



LEIBNIZ INSTITUTE
FOR FARM ANIMAL BIOLOGY

Die Bedeutung der Epigenetik in der Pflanzen- und Tierzucht

Klaus Wimmers

Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN)



Das Schicksal der Zellen



Zygote:
1 Zelle mit vollständiger genetischer
Information

wird

zum komplexen Organismus mit $>10^{14}$ Zellen
mit spezifischen Funktionen

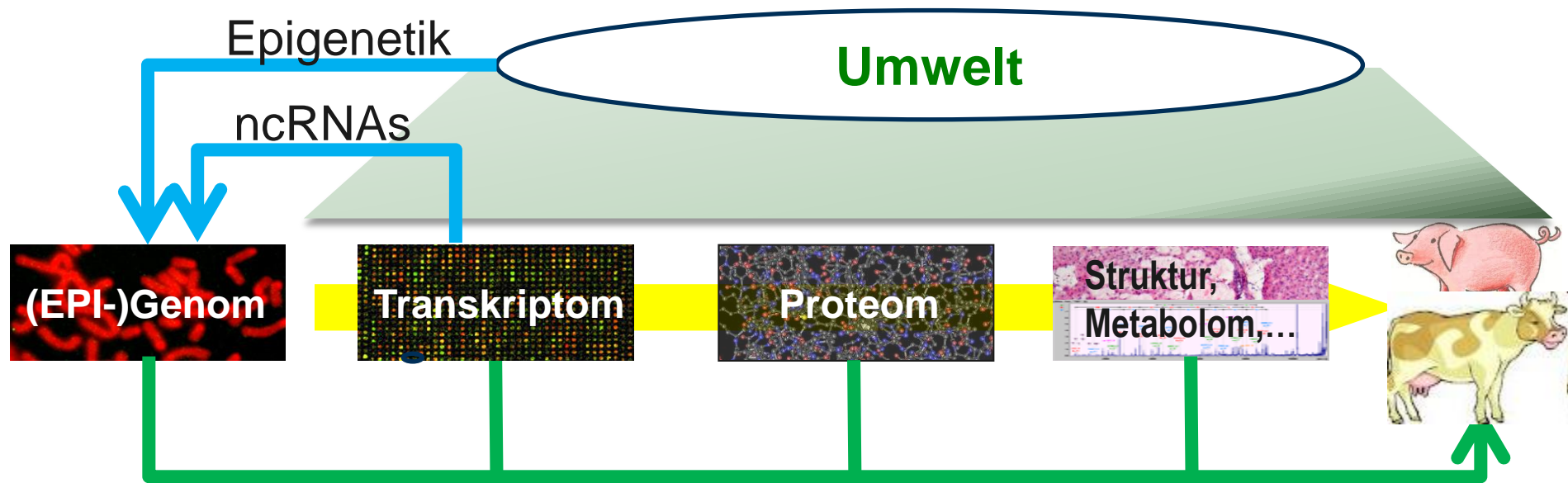
genetische + epigenetische Information

→ 2 Arten der Information im Zellkern:

1. **Genetische Information: umfassende generelle Information des Bauplans, alles was sein kann – DNA sequence**
2. **Epigenetische Information: zusätzliche Information wann, wie, wo die Information genutzt wird – epigenetische Modifikationen**



Genom + Epigenom + Umwelt → Phänotyp



- Epigenetische Variation trägt zur phänotypischen Variation bei; Kenntnis darüber verbessert die Voraussage des Phänotyps
- Epigenetische Mechanismen vermitteln zwischen Umwelt und Genom; Umwelt x Genotyp x Epigenotyp

Epigenetik

- **Conrad Waddington**, 1942 – Epigenese; kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen
- alle meiotisch und mitotisch vererbbaeren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst codiert sind
- strukturelle Anpassung chromosomaler Regionen, um veränderte Zustände der Aktivierung zu kodieren, zu signalisieren, oder zu konservieren
- **Our current definition** (NIH Roadmap Epigenomics): Epigenetics is the study of mitotically(meiotically) heritable changes in gene expression that occur without changes in DNA sequence and of stable, longterm alterations of the transcriptional potential of a cell that are not necessarily heritable.



Epigenetische Modifikationen

A. Modifikation auf DNA-Ebene

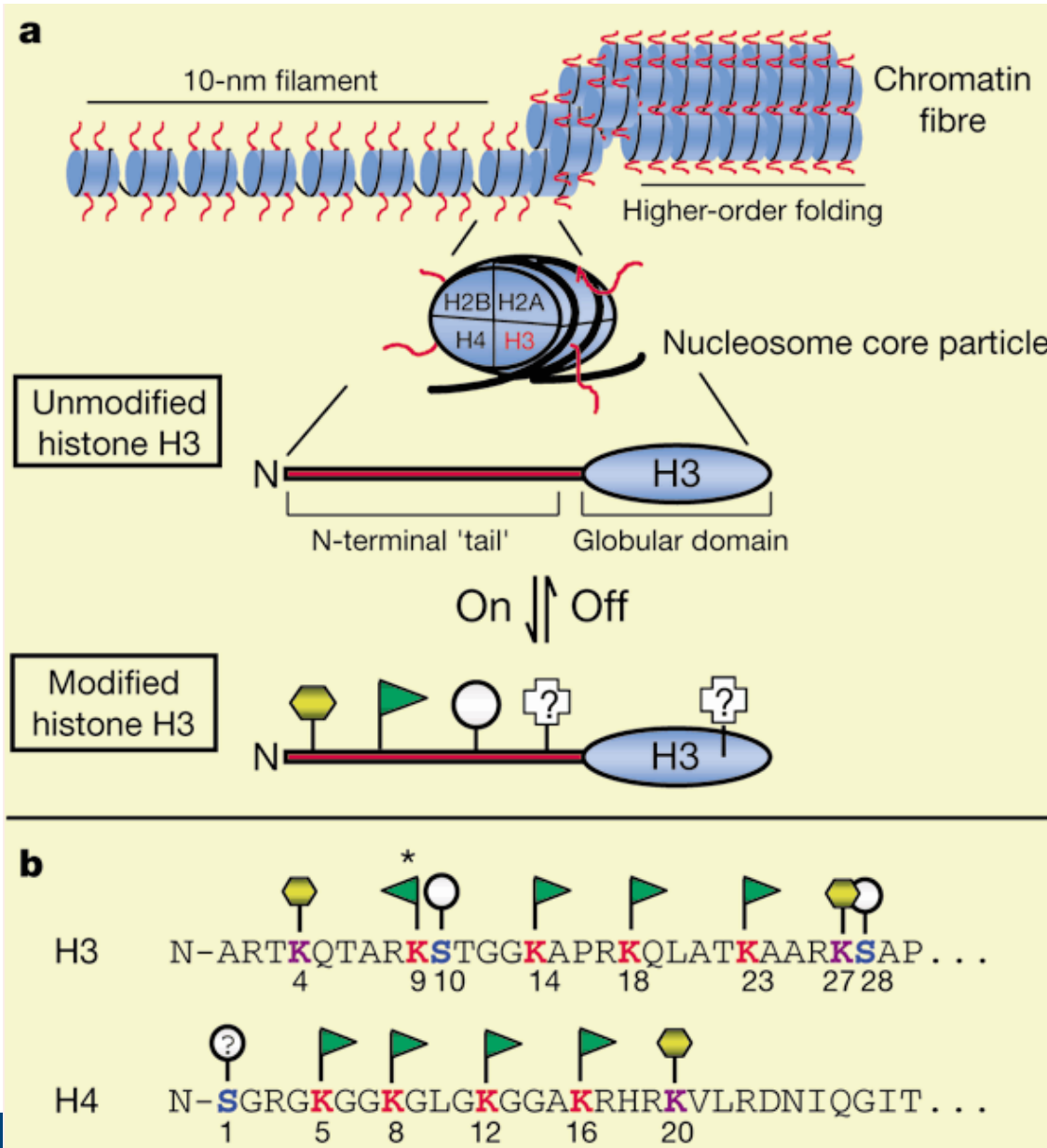
Cytosin-(hydroxy-)methylierung

B. Modifikation auf Chromatin-Ebene

**Histon-Modifikationen: ~acetylierung, ~methylierung,
~phosphorylierung, ~ubiquitinierung, ~sumoylierung**



Histon Modifikationen



Functional Annotation of Animal Genomes FAANG

		Tet	Yeast	Fly	Mouse	Human
H3 Lysine 4	Acetyl	+/-	-	n/d	+/-	+
	Monomethyl	+++	+++	+++	++	++
	Dimethyl	++	++	++	+	+
	Trimethyl	++	++	+	+/-	+/-
H3 Lysine 9	Acetyl	+++	+	n/d	+/-	+/-
	Monomethyl	+/- (?)	-	++	++	++
	Dimethyl	-	-	+	++	++
H3 Lysine 27	Trimethyl	++	-	++	+++	+++
	Acetyl	+++	+++	n/d	+	+/-
	Monomethyl	+++	-	+	++	+++
H3 Lysine 36	Dimethyl	++	-	+++	+++	+++
	Trimethyl	+	-	+++	++	++
	Acetyl	+/-	+/-	n/d	-	+/-
H3 Lysine 56	Monomethyl	++	++	++	++	++
	Dimethyl	-	++	++	++	++
	Trimethyl	++	++	+/-	+/-	+/-
H3 Lysine 79	Acetyl	+++	+++	n/d	-	+/-
	Monomethyl	+	-	n/d	-	+
	Dimethyl	-	n/d	-	-	-
H3 Lysine 9	Trimethyl	-	-	n/d	-	+++
	Acetyl	-	-	n/d	-	+/-
	Monomethyl	+	++	n/d	+	+
H3 Lysine 27	Dimethyl	-	++	++	+	+
	Trimethyl	-	++	-	-	-

- Promotor aktiver Genes
- enhancers
- Regulatorische Elemente
- Inaktive Gene

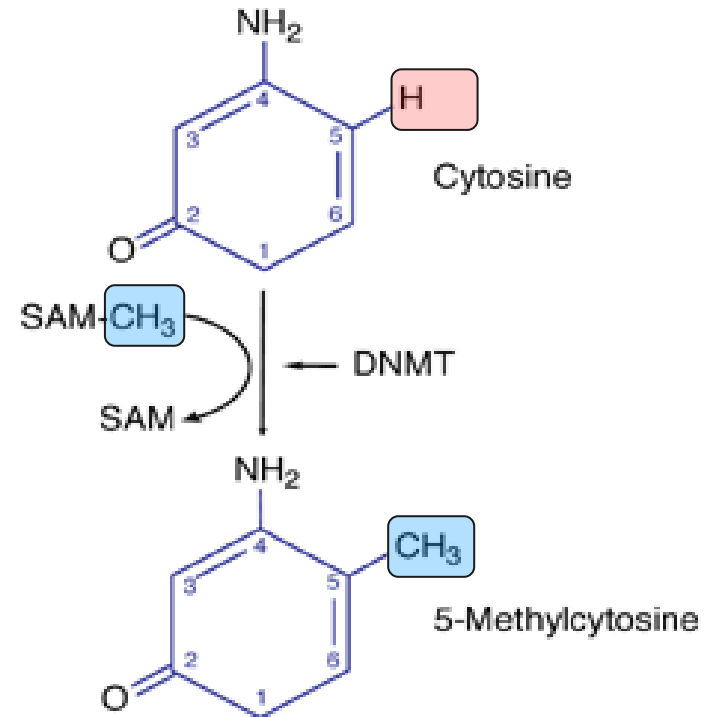
DNA Methylierung

DNA-Methylierung von CpG

→ i.d.R. stabile Inaktivierung

→ anhaltende Kontrolle der Genexpression; Imprinting

→ akute Genregulation



DNMT – DNA Methyltransferases;
SAM – S-Adenosyl-Methionine

DNA-Methylierung

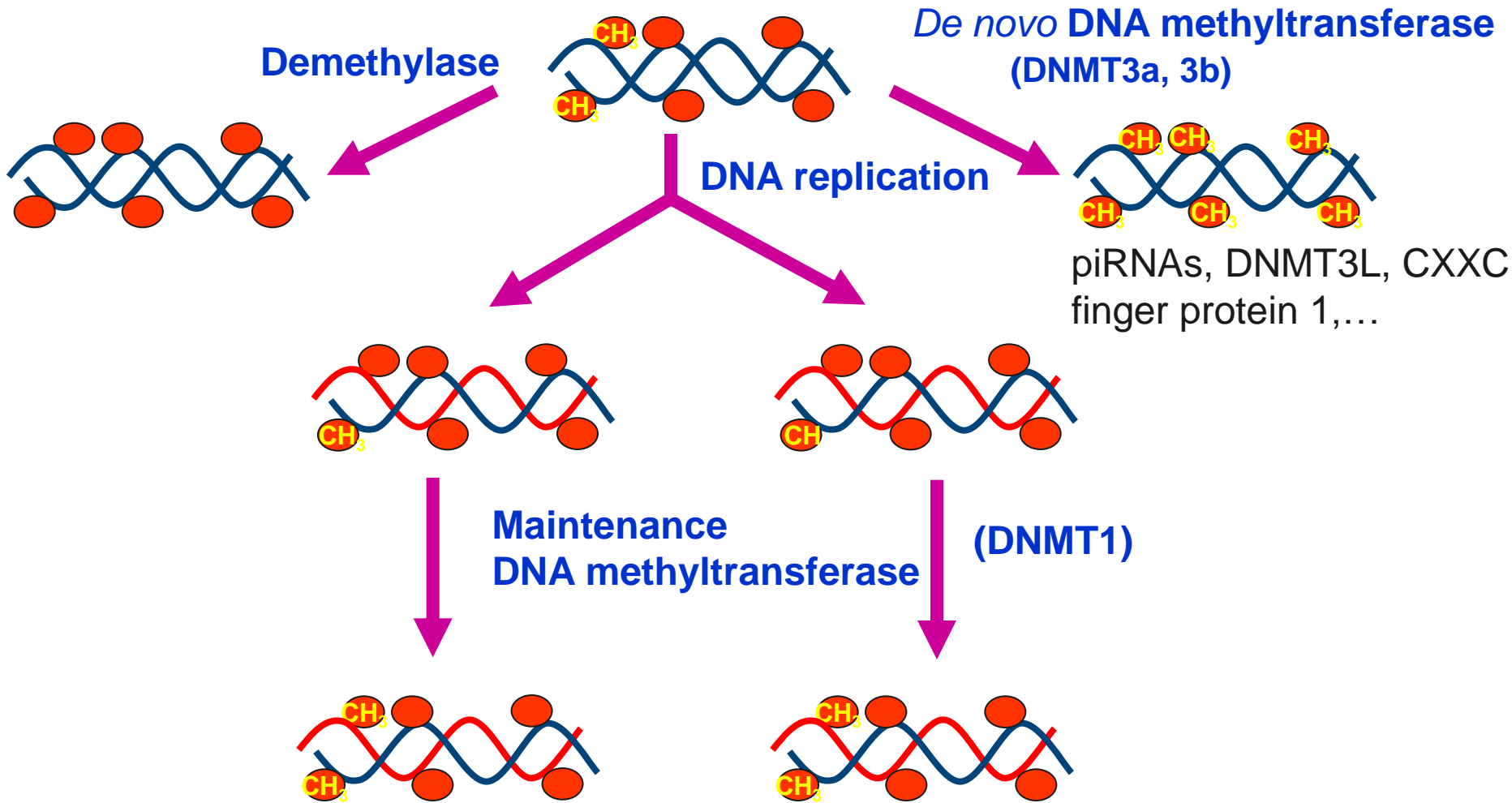
GC-Gehalt ~41%; CpG-Dinukleotide ~1%; 60-80% der CpG methyliert; (CHG und CHH häufiger in Pflanzen methyliert)

CpG-Inseln: ≥ 200 bp, $\geq 60\%$ CpG

- im Promoter; 50-60% der Gene mit CpG-Inseln
- hypomethyliert - offen
- Deaminierung von meth-CpG kann zu TpG führen (C-T-Transition) !!!



DNA Methylierung



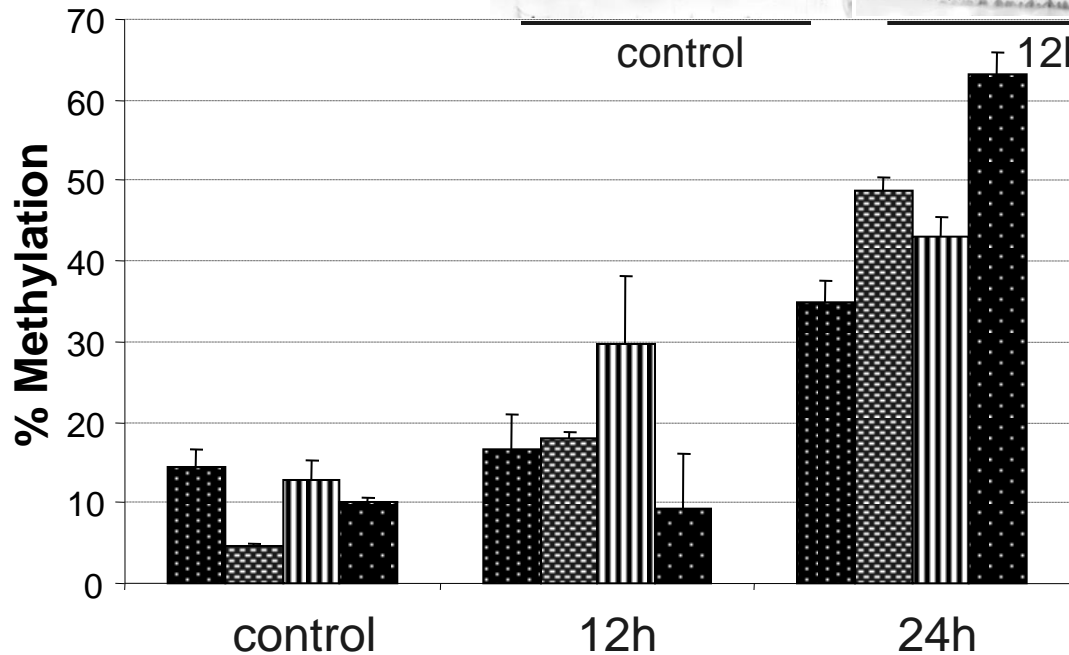
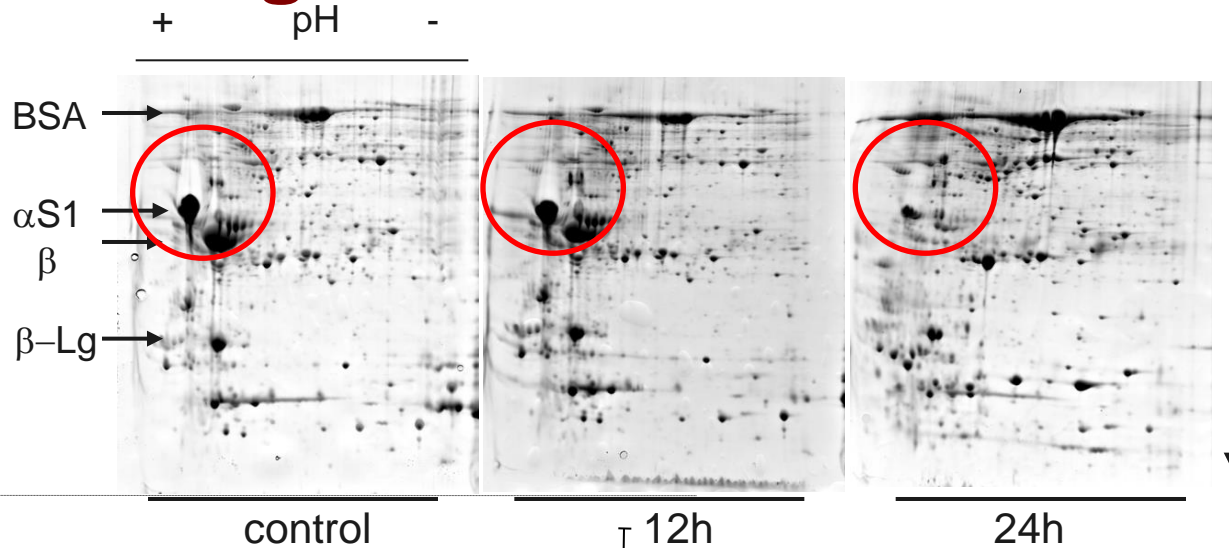
Epigenetische Phänomene



Katze mit Schildpattfärbung
www.wikipedia.org

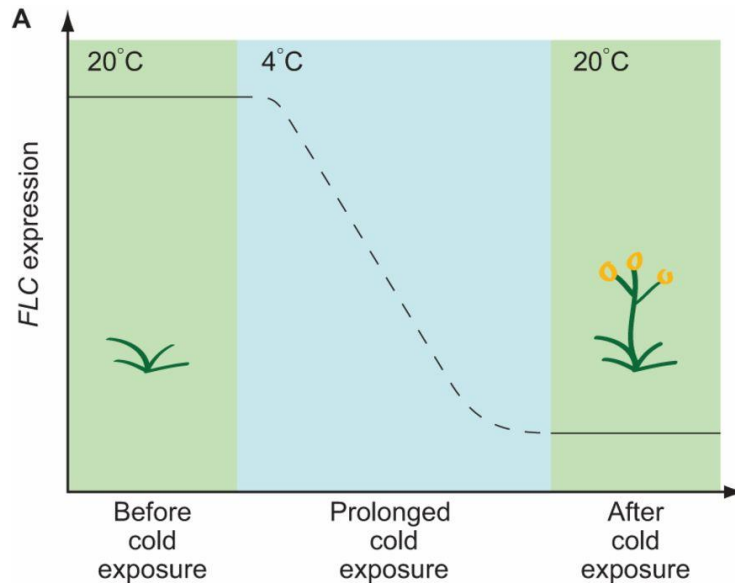
- **X-Chromosom-Inaktivierung**
- **Imprinting**
- **Geninaktivierung**
(spezifische Gene, transposable elements, repeats...)
- **Gewebsspezifische Expression**
- **Akute Regulation der Expression**
- **Krebs**

Akute Regulation von α S1-Kasein



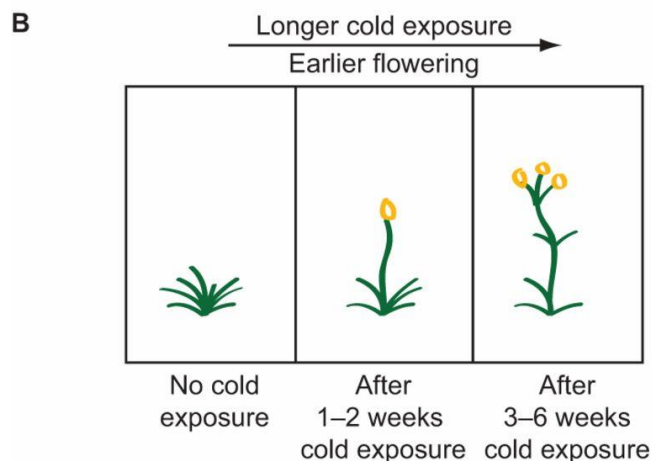
Remethylierung einer STAT5 Bindungsstelle 24 h nach Infektion

Vernalisation

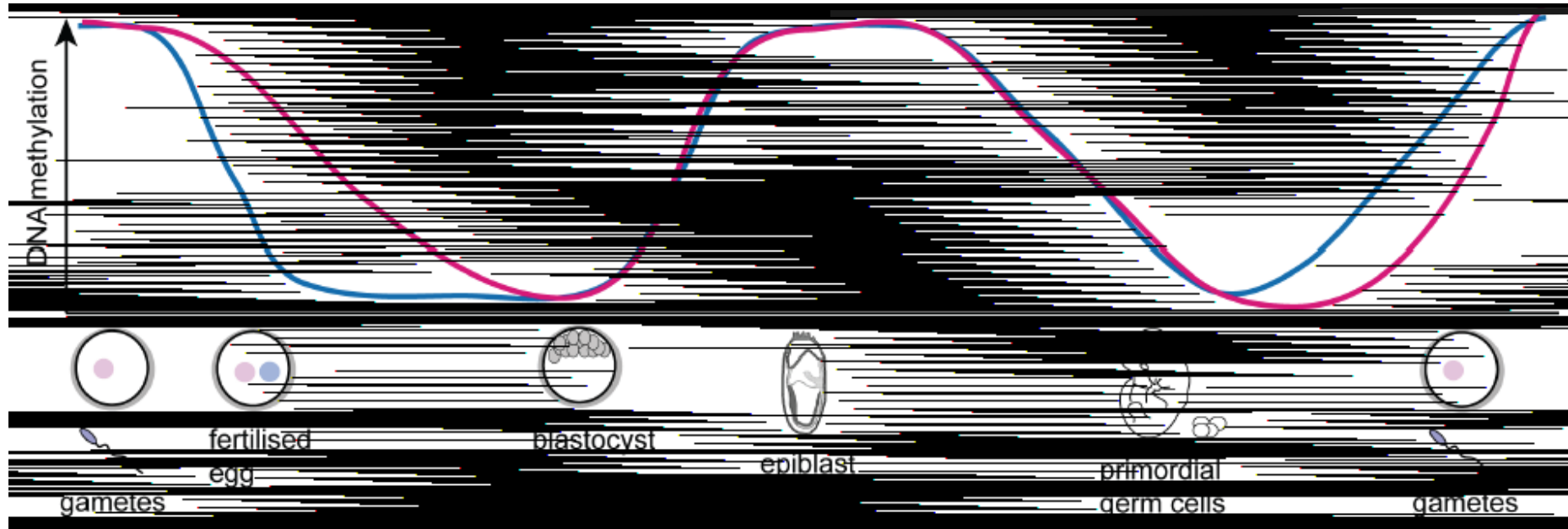


Epigenetische Modifikationen führen zur Reduktion der Expression von FLC nach Kälte

Epigenetische Modifikationen gehen bei der Bildung der Gameten verloren



Epigenetische Reprogrammierung

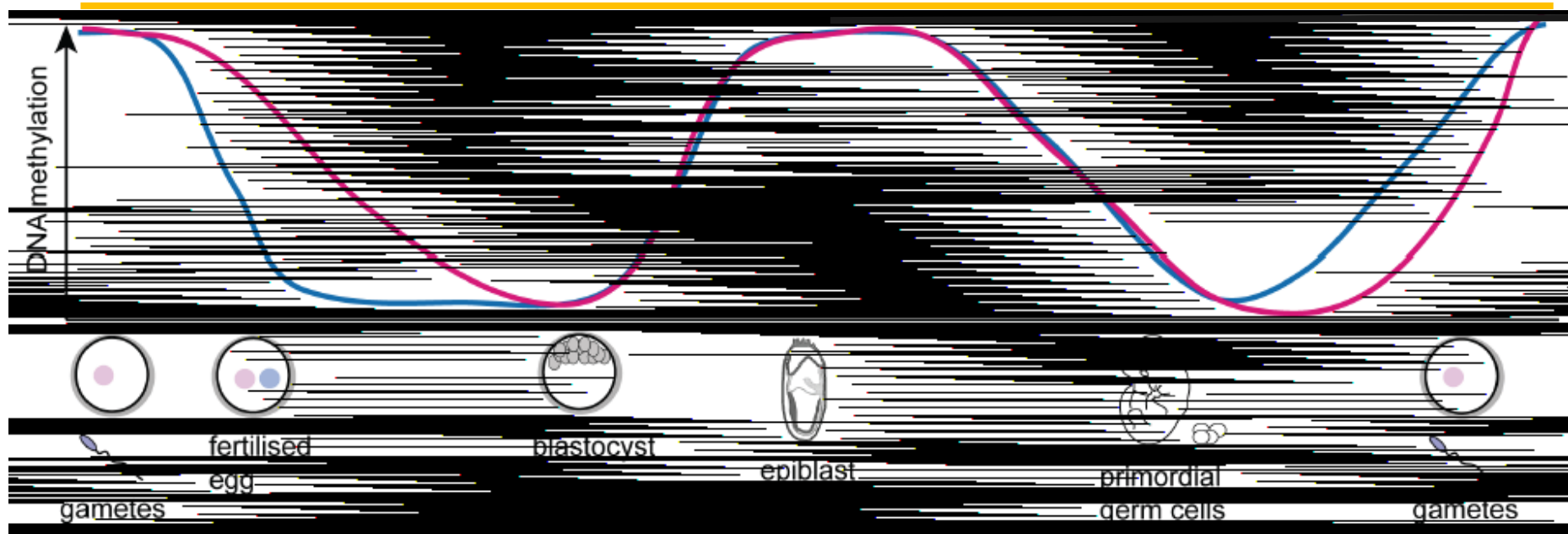


— paternal genome
— maternal genome
— offspring somatic genome

mod.from Blewitt M., course slides

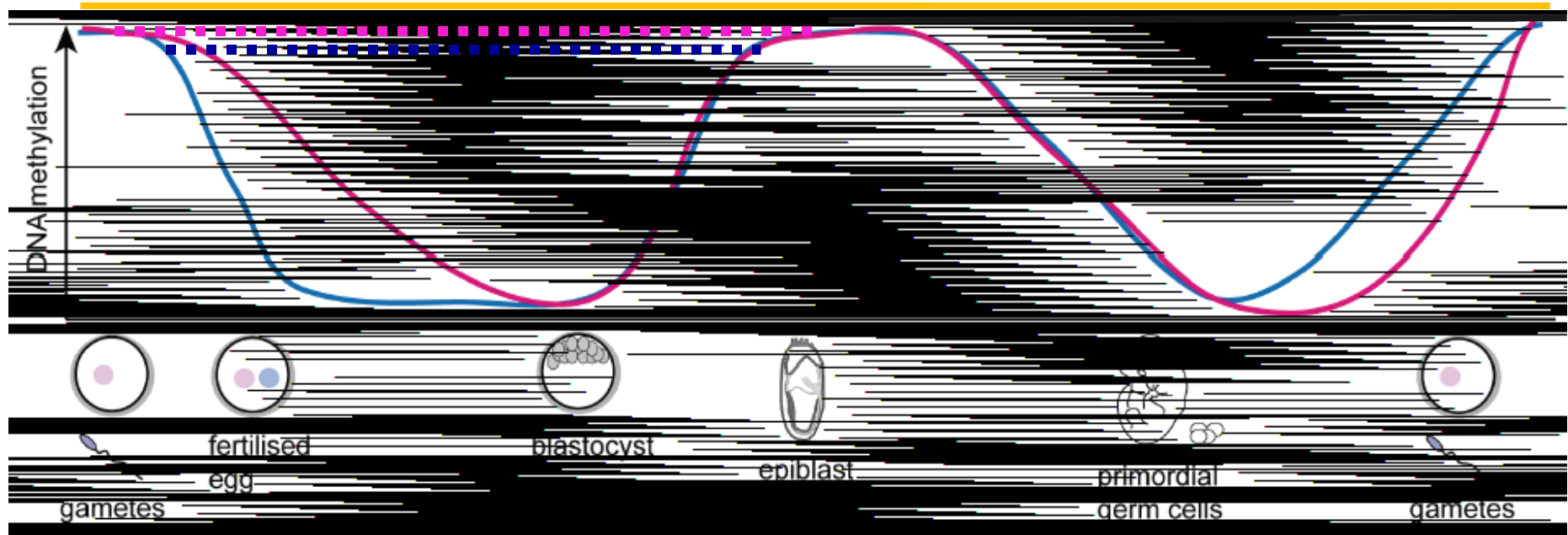


Epigenetische Reprogrammierung



- paternal genome
- maternal genome
- offspring somatic genome
- repeats

Epigenetische Reprogrammierung



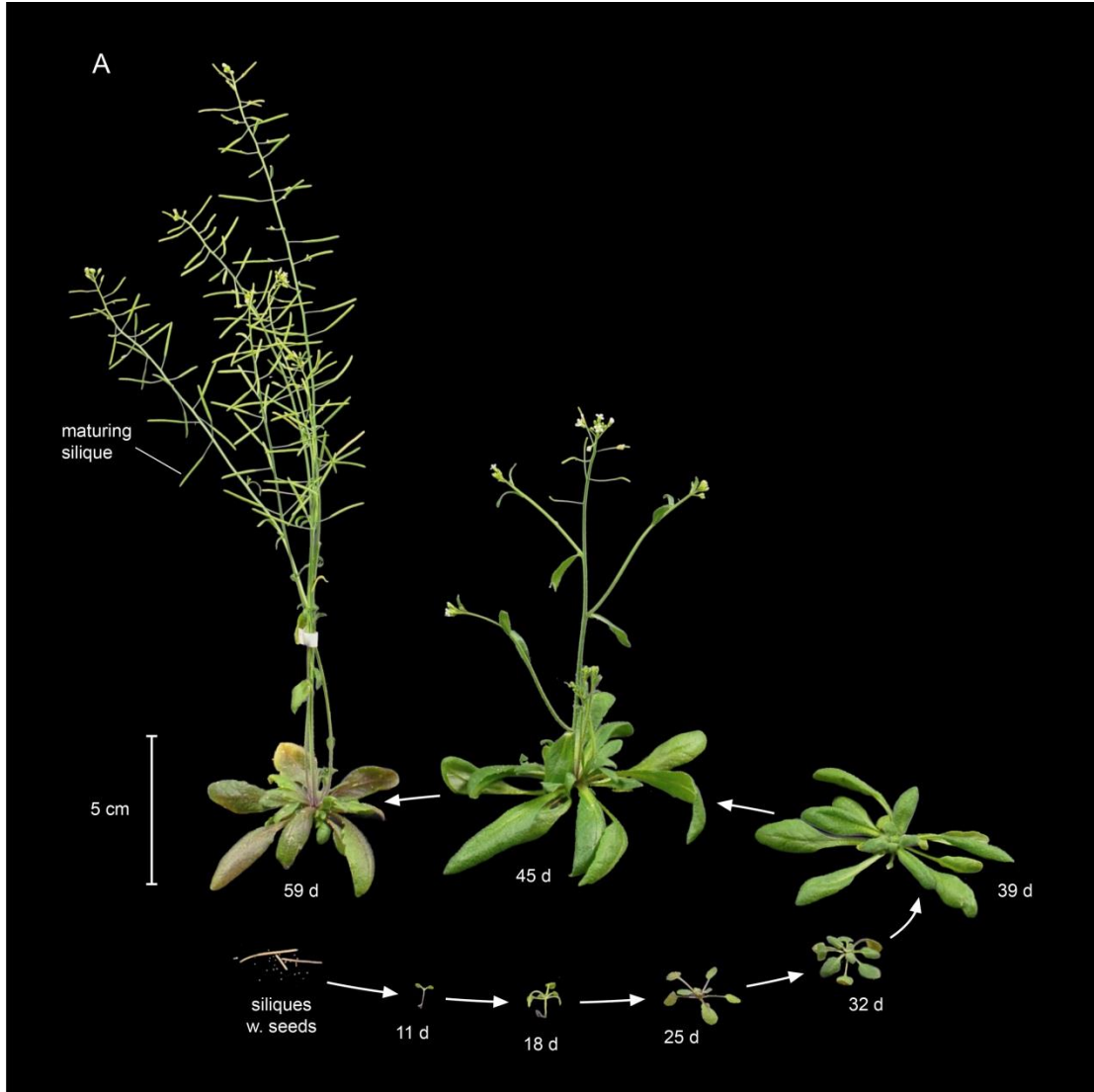
- paternal genome
- maternal genome
- offspring somatic genome
- repeats
- ⋯ paternally imprinted
- ⋯ Maternally imprinted

Evidenz für transgenerationale epigenetische Vererbung

- European, Afrikaner, Asiaten (Human Variation Panel): Unterschiede in >400 CpGs¹
- Jungle Fowl vs. Legehennen; Methylierungsmuster vererbt²
- Agouti: IAP Retroposon; Färbung assoziiert mit DNA-Methylierungsgrad; maternal vererbt³
- Geruchserfahrung bei Mäusen; vererbt über paternale Keimbahn⁴
- Vinclozolin bedingte Störung der Spermatogenese bei Ratte; vererbt über paternale Keimbahn⁵



Entwicklung Pflanze - Reprogrammierung



Keine frühe separate Keimbahn-Entwicklung bei Pflanzen, sondern Entwicklung aus somatischen Zellen;

→ großes Fenster für Weitergabe umwelt-induzierte epigenetische Modifikationen:

Kou et al. 2011: N-Mangel
Feng et al 2012: Salz-, Alkali-Stress

Epiallele - Pflanzen



Methylierung des LCYC Gens in *Linaria vulgaris* → Blütensymmetrie

Methylierung des FWA Gens in *Arabidopsis* → Blühzeitpunkt

Methylierung von CNR in Tomaten → Reifung

**Methylierung! Epiallele durch Modifikation der
DNA-Methylierungs-Maschinerie**



Imprinting

- Diploide Embryonen mit nur maternalen oder nur paternalen Pronuklei sind nicht überlebensfähig
- Genetische Konflikt-Theorie

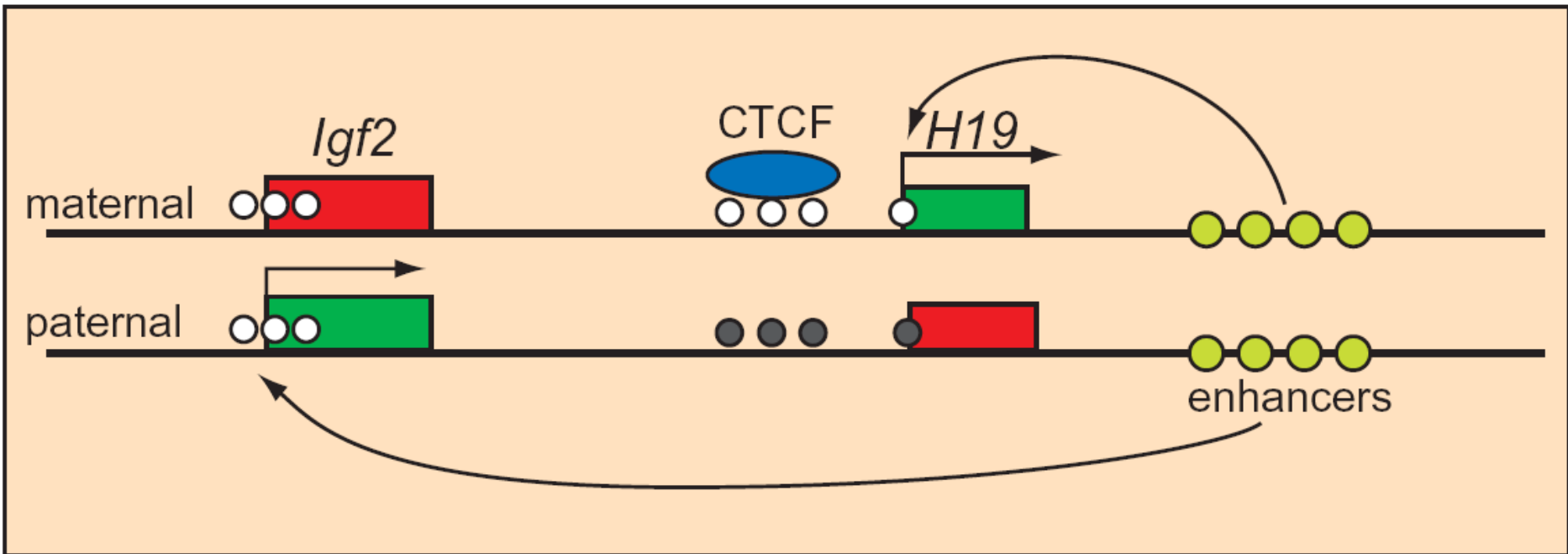
Imprinting Gene:

Maus	132	Rind	25
Mensch	79	Schwein	21
		Schaf	14

- Maus und Mensch nur 40 gemeinsame geprägte Gene
- Geprägte Gene sind oft in Klustern organisiert
- Imprinting control region, ICR
- Geprägte Gene oft für Merkmale der embryonalen Entwicklung, Metabolismus
- Wenige Gene (<1 %) aber oft große Effekte ($\leq 10\%$)



Imprinting IGF2



Setting up boundaries. When the CTCF protein binds to DNA, it blocks regulatory DNA downstream from interacting with the *Igf2* gene and only the *H19* gene is expressed. If methyl groups (black) prevent CTCF binding, *Igf2* is active, but *H19* is silenced.

Rand & Cedar, 2003

Imprinting IGF2

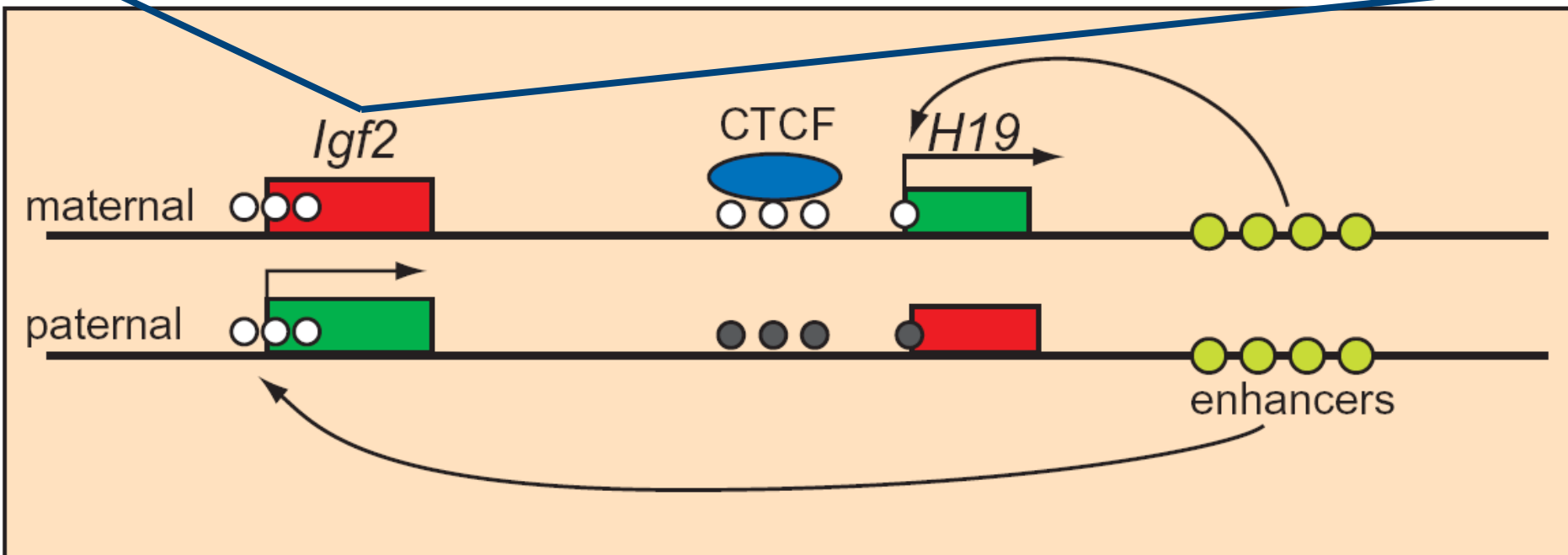
A>G Transition in Intron 3, CpG-Insel

A = Q, bindet den Repressor (ZBED6) nicht

G = q, bindet den Repressor

30% Varianz Magerfleischanteil, Muskel-/Fettansatz

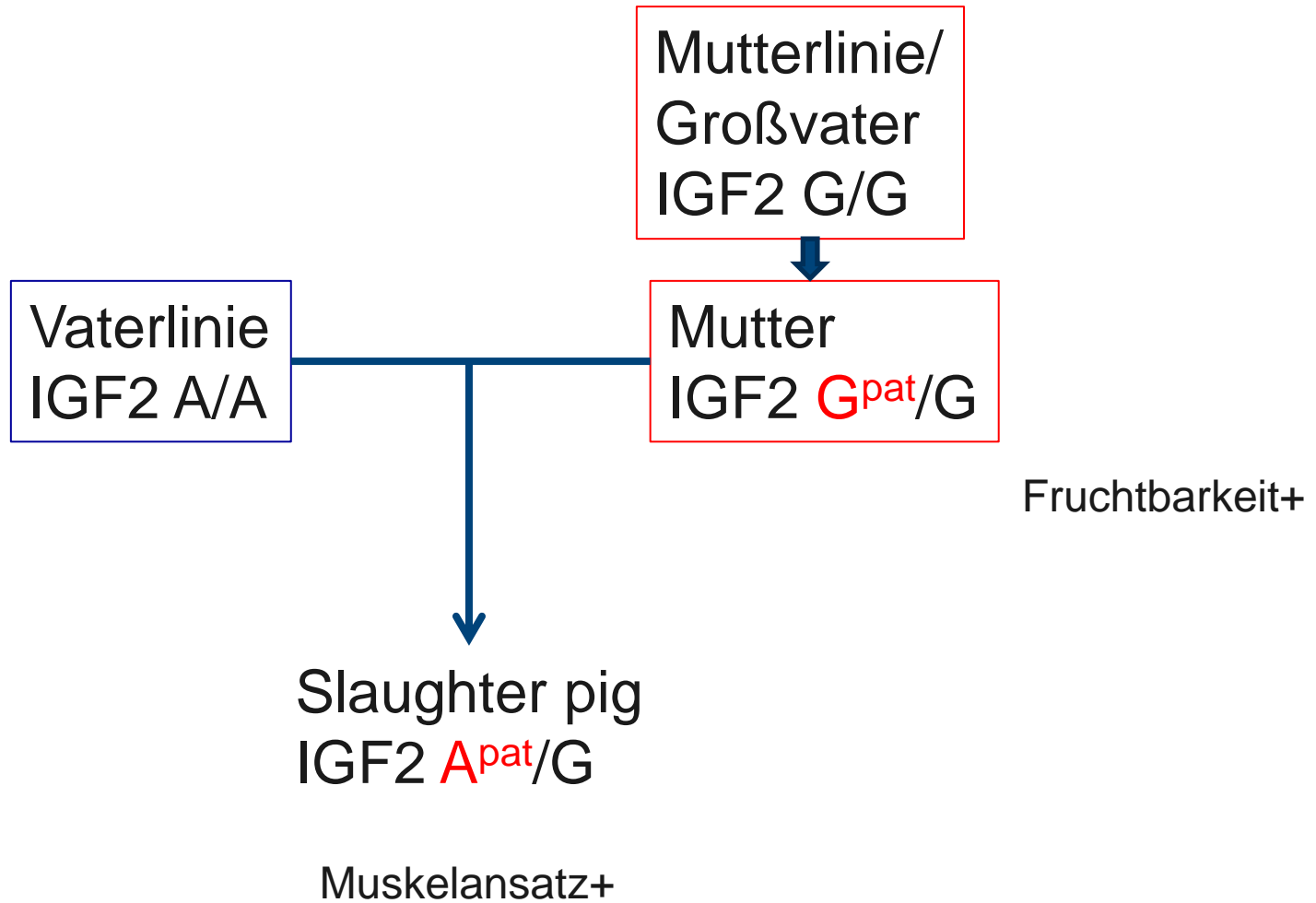
→ A-Allel vom Vater erhöht IGF2 3-fach



mod. from Rand & Cedar, 2003



Imprinting IGF2



Bedeutung von Epigenetik

Genom + Epigenom + Umwelt → Phänotyp

Zusätzliche Varianzursache:

Wissen verbessert Vorhersage des Phänotyps

- **Biomarker → Handlungsmanagement**
- **Selektion → Züchtung**



Bedeutung von Epigenetik

- **Fehlende Heritabilität vs. Fehlende Kausalität**
- **Epimutation stabil:**
wahrscheinlich in LD mit SNP (kein Zugewinn an Info)
- **Epimutation unstabil:**
wahrscheinlich nicht in LD mit SNP, aber weniger sinnvoll als Selektionskriterium

weniger Beitrag zur fehlende Heritabilität, aber teilweise zur fehlenden Kausalität



Bedeutung von Epigenetik

- Reproduktionsbiotechnologie: LOS
- Umwelt-induzierte epigenetische Modifikationen fetal programming/nutritional programming:

Epidemiologische Daten und Experiment in Modell- und Nutztieren haben gezeigt, dass Umwelteinflüsse während der Trächtigkeit den Phänotyp der Nachkommen beeinflussen

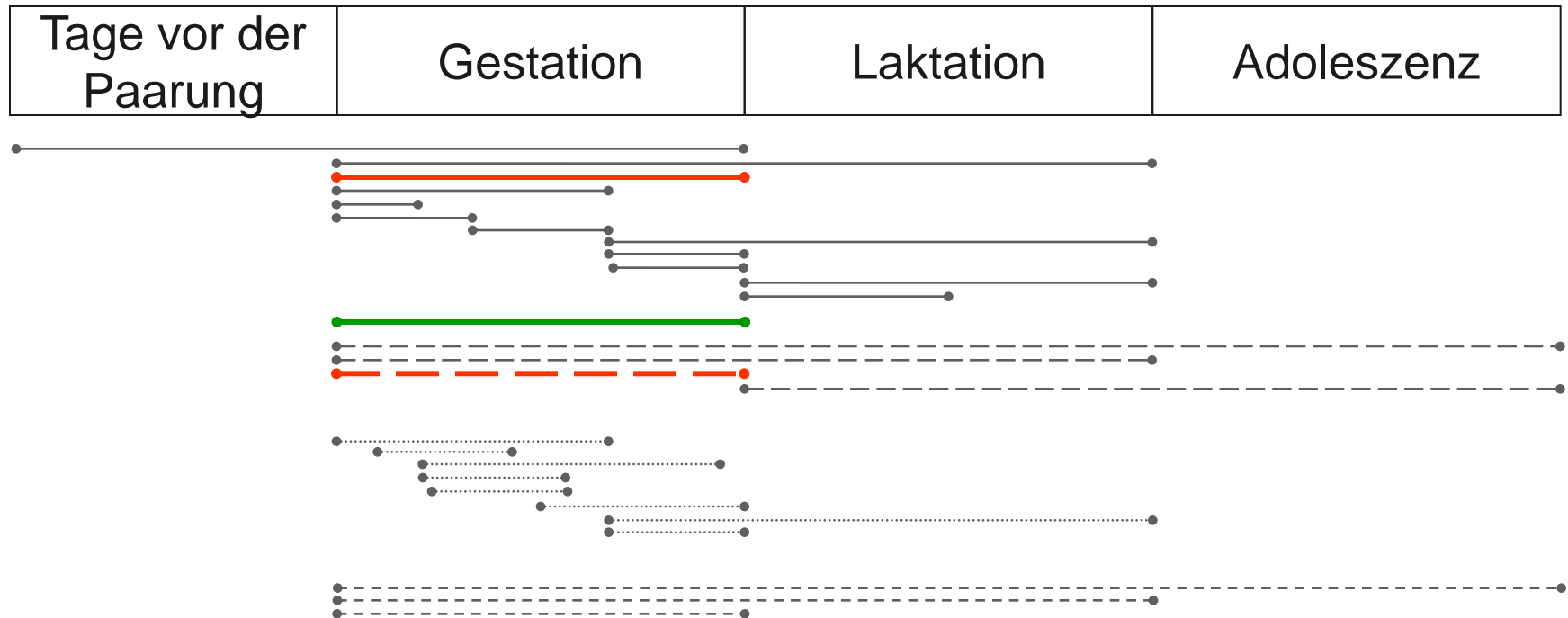
Epigenetische Mechanismen als molekulares Gedächtnis



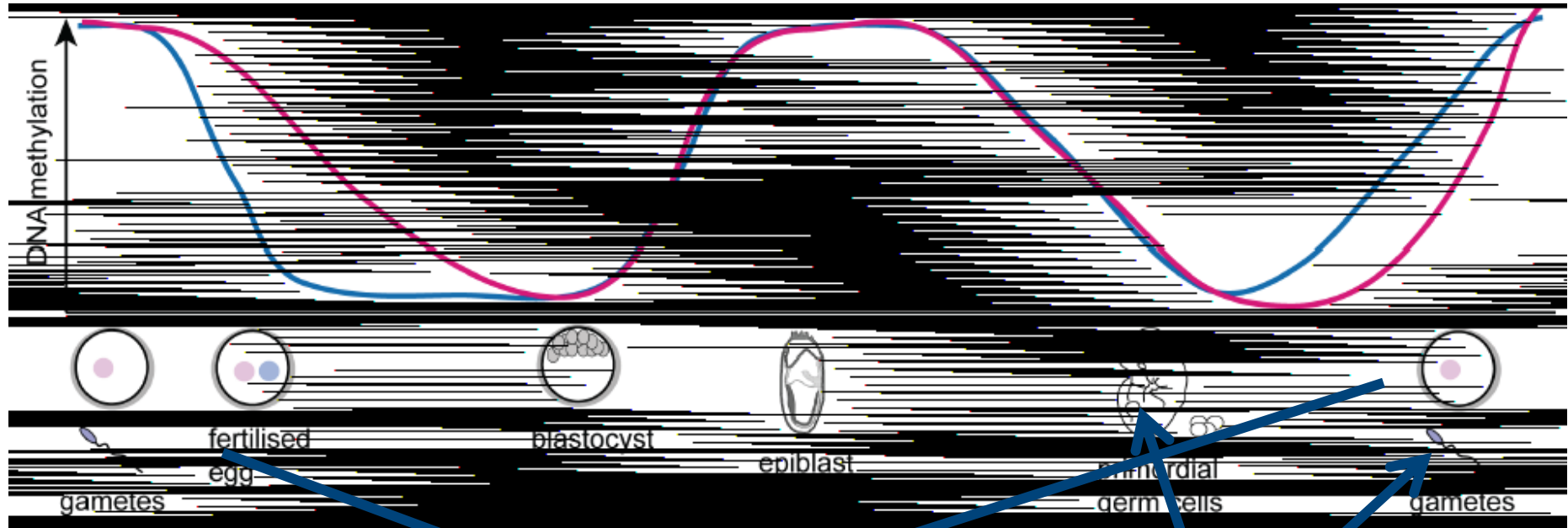
Diätetische Interventionen bei Säugern

- maternale Niedrigproteindiät
- - - - - maternale Hochproteindiät
- maternale Kalorienrestriktionsdiät
- - - - - maternale Hochfettdiät

— Methionin-Zyklus



transgenerationale epigenetische Vererbung



Generation 1

Generation 2

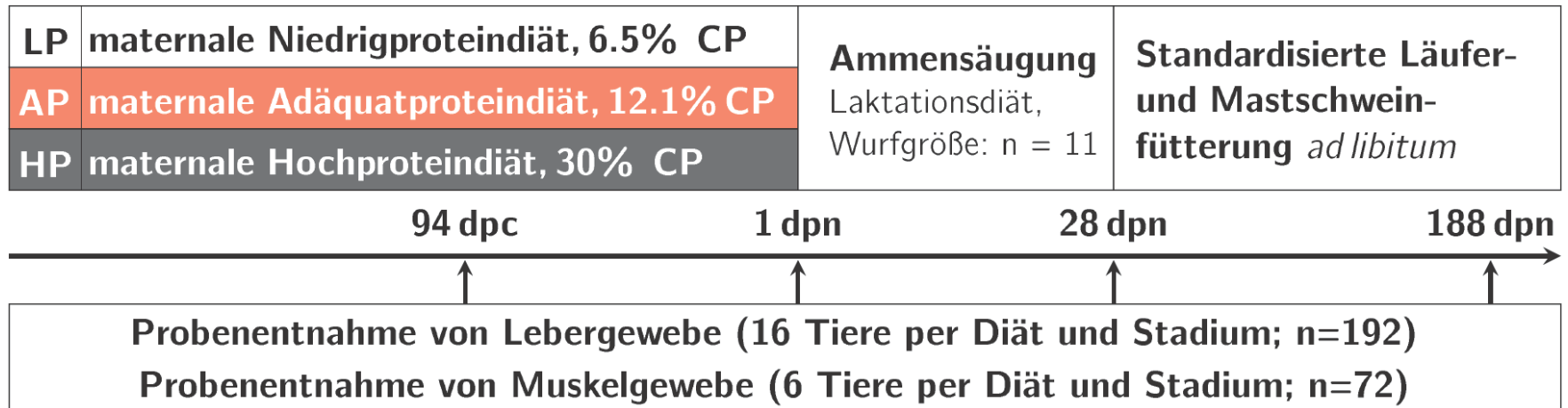
Generation 3

Experimentelle Diät in früher Trächtigkeit
< primordiale Keimzellen

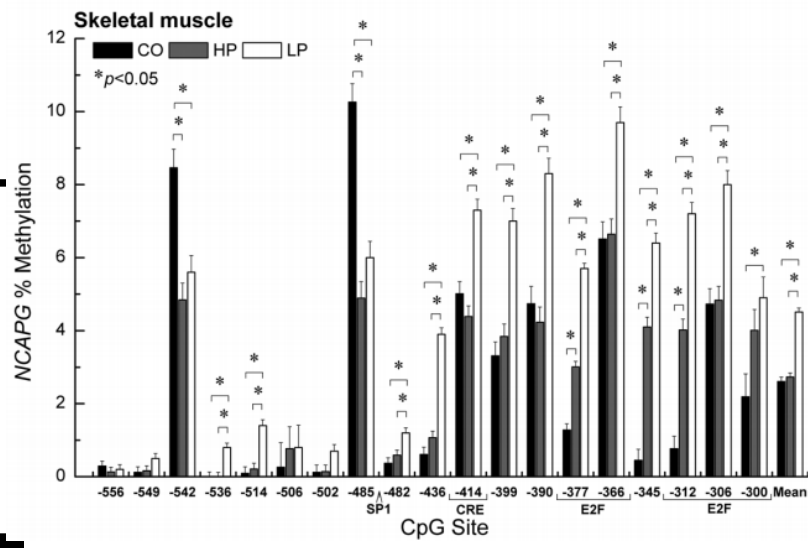
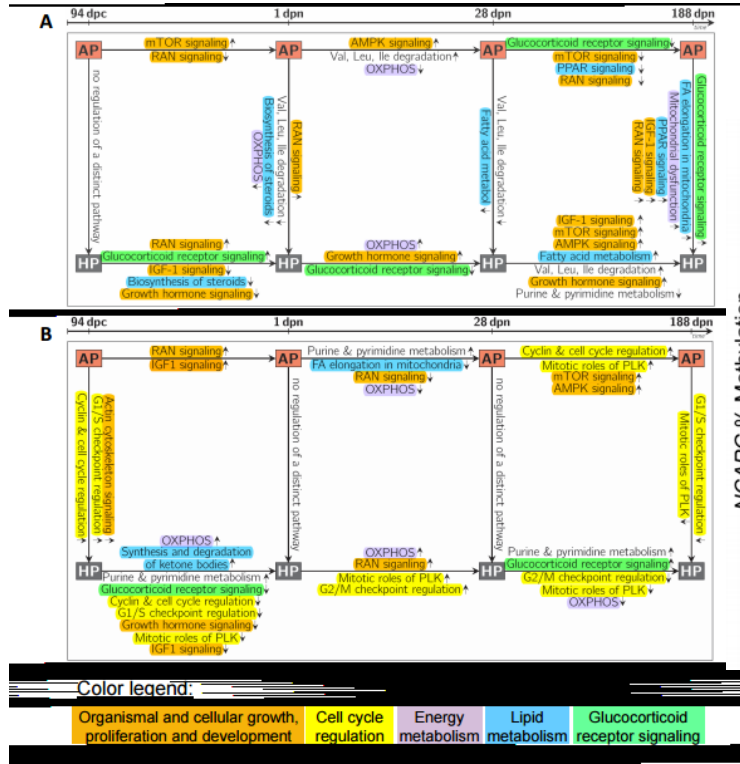
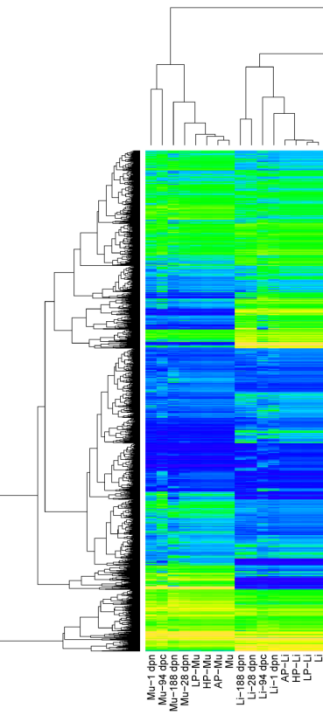
Experimentelle Diät während gesamter Trächtigkeit = primordiale Keimzellen



Fötale Programmierung



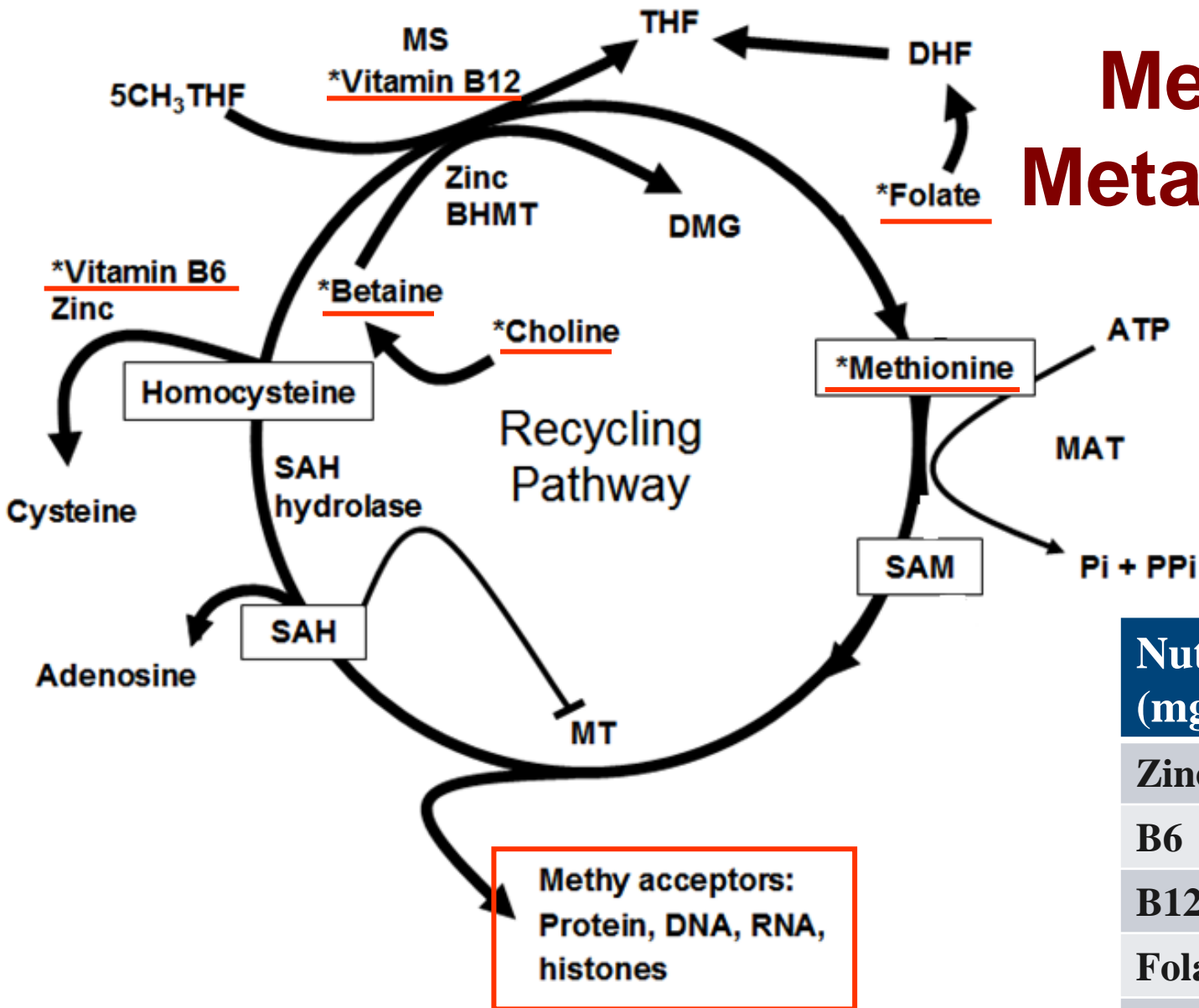
- Transkriptionelle Antwort
- Epigenetische Modifikationen



- Einflüsse Gewebe > ontogenetisches Stadium > Diät
- Muskel-Transkriptome stärker beeinflusst als Leber
- kein “gatekeeper” Gene
- differentielle Expression of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b
- differentielle DNA-Methylierung von PPAR α , NR3C1, NCAPG...



Methionin Metabolismus



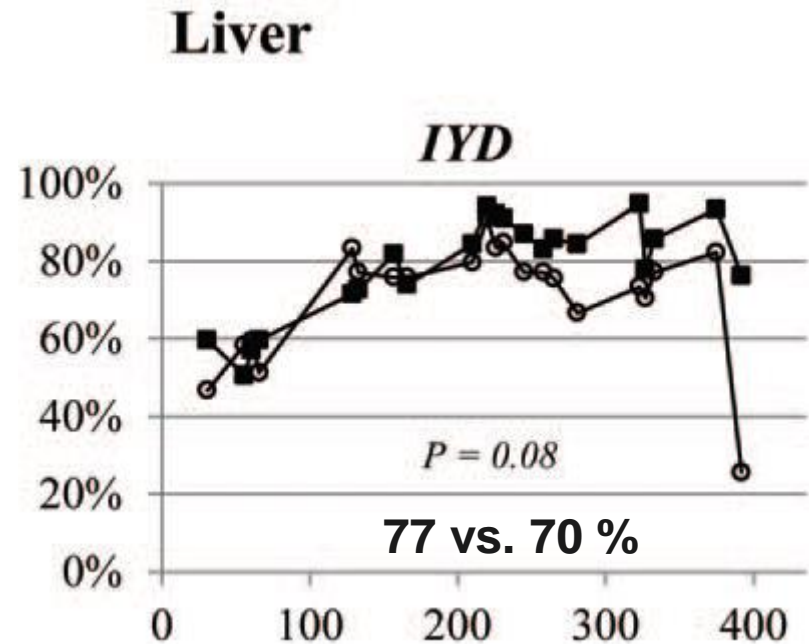
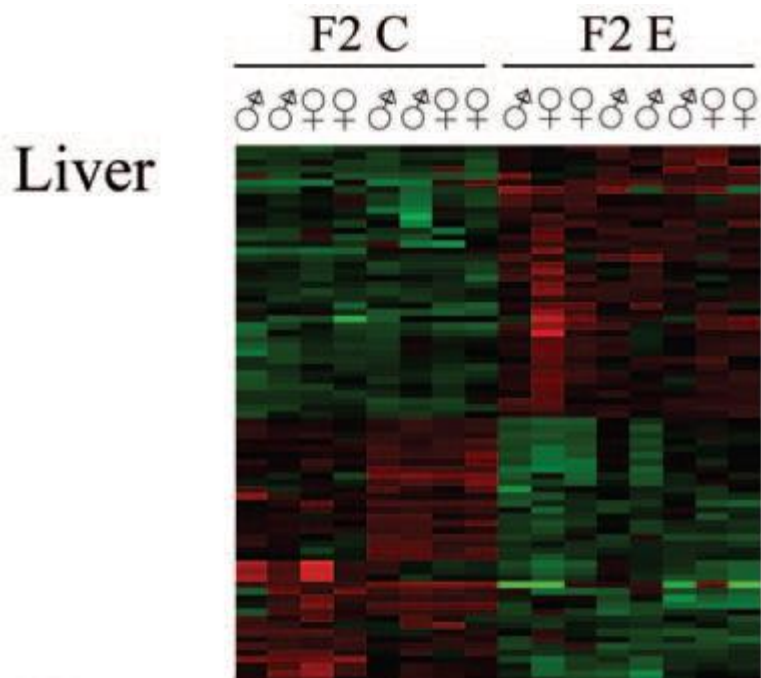
Nutrient (mg/kg)	CON	MET
Zinc	21.8	149.0
B6	3	1180
B12	31	5930
Folate	3	92.2
Choline	500	2230
Methionine	2050	4700

DNA Methylation



transgenerationale epigenetische Vererbung

Differentielle Fütterung von Ebern, Verpaarung bis F2
F2 Nachkommen unterscheiden sind im Rückenspeck ($P = 0.03$)
in Leber und Muskel differentielle Expression von Fett- und Energie-
Stoffwechselwegen
signifikante Unterschiede in DNA Methylierung von IYD



Supplementierung von Methylendonoren

- Effekte der Methyl donor-angereicherten Diät auf Transkriptom
- Kartierung differentiell methylierter Regionen
- Biologische Signifikanz der differentiellen Methylierung durch Integration mit Expressionsdaten

2 Rassen (Pi, GL) × 2 Diäten × 2 Stadien (91 ppc, 150 dpn)
4 Nachkommen/Rasse/Diät/Stadium, n=32 (48), Leber

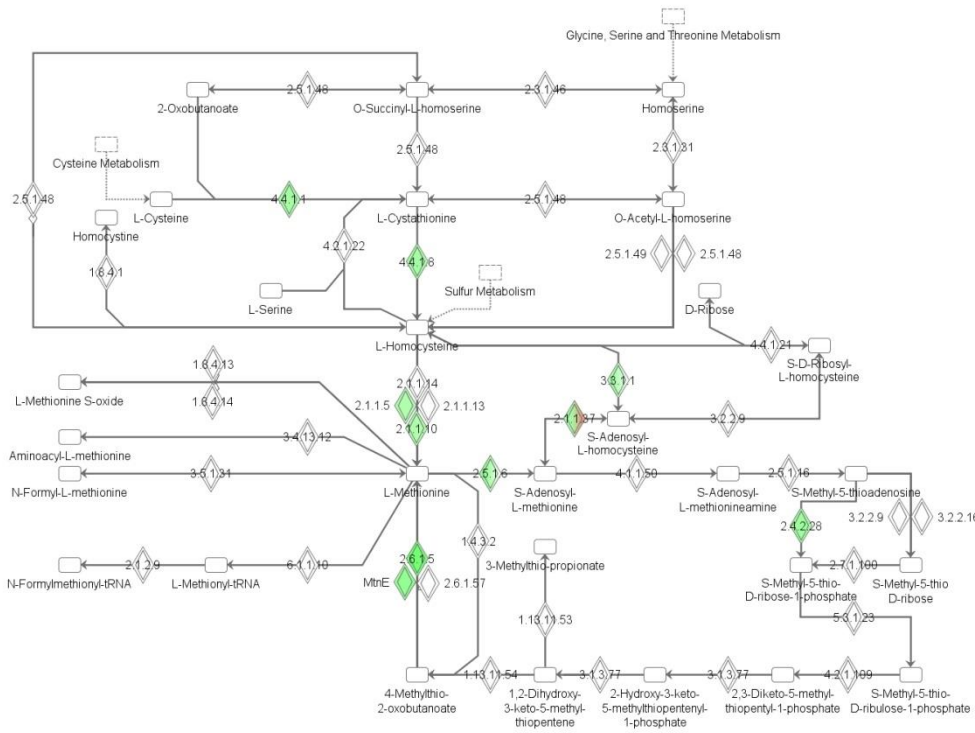
Next Generation Sequencing:
RNA → Transkriptom (RNA-Seq)
DNA → Methylom (RRBS)



Differentielle Expression abhängig von Diät in beiden Rassen

Methionine Metabolism

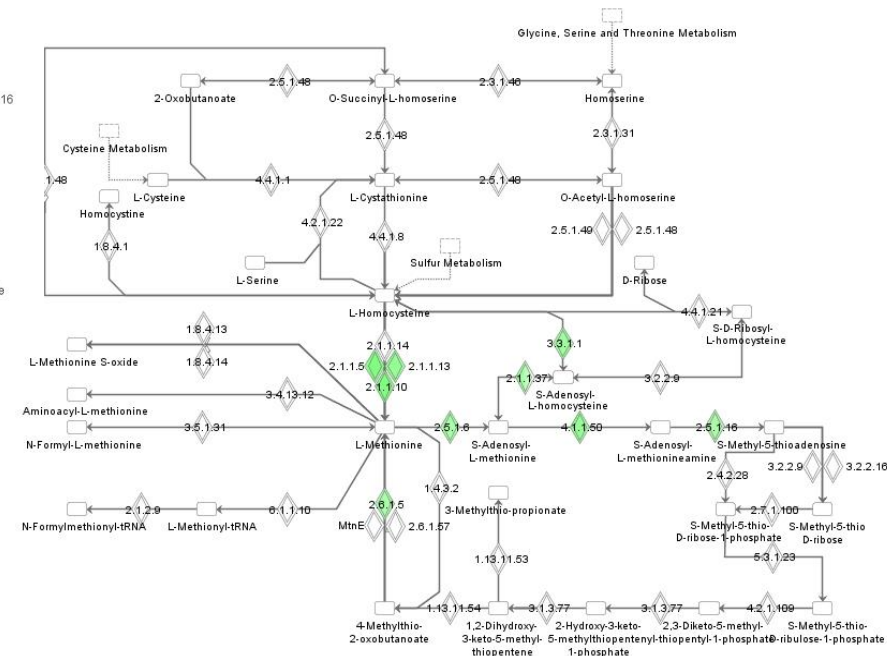
PI



2 (Curated from KEGG Data. Distribution of Curated Data under license from Pathway Solutions Inc). All rights reserved.

Methionin-Metabolismus in beiden Rassen reguliert, einschließlich DNMT1, DNMT3a, DNMT3b

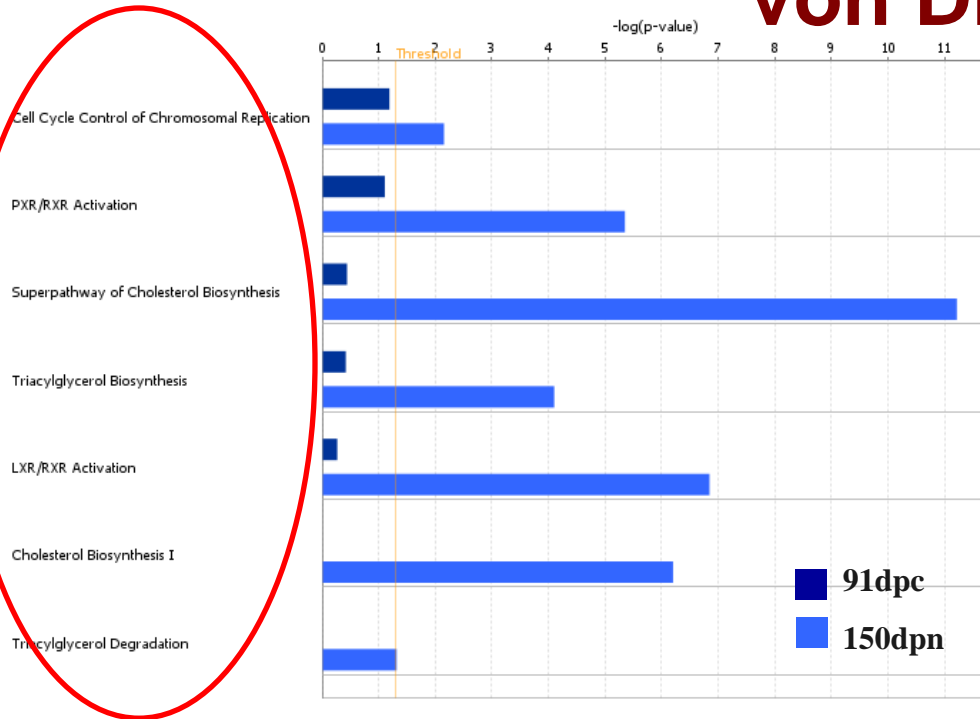
DL



LEIBNIZ INSTITUTE
FOR FARM ANIMAL BIOLOGY

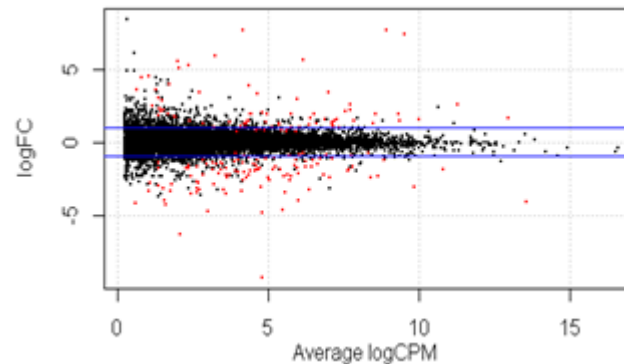
Wimmers Klaus FBN
27. Hülseberger Gespräche
7./8. Juni 2016, Hamburg

Differentielle Expression abhängig von Diät

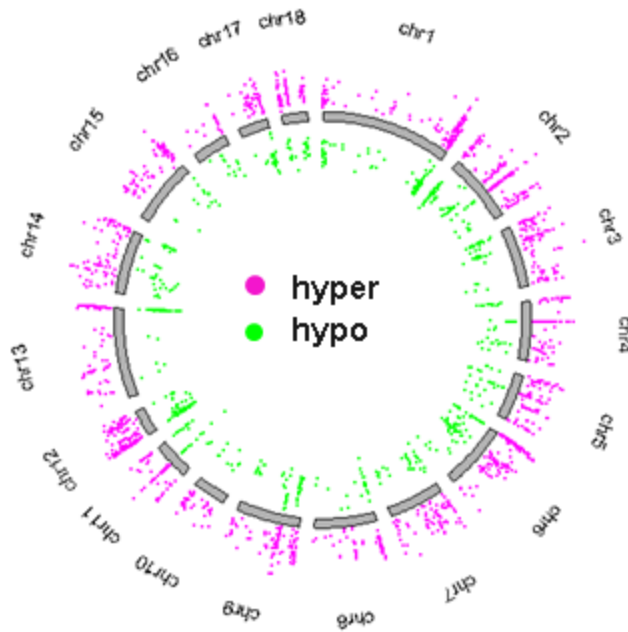


- 150dpc:
 - Fettstoffwechselwege
- 91dpc:
 - IGF Signaling
 - Wnt/ β -catenin signaling

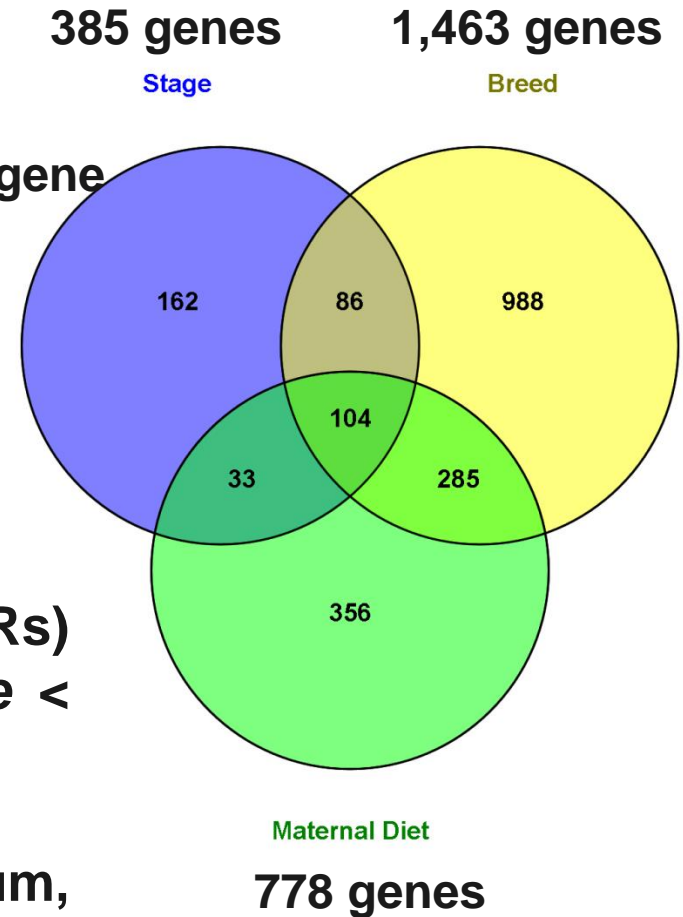
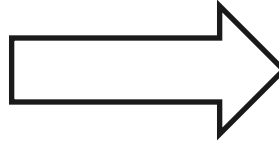
426 und 363 Gene
differenziell exprimiert am
91dpc und 150dpc



Genome-weite Verteilung der DMRs Abhängig von Stadium, Rasse und Diät



link to the nearest gene



Differentiell methylierte Regionen (DMRs)
15% differentieller Methylierung; $q\text{-value} < 0.05$.

433, 2038, und 932 DMRs abh. von Stadium,
Rasse, Diät

Functionelle Annotation der Gene in DMRs

Maternal-diet-associated DMRs/Genes

Epithelial-mesenchymal transition

Eicosanoid Signaling

Human Embryonic Stem Cell Pluripotency

Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency

Wnt/ β -catenin-sign.

Basal Cell Carcinoma Signaling

Adipogenesis

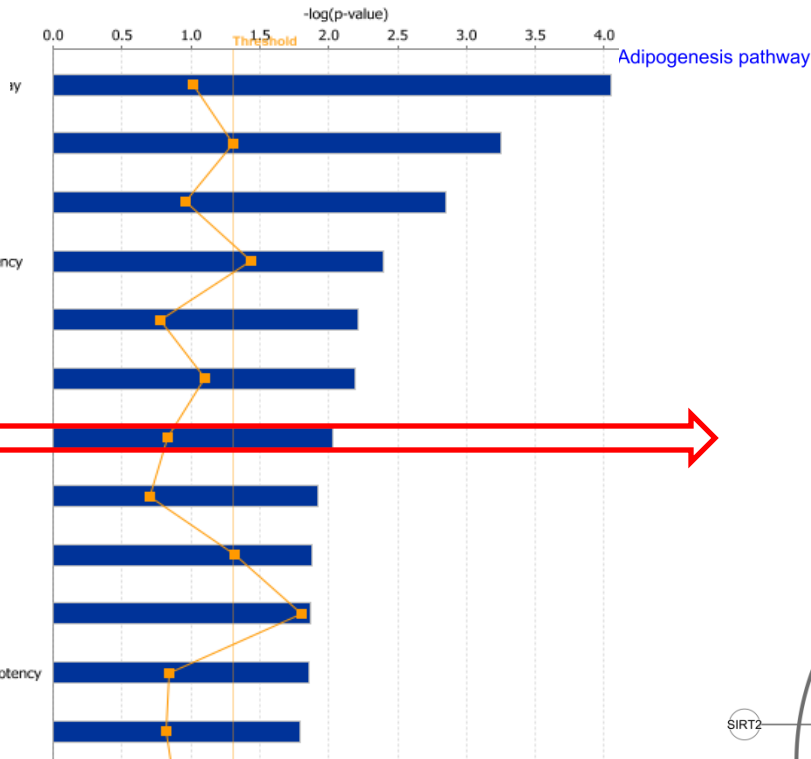
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation

autophagy

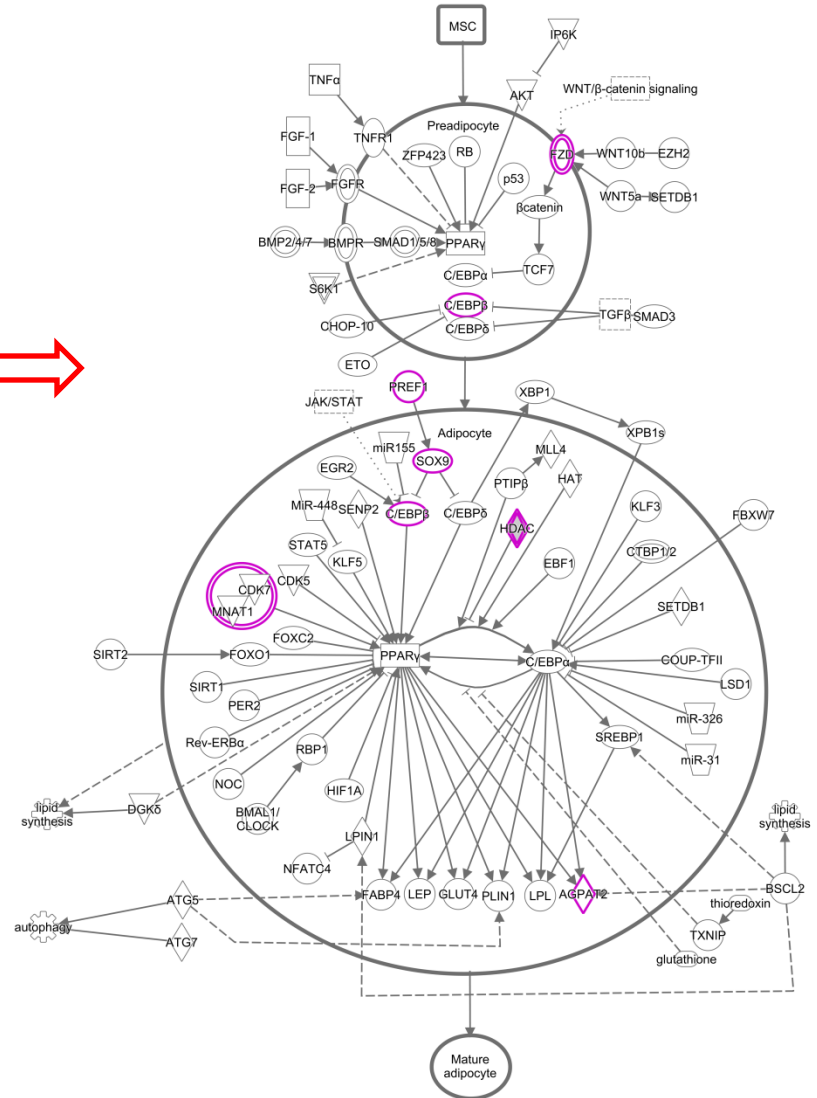
Vitamin-C Transport

Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency

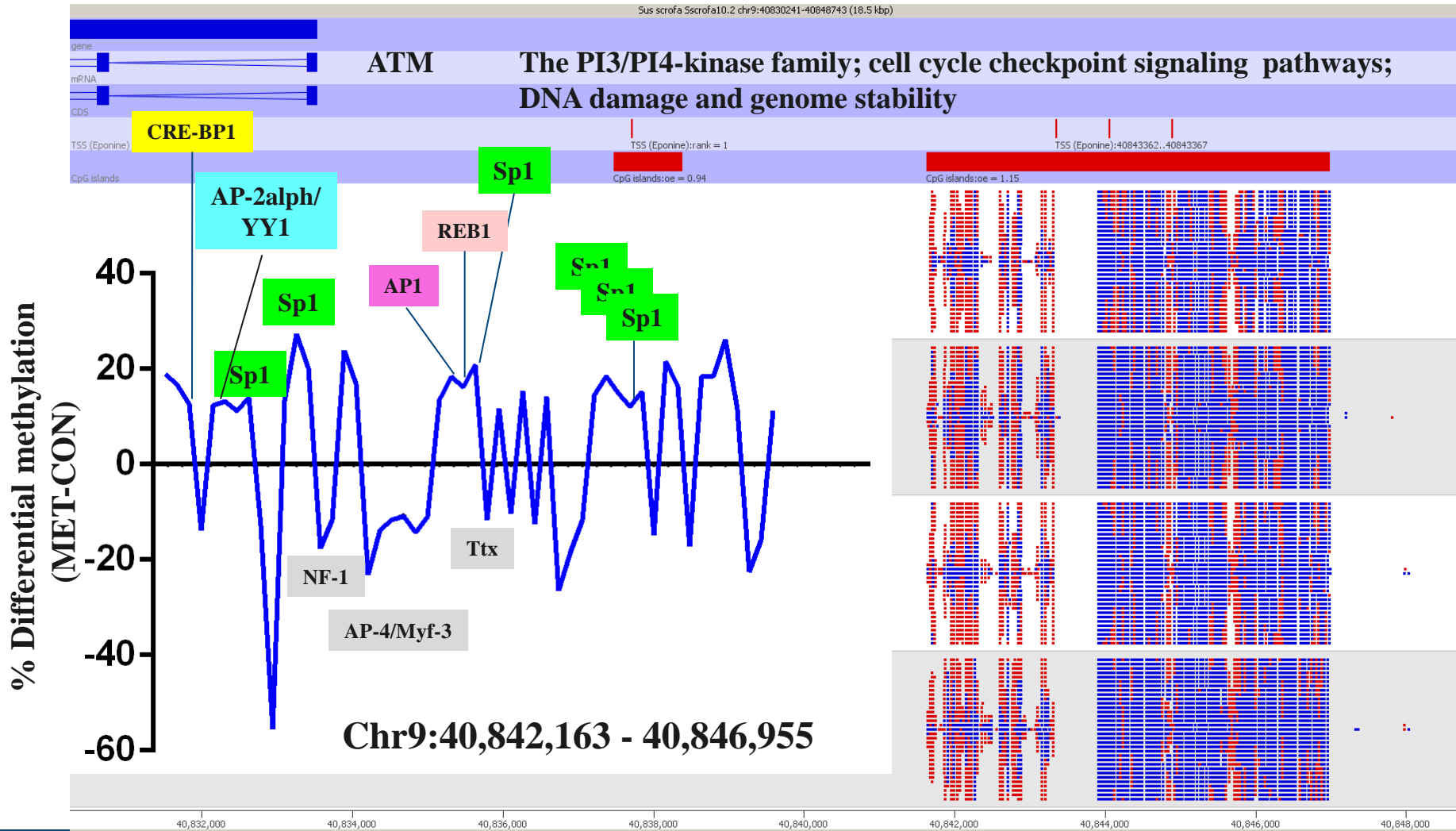
NGF Signaling



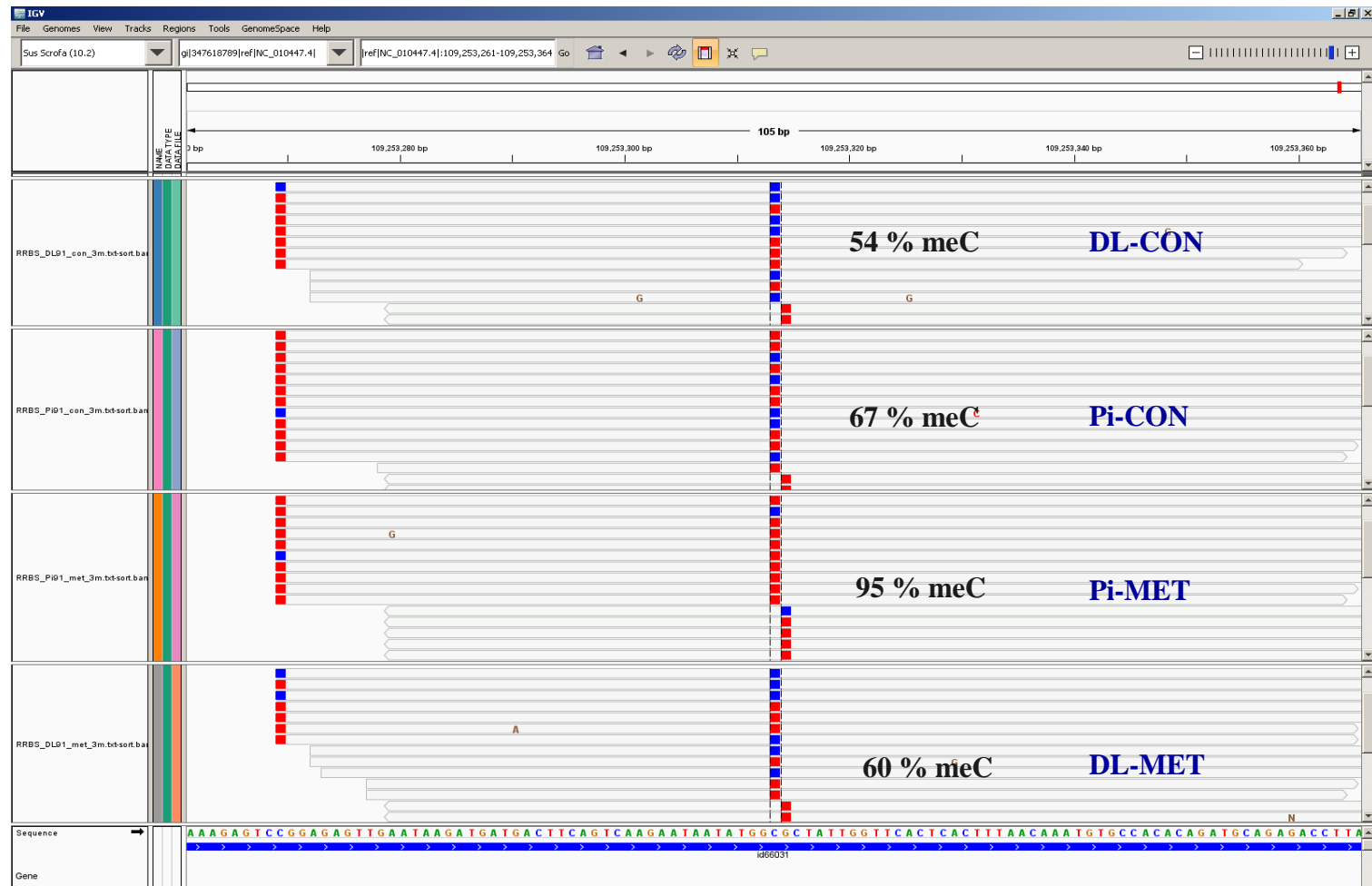
Adipogenesis pathway



Funktionelle Annotation von DMRs



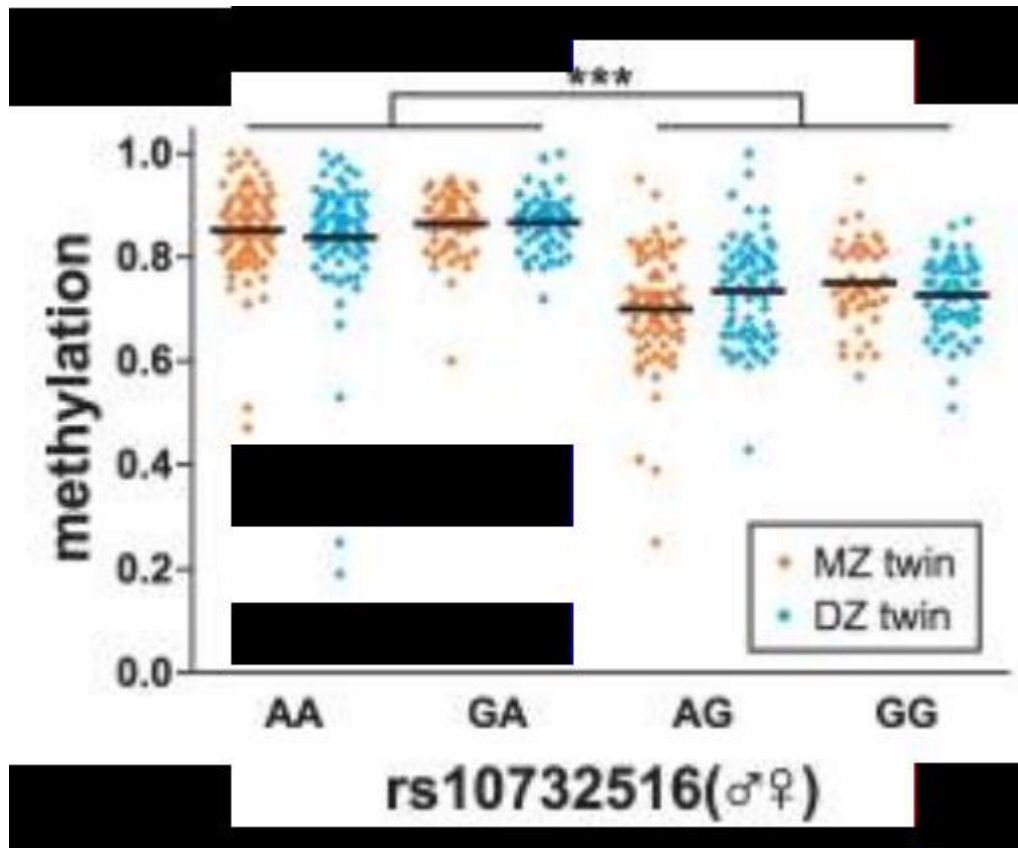
DNA Methylierung – Rassenunterschied



Differentiell methylierte CpGs im E2F7 abhängig von Diät und Rasse;
91 dpc



DNA Methylierung vs. Genotyp

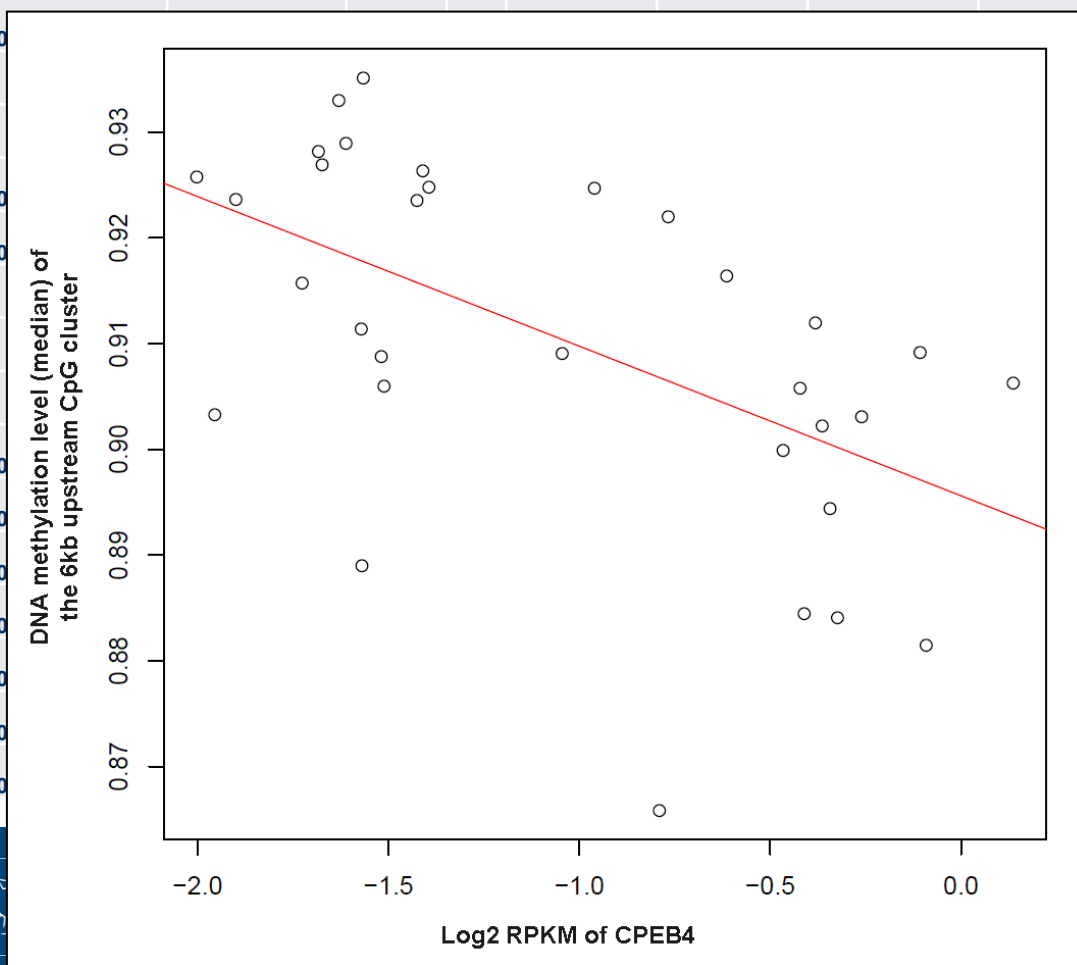


SNP-Genotyp assoziiert mit DNA-Methylierungs-Grad am H19 (Mensch)

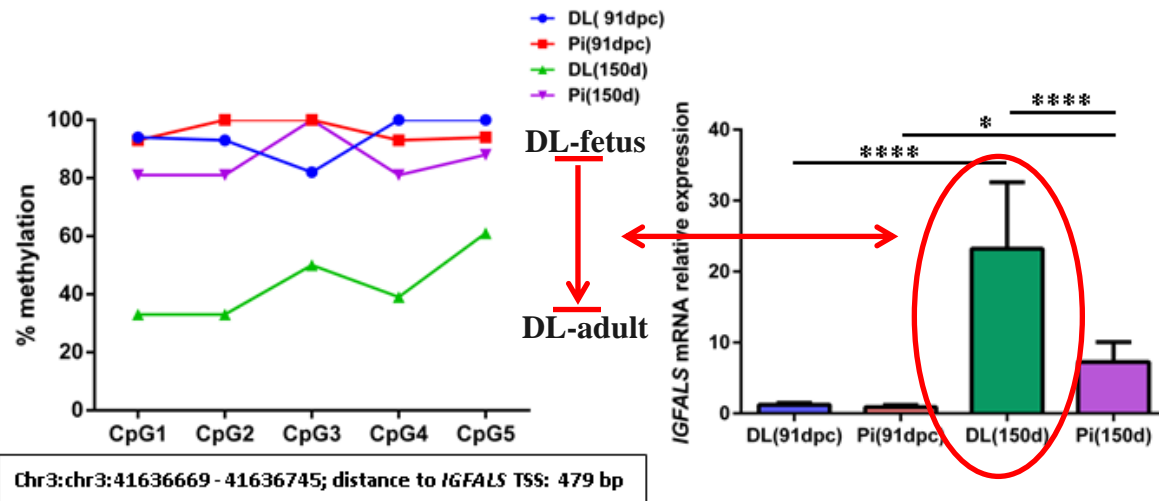
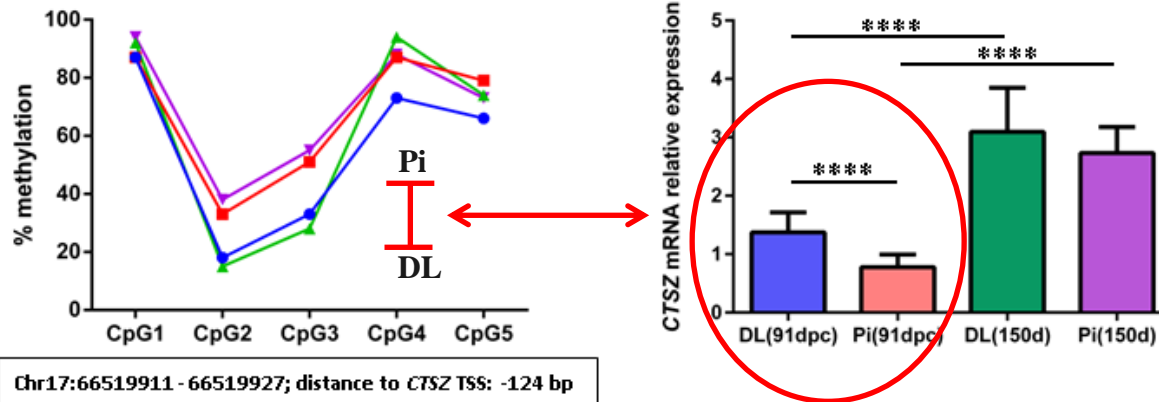
Integration von RRBS und RNA-Seq

Significant correlation between RNA-Seq and RRBS

Gene ID	Symbol	Strand	Chr	Start	End	CpGClust.ID	Start	End	Upstream (kb)	Mean correlation
ENSSSCG00000016981	CPEB4	-	16	54813538	54876701	16_3	54881577	54881654	-4.88	-0.3486
						16_4	54883290	54883353	-6.59	-0.6066
						16_5	54883879	54883948	-7.18	-0.5185
ENSSSCG00000000000							956548	-66.32	-0.4726	
								956001	-66.92	-0.4569
								955334	-67.47	-0.4833
ENSSSCG00000000000								314215939	-78.00	-0.4348
ENSSSCG00000000000								873957	-0.28	-0.3231
								874578	-1.71	-0.3150
								875098	-2.09	-0.3378
								875758	-2.84	-0.3133
ENSSSCG00000000000								314215889	-64.34	-0.3924
ENSSSCG00000000000								314215939	-70.05	-0.3889
ENSSSCG00000000000								20180635	-88.71	-0.3786
ENSSSCG00000000000								96942153	-86.52	-0.3754
ENSSSCG00000000000								314215919	-89.82	-0.3682
ENSSSCG00000000000								96940258	-31.97	-0.3574
ENSSSCG00000000000								20180598	-97.25	-0.3320



Integration von RRBS und RNA-Seq



Zusammenfassung

- Epigenetische Modifikationen stellen eine zusätzliche Ebene der Variation zur Erklärung des Phänotyps dar
- Kenntnis der epigenetischen Mechanismen und Regeln der Entstehung und Vererbung tragen zur Verbesserung der Vorhersage des Phänotyps bei
- Der Beitrag zur “missing heritability” und „missing causality“ wird weiter diskutiert
- Epigenetische Modifikationen vermitteln zwischen Genom und Umwelt und repräsentieren ein molekulares Gedächtnis
- Epigenetische Studien können Biomarker für das Halungsmanagement liefern
- epigenetische Effekte können gezielt genutzt werden um an bestimmte Bedingungen angepasste Phänotypen zu generieren



Danke meinem Team

N. Trakooljul H. Tychsen

E. Murani A. Garve

M. Oster J. Wetzel

H. Reyer



EU-SABRE

JP. Renard, INRA, FR

M. Braunschweig, Uni Bern, CH

FEPROeXPRESS

CC. Metges, FBN

S. Ponsuksili, FBN

H. Sauerwein, Uni Bonn

FEPROeXPRESS



**Federal Ministry of
Education and Research**

**Danke für ihre
Aufmerksamkeit!!!**



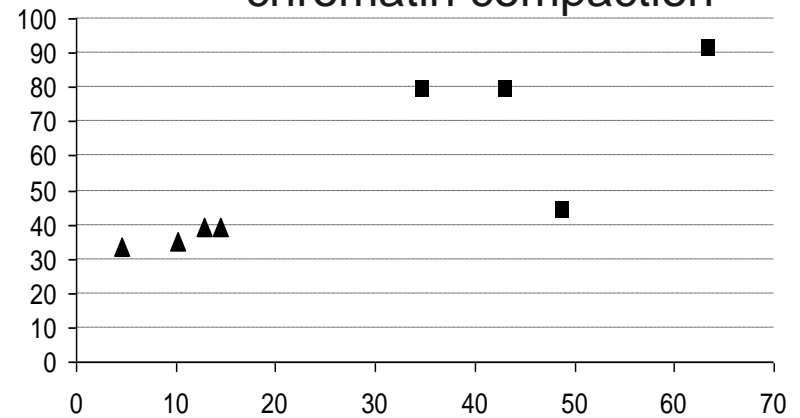
**LEIBNIZ INSTITUTE
FOR FARM ANIMAL BIOLOGY**

Wimmers Klaus FBN
27. Hülseberger Gespräche
7./8. Juni 2016, Hamburg

Acute regulation of α S1 casein

Infection induces remethylation of doublet-STAT5 site

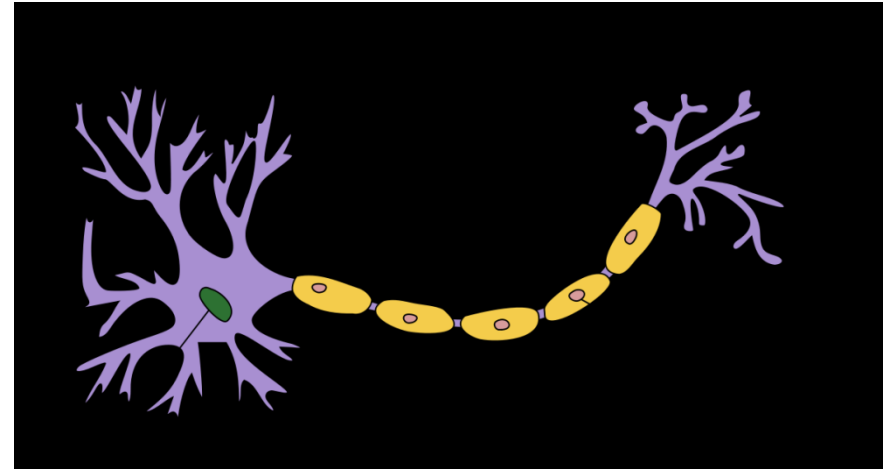
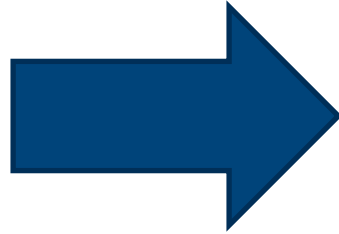
CHART PCR:
chromatin compaction



time after infection



The fate of cells



DNA → RNA → Protein

Only a subset of genes is active in particular cells:

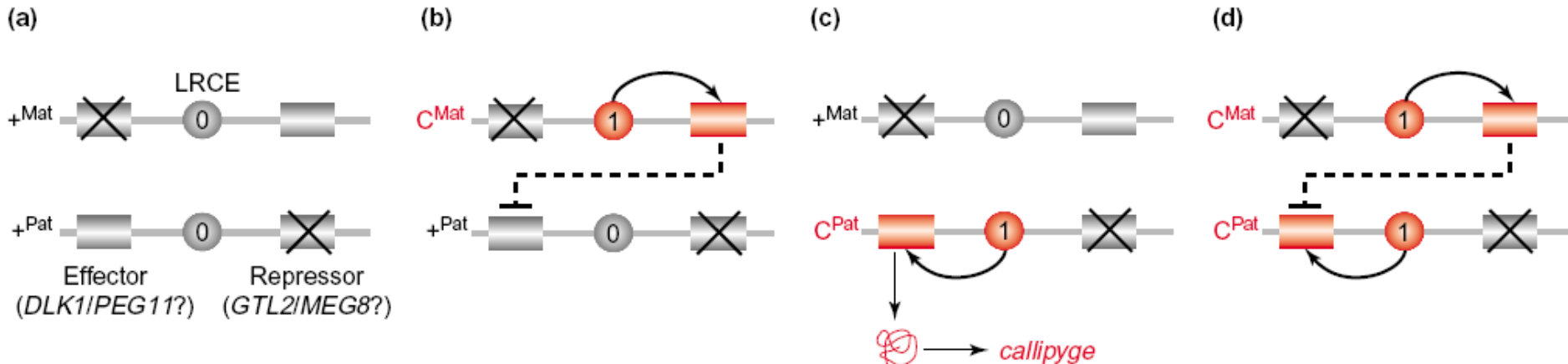
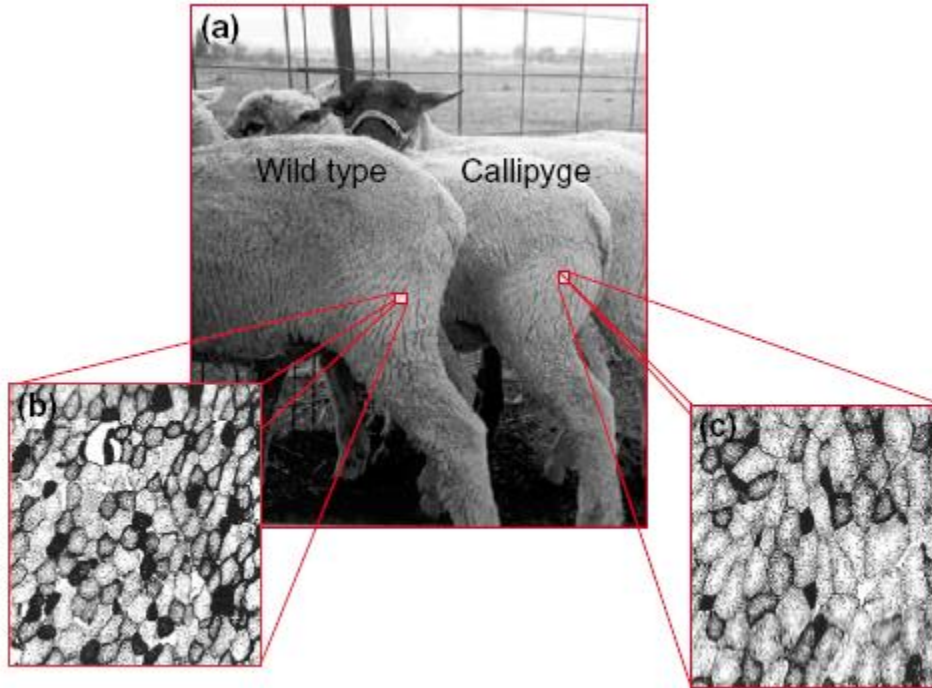
- tissue specific transcription factors
- epigenetic marks



Callipyge

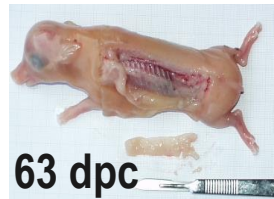
imprinting
polar overdominance

DLK1: paternally expressed,
epidermal growth factor repeat like
family
MEG3: maternal expressed; non
coding RNA



Experimental Design: sampling

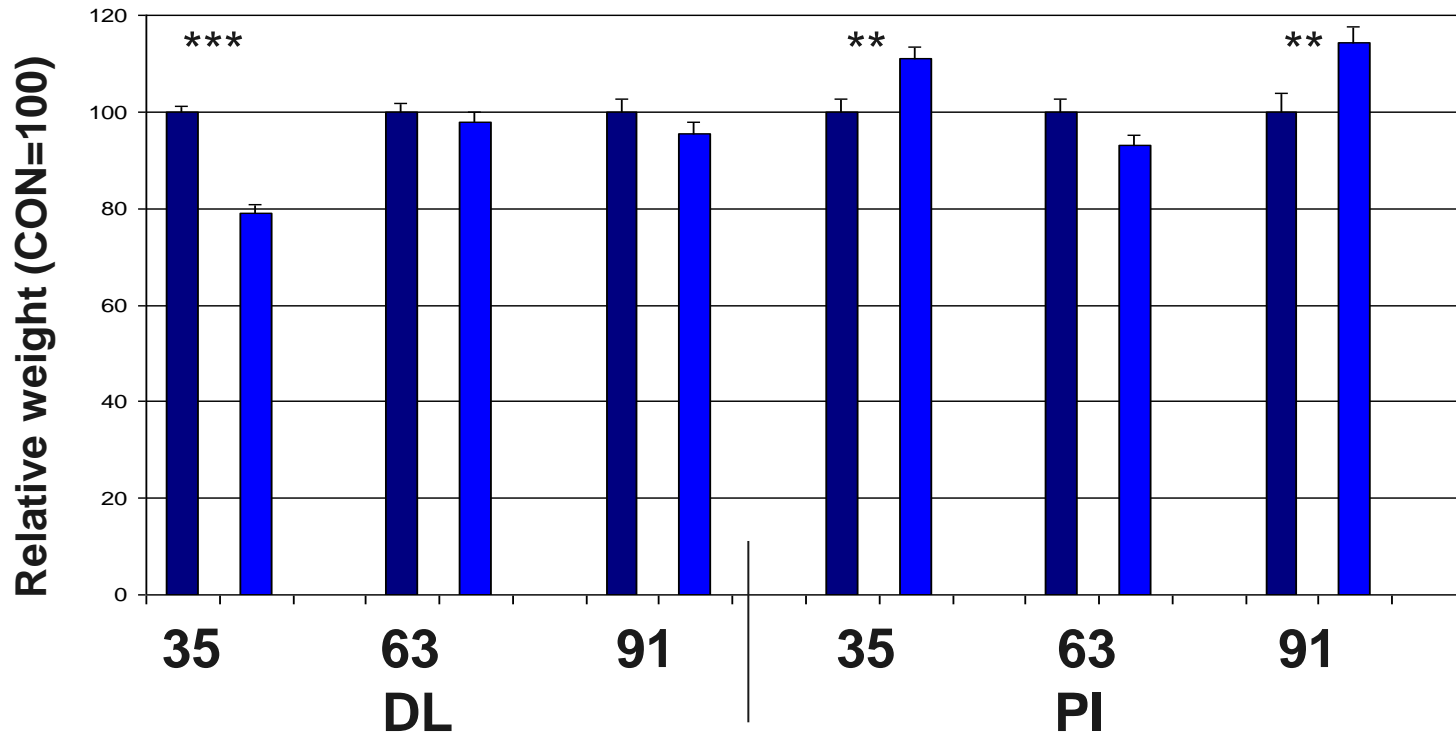
2 breeds × 4 stages × 2 diets



- tissue: liver
- prenatal: 3 litters/breed/diet/stage (n=36 sows);
- peripubertal: 6 litters/breed/diet (n=24 sows);

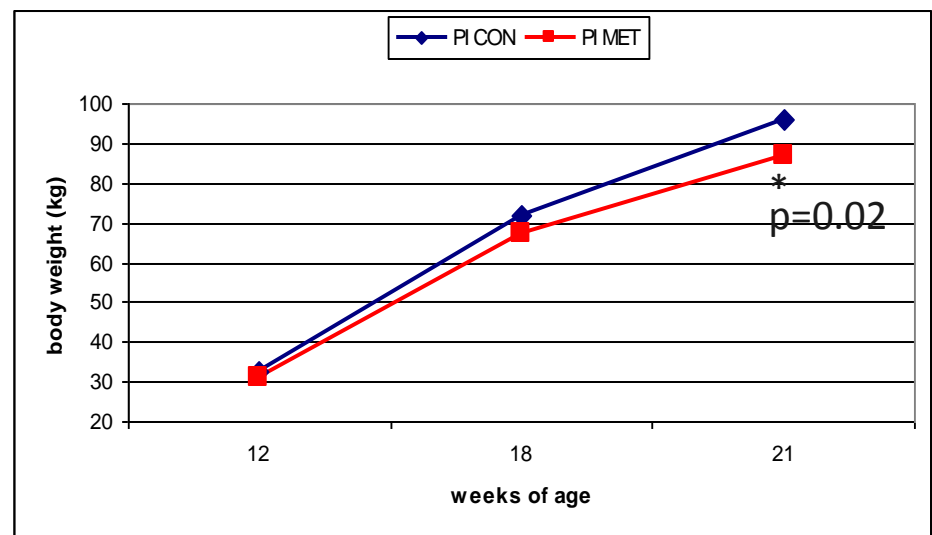
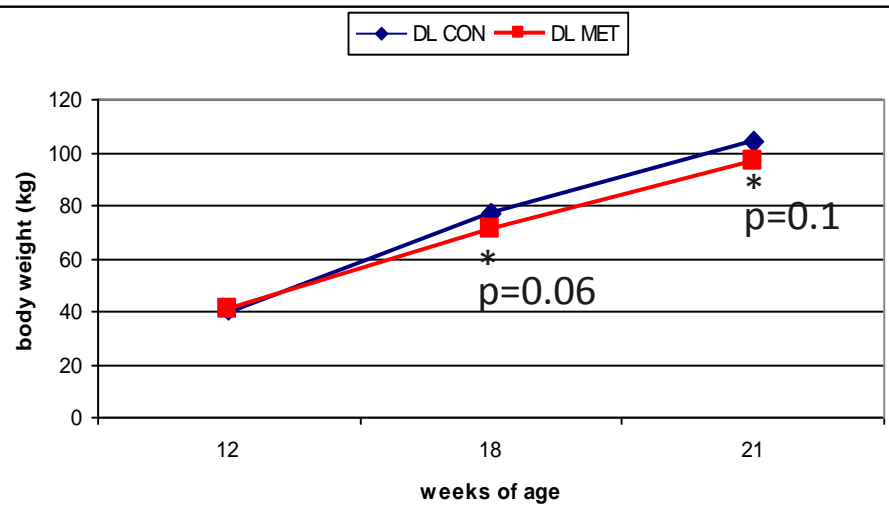
Effects on prenatal development

Fetal weights



- gestation diets affect fetal weight ($p < 0.001$)
- no significant effect of gestation diets on number of offspring

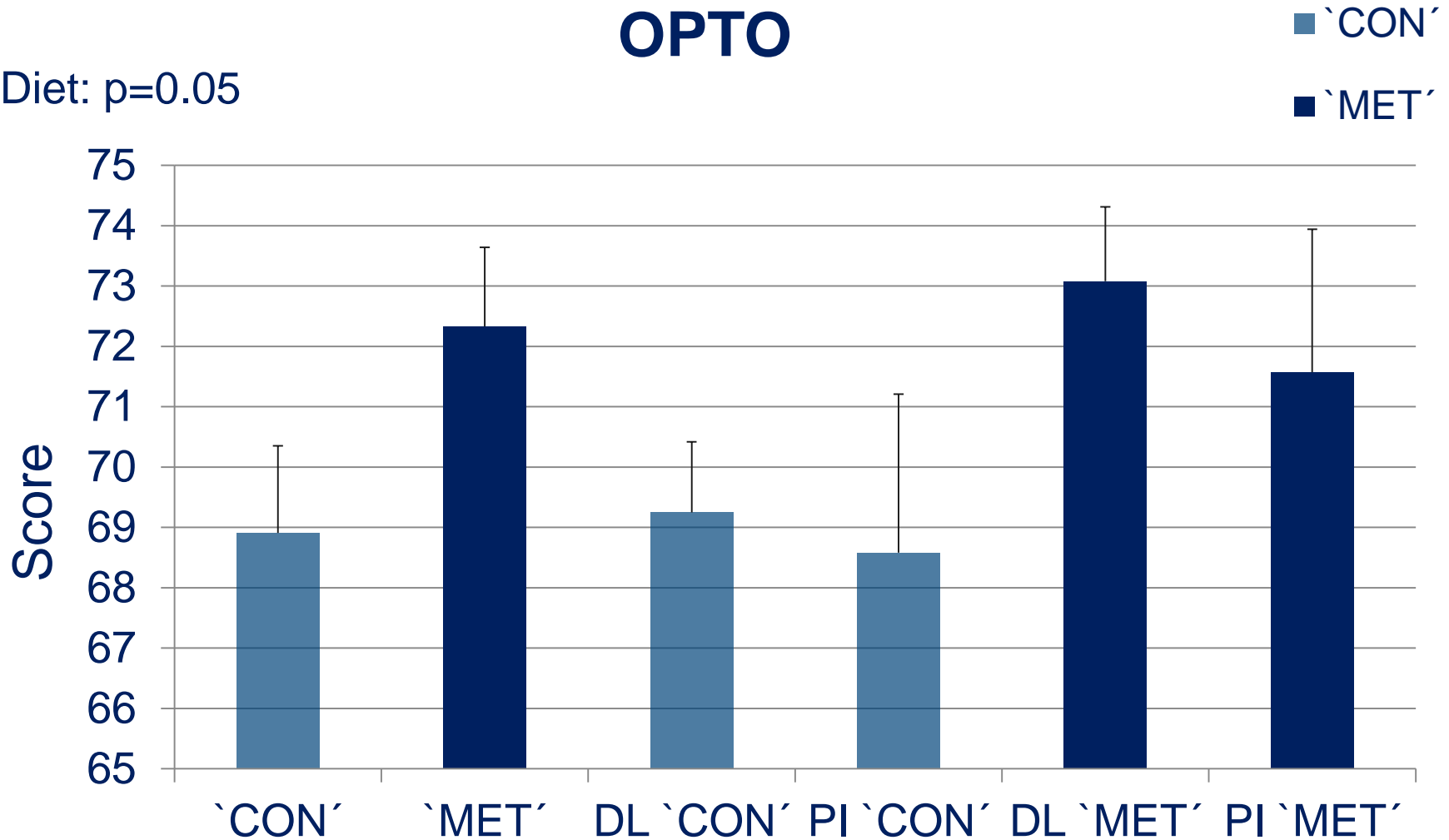
DL & Pi –postnatal growth



Results of analysis of variance for trait records obtained in both breeds

OPTO

Diet: $p=0.05$



RESULTS : PHENOTYPE



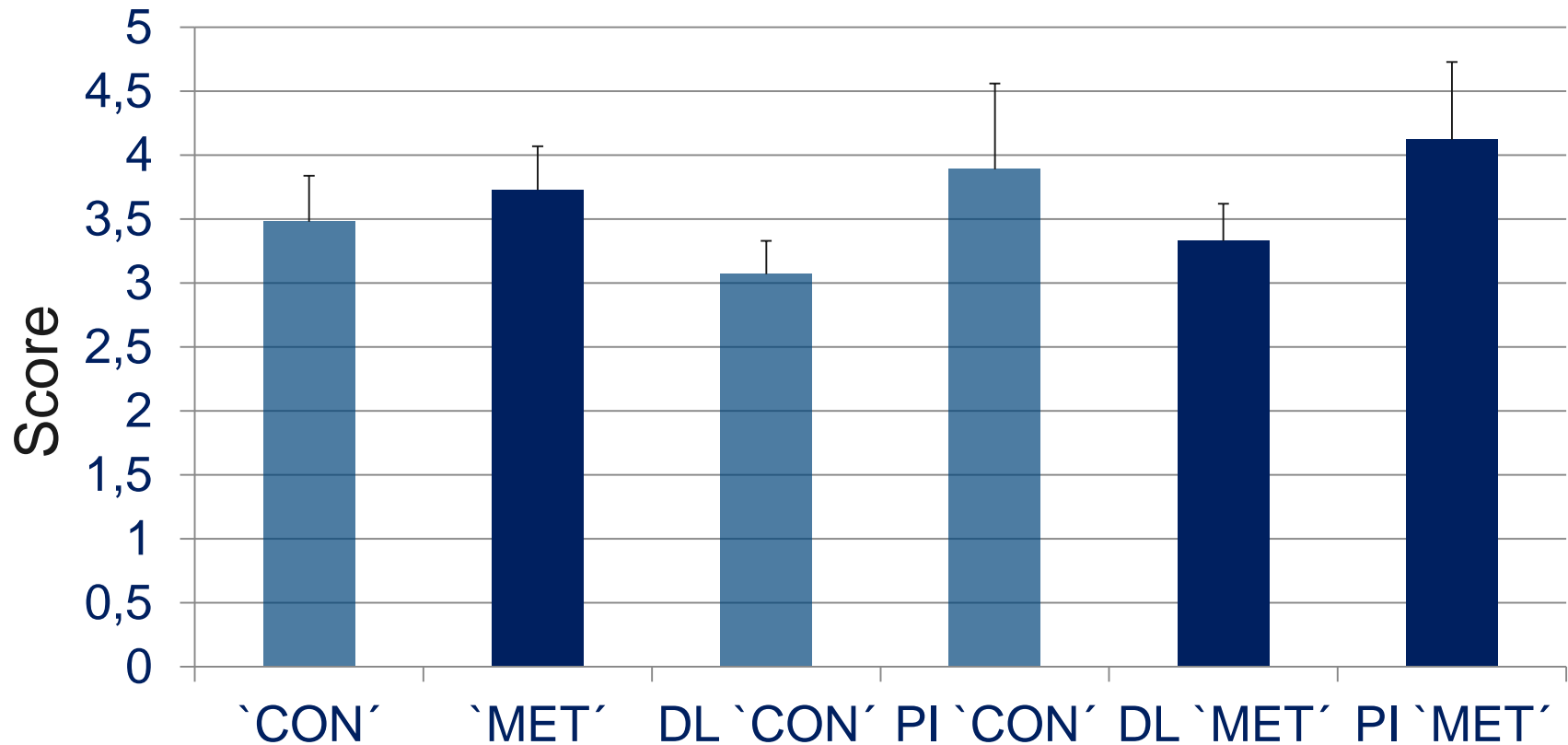
Results of analysis of variance for trait records obtained in both breeds

DRIP

■ `CON`
■ `MET`

RESULTS : PHENOTYPE

Diet: $p=0.05$



Implications

- The experiment showed effects of the maternal gestation diets on intrauterine growth
- At adult stage only slight but significant phenotypic effects on meat quality were observed
- Effects of gestation diets on meat colour might be due to differences of the ultra structural properties of the muscle, i.e. muscle fiber traits, which are determined prenatally
- This implies that the effects recorded at adulthood reflect acute effects of the gestation diets on the myogenesis of the offspring



Microarray analysis



Normalize

Affymetrix GCOS,
Expression Console,
(MAS5, GCRMA)



Significance



$$y = \mu + \text{diet} + \text{mother}(\text{diet}) + e$$



Pathway Analysis



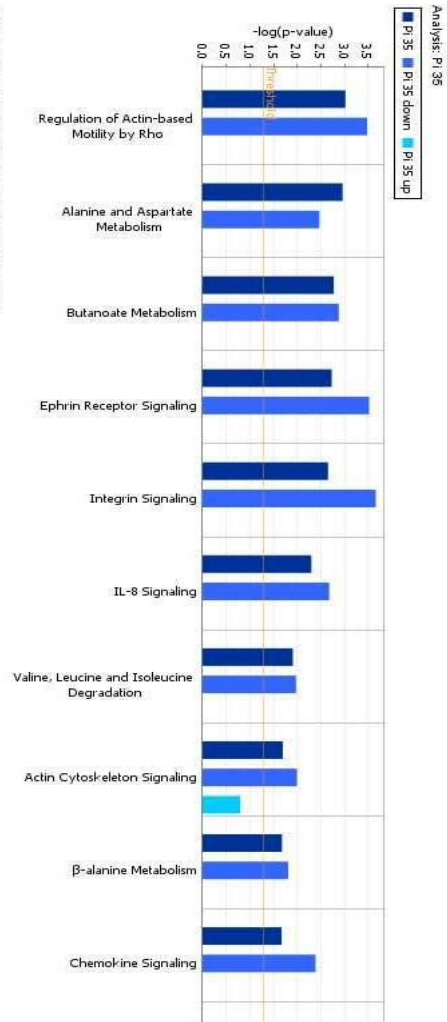
RNA isolation:

- Fetal livers: 2 pools of 6 individuals / stage / breed / diet (=72)
- Peripubertal livers: 2 individual samples /sow / breed / diet (=24)



Networks, biofunctions & canonical pathways

© 2000-2022 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



35 dpc

PI: 618

DL: 2055

Cell mobility & structure:
Actin-based mobility
Integrin signaling

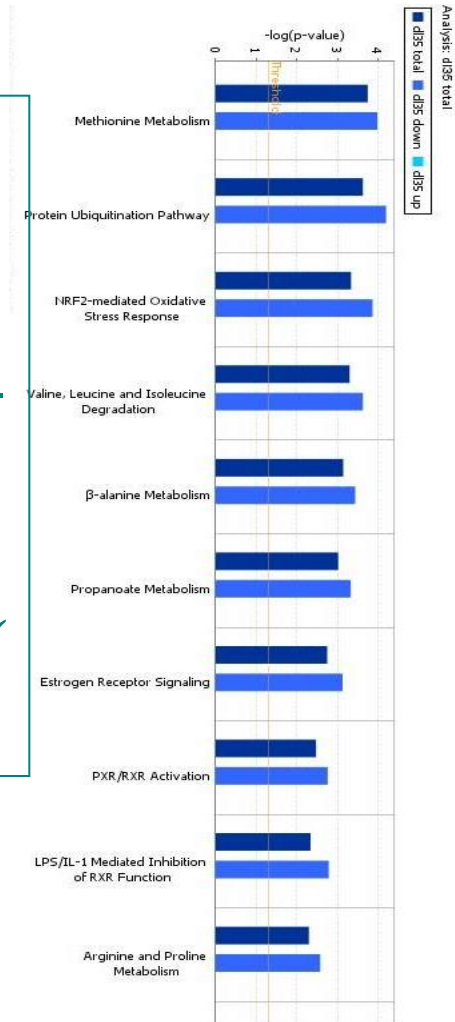
PI ↓

DL-

Amino acid metabolism
Methionin metabolism
ubiquitination

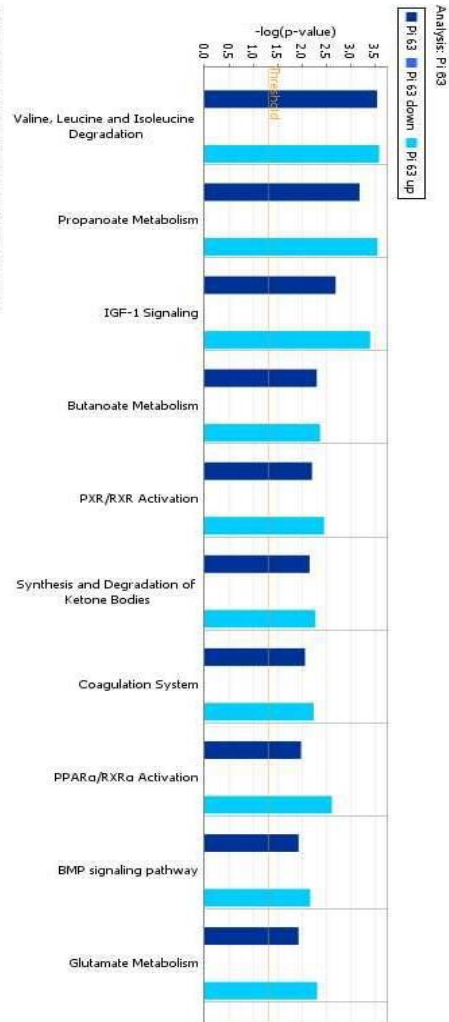
PI-

DL ↓



Networks, biofunctions & canonical pathways

© 2000-2022 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



63 dpc

PI: 1539
DL: 641

growth factor & hormone signaling:

PPAR/RXR

PXR/RXR ~

FGF ~

EGF ~

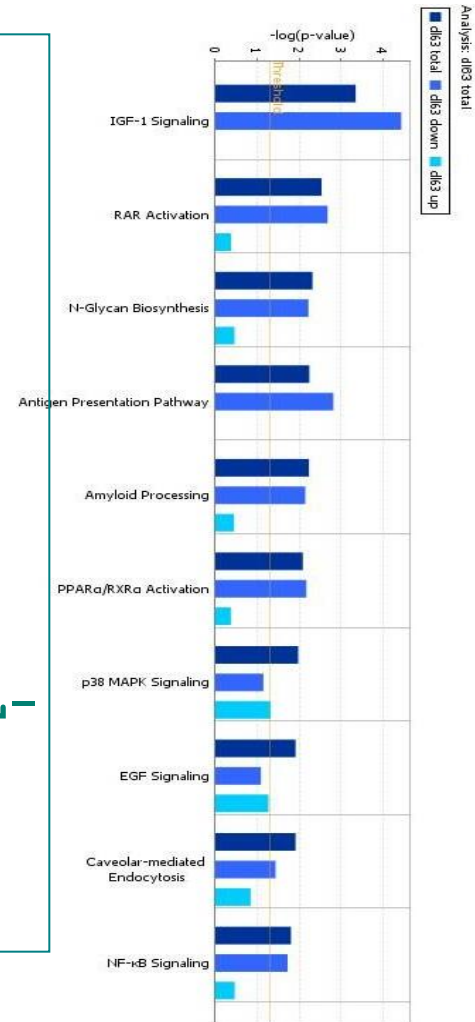
BMP ~

IGF-1 ~

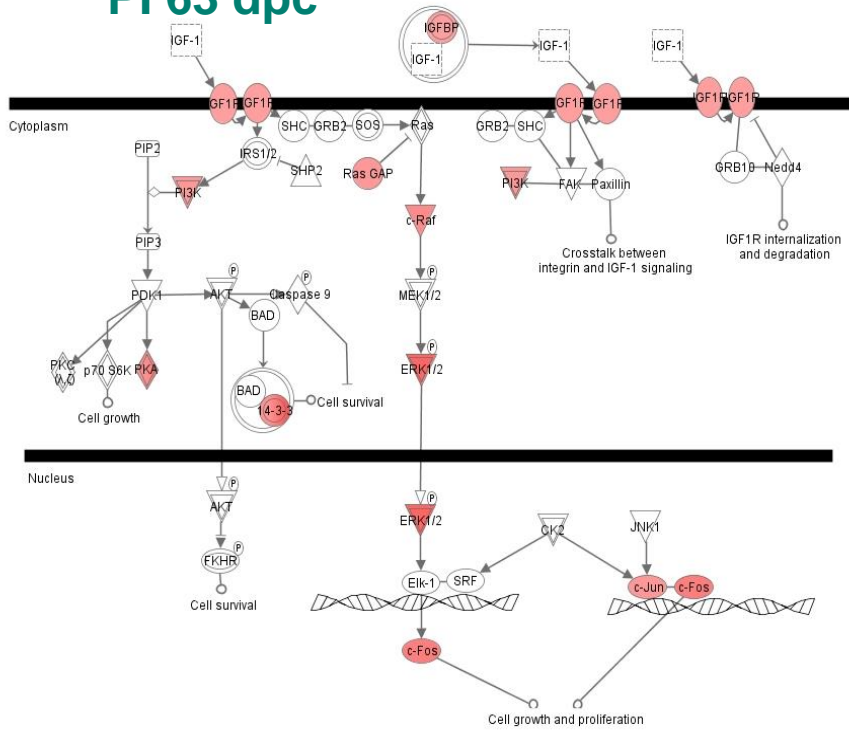
PI ↑ DL ↓

PI ↓ DL -

Amino acid metabolism



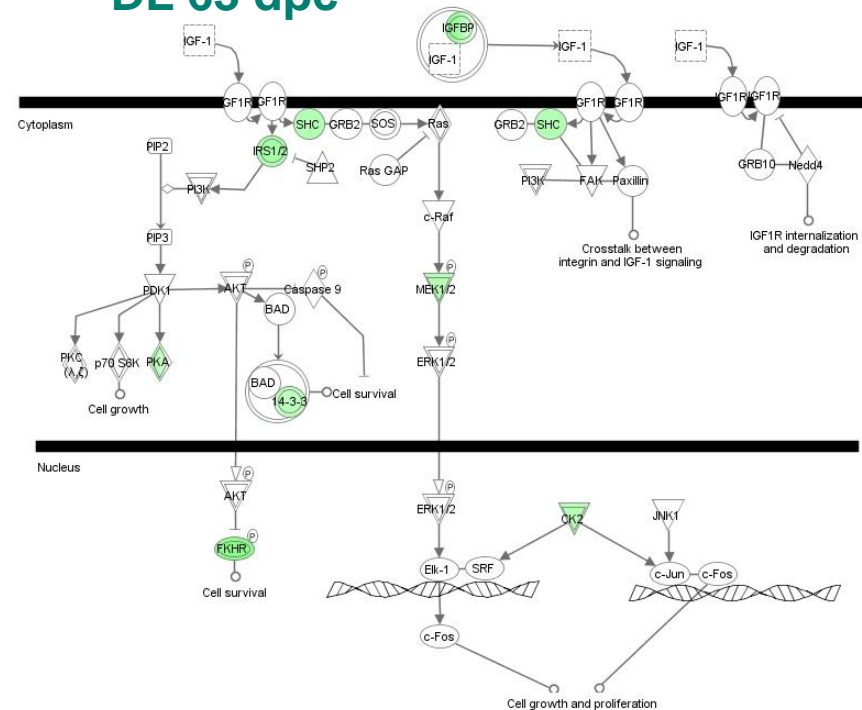
PI 63 dpc



IGF-1 signaling: differentially regulated among breeds

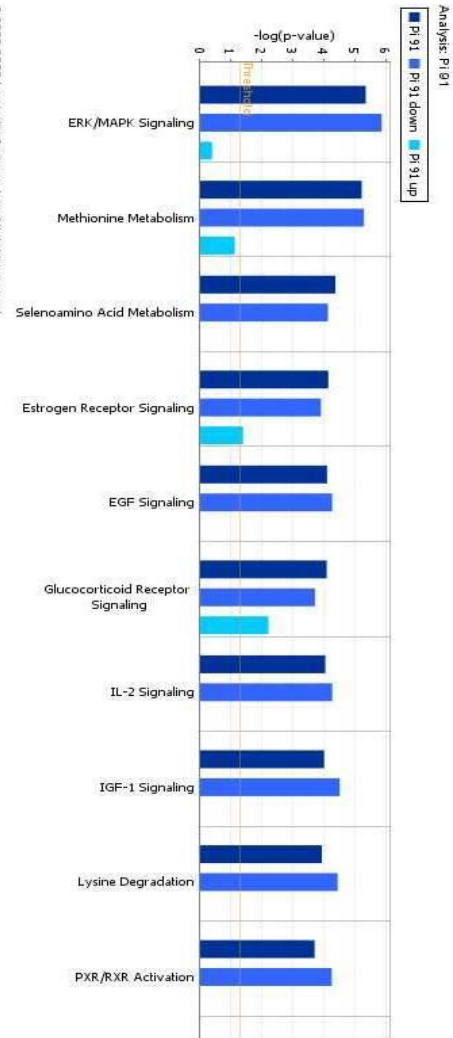
IGF-1 Signaling

DL 63 dpc



Networks, biofunctions & canonical pathways

© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



91 dpc

PI: 1592

DL: 2475

growth factor & hormone signaling:

estrogen & glucocorticoid

receptor ~

ERK/MAPK ~

EGF ~

BMP ~

IGF ~

PI ↓ DL ↑

Methionine metabolism

Lipid metabolism

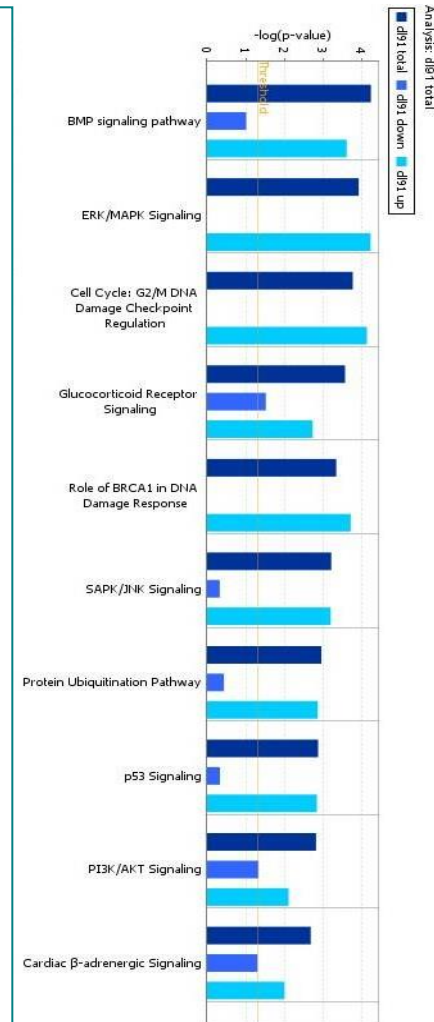
PI ↓ DL -

Protein-DNA-interaction

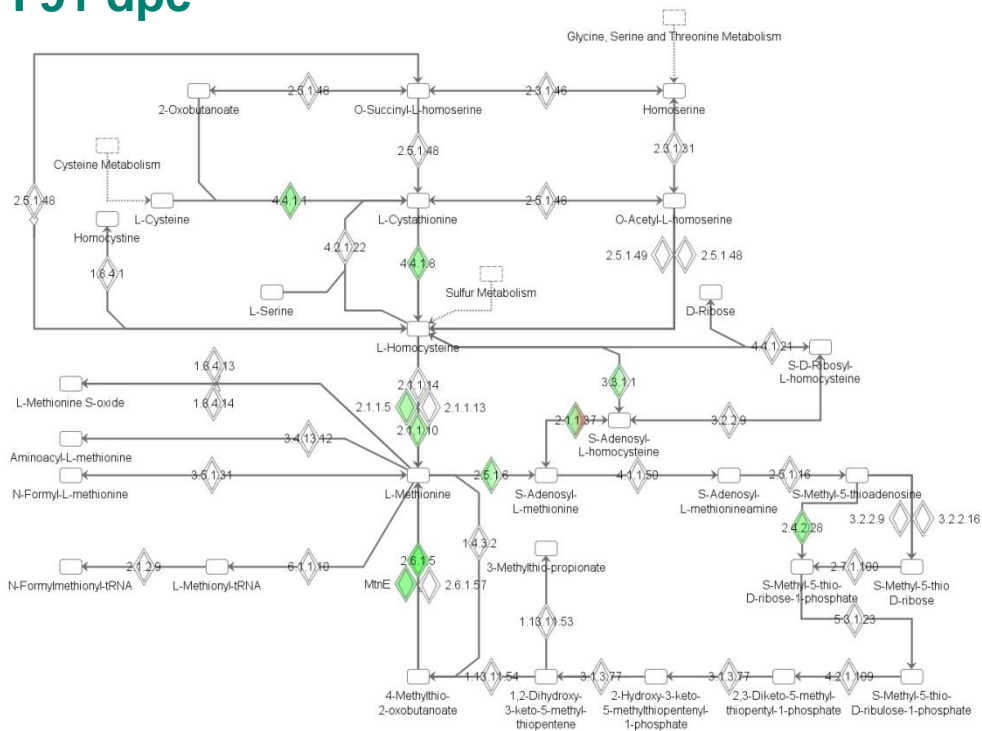
DNA damage response

PI - DL ↓

PI - DL ↑



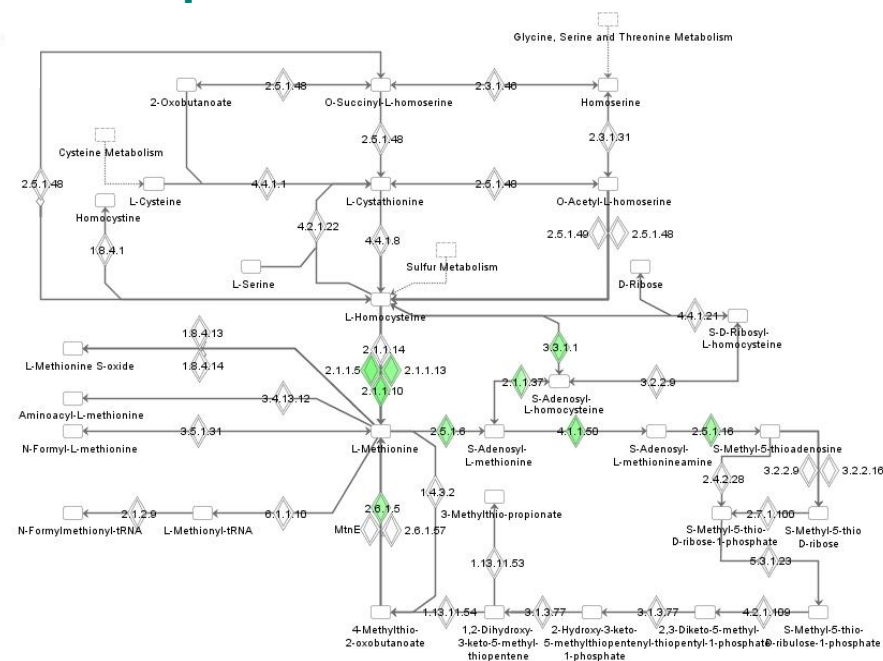
PI 91 dpc



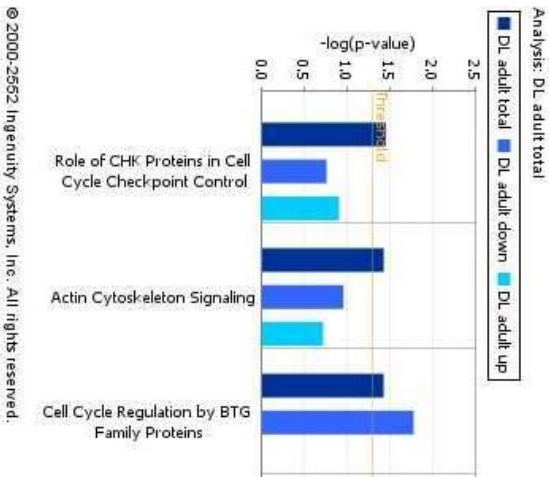
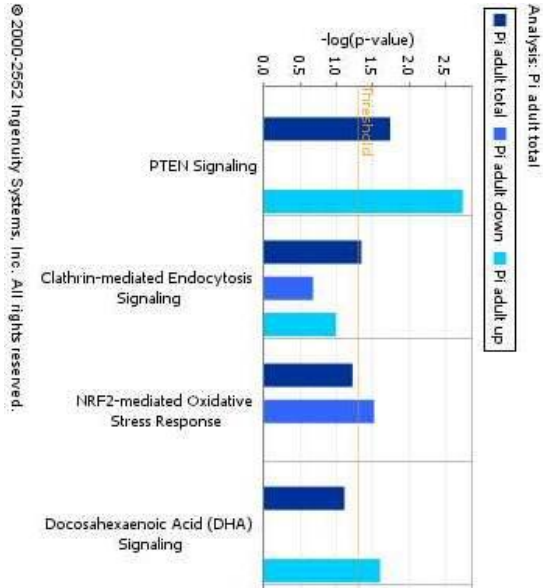
2 (Curated from KEGG Data. Distribution of Curated Data under license from Pathway Solutions Inc). All rights reserved.

**Methionine metabolism:
regulated in both breeds at
different stages**

DL35 dpc



Networks, biofunctions & canonical pathways



adult

PI: 112

DL: 327

protein DNA interaction:

Regulation of transcription

Gene expression

Cell cycle

growth, development, cell signaling

PTEN~

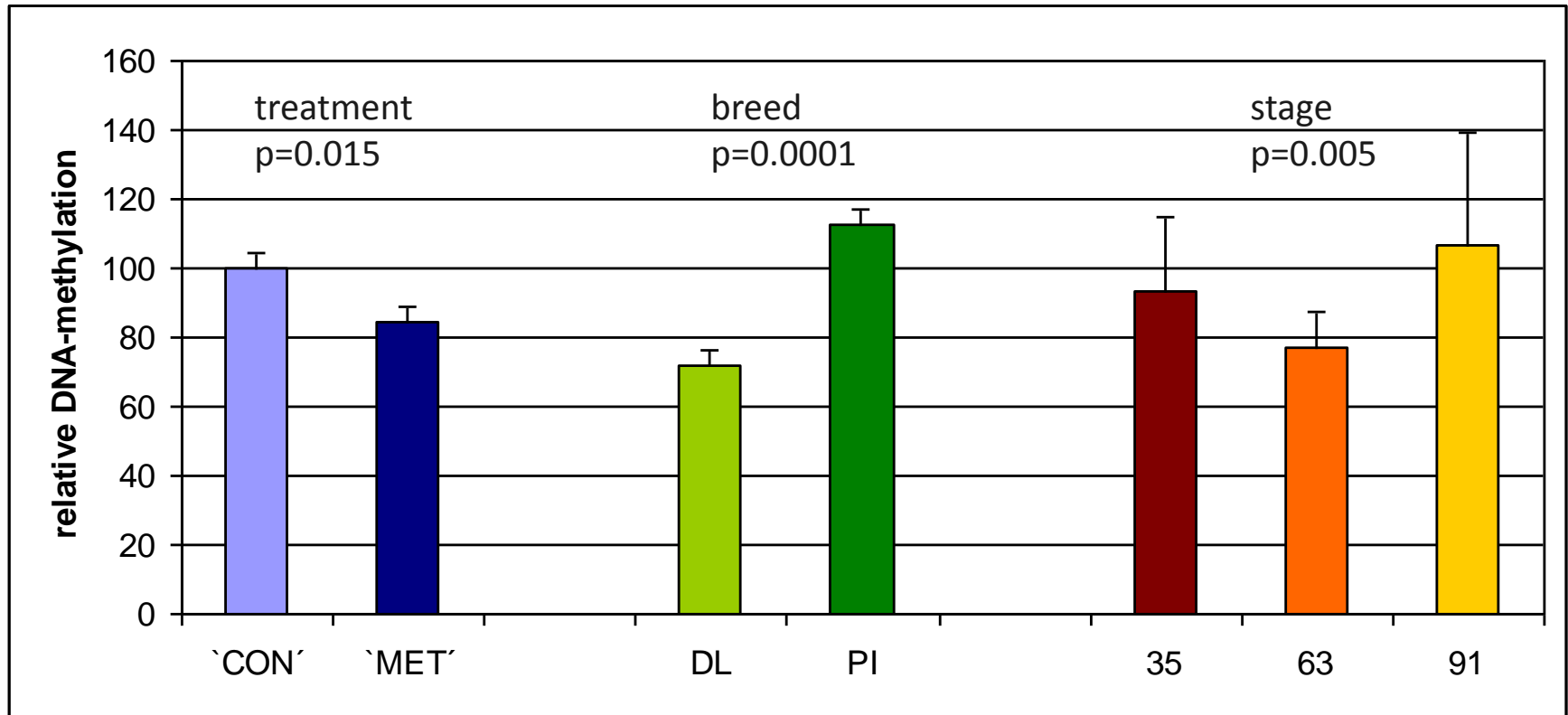
Integrin~

Actin~

growth hormone~



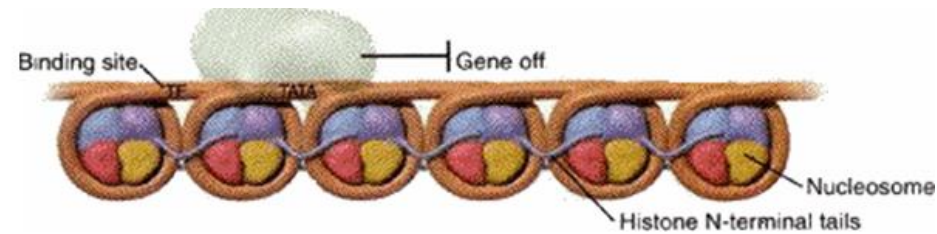
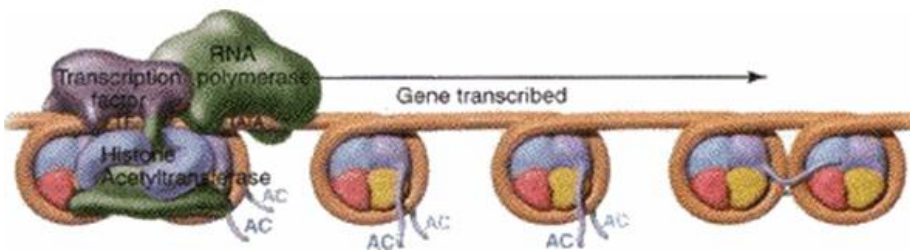
Effects on global DNA methylation



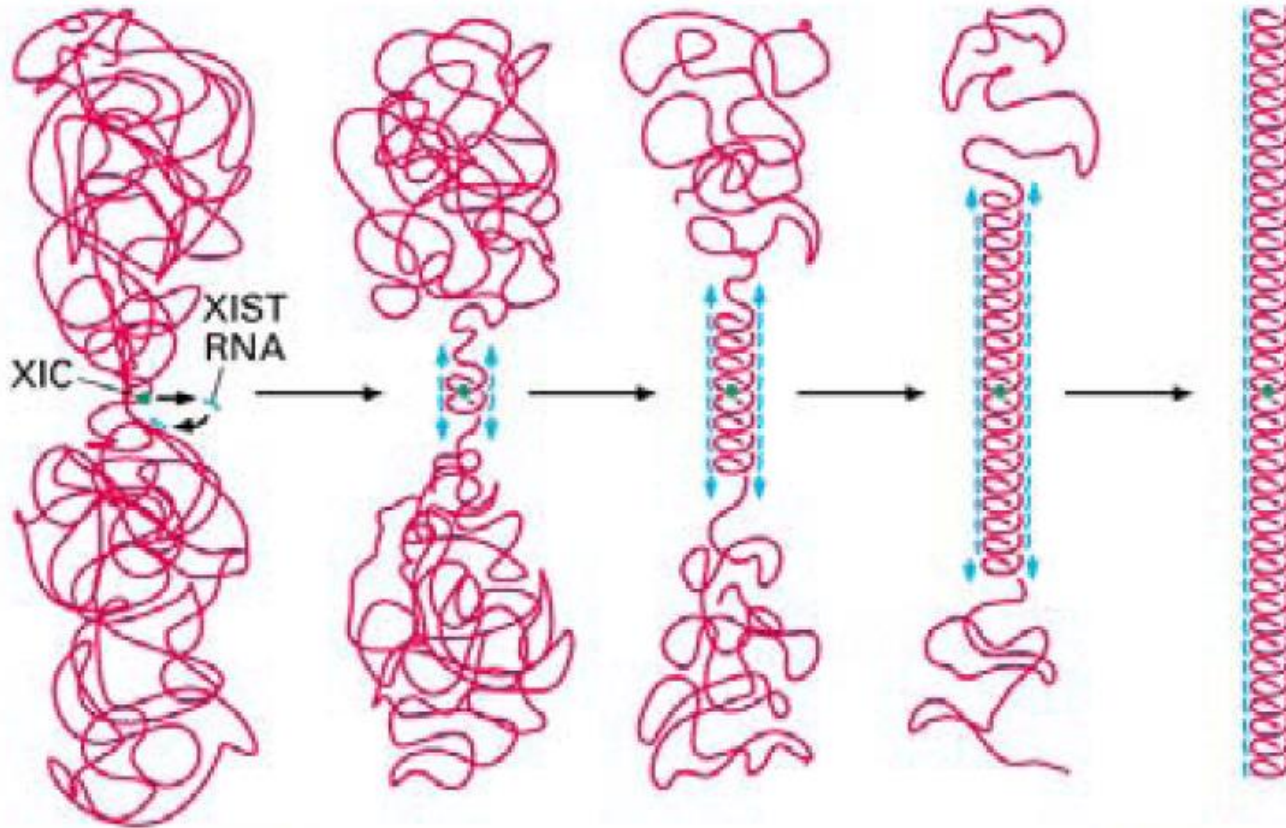
➤ gestation diets affect global DNA methylation in a breed- and stage-specific manner

Repression of Gene Expression by DNA-Methylation

1. Direct blocking of TFBS by methyl-group of CpG
2. Blocking of TFBS by methylcytosine binding proteins (MBP)
3. Recruitment of Histone Deacetylases by MBP leads to deacetylation of core histones → change in chromatin structure to heterochromatin



X chromosome inactivation



XIC= X inactivation center

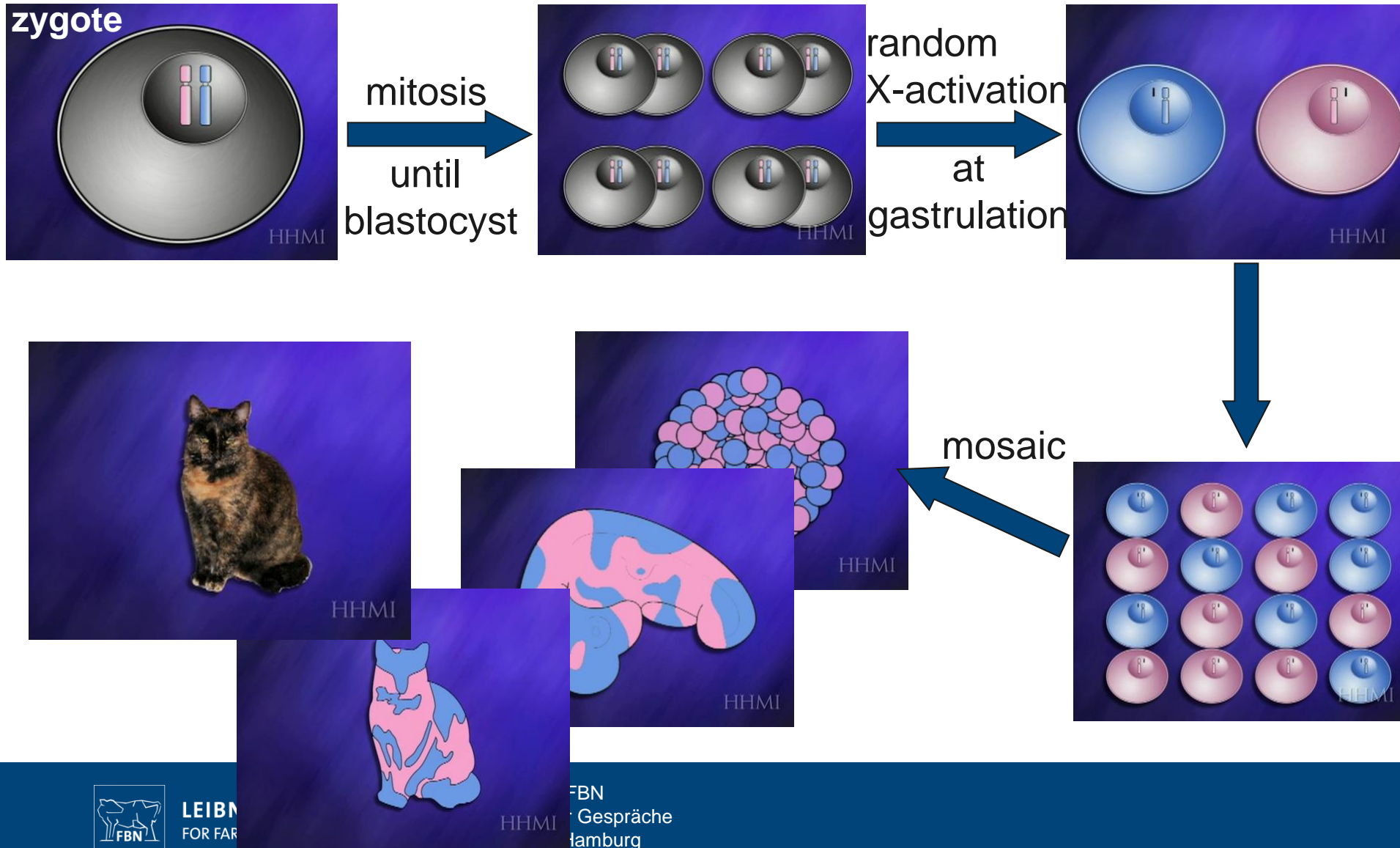
XIST= X inactive specific transcript
17kb noncoding RNA

stable expressed from inactive X

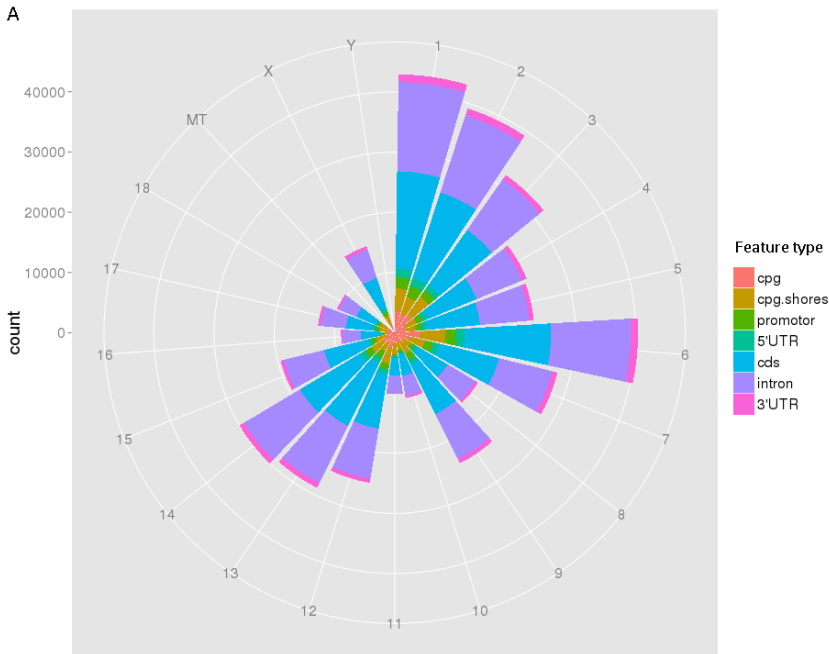
“paints” inactive X chromosome (cis)

its own activity is affected by DNA methylation

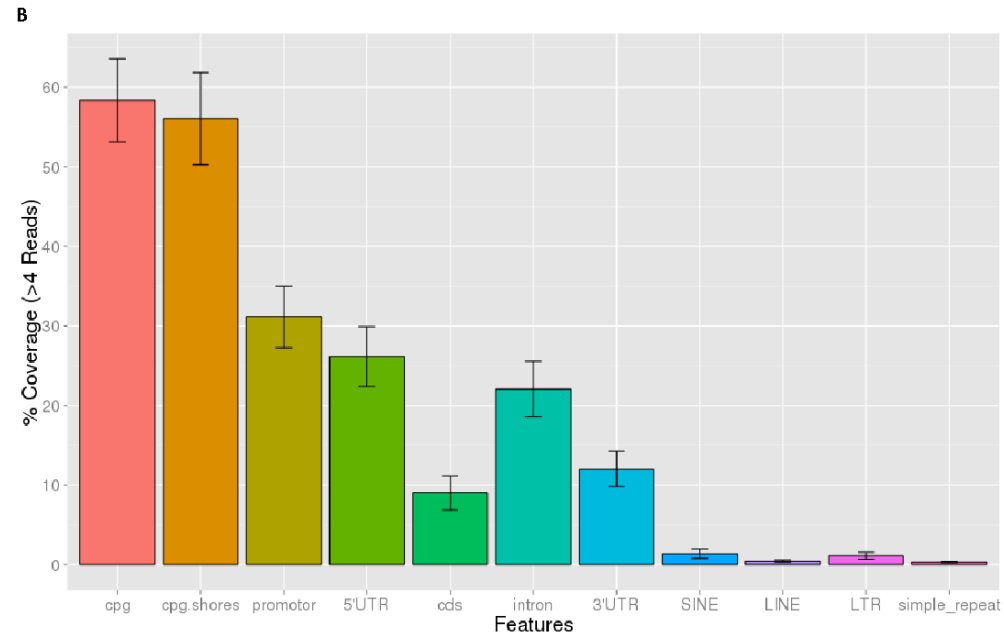
X chromosome inactivation



Genome coverage of the RRBS library



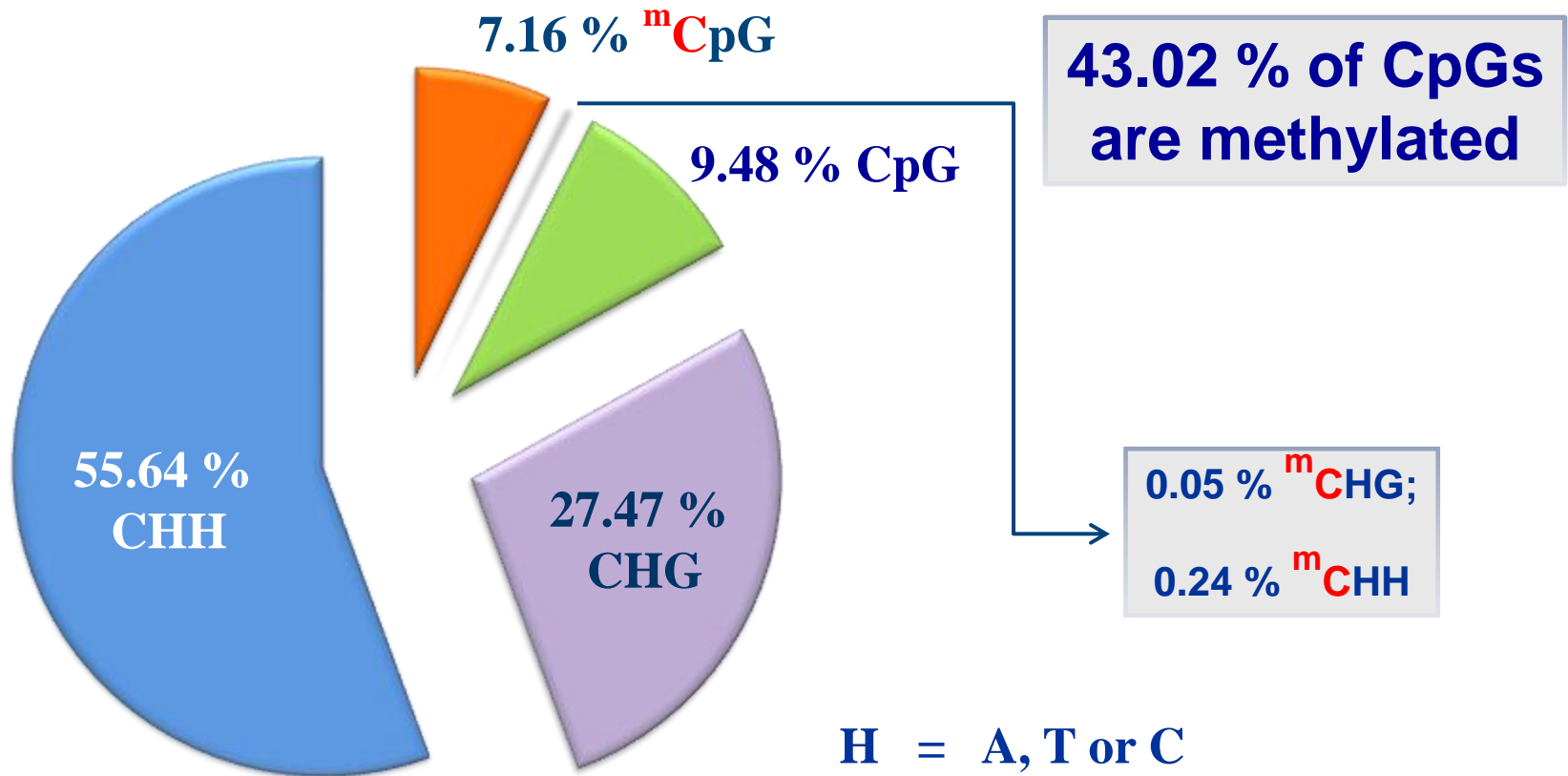
Frequency of annotated features in the pig genome.



Percentage of genomic features covered by greater than 4 reads.

RRBS effectively target specific genomic regions including CpG islands and CpG-island shores (± 1 kb from CpG island) and CpG rich promoters.

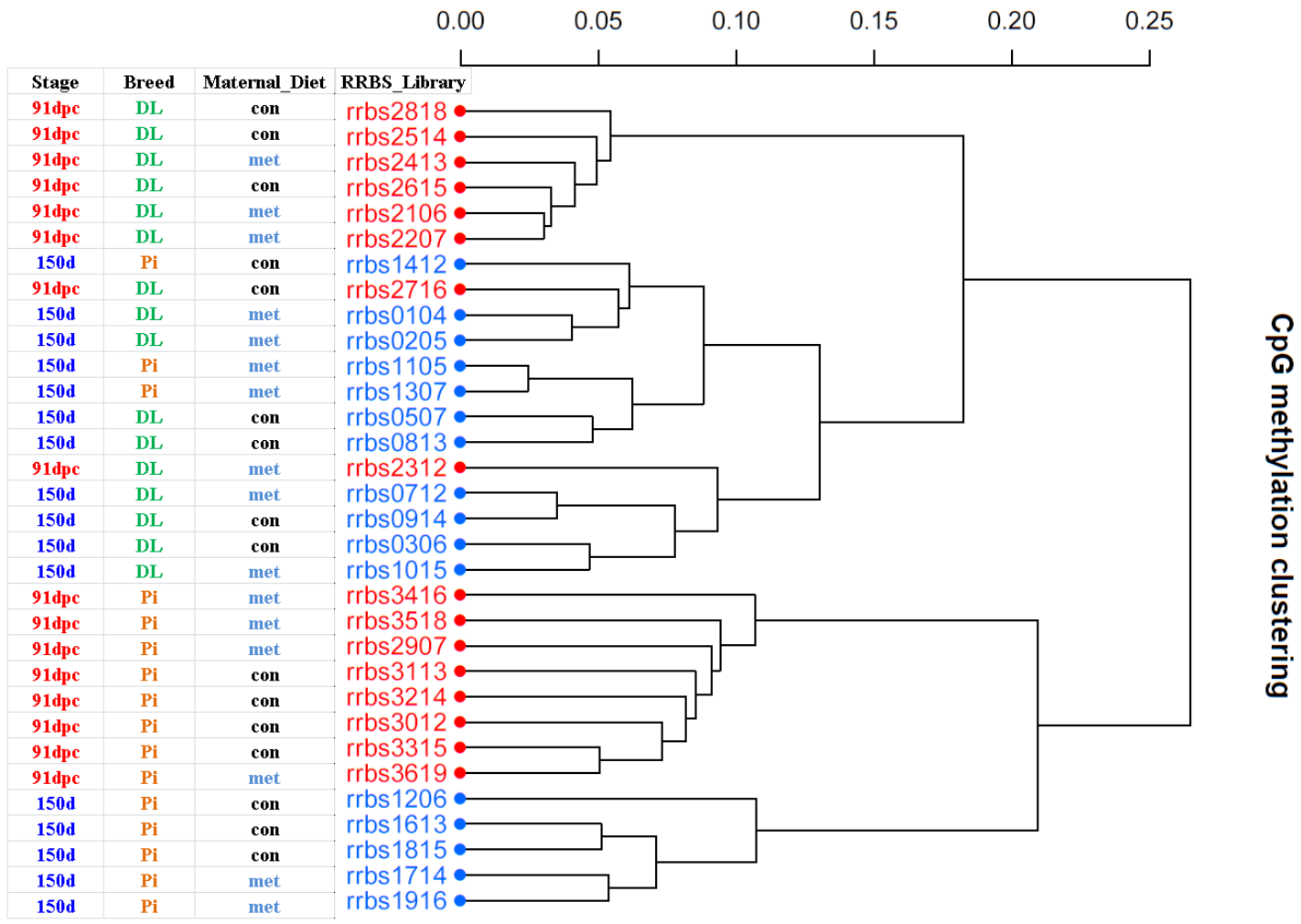
Percentage methylation of cytosines in CpG, CHG or CHH context



H = A, T or C

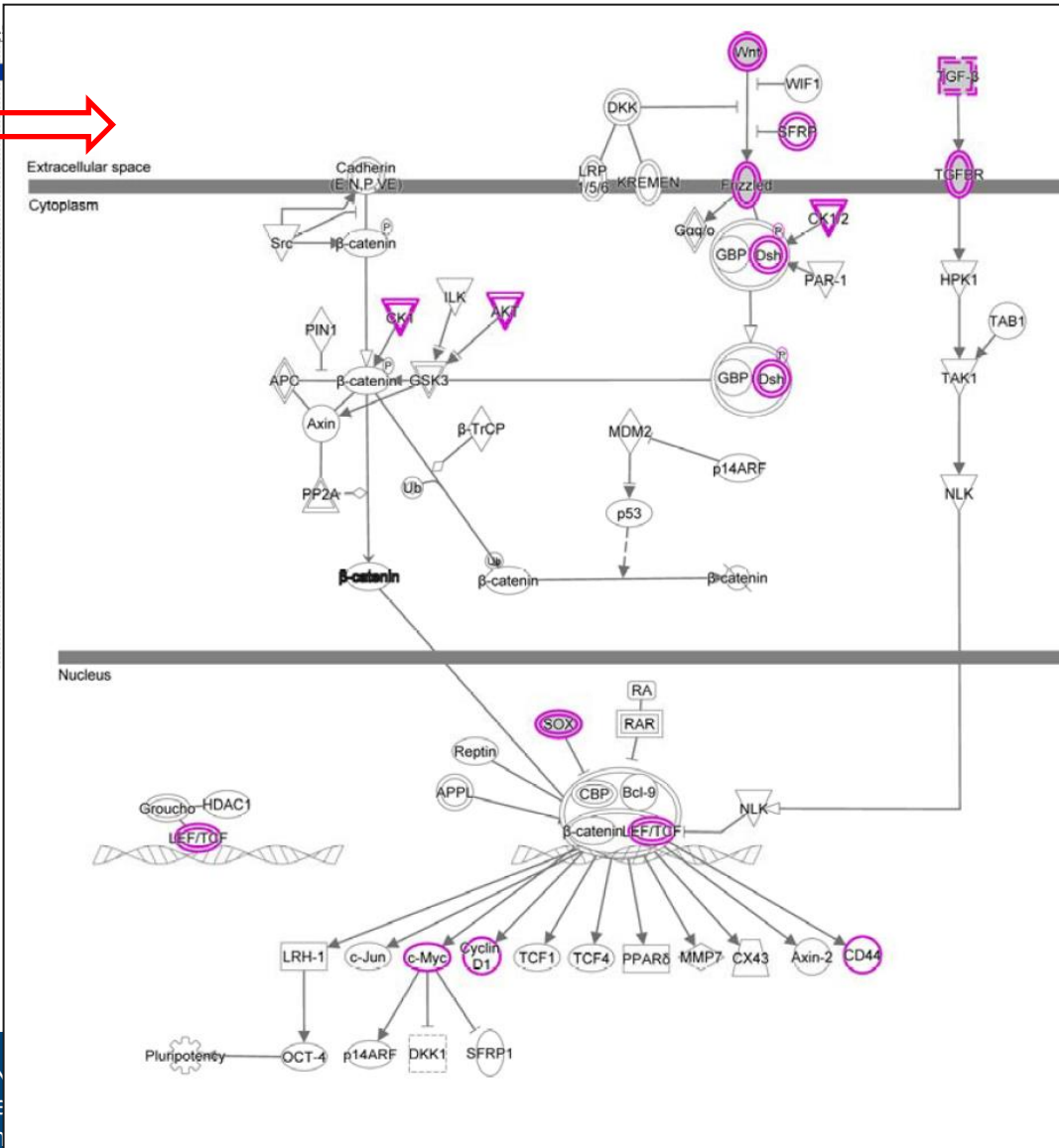
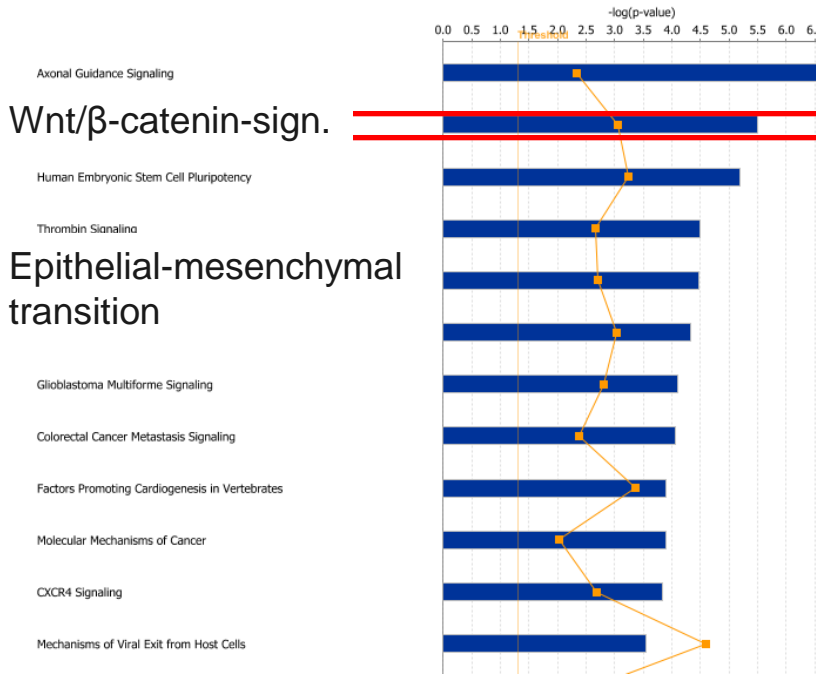
% = median of 32 libraries

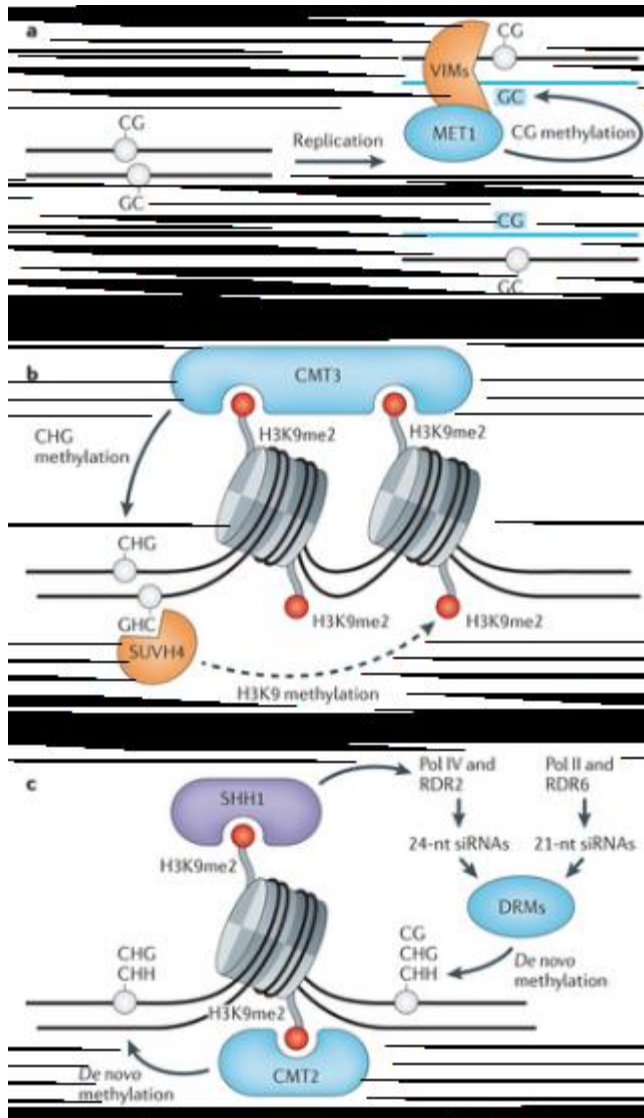
Clustering based on the DNA methylation profile



Functional annotation of genes in DMRs

A) Breed-associated DMRs/Genes





Bei Pflanzen sind verschiedene Modelle für die Mechanismen der (de novo) Methylierung von CG, CHG und CHH beschrieben