA-Methyltransferasen zu bestimmten genomischen Regionen dirigiert werden und wie die spezifischen DNA-Methylierungsmuster (einschließlich der Imprints) in männlichen und weiblichen Keimzellen generiert werden. Dies liegt zum Teil daran, dass diese Zellen nur in geringen Mengen erhalten werden können und daher schwer zu untersuchen sind. Es gibt mehrere postulierte alternative, aber miteinander kompatible Modelle, um DNA-MTasen an ihre Zielregionen (einschließlich DMRs) zu leiten, um eine bevorzugte Methylierung an einigen Loci zu erklären.

1. Direkte Dirigierung von Dnmts: Im Allgemeinen werden die Dnmts an bestimmte genomische Regionen von anderen DNA-bindenden oder Chromatin interagierenden Proteinen rekrutiert, z.B. von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 6a). Im Rahmen des Imprinting könnte eine geschlechtsspezifische Methylierung erzeugt werden, wenn bestimmte Gruppen von DNA-interagierenden Proteinen unterschiedlich in sich entwickelnden Ei- und Samenzellen exprimiert werden und diese anschließend Dnmts zu unterschiedlichen genomischen Loci rekrutieren. Es wurden bereits mehrere Transkriptionsfaktoren mit wichtigen Rollen in der Entwicklung entdeckt, die eine Rolle in diesen Prozess spielen könnten. Zum Beispiel wurden mehr als 300 KRAB(Krüppel-associated box)-Domain-containing-Zinkfingerproteine im menschlichen Genom gefunden,^[61,62] die eine gewebsspezifische Expression zeigen und daher zur Erzeugung von Keimbahn-Methylierungsmustern beitragen könnten. Diese Proteine binden an das Tripartite-Motif-Containing-Protein 28 (TRIM28, auch als KAP1 bekannt), das seinerseits mit Dnmt3a und

Dnmt3b interagiert.^[63,64] Es steht zu erwarten, dass neue Verfahren zur Isolierung und Manipulation von sich entwickelnden Spermien und Eizellen werden in naher Zukunft die Identifizierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren ermöglichen, die an der Erzeugung von Imprints beteiligt sind.

2. Schutz der DNA gegen Methylierung: Umgekehrt könnte die spezifische Bindung anderer Proteine Regionen der DNA vor einer De-novo-Methylierung schützen, ein Modell, das auch durch klare experimentelle Belege gestützt wird.^[65,66] Im Rahmen des Imprinting wurde vorgeschlagen, dass die DNA-Methylierung bei maternal methylierten DMRs ein Standardzustand sein könnte und das Fehlen von Methylierung an den entsprechenden Sequenzen in Spermien darauf zurückzuführen ist, dass diese einen besonderen Schutz vor De-novo-Methylierung genießen. Einige Belege für dieses Modell stammen aus jüngsten Studien, die zeigen, dass die meisten mütterlich methylierten DMRs von Regionen flankiert werden, die in Eizellen und Spermien methyliert sind, und daher die DMRs in den männlichen Keimzellen als „unmethylierte Inseln“ angesehen werden können.^[67–70] Zusätzlich zeigen mehrere mütterliche DMRs zum Zeitpunkt der Etablierung des Imprints in männlichen Keimzellen eine Akkumulation von H3K4-Dimethylierung und -Trimethylierung, was ebenfalls einen möglicher Mechanismus für ihren Schutz vor De-novo-Methylierung darstellt.^[71,72]
3. Intrinsische Sequenzpräferenzen der Dnmts: Alle Dnmt3-Enzyme haben intrinsische Sequenzpräferenzen, welche die Spezifität für bestimmte Zielregionen, wie DMRs, vermitteln können (Abbildung 6b). Beispiele für diesen Mechanismus sind die Präferenzen von Dnmt3a für die Methylierung von CpG-Stellen mit bestimmten flankierenden Sequenzen und für die Methylierung von CpGs, die periodisch in Abständen von 8 bis 10 bp vorkommen. Für beide Effekte wurde gezeigt, dass sie einen globalen Abdruck in genomischen DNA-Methylierungsmustern hinterlassen.^[50,52,57] Mütterlich geprägte DMRs enthalten eine Anreicherung von CpGs in günstigen Abständen von 8–10 bp, was ihre Methylierung durch Dnmt3a erleichtern könnte.^[50–52] Neuere Analysen haben allerdings gezeigt, dass die regelmäßige Positionierung von CpGs in 8–10-bp-Abständen weiter verbreitet ist und auch auf die periodische Abfolge der AT- und GC-reichen DNA-Sequenzen zurückgeführt werden könnte, die an guten Nucleosombindungsstellen auftritt.^[73] Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Sequenzpräferenzen der Dnmts ein direkt bestimmender Faktor für die bevorzugte Methylierung von DMRs sind, da sie die Methylierung beider Allele gleichermaßen beeinflussen würden. Dennoch ist es vernünftig anzunehmen, dass im Zuge der Evolution CpGs in wichtige Loci, die auf eine schnelle und zuverlässige Weise methyliert werden müssen, in einem günstigen Sequenzkontext und in passenden Abständen arrangiert wurden, um die Methylierungsreaktion zu erleichtern.
4. Interaktion von Dnmts mit Chromatin: Spezifische Histon-Modifikationen sind direkt an der Steuerung der Aktivität und der Rekrutierung von Dnmt3s an bestimmte

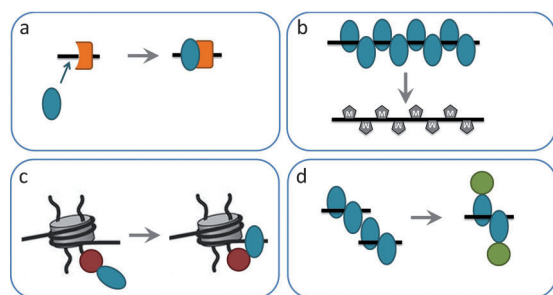


Abbildung 6. Mechanismen, die von Dnmt3-Enzymen (blaue Ovale) erzeugte DNA-Methylierungsmuster beeinflussen können. a) Rekrutierung über DNA-bindende Proteine (orange). b) Einfluss der DNA-Sequenz, hier eine periodische Anordnung der Methylierungsstellen. c) Direkte oder indirekte Bindung der Dnmts an Chromatinmarkierungen auf Nucleosomen. d) Änderungen der Lokalisation von Dnmt3a im Zellkern, hier durch Zugabe von Dnmt3L (grün), wodurch die Quartärstruktur von Dnmt3a verändert und die Bindung an Heterochromatin reduziert wird.

Loci, einschließlich DMRs, beteiligt (Abbildung 6c). Dieses Modell basiert auf der Beobachtung, dass alle drei Dnmt3-Proteine direkt mit ihrer N-terminalen Domäne an N-terminale Peptide von Histon H3 binden, die an K4 unmethyliert sind.^[74–76] Weiterhin bindet die PWWP-Domäne von Dnmt3a Histon H3, das an K36 di- und trimethyliert ist.^[77,78] Interessanterweise stimuliert die Bindung an N-terminale Peptide von Histon H3 Dnmt3a allosterisch.^[79] Diese Stimulation wird durch H3K4-Methylierung gestört, was darauf schließen lässt, dass H3K4-Trimethylierung die Methylierung von Chromatin durch die Dnmt3-Enzyme verhindern kann. Dieses Modell ist konsistent, da H3K4me3 eine aktivierende Modifikation ist, die mit hoher Transkription korreliert ist und mit DNA-Methylierung anti-korreliert vorliegt.^[80a] Ein weiterer Beleg für dieses Modell kam von der Beobachtung, dass die Histon-H3K4-Demethylase KDM1B, die stark in wachsenden Oozyten exprimiert wird, für die Methylierung von mehreren maternalen DMRs in Eizellen erforderlich ist.^[80b]

5. Die Rolle von Dnmt3L beim Imprinting: Wie oben beschrieben, spielt Dnmt3L eine wichtige Rolle bei der Generierung der maternalen Imprints. Es stimuliert die Aktivität der Dnmt3a und verändert außerdem die Quartärstruktur von Dnmt3a und beeinflusst so die Lokalisation von Dnmt3a im Zellkern. Die Umwandlung von Dnmt3a-Oligomeren in Dnmt3a/Dnmt3L-Heterotetramere führt zu einer Freisetzung von Dnmt3a aus Heterochromatin und erhöht die Verfügbarkeit des Enzyms für die Methylierung von euchromatischen Regionen, z.B. DMRs (Abbildung 6d).
6. Die Rolle von Chromatin-Remodellierung für die DNA-Methylierung: Da DNA in Säugerzellen auf Nucleosomen aufgewickelt und in Chromatin verpackt ist, könnte die Zugänglichkeit der DNA für die De-novo-DNA-Methylierungsmaschinerie bestimmen, welche Regionen überhaupt methyliert werden können. Dieses Modell wird von der Beobachtung gestützt, dass das Lymphoide-Spezifische-Helikase(LSH)-Protein, das zur Familie der SnF2-Chromatin-Remodellierer gehört, wesentlich für die De-novo-Methylierung von DNA in Mäusen ist.^[81,82] Es wurde gezeigt, dass LSH die Dnmt3a- und Dnmt3b-abhängige DNA-Methylierung stimuliert, die mechanistischen Details dieses Prozesses sind aber noch nicht bekannt.

5. Mechanismus der Vererbung der DNA-Methylierung und -Imprints mithilfe von Dnmt1

Nach ihrer Generierung in Keimzellen werden die Methylierungsmuster in den DMRs der geprägten Gene über die gesamte Lebensdauer des Organismus vererbt (abgesehen von einem eventuellen Verlust der Imprints in einigen Geweben). Die Aufrechterhaltung dieser molekularen Markierung ist während der genomweiten Demethylierung und Neuprogrammierung, die nach der Befruchtung auftritt, eine besondere Herausforderung. Welche Faktoren schützen speziell die Loci mit Imprints vor einer Demethylierung? Ist die DNA-Erhaltungs-Methylierungsmaschinerie bevorzugt in

diesen Regionen aktiv? Diese Fragen können derzeit nicht beantwortet werden, da die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zum Schutz der Imprints in der frühen Embryogenese unbekannt sind. Wie oben beschrieben, erfordert die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierungsmuster während der Zellteilungen ein Enzym, das eine Präferenz für die Methylierung von hemimethylierten CpGs hat, eine Eigenschaft, die zum ersten Mal 1981 für eine DNA-MTase beschrieben wurde, die später als Dnmt1 identifiziert wurde.^[83] Aktuelle Daten zeigen, dass Dnmt1 eine etwa 10–20-fache Präferenz für hemimethylierte DNA gegenüber unmethylierten Substraten hat.^[84–88] Konzeptionell kann das Verständnis des Kopiervorgangs der DNA-Methylierungsmuster in zwei unabhängige Aufgaben unterteilt werden: Erstens muss verstanden werden, welcher Mechanismus der Präferenz von Dnmt1 für hemimethylierte DNA zugrunde liegt. Zweitens müssen zusätzliche Faktoren für die Steigerung der inhärenten Präferenz von Dnmt1 identifiziert werden, da eine 10–20-fache Bevorzugung von hemimethylierter DNA nicht ausreichend ist, um die Vererbung von DNA-Methylierungsmustern über zahlreiche Zellteilungen zu erklären.

Dnmt1 ist ein prozessives Enzym, das in der Lage ist, lange DNA-Bereiche zu methylieren, ohne von der DNA abzudissoziieren. Diese Eigenschaft passt perfekt zu seiner Funktion an der DNA-Replikationsgabel.^[87,89,90] Interessanterweise ist die prozessive DNA-Methylierung von Dnmt1 auf einen Strang der DNA beschränkt, was anzeigt, dass Dnmt1 seine Orientierung nicht wechselt, während es entlang der DNA gleitet.^[89] Wegen seiner hohen Prozessivität ist Dnmt1 ein sehr leistungsstarkes Enzym, ideal geeignet, um der DNA-Replikation zu folgen und den neu synthetisierten DNA-Strang zu methylieren, bevor das Chromatin wieder assembliert wird. Dnmt1 enthält mehrere funktionelle Domänen in seinem N-terminalen Teil, der durch einen flexiblen Linker an den C-terminalen Teil gebunden ist, in dem sich das katalytische Zentrum befindet. Der N-terminale Teil von Dnmt1 enthält eine CXXC-Domäne mit acht konservierten Cysteinresten und zwei Zinkionen, die unmethylierte DNA bindet.^[84,91,92] Die Struktur eines verkürzten Dnmt1-Proteins, das die CXXC-, BAH- und katalytische Domäne umfasst, im Komplex mit einer unmethylierten DNA zeigte eine spezifische Bindung der unmethylierten CpG-Stelle an die CXXC-Domäne, aber nicht an die katalytische Domäne.^[92] Basierend auf dieser Beobachtung wurde ein Autoinhibitionsmodell für die Regulation der Aktivität und Spezifität von Dnmt1 vorgeschlagen, bei dem die Bindung von unmethylierter DNA an die CXXC-Domäne deren Methylierung verhindert. Dieses Modell wurde durch kinetische Daten mit dem verkürzten Dnmt1 gestützt.^[92] Allerdings zeigten Experimente mit vollständiger Dnmt1, dass ein Austausch von Aminosäuren in der CXXC-Domäne, der zum Verlust der DNA-Bindung führte, die Präferenz des Enzyms für hemimethylierte DNA nicht änderte,^[84] was gegen eine wichtige Rolle der CXXC-Domäne für die Spezifität von Dnmt1 spricht. Stattdessen wurde gezeigt, dass die Spezifität für hemimethylierte DNA in der katalytischen Domäne von Dnmt1 selbst verankert ist.^[84,85,88]

In der Struktur eines kürzeren C-terminalen Dnmt1-Fragments, dem die CXXC-Domäne fehlt, im Komplex mit

hemimethylierter DNA ist die DNA an die katalytische Domäne des Enzyms gebunden.^[88] Dieser Komplex zeigt mehrere spezifische Kontakte von Dnmt1 mit der Zielsequenz, unter anderem mit dem methylierten Cytosin-Guanin-Basenpaar (Abbildung 7), die alle wesentlich für die Katalyse

nen auf: einer katalytisch inaktiven, in der die RFTS-Domäne das aktive Zentrum blockiert, und in einer katalytisch aktiven, in der die DNA an das aktive Zentrum gebunden ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Interaktion von Dnmt1 mit sekundären (Nicht-Substrat-)DNA-Molekülen an

zusätzlichen DNA-Bindungsstellen (wie der CXXC-Domäne) ebenfalls die Aktivität und Spezifität des Enzyms beeinflusst.^[95] In der Zelle kann die Anordnung der verschiedenen Domänen, z.B. der CXXC- und RFTS-Domänen, durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder posttranslationale Modifikationen geregelt werden. Auf diesem Wege könnte das Enzym während der S-Phase aktiviert werden, seine Aktivität während der anderen Phasen des Zellzyklus aber niedrig gehalten werden.^[96,97] Im Einklang mit seiner Funktion wird Dnmt1 auf hohem Niveau in proliferierenden Zellen exprimiert, und seine Menge hat beim Eintritt in die S-Phase ein Maximum, wenn die DNA-Replikation abläuft. Darüber hinaus ist die Stabilität von Dnmt1 über verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert, was auch dazu beiträgt, das Vorhandensein des Enzyms auf die S-Phase zu beschränken.^[98,99]

Ein wichtiger Mechanismus zur Verbesserung der Spezifität von Dnmt1 in Zellen ist es, das Enzym gezielt zu neu synthetisierter DNA zu dirigieren. Dies wird durch mindestens zwei unabhängige Prozesse gewährleistet: Zum einen interagiert Dnmt1 direkt mit PCNA, einer Komponente der DNA-Replikationsmaschine, die einen Ring um die DNA-Helix bildet.^[100] Eine Störung dieser Interaktion verzögert die DNA-Remethylierung nach

der Replikation.^[101] Darüber hinaus interagiert Dnmt1 ebenfalls mit dem Protein Uhrf1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1), das über seine SRA-Domäne spezifisch an hemimethylierte DNA bindet und Dnmt1 nach der Replikation an hemimethylierte DNA rekrutiert.^[102,103] Ein Knockout des Uhrf1-Gens in embryonalen Mauszellen führt zu einem fast vollständigen Verlust der DNA-Methylierung^[102,103] und ähnelt damit dem Phänotyp des Dnmt1-Knockouts.^[104] Diese Beobachtung zeigt, dass Uhrf1 eine essenzielle Rolle bei der Erhaltung-DNA-Methylierung in Säugern spielt. Darüber hinaus bindet Uhrf1 während der S-Phase an N-terminale Peptide von Histon H3, die an K9 di- und trimethyliert sind, was ebenfalls zur Rekrutierung von Dnmt1 beiträgt. Dieser Vorgang verbindet die DNA-Methylierung mit H3K9me3, einer weiteren wichtigen repressiven Chromatinmarkierung, und ist ein Beispiel für das Zusammenwirken von epigenetischen Modifikationen.^[105] Darüber hinaus haben die De-novo-Enzyme Dnmt3a und Dnmt3b eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung an heterochromatischer DNA, besonders an hoch-

Abbildung 7. Strukturelle Grundlage der Spezifität von Dnmt1 für die Methylierung von hemimethylierten CpG-Stellen. Der mittlere Teil zeigt die Struktur eines Dnmt1-Fragments, das die BAH1- und BAH2-Domänen (orange und rot) und die katalytische Domäne (grün) umfasst, gebunden an S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH; farbig nach Atomtyp) und hemimethylierte DNA (blau). Dnmt1 ist in einer Rückgratdarstellung gezeigt. Die Vergrößerung auf der linken Seite zeigt die Wechselwirkung von hydrophoben Resten mit der Methylgruppe des hemimethylierten CpG (hellgrün), welche die Grundlage der Präferenz für die Methylierung von hemimethylierter DNA ist. Die Vergrößerung an der Unterseite zeigt die Erkennung des Methylcytosin(mCyt)/Guanin(Gua)-Basenpaars durch mehrere Wasserstoffbrücken. Die rechte Seite zeigt das aktive Zentrum des Enzyms mit den charakteristischen PCQ-, ENV- und RXR-Motiven (eingefärbt jeweils in Orange, Cyan und Grün). Das zu methylierende Cytosin wird aus der DNA-Helix gedreht und ist in dieser Struktur bereits methyliert (die übertragene Methylgruppe ist in Hellgrün dargestellt). SAH ist in Gelb gezeigt.

sind.^[85] Die Methylgruppe von 5mC bindet in eine hydrophobe Tasche aus Aminosäureresten in der katalytischen Domäne, was die Präferenz von Dnmt1 für hemimethylierte DNA erklärt (Abbildung 7). Darüber hinaus wurde ein Ausklappen der Zielbase im Dnmt1-DNA-Komplex beobachtet,^[88] was in Einklang mit anderen Strukturen von DNA-MTasen mit Substrat-DNA ist, in denen das zu methylierende Cytosin ebenfalls aus der DNA-Helix ausgeklappt und in einer Tasche im Protein gebunden wird, welche die oben beschriebenen Aminosäurereste des aktiven Zentrums enthält.^[20,21]

Eine weitere Struktur der vollständigen Dnmt1 in Abwesenheit von DNA zeigte, dass die RFTS (replication foci targeting sequence)-Domäne die DNA-Bindungsstelle der katalytischen Domäne blockiert,^[93] was darauf hindeutet, dass die RFTS-Domäne die Aktivität des Enzyms allosterisch reguliert. Diese Beobachtung wurde mit kinetischen Daten untermauert, die zeigen, dass die RFTS-Domäne die DNA-Bindung und -Methylierung durch Dnmt1 hemmt.^[93,94] Daher tritt Dnmt1 in mindestens zwei verschiedenen Konformatio-

methylierten repetitiven Sequenzen.^[106] Allerdings spielt bei geprägten Genloci – und diese stehen im Mittelpunkt dieses Aufsatzes – Dnmt1 eine Hauptrolle bei der Erhaltung der DNA-Methylierung, wie dadurch gezeigt wurde, dass Dnmt1-Knockout-Zellen ihre Methylierungs-Imprints verlieren.^[107]

Trotz dieser signifikanten Fortschritte beim Verständnis der DNA-Erhaltungs-Methylierung bleibt es unklar, wie die Imprints speziell während der Phase des genomweiten Verlusts von DNA-Methylierung in der frühen Embryonalentwicklung erhalten bleiben. Diese Phase stellt eine besondere Herausforderung dar, da das Methylierungssignal in einem Allel entgegen der massiven, genomweiten Demethylierungswelle erhalten bleiben muss. Offensichtlich wäre hier ein sequenzspezifisches Dirigieren der DNA-MTasen nicht ausreichend, wie es in Abschnitt 4 als grundlegender Mechanismus zur Erzeugung von gewebespezifischen DNA-Methylierungsmustern durch De-novo-DNA-MTasen eingeführt wurde, weil dieser Vorgang nicht zwischen beiden Allelen differenzieren kann. Eine plausible Erweiterung dieses Modells könnte ein kombiniertes Ablesen der Sequenz und des Methylierungszustands sein. In diesem Konzept würde ein DNA-bindendes Protein spezifisch an geprägte DMRs binden, aber nur, wenn diese methyliert sind, und dadurch DNA-MTasen spezifisch an das methylierte Allel der DMR rekrutieren, und so die Stabilität des Methylierungsstatus erhöhen. Jüngste Studien brachten erste experimentelle Belege für dieses Modell. Sie identifizierten TRIM28 und das Zinkfingerprotein (ZFP) 57 als wichtige Akteure bei der Aufrechterhaltung der Methylierungs-Imprints in Mausembryonen^[63,108,109] und zeigten, dass Mutationen in ZFP57 bei Menschen mit einem Verlust der Methylierung an mehreren geprägten Loci korreliert sind.^[110] Hierbei erkennt ZFP57 ein methyliertes CpG-haltiges Hexanucleotidmotiv und rekrutiert TRIM28 spezifisch an das methylierte Allel des geprägten Gens.^[63] Interessanterweise wurde dieses Motiv im Durchschnitt mit zwei Kopien in allen Maus-ICRs und einer Mehrheit der menschlichen ICRs gefunden.^[63] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TRIM28 einen Komplex mit allen drei Dnmts sowie mit anderen Komponenten der epigenetischen Maschinerie bildet, unter anderem der SETDB1-Histon-H3K9-Methyltransferase, dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1), dem NURC-Chromatin-Remodeling-Komplex und auch Uhrf1. Dieser Komplex könnte daher die DNA-Methylierungsmaschinerie speziell an methylierte, geprägte Allele bringen und dadurch die Stabilität der monoallelischen Methylierungsmarkierung verstärken. Bemerkenswert ist, dass mehr als 300 KRAB-ZFPs im menschlichen Genom identifiziert wurden und vermutet wurde, dass viele von diesen DNA methylierungsspezifisch binden.^[61] Daher könnte die hier vorgeschlagene „Methylierungsverstärkung“ ein allgemeiner Mechanismus sein, um DNA-Methylierung gezielt an differentiell methylierte DMRs zu dirigieren.

6. Geschlechtsunterschiede von DMRs und Gen-Silencing-Mechanismen

Es wurde zuerst von Bestor et al. darauf hingewiesen,^[111,112] dass sowohl die Strukturen der DMRs als auch die

Gen-Silencing-Mechanismen der geprägten Allele zwischen dem mütterlichen und väterlichen Genom stark variieren. Im Allgemeinen sind mütterlich methylierte DMRs CpG-reich, oft in Gen-Promotoren lokalisiert und spielen eine direkte Rolle bei der Regulation des entsprechenden Gens. Im Unterschied dazu sind väterliche DMRs oft CpG-arm, liegen in intergenischen Regionen und sind nicht direkt an der Genregulation beteiligt. Stattdessen wird die Expression der paternal reprimierten Gene oft durch eine nichtkodierende RNA reprimiert, die ihrerseits durch eine Methylierung des mütterlichen Allels reguliert wird. Dieses Verfahren kann am Beispiel der Repression des väterlichen *Igfr2* durch die Wirkung einer nichtkodierenden RNA illustriert werden (Abbildung 2). Im mütterlichen Allel wird die Expression der nichtkodierenden RNA durch die Methylierung der DMR unterdrückt, und das *Igfr2*-Gen kann deshalb exprimiert werden. Im Unterschied dazu wird im väterlichen Allel die nichtkodierende RNA exprimiert und bewirkt die Stilllegung des *Igfr2*-Gens. Daher wird die Repression des väterlichen *Igfr2*-Allels überraschenderweise durch eine spezifische Methylierung des mütterlichen Allels und nicht durch eine Methylierung des väterlichen Allels vermittelt.

Dieser faszinierende strukturelle und mechanistische Dimorphismus zwischen mütterlich und väterlich methylierten DMRs kann aus evolutionärer Sicht erklärt werden, wenn man die Entwicklung der Keimzellen in Betracht zieht. Die Gegenwart von 5-Methylcytosin in der DNA höherer Eukaryonten ist mutagen, weil die Methylierung die Desaminierung von Cytosin fördert, und T/G-Fehlpaarungen (aus der Desaminierung von 5-Methylcytosin) eine geringere Reparaturreffizienz haben als U/G-Fehlpaarungen (aus der Desaminierung von unmethyliertem Cytosin).^[21] Dieser Unterschied ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Uracil eine nichtnatürliche Base in der DNA ist, die von der Uracil-DNA-Glycosylase effizient erkannt und ausgeschnitten wird, während Thymidin ein natürlicher Bestandteil der DNA ist. Die DNA-Sequenz des menschlichen Genoms zeigt deutliche Auswirkungen der Methylierungs-vermittelten Mutagenese auf die Genomevolution, weil CpG-Dinucleotide gegenüber ihrer erwarteten Frequenz 3-fach unterrepräsentiert sind, während beispielsweise GpC-Dinucleotide fast gemäß ihrer erwarteten Häufigkeit auftreten. Einige Regionen des Genoms zeigen allerdings keine Abreicherung von CpG, genannt CpG-Inseln, die mit den annotierten Transkriptionsstartstellen von etwa 70% aller menschlichen Gene überlappen,^[113] darunter den meisten Housekeeping-Genen. Wichtig ist, dass diese Gen-Promotoren in der Regel in der Keimbahn nicht methyliert sind, was bedeutet, dass sie dem mutagenen Druck des 5-Methylcytosins nicht ausgesetzt sind. Ein ähnlicher Mechanismus könnte zum geschlechtsspezifischen Dimorphismus beim Imprinting geführt haben, weil die Methylierungs-Imprints bei beiden Geschlechtern in verschiedenen Entwicklungsstadien eingebracht werden – in frühen embryonalen Stadien in den männlichen Keimzellen, aber erst relativ spät (während des Wachstums der Eizellen nach der Geburt und kurz vor dem Eisprung) in der weiblichen Keimbahn (Abbildung 8).^[111,112] Dies führt dazu, dass die methylierten DMRs in der Eizelle nur unter einem geringen durch die DNA-Methylierung verursachten Mutati-

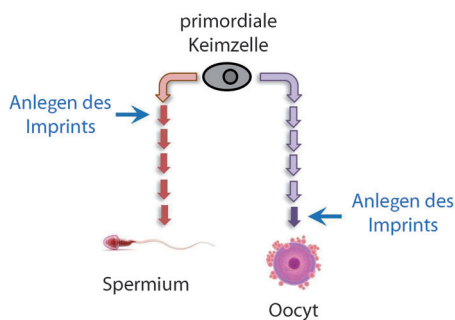


Abbildung 8. Unterschiede im Zeitpunkt der Etablierung der Imprints in der Entwicklung von männlichen und weiblichen Keimzellen führen zu den differentiellen genomischen Eigenschaften der mütterlich und väterlich methylierten DMRs. Bei männlichen Keimzellen wird der Methylierungs-Imprint früh in der embryonalen Entwicklung angelegt, sodass die methylierte DNA viele Duplikationen durchläuft, bevor reife Spermien entwickelt sind. Jede DNA-Duplikation hat dabei das Risiko durch Cytosindesaminierung Mutationen zu erwerben, die durch DNA-Methylierung gefördert werden. Im Unterschied dazu wird der Methylierungs-Imprint in der sich entwickelnden Eizelle erst spät in der Entwicklung angelegt, sodass die Gefahr von Methylierungs-induzierten Mutationen geringer ist.

onsdruck stehen, da die mütterlichen Imprints nur wenige Zellteilungen bis zur Befruchtung durchlaufen. Dies unterscheidet sich drastisch von der Situation in Spermien, in denen die Methylierungs-Imprints früh in der Entwicklung angelegt werden und die DNA-Methylierung über zahlreiche Zellteilungen propagiert werden muss, bevor ein reifes Spermium ausgebildet ist. Somit erfährt die paternal methylierte DNA einen starken Mutationsdruck, der zu einem Verlust vieler CpG-Stellen in paternalen DMRs geführt hat. Dieser Prozess hat letztlich die Regelungsmöglichkeiten der väterlich methylierten DMRs untergraben, weil mit der reduzierten Dichte der CpG-Stellen auch das DNA-Methylierungssignal verdünnt wurde. Daher wurde die direkte Stilllegung von paternal reprimierten Genen durch DNA-Methylierung ineffizient, sodass der oben beschriebene, indirekte Mechanismus von der Evolution erfunden wurde. Der sexuelle Dimorphismus von DMRs und Gen-Silencing-Mechanismen ist somit ein schönes Beispiel zur Veranschaulichung der Zusammenhänge von Entwicklung, Epigenetik und Evolution.

7. Imprinting und der evolutionäre Konflikt zwischen männlich und weiblich in der Entwicklung von Säugetieren

Das am weitesten akzeptierte Modell für die biologische Rolle von Imprinting in Säugetieren wurde 1991 von Haig und Moore vorgestellt^[114] und beruht auch auf evolutionären Argumenten. In lebendgebärenden Tieren, bei denen die Mutter den wachsenden Embryo mit großem Einsatz von Ressourcen unterstützt (wie in Säugetieren), besteht ein grundlegender Interessenskonflikt zwischen der Mutter auf der einen Seite und dem Embryo und Vater auf der anderen Seite. Da ein hohes Geburtsgewicht stark mit guter Gesundheit und guten Überlebenschancen des Embryos korreliert

ist, sind sowohl der Embryo wie auch der Vater daran interessiert, so viele Ressourcen wie möglich von der Mutter auf den sich entwickelnden Embryo zu lenken, um ihre Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. ihren Fortpflanzungserfolg zu optimieren. Die Mutter muss dagegen das Wachstum des Embryos und die Bereitstellung von Ressourcen steuern, um nicht ihr eigenes Überleben und die Chancen für eine zukünftige Schwangerschaft zu gefährden. Sie wird daher dazu neigen, das Wachstum des Embryos auf ein vernünftiges Maß zu beschränken (Abbildung 9). Dieser Interessenskonflikt

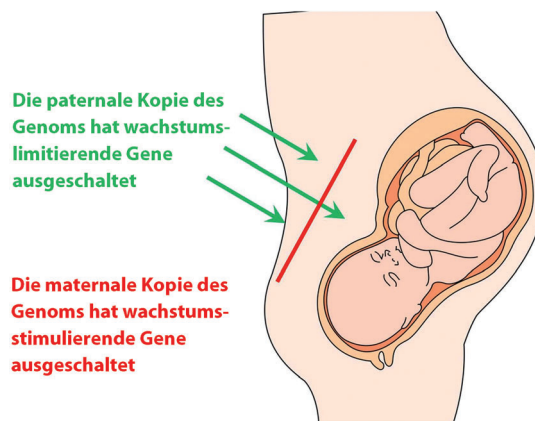


Abbildung 9. Evolutionäre Konflikte zwischen den Eltern bei lebendgebärenden Tieren werden durch genomische Prägung vermittelt. Die väterlich exprimierten Gene neigen dazu, das Wachstum des Embryos zu erhöhen, während die mütterlich exprimierten Gene dieses begrenzen.

kann nicht durch herkömmliche mendelsche Vererbung gelöst werden, weil die evolutionären Vor- und Nachteile jeder Veränderung vom Geschlecht der Nachkommen abhängen. Während beispielsweise eine Mutation, die das Wachstum des Embryos fördert, ein Vorteil für die männlichen Nachkommen wäre, wäre sie ein Nachteil für die weiblichen. Folglich ist ein Mechanismus der geschlechtsspezifischen Genregulation erforderlich, also genau das, was das genomische Imprinting leistet. In diesem Konzept versucht das weibliche Genom des Embryos, das embryonale Wachstum zu reduzieren, während das männliche dazu neigt, dieses zu stimulieren. Dieses Modell beruht auf der Beobachtung, dass die paternal exprimierten Gene oft Wachstum fördern, während maternal exprimierten Gene das Wachstum hemmen.^[13] Dementsprechend werden viele geprägte Gene in der Plazenta exprimiert und spielen eine Rolle bei der Übertragung von Nährstoffen über die Plazenta zum Embryo. Zum Beispiel ist das maternal exprimierte Igf2 ein Wachstumsfaktor, während der paternal exprimierte Igf2-Rezeptor (Igf2r) als Wachstumsinhibitor wirkt, weil er Igf2 bindet und inaktiviert. Dementsprechend zeigen Mäuse ohne Igf2 eine Reduktion der Größe^[6] während Embryonen ohne Igf2r vergrößert sind.^[115,116] In Übereinstimmung mit dieser Interpretation zeigen die parthenogenetischen Zygoten (abgeleitet von zwei weiblichen Pronuclei) eine reduzierte Größe der extra-embryonalen Gewebe, während die androgenetischen Zygoten (abgeleitet von zwei männlichen Pronuclei) vergrößert

Berte extra-embryonale Gewebe, aber unterentwickelte embryonale Anteile, aufweisen.^[4] Da die extraembryonalen Teile sich später zur Plazenta entwickeln und damit die Nährstoffzufuhr für den Embryo kontrollieren, sind diese Befunde in Übereinstimmung mit der Vorhersage, dass mütterlich exprimierte Gene das Wachstum des Embryos beschränken und die väterlich exprimierten Gene es fördern sollten. Ähnliche Argumente gelten für die Regulation der Mutter/Kind-Beziehung während der Stillzeit, was erklärt, warum geprägte Gene auch an der Steuerung des Verhaltens beteiligt sind. Darüber hinaus zeigen menschliche Erkrankungen, die mit Störungen des Imprintings einhergehen, oft entsprechende Wachstumsphänotypen, wie in Abschnitt 8 beschrieben. Ein zusätzlicher Beleg für dieses Modell zur Erklärung der biologischen Rolle der Prägung ist, dass die Prägung in der Evolution in der Säugerlinie erschien, während Beuteltiere und eierlegende Säugetiere sowie Vögel und Reptilien kein Imprinting aufweisen.^[117] Außerdem haben höhere Blütenpflanzen, in denen Sämlinge auch in großem Ausmaß von der Mutter mit Nährstoffen unterstützt werden, unabhängig von den Säugern in einer konvergenten Evolution ebenfalls Imprinting entwickelt und verwenden dafür sehr ähnliche epigenetische Mechanismen einschließlich DNA-Methylierung. Insgesamt schlägt dieses Modell vor, dass der molekulare Prozess der Prägung eine evolutionäre Reaktion auf strategische Konflikte zwischen männlichen und weiblichen Tieren ist, die mit der Entwicklung der Lebendgeburt bei Säugern auftraten.

8. Medizinische Implikationen: Imprinting-Fehler und der Verlust der Prägung in Krebszellen

Geprägte Gene sind anfällige Ziele für zahlreiche menschliche Krankheiten, weil ihr funktionell haploider Zustand es einer einzelnen genetischen oder epigenetischen Veränderung ermöglicht, die Expression dieser Gene deutlich zu ändern, was Auswirkungen auf die Gesundheit haben kann. Aufgrund ihrer wesentlichen Rolle bei der Entwicklung manifestieren sich Imprinting-Anomalien oft als Entwicklungs- und neurologische Störungen, wenn sie während der frühen Entwicklung auftreten. Beispiele für Imprinting-Erkrankungen sind das Beckwith-Wiedemann-, Silver-Russel- oder Angelman-Syndrom.^[13, 118–120] Die ersten beiden sind durch Veränderungen des menschlichen *Igf2*-Locus verursacht (siehe Abbildung 2). Im Fall des Beckwith-Wiedemann-Syndroms trägt auch das mütterliche Genom eine Methylierung an der CTCF-Bindungsstelle, die eigentlich charakteristisch für den paternalen Zustand ist, was eine zweifache (= biallelische) Erhöhung der Expression von *Igf2* verursacht. Betroffene Kinder haben ein erhöhtes Geburtsgewicht. Umgekehrt fehlt beim Silver-Russel-Syndrom die Methylierung des *Igf2*-Locus in beiden Allelen, sodass beide Allele im „mütterlichen“ Zustand sind. Dadurch geht die *Igf2*-Expression verloren, und betroffene Kinder haben ein niedriges Geburtsgewicht.

Da geprägte Gene Wachstum regulieren, tragen Imprinting-Anomalien oft zur Krebsentstehung bei. Im Fall von wachstumsfördernden Genen ist der Organismus an die

Gendosis des einen aktiven Allels angepasst, und der Verlust der epigenetischen Inaktivierung der zweiten Kopie kann zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Im Falle geprägter wachstumsreduzierender Gene (die oft eine wichtige Rolle als Tumor-Suppressor-Gene spielen) genügt eine kritische Mutation im aktiven Allel, um zu einem vollständigen Verlust des Genprodukts zu führen, da das zweite Allel ja bereits stillgelegt ist. Der somatische Verlust der Prägung wurde bei vielen Krebsarten beobachtet, z.B. bei Tumoren von Blase, Brust, Gebärmutterhals, Darm, Speiseröhren, Leber, Lunge, Eierstock, Prostata und Hoden sowie bei Leukämie.^[121, 122] Die hohe Inzidenz von Imprinting-Anomalien bei Krebserkrankungen zeigt, dass der Verlust der Heterozygotie bei geprägten Genen ein hohes Risiko darstellt. Die Tatsache, dass Prägung dennoch in der Evolution etabliert wurde und stabil bleibt, belegt umso mehr die wichtige Rolle dieses Vorgangs bei der Vermittlung der Interessen beider Geschlechter auf molekularer Ebene während der Schwangerschaft und der frühen Kindheit.

Eingegangen am 9. August 2013

Online veröffentlicht am 7. November 2013

- [1] A. C. Ferguson-Smith, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 565–575.
- [2] J. McGrath, D. Solter, *Cell* **1984**, *37*, 179–183.
- [3] M. A. Surani, S. C. Barton, M. L. Norris, *Nature* **1984**, *308*, 548–550.
- [4] S. C. Barton, M. A. Surani, M. L. Norris, *Nature* **1984**, *311*, 374–376.
- [5] D. P. Barlow, R. Stoger, B. G. Herrmann, K. Saito, N. Schweifer, *Nature* **1991**, *349*, 84–87.
- [6] T. M. DeChiara, E. J. Robertson, A. Efstratiadis, *Cell* **1991**, *64*, 849–859.
- [7] A. C. Ferguson-Smith, B. M. Cattanach, S. C. Barton, C. V. Beechey, M. A. Surani, *Nature* **1991**, *351*, 667–670.
- [8] M. S. Bartolomei, S. Zemel, S. M. Tilghman, *Nature* **1991**, *351*, 153–155.
- [9] A. C. Ferguson-Smith, H. Sasaki, B. M. Cattanach, M. A. Surani, *Nature* **1993**, *362*, 751–755.
- [10] R. Stoger, P. Kubicka, C. G. Liu, T. Kafri, A. Razin, H. Cedar, D. P. Barlow, *Cell* **1993**, *73*, 61–71.
- [11] M. S. Bartolomei, A. L. Webber, M. E. Brunkow, S. M. Tilghman, *Genes Dev.* **1993**, *7*, 1663–1673.
- [12] D. P. Barlow, *Annu. Rev. Genet.* **2011**, *45*, 379–403.
- [13] F. M. Smith, A. S. Garfield, A. Ward, *Cytogenet. Genome Res.* **2006**, *113*, 279–291.
- [14] M. S. Bartolomei, A. C. Ferguson-Smith, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a002592.
- [15] F. Sleutels, R. Zwart, D. P. Barlow, *Nature* **2002**, *415*, 810–813.
- [16] A. T. Hark, C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. LeVorse, S. M. Tilghman, *Nature* **2000**, *405*, 486–489.
- [17] A. C. Bell, G. Felsenfeld, *Nature* **2000**, *405*, 482–485.
- [18] P. Szabó, S. H. Tang, A. Rentsendorj, G. P. Pfeifer, J. R. Mann, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 607–610.
- [19] W. Reik, J. Walter, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 21–32.
- [20] X. Cheng, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 293–318.
- [21] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 274–293.
- [22] S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607–620.
- [23] T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2543–2545.
- [24] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206–222.

- [25] P. A. Jones, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 484–492.
- [26] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204–220.
- [27] Z. D. Smith, A. Meissner, *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 204–220.
- [28] A. D. Riggs, *Cytogenet. Cell Genet.* **1975**, *14*, 9–25.
- [29] R. Holliday, J. E. Pugh, *Science* **1975**, *187*, 226–232.
- [30] S. Feng, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Science* **2010**, *330*, 622–627.
- [31] W. Reik, *Nature* **2007**, *447*, 425–432.
- [32] S. Seisenberger, S. Andrews, F. Krueger, J. Arand, J. Walter, F. Santos, C. Popp, B. Thienpont, W. Dean, W. Reik, *Mol. Cell* **2012**, *48*, 849–862.
- [33] D. Lucifero, S. La Salle, D. Bourc'h, J. Martel, T. H. Bestor, J. M. Trasler, *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 36.
- [34] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247–257.
- [35] D. Watanabe, I. Suetake, T. Tada, S. Tajima, *Mech. Dev.* **2002**, *118*, 187–190.
- [36] S. La Salle, C. Mertineit, T. Taketo, P. B. Moens, T. H. Bestor, J. M. Trasler, *Dev. Biol.* **2004**, *268*, 403–415.
- [37] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 219–220.
- [38] C. L. Hsieh, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 8211–8218.
- [39] H. Gowher, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1201–1208.
- [40] K. Hata, M. Okano, H. Lei, E. Li, *Development* **2002**, *129*, 1983–1993.
- [41] M. Kaneda, M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li, H. Sasaki, *Nature* **2004**, *429*, 900–903.
- [42] M. Kaneda, R. Hirasawa, H. Chiba, M. Okano, E. Li, H. Sasaki, *Genes Cells* **2010**, *15*, 169.
- [43] U. Aapola, K. Kawasaki, H. S. Scott, J. Ollila, M. Vihinen, M. Heino, A. Shintani, S. Minoshima, K. Krohn, S. E. Antonarakis, N. Shimizu, J. Kudoh, P. Peterson, *Genomics* **2000**, *65*, 293–298.
- [44] D. Bourc'h, G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, T. H. Bestor, *Science* **2001**, *294*, 2536–2539.
- [45] D. Bourc'h, T. H. Bestor, *Nature* **2004**, *431*, 96–99.
- [46] F. Chedin, M. R. Lieber, C. L. Hsieh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16916–16921.
- [47] H. Gowher, K. Liebert, A. Hermann, G. Xu, A. Jeltsch, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13341–13348.
- [48] M. S. Kareta, Z. M. Botello, J. J. Ennis, C. Chou, F. Chedin, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25893–25902.
- [49] I. Suetake, F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, S. Tajima, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27816–27823.
- [50] D. Jia, R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, X. Cheng, *Nature* **2007**, *449*, 248–251.
- [51] R. Z. Jurkowska, A. Rajavelu, N. Anspach, C. Urbanke, G. Jankevicius, S. Ragozin, W. Nellen, A. Jeltsch, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 24200–24207.
- [52] R. Z. Jurkowska, N. Anspach, C. Urbanke, D. Jia, R. Reinhardt, W. Nellen, X. Cheng, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6656–6663.
- [53] A. Rajavelu, R. Z. Jurkowska, J. Fritz, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 569–580.
- [54] S. Jeong, G. Liang, S. Sharma, J. C. Lin, S. H. Choi, H. Han, C. B. Yoo, G. Egger, A. S. Yang, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 5366–5376.
- [55] S. Sharma, D. D. De Carvalho, S. Jeong, P. A. Jones, G. Liang, *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001286.
- [56] I. G. Lin, L. Han, A. Taghva, L. E. O'Brien, C. L. Hsieh, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 704–723.
- [57] V. Handa, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 1103–1112.
- [58] R. Z. Jurkowska, A. N. Siddique, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1589–1594.
- [59] M. Fatemi, A. Hermann, H. Gowher, A. Jeltsch, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4981–4984.
- [60] G. D. Kim, J. Ni, N. Kelesoglu, R. J. Roberts, S. Pradhan, *EMBO J.* **2002**, *21*, 4183–4195.
- [61] Y. Liu, X. Zhang, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 177–183.
- [62] <http://epgd.biosino.org/SysZNF/>; G. Ding, P. Lorenz, M. Kreutzer, Y. Li, H. J. Thiesen, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D267–273.
- [63] S. Quenneville, G. Verde, A. Corsinotti, A. Kapopoulou, J. Jakobsson, S. Offner, I. Baglivo, P. V. Pedone, G. Grimaldi, A. Riccio, D. Trono, *Mol. Cell* **2011**, *44*, 361–372.
- [64] X. Zuo, J. Sheng, H. T. Lau, C. M. McDonald, M. Andrade, D. E. Cullen, F. T. Bell, M. Iacovino, M. Kyba, G. Xu, X. Li, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2107–2118.
- [65] M. Brandeis, D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V. Temper, A. Razin, H. Cedar, *Nature* **1994**, *371*, 435–438.
- [66] D. Macleod, J. Charlton, J. Mullins, A. P. Bird, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2282–2292.
- [67] S. Tomizawa, H. Kobayashi, T. Watanabe, S. Andrews, K. Hata, G. Kelsey, H. Sasaki, *Development* **2011**, *138*, 811–820.
- [68] H. Kobayashi, T. Sakurai, M. Imai, N. Takahashi, A. Fukuda, O. Yayoi, S. Sato, K. Nakabayashi, K. Hata, Y. Sotomaru, Y. Suzuki, T. Kono, *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002440.
- [69] H. Kobayashi, T. Sakurai, F. Miura, M. Imai, K. Mochiduki, E. Yanagisawa, A. Sakashita, T. Wakai, Y. Suzuki, T. Ito, Y. Matsui, T. Kono, *Genome Res.* **2013**, *23*, 616–627.
- [70] A. Molaro, E. Hodges, F. Fang, Q. Song, W. R. McCombie, G. J. Hannon, A. D. Smith, *Cell* **2011**, *146*, 1029–1041.
- [71] K. Delaval, J. Govin, F. Cerqueira, S. Rousseaux, S. Khochbin, R. Feil, *EMBO J.* **2007**, *26*, 720–729.
- [72] A. Henckel, K. Chebli, S. K. Kota, P. Arnaud, R. Feil, *EMBO J.* **2012**, *31*, 606–615.
- [73] R. K. Chodavarapu, S. Feng, Y. V. Bernatavichute, P. Y. Chen, H. Stroud, Y. Yu, J. A. Hetzel, F. Kuo, J. Kim, S. J. Cokus, D. Casero, M. Bernal, P. Huijser, A. T. Clark, U. Kramer, S. S. Merchant, X. Zhang, S. E. Jacobsen, M. Pellegrini, *Nature* **2010**, *466*, 388–392.
- [74] J. Otani, T. Nankumo, K. Arita, S. Inamoto, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1235–1241.
- [75] S. K. Ooi, C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng, T. H. Bestor, *Nature* **2007**, *448*, 714–717.
- [76] Y. Zhang, R. Jurkowska, S. Soeroes, A. Rajavelu, A. Dhayalan, I. Bock, P. Rathert, O. Brandt, R. Reinhardt, W. Fischle, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4246–4253.
- [77] A. Dhayalan, A. Rajavelu, P. Rathert, R. Tamas, R. Z. Jurkowska, S. Ragozin, A. Jeltsch, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26114–26120.
- [78] I. Bock, S. Kudithipudi, R. Tamas, G. Kungulovski, A. Dhayalan, A. Jeltsch, *BMC Biochem.* **2011**, *12*, 48.
- [79] B. Z. Li, Z. Huang, Q. Y. Cui, X. H. Song, L. Du, A. Jeltsch, P. Chen, G. Li, E. Li, G. L. Xu, *Cell Res.* **2011**, *21*, 1172–1181.
- [80] a) Y. Zhang, C. Rohde, S. Tierling, T. P. Jurkowski, C. Bock, D. Santacruz, S. Ragozin, R. Reinhardt, M. Groth, J. Walter, A. Jeltsch, *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000438; b) D. N. Ciccone, H. Su, S. Hevi, F. Gay, H. Lei, J. Bajko, G. Xu, E. Li, T. Chen, *Nature* **2009**, *461*, 415–418.
- [81] K. Dennis, T. Fan, T. Geiman, Q. Yan, K. Muegge, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2940–2944.
- [82] H. Zhu, T. M. Geiman, S. Xi, Q. Jiang, A. Schmidtman, T. Chen, E. Li, K. Muegge, *EMBO J.* **2006**, *25*, 335–345.
- [83] Y. Gruenbaum, R. Stein, H. Cedar, A. Razin, *FEBS Lett.* **1981**, *124*, 67–71.
- [84] P. Bashtrykov, G. Jankevicius, A. Smarandache, R. Z. Jurkowska, S. Ragozin, A. Jeltsch, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 572–578.
- [85] P. Bashtrykov, S. Ragozin, A. Jeltsch, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1821–1823.
- [86] M. Fatemi, A. Hermann, S. Pradhan, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1189–1199.
- [87] R. Goyal, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1182–1188.

- [88] J. Song, M. Teplova, S. Ishibe-Murakami, D. J. Patel, *Science* **2012**, 335, 709–712.
- [89] A. Hermann, R. Goyal, A. Jeltsch, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 48350–48359.
- [90] G. Vilkaitis, I. Suetake, S. Klimasauskas, S. Tajima, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 64–72.
- [91] M. Pradhan, P. O. Esteve, H. G. Chin, M. Samaranayake, G. D. Kim, S. Pradhan, *Biochemistry* **2008**, 47, 10000–10009.
- [92] J. Song, O. Rechakoblit, T. H. Bestor, D. J. Patel, *Science* **2011**, 331, 1036–1040.
- [93] K. Takeshita, I. Suetake, E. Yamashita, M. Suga, H. Narita, A. Nakagawa, S. Tajima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 9055–9059.
- [94] F. Syeda, R. L. Fagan, M. Wean, G. V. Avvakumov, J. R. Walker, S. Xue, S. Dhe-Paganon, C. Brenner, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 15344–15351.
- [95] A. Jeltsch, *Epigenetics* **2006**, 1, 63–66.
- [96] S. Kishikawa, T. Murata, H. Ugai, T. Yamazaki, K. K. Yokoyama, *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, 3, 307–308.
- [97] K. Schneider, C. Fuchs, A. Dobay, A. Rottach, W. Qin, P. Wolf, J. M. Alvarez-Castro, M. M. Nalaskowski, E. Kremmer, V. Schmid, H. Leonhardt, L. Schermelleh, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, 4860–4876.
- [98] P. O. Estève, Y. Chang, M. Samaranayake, A. K. Upadhyay, J. R. Horton, G. R. Feehery, X. Cheng, S. Pradhan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 42–48.
- [99] Z. Du, J. Song, Y. Wang, Y. Zhao, K. Guda, S. Yang, H. Y. Kao, Y. Xu, J. Willis, S. D. Markowitz, D. Sedwick, R. M. Ewing, Z. Wang, *Sci. Signaling* **2010**, 3, ra80.
- [100] L. S. Chuang, H. I. Ian, T. W. Koh, H. H. Ng, G. Xu, B. F. Li, *Science* **1997**, 277, 1996–2000.
- [101] G. Egger, S. Jeong, S. G. Escobar, C. C. Cortez, T. W. Li, Y. Saito, C. B. Yoo, P. A. Jones, G. Liang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 14080–14085.
- [102] M. Bostick, J. K. Kim, P. O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan, S. E. Jacobsen, *Science* **2007**, 317, 1760–1764.
- [103] J. Sharif, M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T. A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano, H. Koseki, *Nature* **2007**, 450, 908–912.
- [104] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* **1992**, 69, 915–926.
- [105] S. B. Rothbart, K. Krajewski, N. Nady, W. Tempel, S. Xue, A. I. Badeaux, D. Barsyte-Lovejoy, J. Y. Martinez, M. T. Bedford, S. M. Fuchs, C. H. Arrowsmith, B. D. Strahl, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 1155–1160.
- [106] P. A. Jones, G. Liang, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 805–811.
- [107] E. Li, C. Beard, R. Jaenisch, *Nature* **1993**, 366, 362–365.
- [108] X. Li, M. Ito, F. Zhou, N. Youngson, X. Zuo, P. Leder, A. C. Ferguson-Smith, *Dev. Cell* **2008**, 15, 547–557.
- [109] D. M. Messerschmidt, W. de Vries, M. Ito, D. Solter, A. Ferguson-Smith, B. B. Knowles, *Science* **2012**, 335, 1499–1502.
- [110] D. J. Mackay, J. L. Callaway, S. M. Marks, H. E. White, C. L. Acerini, S. E. Boonen, P. Dayanikli, H. V. Firth, J. A. Goodship, A. P. Haemers, J. M. Hahnemann, O. Kordonouri, A. F. Masoud, E. Oestergaard, J. Storr, S. Ellard, A. T. Hattersley, D. O. Robinson, I. K. Temple, *Nat. Genet.* **2008**, 40, 949–951.
- [111] D. Bourc’his, T. H. Bestor, *Cytogenet. Genome Res.* **2006**, 113, 36–40.
- [112] C. B. Schaefer, S. K. Ooi, T. H. Bestor, D. Bourc’his, *Science* **2007**, 316, 398–399.
- [113] S. Saxonov, P. Berg, D. L. Brutlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1412–1417.
- [114] T. Moore, D. Haig, *Trends Genet.* **1991**, 7, 45–49.
- [115] M. M. Lau, C. E. Stewart, Z. Liu, H. Bhatt, P. Rotwein, C. L. Stewart, *Genes Dev.* **1994**, 8, 2953–2963.
- [116] Z. Q. Wang, M. R. Fung, D. P. Barlow, E. F. Wagner, *Nature* **1994**, 372, 464–467.
- [117] M. B. Renfree, S. Suzuki, T. Kaneko-Ishino, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2013**, 368, 20120151.
- [118] J. Walter, M. Paulsen, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2003**, 14, 101–110.
- [119] B. Horsthemke, K. Buiting, *Adv. Genet.* **2008**, 61, 225–246.
- [120] R. Hirasawa, R. Feil, *Essays Biochem.* **2010**, 48, 187–200.
- [121] D. H. Lim, E. R. Maher, *Adv. Genet.* **2010**, 70, 145–175.
- [122] S. Uribe-Lewis, K. Woodfine, L. Stojic, A. Murrell, *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, 13, e2.
- [123] <http://www.geneimprint.com/>; <http://igc.otago.ac.nz/>; <http://www.mousebook.org>.