

# **Epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung in der frühen Embryogenese der Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

Von

Mark Wossidlo

Saarbrücken  
September 2011

*Datum des Kolloquiums:* .....

*Dekan:* .....

*Berichtersteller:* .....

.....

.....

*Vorsitzender:* .....

*Akad. Mitarbeiter:* .....

*„Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle.“*

*Albert Einstein*

## *Danksagung*

An erster Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörn Walter für die sehr interessante Aufgabenstellung und die mir gegebene Freiheit in meiner experimentellen Forschung während meiner Doktorarbeit bedanken. Seine besondere Art hinter die Dinge zu blicken und den „*Advocatus Diaboli*“ zu spielen hat meine wissenschaftliche Art zu Denken sehr geprägt. Für die zahlreichen, tiefgründigen Diskussionen nicht nur wissenschaftlicher Aspekte bin ich ihm sehr dankbar.

Meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Uli Müller möchte ich für die schnelle Zusage der Begutachtung meiner Arbeit danken. Auch für die Unterstützung in experimentellen Fragen und Gerätschaften (manch nächtliche Aktion im Fotolabor) möchte ich ihm danken.

Während meiner Doktorarbeit hatte ich das große Privileg, mit vielen hervorragenden Wissenschaftlern auch außerhalb von Saarbrücken zusammenzuarbeiten und diskutieren zu dürfen. Mein großer Dank gebührt an dieser Stelle Prof. Dr. Wolf Reik für seine stets hilfsbereite und entgegenkommende Art. Für seine Diskussionsbereitschaft und seine aufmunternden Worte in stets hektischen Momenten während unserer Begegnungen auf diversen Konferenzen und dem Submitten des 5hmC-Papers bin ich ihm sehr dankbar. Des Weiteren möchte mich bei Prof. Dr. Hans Schöler für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe während meiner Aufenthalte am MPI in Münster und für die tolle Zeit auf Schloss Ringberg bedanken. Bei Dr. Vittorio Sebastiano (was für ein Name!) und Dr. Michele Boiani möchte ich mich für die freundschaftliche und sehr lehrreiche Einführung in das Klonen bedanken. Vittorio gebührt hier ein ganz besonderer Dank für die zahlreichen Nachtschichten am Mikroskop und seine überaus zuvorkommende Art.

Bei Prof. Dr. Ortrun Mittelsten Scheidt möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Einladung an das GMI in Wien bedanken. Ihre bewundernswert einfühlsame und optimistische Art hat mir in wichtigen Entscheidungsprozessen sehr geholfen. Auch für die „Blunz'n Gröstl“ in den Heurigen möchte ich mich bei Ortrun herzlichst bedanken.

Prof. Dr. Heinrich Leonhardt möchte ich für die freundliche Einladung an die LMU-München und für sehr interessante Gespräche bei bayerischer Kost danken. Prof. Dr. Geneviève Almouzni und Miguel Casanova danke ich für die herzliche Einladung und spannende Zeit am Marie-Curie-Institut in Paris.

Meinem Betreuer und guten Freund Dr. Konstantin Lepikhov (Kostya) möchte ich für die jederzeit hilfsbereite und manchmal aufopfernde Begleitung meiner Doktorarbeit und der vergangenen Jahre aufrichtig danken. Seine „russische“ Art der Improvisation hat viele Dinge erst möglich gemacht und mich des Öfteren zum Staunen gebracht.

Einen herzlichen Dank an Corry Schwierzy, Gilles Gasparoni, Diana Santacruz und Nina Palmke für manch kreative Kaffeepause und lustige Konferenzbesuche (Tamariuuuu, Berlin „Berolina“, Mischpult mit Bühnenregie in Mosbach). Den Männern der Arbeitsgruppe, Kostya, Dr. Sascha Tierling, Tommy Karius, Dominik Ewald, Jie Lan, Pavlo Lutsik und Sam Ringle (und Jörn) danke ich für die Zerstreuung bei spannenden Tischfußballsessions und das

anschließende Grabbeln unterm Tisch. Bei Daniel Jans möchte ich mich für die Kurzweil während langer Abende im Labor und seiner Kreativität beim Krimirollenspiel bedanken. Bei Nicole Jundel möchte ich mich außerordentlich für ihre stets hilfsbereite und verständnisvolle Art während manch hektischer Phasen und für die Unterstützung in den bürokratischen Dingen des Universitätsdschungels bedanken. Dr. Martina Paulsen danke ich für ihre offenen und kritischen Hinweise während meiner Doktorarbeit. Michael (Düsentrieb) Glander danke ich für die schnelle und stets erfolgreiche Hilfe in technischen Dingen. Beate Schmitt, Christina Lo Porto und Jasmin Gries danke ich für die vielen labortechnischen Dinge, die keiner sieht, aber gemacht werden müssen; Beate danke ich zudem für die Hilfe in der Zellkultur. Eva und Sabine Dilly und Jenny danke ich für ihre wertvolle Arbeit im Mausstall. Der saarländischen Tierschutzbeauftragten Dr. Monika Frings möchte ich für die vielen kleinen Tipps in der Maushaltung und für ihre unbürokratische und nette Hilfe danken. Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe EpiGenetik danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und für die schöne Zeit an der Uni.

Meinen indischen Freunden Tarang und Shiva danke ich für die lehrreichen Einblicke in eine für mich sehr unbekannt Kultur.

Den Volleyballern danke ich für ihre Rücksichtnahme, wenn´s bei mir mal wieder länger im Labor gedauert hat oder ich mal wieder schnell zur Uni musste.

Rosi und Gero danke ich für das gute Hammjamm (insbesondere monatliche Tomatenrationen und Spezial-Semmel-Knödel) und die vielen aufmunternden Worte, wenn´s mal nicht so lief (und die kleinen Urlaube in dem tollen Garten).

Meinen Eltern Ruth und Hans-Gerd möchte ich für die langjährige Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus ganz herzlich danken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

Der letzte und zugleich allerherzlichste Dank gebührt Julia, weil sie immer für mich da war und weil mir ihre immer wieder liebevolle und erstaunlich pragmatische Art (wissenschaftliche) Probleme anzugehen des Öfteren geholfen haben, den Wald wieder vor lauter Bäumen zu sehen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Grundlagen der epigenetischen (Re-)Programmierung.....	1
1.1.1 DNA Methylierung.....	2
1.1.2 Histonmodifikationen.....	5
1.1.3 Zelluläre Potenz.....	7
1.1.4 Induzierte epigenetische Reprogrammierung.....	8
1.2 Epigenetische (Re-)Programmierung während der Entwicklung von höheren Säugetieren.....	9
1.2.1 Epigenetische Reprogrammierung in primordialen Keimzellen.....	11
1.2.2 Epigenetische Reprogrammierung in der Zygote und frühen Präimplantationsembryonen.....	12
1.3 DNA Demethylierung in Zygoten höherer Säugetiere.....	16
1.4 Die „sechste Base“ 5-Hydroxymethyl-Cytosin.....	18
1.5 Mögliche Mechanismen der aktiven DNA Demethylierung.....	20
1.5.1 Direkte aktive DNA Demethylierung.....	21
1.5.2 Indirekte aktive DNA Demethylierung.....	22
1.6 Zielsetzung.....	29
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 Material.....	30
2.1.1 Antikörper.....	30
2.1.2 Chemikalien.....	31
2.1.3 Enzyme.....	33
2.1.4 Eukaryotische Zelllinien.....	33
2.1.5 Instrumente, Geräte und besondere Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.6 Kulturmedien.....	34
2.1.7 Lösungen und Puffer.....	34
2.1.8 Mäuse.....	35
2.1.9 Oligonukleotide, siRNAs und Größenstandard für Agarosegele.....	35
2.1.10 Reaktionskits.....	36
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Experimentelles Arbeiten mit Mäusen und Mausembryonen.....	36
2.2.2 Superovulation von Mausweibchen.....	36
2.2.3 <i>In vitro</i> Fertilisation und Kultivierung der Mausembryonen.....	37
2.2.4 Gewinnung von SCNT 1-Zell Mausembryonen.....	38
2.2.5 Gewinnung von Kaninchen- und Rinderzygoten.....	38
2.2.6 EdU, EdCTP and BrdU Inkorporationsexperimente.....	39
2.2.7 Immunfluoreszenzanalysen.....	39
2.2.8 Injektion von siRNAs in Eizellen und Befruchtung durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	41
2.2.9 Modifizierter Nick-Translations-Test.....	43
2.2.10 Autoradiographie von radioaktiv markiertem Desoxycytidintriphosphat in Präimplantationsembryonen.....	43
2.2.11 RNA Isolation von Oozyten und RT-PCR.....	44
2.2.12 Bioinformatische Analysen.....	46
2.2.13 Statistik.....	47

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1 Dynamik der DNA Demethylierung in der Mauszygote .....	49
3.1.1 5-Methyl-Cytosin Immunfluoreszenzanalyse in Mauszygoten .....	49
3.1.2 Dynamischer Verlust von 5mC-Antikörpersignal in paternalen und maternalen Pronuklei der Mauszygote .....	50
3.1.3 Bestimmung der S-Phase in der Mauszygote .....	52
3.1.4 Unterschiede in der Dynamik der DNA-Demethylierung durch die 5mC- Immunfluoreszenzanalyse und Bisulfit-Sequenzierung .....	55
3.2 5-hydroxymethyl-Cytosin in der frühen Embryogenese .....	56
3.2.1 Dynamisches Erscheinen von 5hmC in der Mauszygote .....	57
3.2.2 5hmC in Kaninchen- und Rinderzygoten .....	61
3.2.3 Epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung von geklonten 1-Zell Embryonen .....	63
3.2.4 5hmC in der späteren Präimplantationsentwicklung der Maus .....	66
3.2.5 Die Akkumulation von 5hmC erfolgt unabhängig von der DNA Replikation .....	67
3.2.6 Expression von Tet Proteinen in Eizellen und Embryonen .....	69
3.2.7 Der Knockdown von Tet Transkripten in der Eizelle vermindert den Verlust von 5mC- Signal in der Zygote .....	70
3.3 DNA Demethylierung und DNA Reparatur in der Zygote .....	74
3.3.1 Der DNA Strangbruchmarker $\gamma$ H2A.X .....	74
3.3.2 Einzelstrangbrüche im paternalen Pronukleus von Zygoten der G1-Phase .....	83
3.3.3 DNA Reparaturfaktoren während der aktiven DNA Demethylierung .....	85
3.3.4 Einbau von Nukleotiden im paternalen Pronukleus der Zygote während der aktiven Demethylierung in der G1-Phase .....	88
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1 Die genomweite DNA Demethylierung in einem neuen Licht .....	93
4.2 Der Verlust von 5mC-Signal im paternalen und maternalen Pronukleus der Zygote ..	95
4.3 5hmC in der Zygote und in der frühen Präimplantationsentwicklung .....	97
4.3.1 Der Verlust von 5mC ist mit dem Gewinn von 5hmC verbunden .....	97
4.3.2 Die epigenetische Reprogrammierung in der Zygote erfolgt durch Faktoren der Eizelle .....	98
4.3.3 5hmC in der späteren Präimplantationsentwicklung .....	99
4.4 Zusammenhang zwischen Hydroxymethylierung und Demethylierung .....	101
4.4.1 Unter dem Schutzmantel von Stella .....	103
4.5 Aktive DNA Demethylierung und DNA Reparatur im paternalen Pronukleus .....	105
4.5.1 DNA Strangbrüche weisen auf Reparaturvorgänge im paternalen Pronukleus hin....	108
4.5.2 Die Basenexzisionsreparatur als Bestandteil der aktiven Demethylierung .....	111
4.5.3 Einbau von Nukleotiden im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase .....	113
4.6 Mögliche Modelle der indirekten aktiven DNA Demethylierung .....	113
4.7 Perspektive .....	116
4.8 Abstract .....	118
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
<b>Summary .....</b>	<b>121</b>
<b>Referenzen .....</b>	<b>122</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>134</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XI</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 GRUNDLAGEN DER EPIGENETISCHEN (RE-)PROGRAMMIERUNG

Die (Re-)Programmierung epigenetischer Signale hat eine zentrale Bedeutung in der Steuerung entwicklungsbiologischer Prozesse von Säugetieren. Auch in der regenerativen Medizin werden die Prozesse zur Generierung von nativen Stammzellen und Vorläuferzellen, die für die Therapie von krankhaften Zellen benutzt werden können, durch epigenetische Reprogrammierungereignisse begleitet. Das genaue Verständnis der komplexen Mechanismen und Abläufe der epigenetischen Reprogrammierung in höheren Säugetieren ist Gegenstand heutiger Forschung und wird zur Verbesserung der bisher sehr ineffizienten induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen beitragen. Mit Hilfe der Erkenntnisse der genauen Abläufe der natürlichen epigenetischen Reprogrammierung wird es in naher Zukunft möglich sein, bestimmte Zellen und ganze Organe aus terminal differenzierten Zellen zu gewinnen und für die regenerative Medizin nutzen zu können. Um den Begriff der epigenetischen Reprogrammierung bzw. epigenetischer Programmierung des Genoms von Säugetieren genauer einzugrenzen, möchte ich zunächst den Begriff der Epigenetik und die Funktionsweise epigenetischer Informationen näher erläutern.

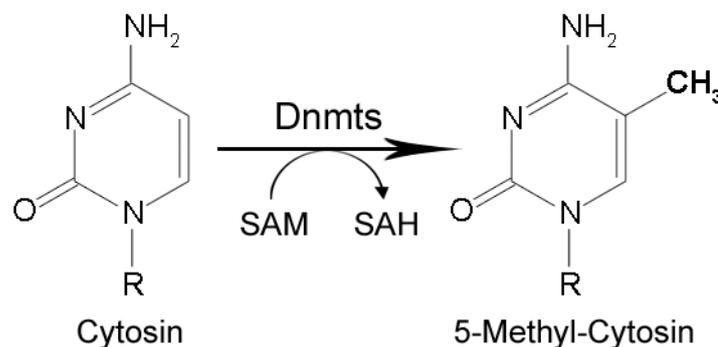
Die Epigenetik ist ein relativ junger Wissenschaftszweig, der in den Beobachtungen nicht-mendelscher Vererbungsereignisse und deren molekulargenetischen Erkenntnissen seinen Ursprung hat. Der Begriff Epigenetik leitet sich aus der griechischen Vorsilbe Epi- ab, die mit „darauf“, „nach“ oder „zusätzlich“ übersetzt werden kann und welche die auf der DNA-Sequenz überlagerte und vererbare Information anspricht, die zur Regulation der genetischen Aktivität beiträgt. Die genaue Definition dieses Forschungszweiges hat sich im Laufe der wissenschaftlichen Entdeckungen molekularer Grundlagen fortwährend weiterentwickelt. Die von Russo et al. (1996) eingeführte operationale Definition der Epigenetik als „*das Studium von mitotisch und/oder meiotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen der DNA Sequenz erklärt werden können*“ (Russo et al., 1996) kommt dabei einer allgemein gültigen Beschreibung sehr nahe.

Molekular beruhen epigenetische Mechanismen auf vererbaren kovalenten chemischen Modifikationen des Chromatins, die zu einer vererbaren, veränderten Genexpression führen. Aus heutiger Sicht geht man davon aus, dass die Genome in unterschiedlichen Zelltypen eines komplexen Säugetiers mit zelltypspezifischen epigenetischen Mustern versehen sind, die als Epigenome bezeichnet werden. Dabei ist die zugrunde liegende DNA Sequenz selbst unverändert. Das Epigenom jedes Zelltyps besitzt ein einzigartiges Profil komplexer epigenetischer Muster, welche zur zellulären Identität durch die Regulation der Genaktivität höherer Säugetiere beitragen. In der Epigenetik spielen dabei zwei miteinander verknüpfte

Typen von Modifikationen eine wichtige Rolle: die DNA Methylierung und die posttranslationalale Modifikation der Proteine des Chromatins (Histone).

### 1.1.1 DNA METHYLIERUNG

Die DNA Methylierung ist eine wichtige epigenetische Modifikation, die zu einer normalen Entwicklung von Säugetieren und anderen Vertebraten zwingend notwendig ist (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999). Diese kovalente Modifikation der DNA wird durch DNA Methyltransferasen (Dnmts) enzymatisch katalysiert (Bestor, 1988; Okano *et al.*, 1999), welche in Säugetieren und anderen Vertebraten hauptsächlich für die Methylierung von CpG-Dinukleotiden an der 5'-Position des Cytosins verantwortlich sind (siehe Abb. 1.1 und Jones *et al.*, 2001). In menschlichen somatischen Zellen entspricht 5-Methyl-Cytosin (5mC) etwa 1% aller Basen des Genoms, welches die Methylierung von 70-80% aller CpG-Dinukleotide betrifft (Ehrlich *et al.*, 1982). Die DNA Methylierung kann auch in anderen Vertebraten, Blütenpflanzen, einigen Pilzarten, wenigen Invertebraten und sehr wenigen Protozoen gefunden werden. Auch in vielen Bakterienarten kann 5mC nachgewiesen werden (Bird, 2002; Goll *et al.*, 2005).

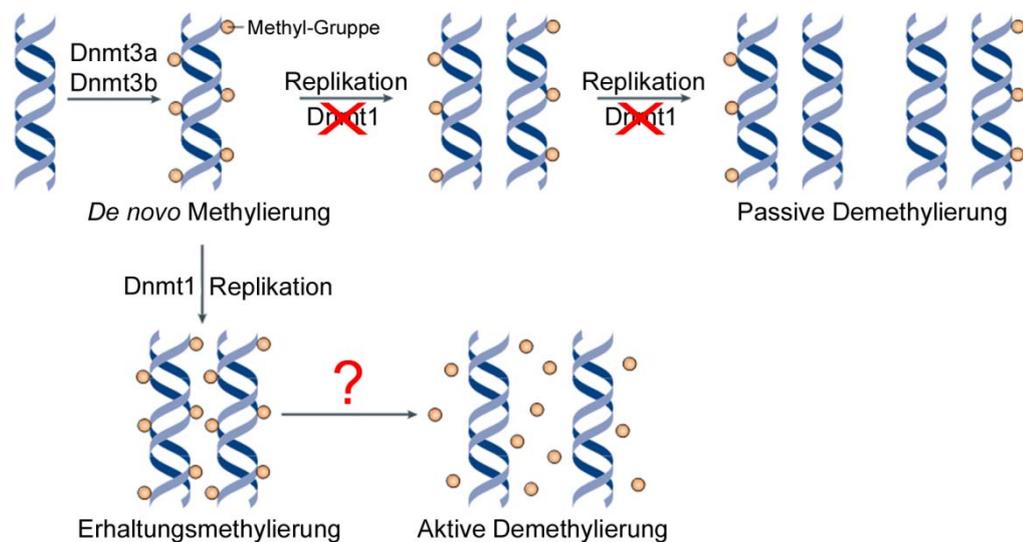


**Abb. 1.1 | Enzymatische Katalyse von 5-Methyl-Cytosin durch DNA Methyltransferasen.** Die DNA Methyltransferasen Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b katalysieren die Methylierung von Cytosin zu 5-Methyl-Cytosin. Dabei wird S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Donor der Methylgruppe benötigt.

Die in Säugetieren hochkonservierten DNA (5-Cytosin) Methyltransferasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: in *de novo* DNA Methyltransferasen und Erhaltungsmethyltransferasen (Holliday *et al.*, 1975; Goll *et al.*, 2005).

Die *de novo* Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b sind in Verbindung mit Dnmt3l für die Etablierung der DNA Methylierung von unmethylierten CpG-Dinukleotiden während der Phasen der elterlichen Prägung (Parentales Imprinting, siehe unten) in den wachsenden Keimzellen und während der Differenzierung in der frühen Embryonalentwicklung verantwortlich (Okano *et al.*, 1999; Kaneda *et al.*, 2004). Zur zweiten Gruppe der Erhaltungsmethyltransferasen gehört Dnmt1, welche für die Weitergabe der DNA Methylierung während der semikonservativen DNA Replikation benötigt wird. Dadurch ist die mitotische Vererbung der DNA Methylierung gewährleistet. Allerdings wird in neueren Modellen

angenommen, dass auch Dnmt3a und Dnmt3b lokal zur Aufrechterhaltung der DNA Methylierung beitragen können (Jones *et al.*, 2009). Die DNA Methylierung ist somit eine sehr stabile, direkte epigenetische Modifikation des Erbguts. Durch ein koordiniertes Zusammenspiel von *de novo* und Erhaltungs-Methyltransferasen kann die DNA Methylierung in den Keimzellen neu etabliert und an nachfolgende Generationen weitergegeben werden (siehe Abb. 1.2). Während der Entwicklung von Säugetieren gibt es daher Phasen in denen die DNA Methylierung verändert (reprogrammiert) und andere in denen sie beibehalten wird. In bestimmten Phasen der frühen Embryogenese erfolgen solche Reprogrammierungen in Form eines starken Verlusts von genomweiter DNA Methylierung. Diese Demethylierung kann durch aktive oder passive Mechanismen erfolgen (siehe Abb. 1.2). Da DNA Methylierung postreplikativ erfolgt, kann durch die Nicht-Aufrechterhaltung der DNA Methylierung während der DNA Replikation in zwei Zellteilungen ein unmethylierter Zustand erreicht werden. Zu solch „passiver Demethylierung“ kommt es, wenn die Aktivität der Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1 fehlt. Im Unterschied dazu wird in der „aktiven Demethylierung“ das methylierte Cytosin über enzymatische Prozesse aus dem Genom entfernt. Auf die möglichen Mechanismen wird in Kapitel 1.5 genauer eingegangen.



**Abb. 1.2 | Mechanismen der Etablierung, Aufrechterhaltung und Löschung der DNA Methylierung in Säugetieren.** In der frühen Embryogenese von Säugern kommt es durch die enzymatische Aktivität der *de novo* DNA Methyltransferasen Dnmt3a/b zur Etablierung von DNA Methylierungsmustern. Während der DNA Replikation und der anschließenden Zellteilung wird diese DNA Methylierung durch die Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1, welche eine Präferenz für hemimethylierte CpG-Positionen besitzt, an die Tochterzellen weitergegeben. Durch das Fehlen der enzymatischen Aktivität von Dnmt1 während der DNA Replikation kann es zur Nicht-Aufrechterhaltung der DNA Methylierung des neu synthetisierten DNA Stranges kommen und zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen führen so zu einer passiven DNA Demethylierung. Im Unterschied dazu kann die aktive DNA Demethylierung über bisher kontrovers diskutierte Mechanismen zur enzymatischen Umwandlung des 5mC zu unmodifiziertem Cytosin führen (Wu *et al.*, 2010, verändert).

Die Methylierung von Cytosin hat in Prokaryoten und Eukaryoten unterschiedliche Funktionen (Goll *et al.*, 2005). Während in Bakterien die DNA Methylierung vor allem dem Schutz des eigenen Genoms vor parasitärer oder viraler DNA durch das bakterielle Modifikations-Restriktions-System dient, ist in Eukaryoten eine starke Methylierung regulatorischer Elemente (z.B. die Methylierung der Promotorregion oder von mehreren CpG-Dinukleotiden in einer kurzen DNA Sequenz, sogenannten CpG-Inseln) in den meisten Fällen mit einer stabilen Unterdrückung der Genaktivität verbunden. Die DNA Methylierung spielt dadurch eine wichtige Rolle in der stabilen Stilllegung von retrotransposablen Elementen, die sich im Laufe der Jahrmillionen im Säuger genom eingenistet haben. In diesen Bereichen findet man mehr als 90% der methylierten CpG-Sequenzen (Jaenisch *et al.*, 1985; Yoder *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige Rolle spielt die DNA Methylierung in der Inaktivierung des X-Chromosoms von Säugetieren. Da bei Säugetieren die Ausbildung des Geschlechts über die Verteilung der Geschlechtschromosomen gesteuert wird, muss im Zuge der Dosiskompensation eines der beiden X Chromosomen des weiblichen Organismus stillgelegt werden. So besitzen auch weibliche Zellen die für Säuger normale Gendosis nur eines X-Chromosomes. Dieser als „X-Inaktivierung“ bezeichnete Vorgang ist durch die starke DNA Methylierung von CpG-Inseln auf dem stillgelegten X-Chromosom im weiblichen Organismus gekennzeichnet (Migeon, 2007). Die DNA Methylierung ist weiterhin an der Entstehung des parentalen Imprintings beteiligt (Reik *et al.*, 2001c). Dabei kommt es zu einer differentiellen Methylierung bestimmter CpG-Dinukleotide auf einem elterlichen Allel, welches zur allelspezifischen Genexpression paternaler oder maternaler Gene führt. Elterlich geprägte „imprintete Gene“ unterliegen meist der Regulationskontrolle von differentiell regulierten Regionen (DMRs), die durch einen hohen Gehalt an CpG-Dinukleotiden gekennzeichnet sind. Der Methylierungszustand vieler dieser DMRs wird in der elterlichen Keimbahn festgelegt und bleibt bis auf wenige Ausnahmen in allen Geweben und Entwicklungsstadien gleich (Reik 2001). Die DNA Methylierung spielt auch eine besondere Rolle in der Entstehung von Tumoren und Krebszellen. Dabei können Veränderungen des Methylierungsstatus Tumorsuppressorgene inaktivieren und/oder Onkogene aktivieren, die zur Entstehung von Tumoren beitragen können (Valinluck *et al.*, 2007; Gal-Yam *et al.*, 2008).

Die Kontrolle der Genregulation durch die DNA Methylierung wird weitestgehend über vermittelnde Proteine und Chromatinstrukturen interpretiert. Diese Regulation kann z.B. durch die Interaktion bestimmter Transkriptionsfaktoren an ihrer jeweiligen DNA-Bindestelle erfolgen (Bird, 2002). Dabei sind viele Faktoren bekannt, die DNA Sequenzen mit CpG-Gehalt binden. Durch die Methylierung dieser CpG-Dinukleotide und die daraus resultierende strukturelle Veränderung der großen Furche der DNA können bestimmte Faktoren nicht mehr an die DNA binden (z.B. CTCF) bzw. andere Faktoren werden von dieser Modifikation durch ihre Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) angezogen (z.B. MeCP2) (Bird, 2002). Die Interaktion dieser Faktoren mit der DNA führt zur Ausbildung einer aktiven oder repressiven Chromatinstruktur, welche wesentlich zur Regulation der Genexpression beiträgt. Dabei ist die Position der DNA Methylierung relativ zum transkriptionellen Startpunkt entscheidend für

die Aktivierung oder Repression eines Gens. So führt z.B. die Methylierung eines Promotors, der mehrere CpG-Dinukleotide enthält, zur Rekrutierung von MBDs und Repressoren der Transkription wie Histondeacetylasen (HDACs), die für eine weitere Modifizierung der umgebenden Histone sorgen und durch die Formierung einer repressiven, heterochromatischen Chromatinstruktur die Initiation der Transkription dieses Gens unterbinden (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2001). Zusammen mit der Aktivierung alternativer Promotoren könnte die DNA Methylierung dadurch eine bedeutende Rolle in der gewebs- und zelltypspezifischen Regulation von Genen haben (Hellman *et al.*, 2007; Maunakea *et al.*, 2010). Aus diesen Gründen ist die Steuerung der Genexpression durch die DNA Methylierung sehr kontextabhängig. Die genaue biologische Funktion und Wirkung der DNA Methylierung ist sicherlich noch nicht vollständig verstanden (Bird, 2002; Ndlovu *et al.*, 2011).

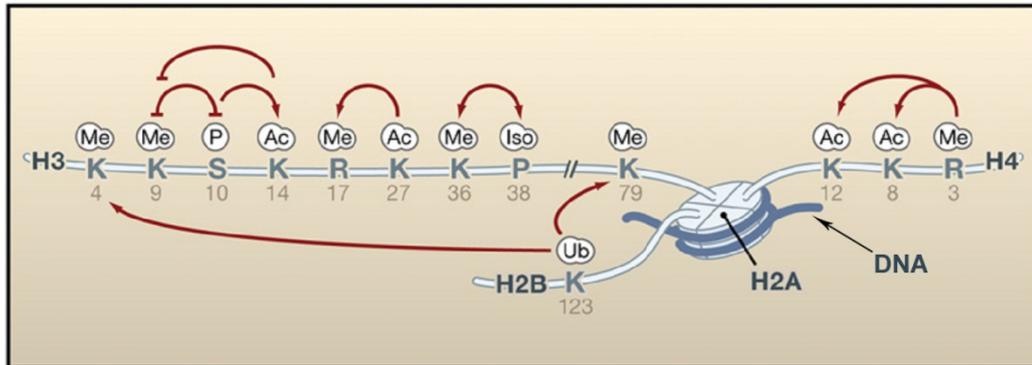
### 1.1.2 HISTONMODIFIKATIONEN

Neben der DNA Methylierung haben posttranslationale Modifikationen von Histonen eine zentrale Bedeutung für die epigenetische Steuerung von Genomen. Über Histonmodifikationen wird die dichte Verpackung der DNA in Nukleosomen, d.h. die Struktur des Chromatins reguliert.

Histone sind evolutionär hoch-konservierte basische Proteine, die als Oktamer zusammen mit DNA die Nukleosomenstruktur bilden, welche die Grundeinheit des Chromatins darstellt (Kornberg, 1974; Richmond *et al.*, 2003). Besonders die N-terminalen Aminosäuren der Histone, die aus der Nukleosomenstruktur herausragen, können mannigfaltig modifiziert werden. Es wurden bereits mindestens acht verschiedene Typen epigenetischer, posttranslatinaler Modifikationen der Histone gefunden - Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, Deiminierung und Isomerisierung durch Prolin (Kouzarides, 2007). Zudem werden diese Modifikationen positionsspezifisch an Lysinen, Argininen, Serinen und Prolinen durch eine Vielzahl hochspezifischer Enzyme gesteuert. Histonmodifikationen sind stabil vererbbar aber auch reversibel.

Die Gesamtheit der verschiedenen Histonmodifikationen ergeben eine Art Kodierung („Histon-Code“), bei der es je nach Art, Kombination, Position und Dichte der Modifikation zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Genregulation oder die Interaktion mit anderen Faktoren kommen kann (Jenuwein *et al.*, 2001). Die Acetylierung von Lysinen an den Histonenden beispielsweise führt im Allgemeinen zu einer Öffnung des Chromatins und zur Aktivierung dieser Genregion. Die Methylierung von Lysinen an der Position 4 des Histons H3 (H3K4me) ist ebenfalls mit der Aktivierung der Genexpression verbunden, während eine Di- und Trimethylierung des Lysins 9 von Histon H3 (H3K9me<sub>2/3</sub>) für die Unterdrückung der Genaktivität sorgt. Manche Histonmodifikationen können sich auch gegenseitig

beeinflussen und dadurch zur Feinregulation der epigenetischen Auswirkungen beitragen (siehe Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 | Histonmodifikationen und Wechselwirkungen.** Gezeigt sind exemplarische Histonmodifikationen und ihre jeweiligen positiven (spitze Pfeile) und negativen (stumpfe Pfeile) Wechselwirkungen mit anderen Modifikationen (Abb. aus Kouzarides (2007), verändert).

Durch diese komplexen Modifikationen können die Enden der Histone durch die Interaktion mit anderen Proteinen die Chromatinstruktur verändern und zu einer offenen, aktiven (Euchromatin) oder einer geschlossenen, inaktiven Konformation (Heterochromatin) des Chromatins führen und damit die Genaktivität ganzer Chromosomenbereiche regulieren. So z.B. kommt es durch die Methylierung von H3K27 zur Rekrutierung von Proteinen der Polycomb-Gruppe wie PC2, die aufgrund ihrer Chromodomäne diese Modifikation binden und mit der Hilfe weiterer Faktoren wie das Heterochromatin Protein 1 (HP1) zur Etablierung von Heterochromatin führen können (Kouzarides, 2007). In embryonalen Stammzellen wurden Chromosomenabschnitte entdeckt, die sowohl aktive als auch repressive Histonmodifikationen aufweisen (Bernstein *et al.*, 2006). Diese sogenannten bivalenten Chromatinstrukturen sollen für die schnelle Aktivierung oder Stilllegung von wichtigen Genen verantwortlich sein. Neben den angesprochenen Histonmodifikationen an den N-terminalen Enden können im Säugerchromatin auch mehrere verschiedene Histonvarianten gefunden werden, die ebenfalls für bestimmte Stoffwechselprozesse sorgen können und zusätzlich zur Komplexität der epigenetischen Regulation beitragen.

Histone sind folglich mehr als nur Verpackungseinheiten der DNA und leisten einen bedeutenden Beitrag zur epigenetischen Regulation des Genoms. Histonmodifikationen werden im Unterschied zur DNA Methylierung für die flexible und schnelle Regulation der genetischen Information benötigt, während die DNA Methylierung eher für die Langzeit-Regulation wichtiger konstitutiver Gene verwendet wird. Es gibt Hinweise darauf, dass Histonmodifikationen und DNA Methylierung miteinander in Kontakt stehen. So wurde z.B. im Schlauchpilz *Neurospora crassa* und in der Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* gefunden, dass die Methylierung von Histonen an der Etablierung der DNA Methylierung beteiligt sein kann (Tamaru *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002). Auch der umgekehrte Fall wurde in der Literatur dokumentiert - die Rekrutierung von MeCP2 durch die DNA Methylierung von CpG-Dinukleotiden führt zur Unterdrückung der betroffenen Genaktivität

und der weiteren Rekrutierung von Histonmethyltransferasen (HMTs) und HDACs, die für die Methylierung von H3K9 verantwortlich sind (Jones *et al.*, 2001; Fuks *et al.*, 2003).

### 1.1.3 ZELLULÄRE POTENZ

Die Entwicklung hochspezialisierter Zelltypen mit nur einer relativ kleinen Anzahl von Genen im Säuger genom wird über vererbte epigenetische Programme gesteuert und stabilisiert. Für die komplexe epigenetische Regulation der Genaktivität im Verlauf der Differenzierung ist es daher notwendig die eine „Blaupause“ der genetischen Information in jeder Zelle eines Säugetieres aus einer einzigen befruchteten Eizelle heraus geordnet zu steuern. Während der frühen Embryogenese von Säugetieren kommt es dabei zu komplexen epigenetischen Programmierungs- und Reprogrammierungsereignissen. Im Zuge einer steigenden zellulären Differenzierung werden die Epigenome der Keimzellen reprogrammiert um sie einem totipotenten Status zu überführen. Im Verlauf der Differenzierung werden sie dann über pluripotente und multipotente Zwischenzustände einem unipotenten und terminal differenzierten Zellcharakter angepasst (zur Begriffserklärung der zellulären Potenz siehe Tab. 1.1). Im Verlauf dieser Programmierungsprozesse wird die jeweilige Genexpression durch ein enges Wechselspiel zwischen (aktivierenden und reprimierenden) Transkriptionsregulatoren und epigenetischen Programmen gesteuert. Mit zunehmender zellulärer Differenzierung werden dabei epigenetische Signale wie die DNA Methylierung vor allem benötigt, um nicht benötigte genetische Information stillzulegen.

**Tab. 1.1 | Begriffserklärung der verschiedenen Stufen zellulärer Potenz**

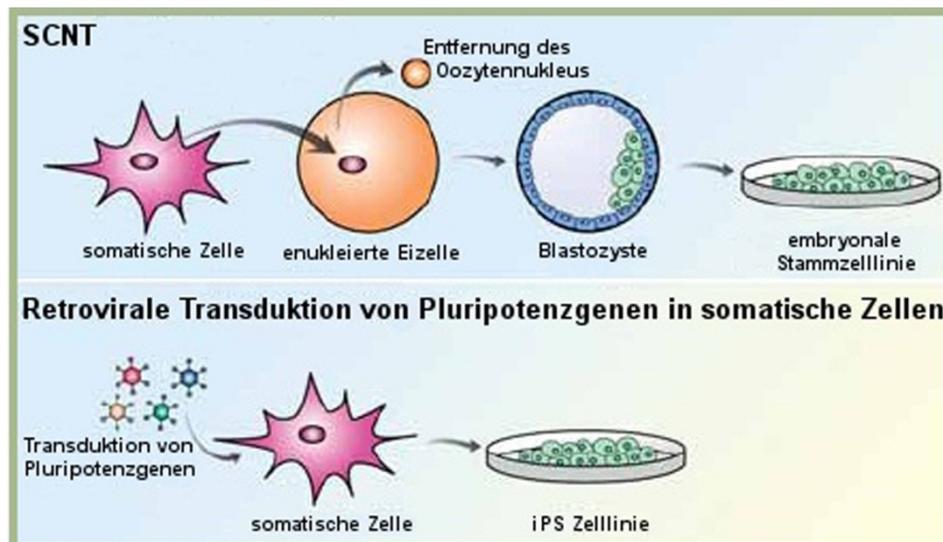
Name	Potential
Totipotent	Als Totipotenz wird die Fähigkeit bezeichnet, alle die für die Entwicklung eines Organismus notwendigen Zelltypen zu generieren (dazu zählen embryonale und extraembryonale Zellen). In höheren Säugetieren sind dazu nur die Zygote und die Blastomere der 2- bis 8-Zell Embryonen in der Lage.
Pluripotent	Die Pluripotenz ist die Fähigkeit einer Zelle, alle Zelltypen eines Organismus hervorzubringen. Als Beispiel dienen Zellen der ICM, ESCs und iPSCs.
Multipotent	Multipotente Zellen können mehrere verschiedene Zelltypen einer Abstammungslinie generieren. Hierzu gehören beispielsweise adulte Stammzellen.
Unipotent	Die Unipotenz befähigt Zellen, nur einen bestimmten Zelltyp zu generieren. Im Unterschied zu terminal differenzierten Zellen besitzen diese Zellen weiterhin die Fähigkeit zur Selbst-Erneuerung. In diese Gruppe gehören beispielsweise Fibroblasten.

Die epigenetische Reprogrammierung bezeichnet den umgekehrten Fall, indem durch das Löschen der bereits vorhandenen epigenetischen Information terminal differenzierte Zellen in

einen Zustand der Totipotenz überführt werden. Diese reprogrammierten Zellen besitzen dadurch das nötige Entwicklungspotential, in alle möglichen Zelltypen eines multizellulären Organismus umgewandelt werden zu können.

### 1.1.4 INDUZIERT EPIGENETISCHE REPROGRAMMIERUNG

Neben der natürlichen epigenetischen Reprogrammierung in der frühen Embryogenese von Säugetieren (siehe nächstes Kapitel) wurden auch Methoden zur künstlichen Reprogrammierung entwickelt (siehe Abb. 1.4).



**Abb. 1.4 | Verschiedene Methoden zur induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen.** Gezeigt sind zwei verschiedene Methoden zur Erzeugung von pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellkernen – über SCNT und über die Transduktion von Pluripotenzfaktoren (Bildquelle: <http://www.hsci.harvard.edu/newsroom/stem-cell-research-progresses-turning-back-clock>, verändert).

Eine Methode zur induzierten Reprogrammierung ist die Injektion eines Zellkerns einer differenzierten somatischen Zelle in eine enukleierte Eizelle (SCNT, engl. somatic cell nuclear transfer). Diese Eizelle ist daraufhin in der Lage, das Epigenom des bereits terminal differenzierten Zellkerns zu reprogrammieren und einen neuen Organismus zu erschaffen. Durch dieses sogenannte Klonen wurde 1997 das erste geklonte Säugetier, das Klonschaf Dolly geboren (Wilmut *et al.*, 1997). Mittlerweile wurde bereits eine Vielzahl von Säugetieren durch den nukleären Transfer eines somatischen Zellkerns geklont (siehe Campbell *et al.*, 2005). Trotz dieser Erfolge ist die Klonierungseffizienz beim SCNT sehr gering und nur bis zu 5% der klonierten Embryonen entwickeln sich zu ausgewachsenen Säugetieren (Campbell *et al.*, 2005). Viele dieser Klone werden mit starken Missbildungen geboren und sterben früh nach der Geburt. Anscheinend kommt es in diesen Fällen hauptsächlich zur fehlerhaften Etablierung der DNA Methylierung wichtiger regulatorischer Elemente (Vignon *et al.*, 1998; Dean *et al.*, 2001; Reik, 2007). Neben vielen technischen Hürden bei der Durchführung des SCNT sind immer noch viele wichtige biologische Fragen

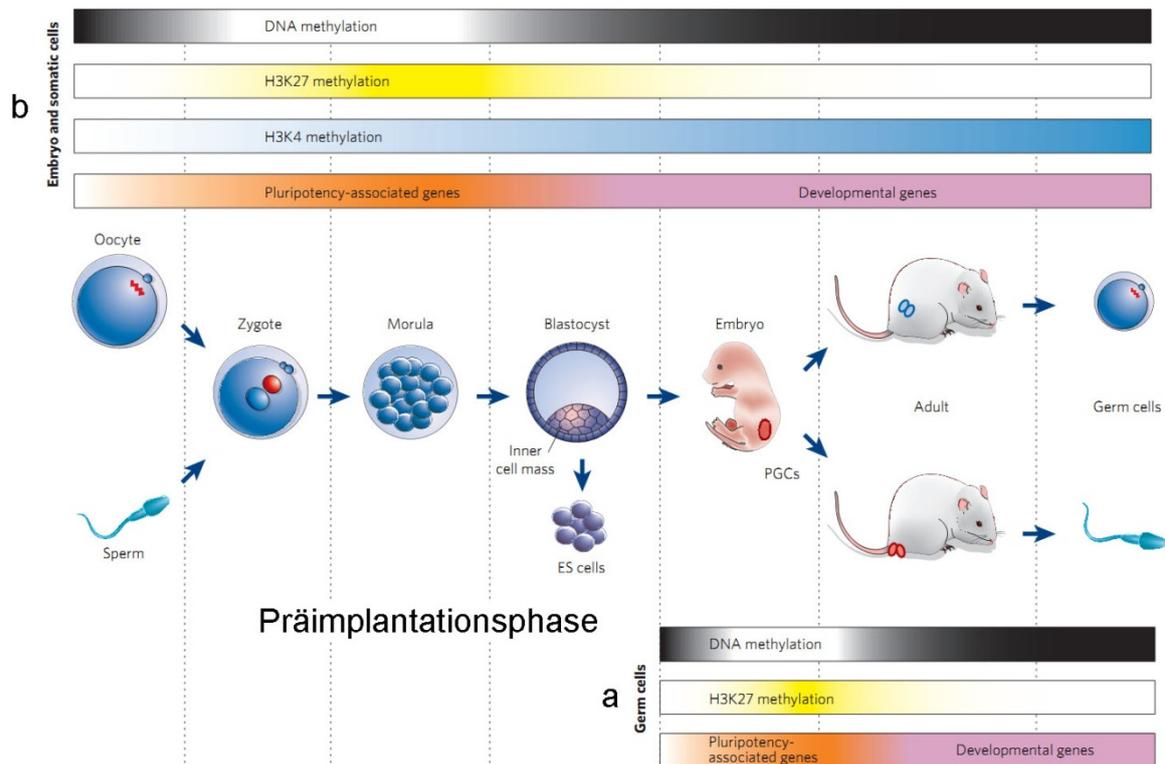
ungelöst und tragen zur Ineffizienz der Reprogrammierung bei (Jaenisch, 2004). Im Jahr 2006 gelang den beiden Wissenschaftlern Takahashi und Yamanaka die Erzeugung von pluripotenten Stammzellen durch die Verwendung von nur vier Faktoren (Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4), die in der frühen Embryogenese eine wichtige Rolle spielen (Takahashi *et al.*, 2006). Diese sogenannten „induzierten pluripotenten Stammzellen“ (engl. induced pluripotent stem cells, iPSCs) wurden aus differenzierten Bindegewebszellen generiert und tragen die Hoffnung der regenerativen Medizin als „Alleskönner-Zellen“ in der Stammzelltherapie benutzt werden zu können. Diese Technik wurde bis heute weiterentwickelt und mittlerweile können iPSCs auch mit nur 3 Faktoren über stabile transgene Induktion oder transiente Proteintransfektion hergestellt werden. Allerdings ist diese genetisch induzierte Reprogrammierung durch bestimmte Faktoren mit nur etwa 0,001-0,1% Effizienz charakterisiert und könnte auf ein stochastische Ereignis nach dem Prinzip „reprogrammier oder stirb“ erfolgen und keineswegs das Ergebnis einer gezielten Reprogrammierung sein. Zudem scheinen nicht alle generierten iPS Zellen das gleiche pluripotente Potential aufzuweisen und können sich je nach somatischem Vorläuferzellkern in ihrem Epigenom erheblich unterscheiden (Apostolou *et al.*, 2011; Ohi *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011b).

Anscheinend ist die „geordnete“ Etablierung der Totipotenz bzw. Pluripotenz durch eine natürliche epigenetische Reprogrammierung in Verbindung mit genetisch gesteuerter Dedifferenzierung während der frühen Embryogenese unangefochten an erster Stelle der Effizienzskala für die Herstellung pluripotenter Zellen. Aus diesem Grund ist das bessere Verständnis der natürlichen epigenetischen Reprogrammierung ein wichtiger Forschungsbereich in der epigenetischen Grundlagenforschung und der regenerativen Medizin.

## 1.2 EPIGENETISCHE (RE-)PROGRAMMIERUNG WÄHREND DER ENTWICKLUNG VON HÖHEREN SÄUGETIEREN

Die Entwicklung eines höheren Säugetieres beginnt mit der Befruchtung der Eizelle mit dem Spermium (siehe Abb. 1.5). Die Zygote, das Produkt der Fusion von Spermium und Eizelle, wird als totipotent bezeichnet, da aus dieser einen Zelle der gesamte spätere Organismus gebildet werden kann. Allerdings sind die Genome der Keimzellen zunächst durch differenzierte und epigenetisch sehr unterschiedliche Epigene charakterisiert (Lepikhov *et al.*, 2010; Smallwood *et al.*, 2011), so dass das totipotente Potential erst im Verlauf gesteuerter epigenetischer Reprogrammierungsprozesse etabliert werden muss. Im Zuge der weiteren Entwicklung der Präimplantationsembryonen kommt es in der Blastozyste zur ersten Differenzierung von Zellen in Trophoektoderm (TE) und Zellen der Inneren Zellmasse (engl. inner cell mass, ICM). Aus Zellen der ICM können embryonale Stammzellen (engl. embryonic stem cells, ESCs) isoliert werden. Diese pluripotenten Zellen sind ähnlich der iPSCs unbegrenzt teilungsfähig und können in Zellkultur gehalten werden. ESCs sind aufgrund ihrer Pluripotenz in der Lage alle für einen Organismus notwendigen Zelltypen zu

entwickeln. Nach der Einnistung (Implantation) der Blastozyste in die Gebärmutter entwickeln sich Zellen der ICM zum Epiblast, während sich Zellen des TE zur Plazenta weiterdifferenzieren. Im heranwachsenden Epiblast und dem daraus hervorgehenden Postimplantationsembryo kommt es in den Gonadenanlagen zur Bildung der Urkeimzellen (primordiale Keimzellen, engl. PGCs), welche im adulten Organismus wieder in reife Keimzellen differenziert werden. Damit ist der Kreislauf der Entwicklung und Fortpflanzung höherer Säugetiere abgeschlossen.



**Abb. 1.5 | Der Lebenszyklus von Säugetieren ist mit zwei Hauptphasen epigenetischer Reprogrammierung gekennzeichnet.** In dem Lebenszyklus höherer Säugetiere können zwei wichtige Phasen der epigenetischen Reprogrammierung unterschieden werden: (a) In den heranwachsenden Urkeimzellen (primordiale Keimzellen, PGCs) wird die DNA Methylierung elterlich geprägter Gene gelöscht und in Abhängigkeit des Geschlechts des Embryos neu gesetzt. (b) In der Zygote bis zur Blastozyste kommt es zur genomweiten Reprogrammierung der DNA Methylierung und aktiver/repressiver Histonmodifikationen, die für ein normale Embryogenese höherer Säugetiere zwingend notwendig ist (Reik, 2007, verändert).

Dieser Kreislauf der höheren Säugetierentwicklung kann auch auf der Ebene zellulärer Potenz betrachtet werden. Die Entstehung eines neuen Organismus aus der Sicht der Zygote bedeutet den schrittweisen Verlust der Totipotenz über pluripotente Stammzellen und multipotente adulte Stammzellen bis hin zur hochspezialisierten Eizelle oder Spermium, die durch die Verschmelzung beider mit der erneuten Generierung einer totipotenten Zelle und für den Neubeginn dieses Zyklus sorgen. Nur durch die epigenetische Reprogrammierung des Epigenoms der terminal differenzierten Keimzellen kann dieser Zyklus von Generation zu Generation fortgeführt werden.

Der Lebenszyklus der Säugtiere zeichnet sich daher durch zwei zentrale Phasen der epigenetischen (Re-)Programmierung aus. In beiden kommt es zu umfassenden und schnellen Veränderungen der Epigenome in nur wenigen Stammzellen. Eine genomweite DNA Demethylierung und Veränderungen bestimmter Histonmodifikationen sind dabei zu beobachten.

### 1.2.1 EPIGENETISCHE REPROGRAMMIERUNG IN PRIMORDIALEN KEIMZELLEN

Die erste Phase der epigenetischen Reprogrammierung erfolgt während des Wachstums und der Reifung der PGCs in den Postimplantationsembryonen (siehe Abb. 1.5a). Kurz nach der Implantation des Epiblasts in der Gebärmutter kommt es am embryonalen Tag 5.5 (E5.5) bei Mäusen (in der zweiten Woche beim Menschen) zur Migration weniger PGCs (~50 in der Maus und ~100 beim Menschen) von der dorsalen Darmgegend in die Gonadenanlagen. Bereits während dieser Wanderung erfolgt die epigenetische Reprogrammierung dieser Zellen. Dabei wird durch die schrittweise Änderung bestimmter Histonmodifikationen und durch die genomweite DNA Demethylierung des Genoms das somatische, epigenetische „Gedächtnis“ der PGCs gelöscht und für die Aufgabe der reifen Keimzellen neu programmiert (Surani *et al.*, 2007). So wird bereits am E7.5 die Methylierung von H3K9 gelöscht und von H3K27 vorübergehend neu gesetzt (Seki *et al.*, 2005). Studien von Hajkova *et al.* (2002) haben gezeigt, dass am E11.5 die DNA Demethylierung dieser Zellen erfolgt (Hajkova *et al.*, 2002). Diese DNA Demethylierung betrifft sowohl bestimmte Gene als auch den Großteil repetitiver Elemente. Aufgrund der schnellen und kompletten Demethylierung dieser Sequenzen werden aktive, enzymatische Prozesse für diese Reprogrammierung angenommen (Hajkova *et al.*, 2002). Durch die genomweite Demethylierung wird auch der Methylierungsstatus aller parentalen imprinteten Gene gelöscht und in späteren PGCs in Abhängigkeit des Geschlechts des Embryos neu etabliert. Ein weiterer Effekt der genomweiten DNA Demethylierung in PGCs ist die Reaktivierung des stillgelegten X-Chromosoms in weiblichen Embryonen (Tam *et al.*, 1994). Dadurch können wieder beide X-Chromosomen in der Oogenese reifender Eizellen in den Kreislauf der Evolution eingebracht werden. Durch die genomweite Reprogrammierung des Genoms können auch fehlerhaft etablierte Epimutationen beseitigt werden, die sich ansonsten in die nächste Generation fortpflanzen würden (Reik *et al.*, 2001a).

Während dieser umfangreichen Phase der Reprogrammierung des Epigenoms kommt es zunächst zur Aktivierung von wichtigen Schlüsselfaktoren der Pluripotenz. Dazu gehören Sox2, Stella/PGC7, Oct4/Pou5F1 und Nanog in frühen Phasen dieser Reprogrammierung (Yamaguchi *et al.*, 2005; Hajkova *et al.*, 2008). Oct4 kann auch in späten Phasen der Entwicklung von PGCs detektiert werden, wodurch Oct4 ein wichtiger Marker reifender PGCs ist (Scholer *et al.*, 1990). Am E10.5 während der Einwanderung der PGCs in die Gonadenanlagen werden neben der Expression von Pluripotenzgenen auch bestimmte Gene

aktiviert, die für die weitere Differenzierung notwendig sind. So werden die Faktoren Nanos und Dazl für die anschließende somatische Differenzierung in der Gametogenese benötigt (Julaton *et al.*, 2011). Die Expression dieser Differenzierungs-Faktoren im Anschluß an die Aktivierung von Pluripotenzgenen betont die gerichtete epigenetische Reprogrammierung der PGCs (Surani *et al.*, 2007). Am E12.5 kommt es daraufhin zu der Differenzierung in Oogonien bzw. Spermatogonien, welches mit der Etablierung eines unipotenten Epigenoms einhergeht. Im Laufe der weiteren Oogenese bzw. Spermatogenese erfolgt die geschlechts-spezifische *de novo* Methylierung des maternalen und paternalen Genoms, welche in den reifen Keimzellen mit der Etablierung dem für Eizellen und Spermien spezifischen Methylierungsmuster einhergeht. Dabei kommt es hauptsächlich zur Methylierung retro-transposabler Elemente und zur Etablierung der parentalen Imprints in Abhängigkeit des Geschlechts des Embryos durch die Aktivität der *de novo* DNA Methyltransferasen (Kafri *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 2007). Als Resultat der *de novo* Methylierung in der Oogenese und Spermatogenese ist das Genom von Eizellen relativ hypomethyliert im Vergleich zum eher hypermethylierten Genom des Spermiums (Monk *et al.*, 1987; Popp *et al.*, 2010; Smallwood *et al.*, 2011).

### 1.2.2 EPIGENETISCHE REPROGRAMMIERUNG IN DER ZYGOTE UND FRÜHEN PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN

Die zweite Phase der epigenetischen (Re-)Programmierung im Lebenszyklus höherer Säugetiere erfolgt kurz nach der Befruchtung der Eizelle in der Zygote bis hin zu späteren Präimplantationsstadien (siehe Abb. 1.5b). Dabei kommt es erneut zu dramatischen epigenetischen Veränderungen der genomweiten DNA Methylierung und wichtiger Histonmodifikationen.

Bereits in der Zygote beginnt die genomweite DNA Demethylierung bis hin zur Morula, welche mit dem dynamischen Erscheinen von aktiven und repressiven Histonmodifikationen wie der Methylierung von H3K4 bzw. H3K27 begleitet wird (Monk *et al.*, 1987; Howlett *et al.*, 1991; Rougier *et al.*, 1998; Sarmiento *et al.*, 2004). Durch diese epigenetische Reprogrammierung wird zunächst das hochspezialisierte epigenetische Programm der Eizelle und des Spermiums gelöscht und in ein totipotenten Epigenom überführt (Farthing *et al.*, 2008; Smallwood *et al.*, 2011). Außerdem erfolgt auch hier die Regulation der Expression wichtiger Pluripotenzgene, die für die frühe Embryogenese benötigt werden. So kommt es im frühen Blastozystenstadium zur ersten Differenzierung in TE und ICM. Diese Differenzierung geschieht durch ein komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren (Cdx2 und Oct3/4 spielen hier zentrale steuernde Rollen), deren epigenetische und genetische Regulation in Blastomeren später 8-Zell Embryonen über das weitere Schicksal als Zelle des TE oder der ICM entscheidet (Suwinska *et al.*, 2008). Ein höherer Expressionslevel von Cdx2 beispielsweise lenkt die weitere Entwicklung eines Blastomers in Richtung TE, während erhöhte Mengen an Oct3/4 und Nanog für Zellen der ICM typisch sind (Ng *et al.*, 2008).

Während dieser Differenzierung in TE und ICM ist eine *de novo* Methylierung von Zellen der ICM zu beobachten (Santos *et al.*, 2002). Die Pluripotenz dieser Zellen wird hauptsächlich durch Transkriptionsfaktoren geregelt. Epigenetische Modifikationen werden dabei für die Stabilität oder die Etablierung benötigt (Albert *et al.*, 2009). Das TE scheint im Vergleich zu den Zellen der ICM hypomethyliert zu sein und dieser Zustand kann auch in den extraembryonalen Geweben der Plazenta gefunden werden, die aus den Zellen des TE hervorgehen (Santos *et al.*, 2004). Mit der Remethylierung der DNA Methylierung in der pluripotenten ICM ist die zweite wichtige Phase der epigenetischen Reprogrammierung abgeschlossen.

Die genauere Untersuchung der epigenetischen Reprogrammierung in der Entwicklung von Präimplantationsembryonen höherer Säugetiere hat bemerkenswerte Eigenheiten in der Reprogrammierung der DNA Methylierung ergeben - während der Entwicklung von der Zygote zur Morula kommt es in beiden elterlichen Genomen zu einer genomweiten DNA Demethylierung, wobei das maternale Chromatin der Eizelle und das paternale Chromatin des Spermiums unterschiedliche Dynamiken zeigen.

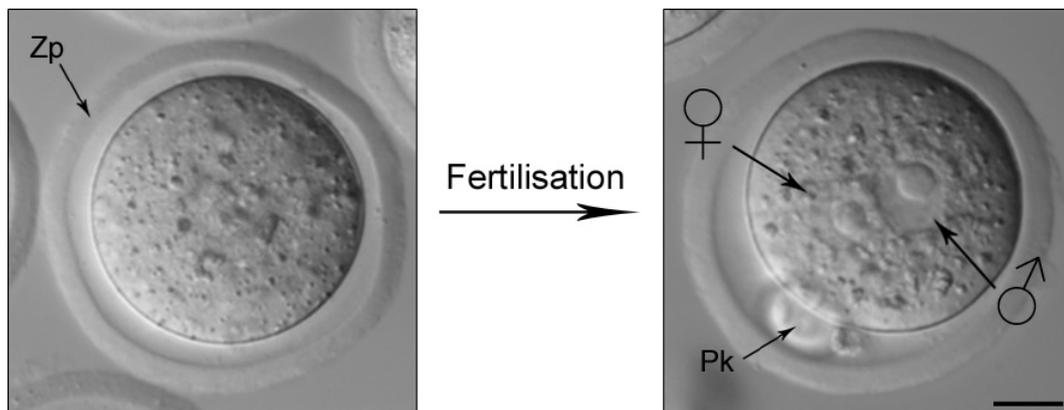
Vom 2-Zell Embryo bis zur Morula kommt es zur passiven Demethylierung des maternalen Genoms, welches durch die fehlende Aktivität der Erhaltungsmethyltransferase Dnmt1 erklärt wird (Monk *et al.*, 1987; Bestor, 2000; Howell *et al.*, 2001). Im Unterschied zur DNA Demethylierung während der Entwicklung der PGCs bleiben die in der Gametogenese etablierten parentalen Imprints von dieser passiven Demethylierung weitestgehend unberührt (Reik *et al.*, 2001b; Santos *et al.*, 2004). Auch die DNA Methylierung bestimmter retrotransposabler Elemente ist von dieser genomweiten Reprogrammierung nicht gleichermaßen betroffen; wahrscheinlich um die Integrität der genetischen Information nicht zu gefährden (Lane *et al.*, 2003).

In der Zygote werden die paternale und maternale Genome unterschiedlich epigenetisch reprogrammiert. Während des ersten Zellzyklus kommt es zu dramatischen und unterschiedlichen epigenetischen Veränderungen des paternalen und maternalen Chromatins. Die biologische Bedeutung dieser asymmetrischen Reprogrammierung ist unklar. Die Zygote enthält zunächst sehr spezielle Keimzellgenome, die durch die unterschiedliche Entwicklung in der Oogenese und Spermatogenese sehr verschiedene epigenetische und phänotypische Charakteristika aufweisen (Smallwood *et al.*, 2011).

Die reife Eizelle höherer Säugetiere befindet sich im arretierten Metaphase II Stadium der Meiose. Sie besitzt ein diploides Genom und ist bereits mit posttranslationalen Histonmodifikationen beladen. Das reife Spermium höherer Säugetiere hingegen hat die Meiose abgeschlossen und besitzt ein haploides Genom. Es ist zum Großteil mit Protaminen bepackt und befindet sich in einer sehr kondensierten Konformation (Balhorn *et al.*, 2000). Protamine sind stark basische, toroidale Proteine und ersetzen während der späten Reifung der Spermien in der Spermatogenese die Mehrheit der Histone des haploiden Chromatins. Dieser Austausch resultiert in einer besonders dichten Verpackung des paternalen Genoms, die es ermöglicht, die paternale Erbinformation in engstem Raum geschützt vor Umwelteinflüssen

zu transportieren. Allerdings werden nicht alle Histone durch Protamine ausgetauscht; in der Maus können weiterhin 1% Histone (10% beim Menschen) in reifen Spermien gefunden werden und diese sind mit entwicklungsbiologisch wichtigen Genen assoziiert (Hammoud *et al.*, 2009; Brykczynska *et al.*, 2010).

Kurz nach der Befruchtung der Eizelle mit dem Spermium kommt es zum Abschluss der Meiose II der Eizelle einhergehend mit der Extrusion des zweiten Polkörpers, welcher einem haploiden Chromosomensatz der Eizelle entspricht. Das paternale Genom hingegen durchläuft eine Phase der Dekondensation und es erfolgt der sogenannte Protamin-Histon-Austausch (Adenot *et al.*, 1997), bei dem die Protamine des paternalen Genoms mit maternal zur Verfügung gestellten Histonen ersetzt werden. Zeitgleich kommt es zur Formierung einer für die Zygote typischen Besonderheit - der sogenannten Pronuklei (Vorläufer-Zellkerne), denn in der Zygote liegen das maternale und das paternale Genom bis zu ihrer Verschmelzung in Folge der Metaphase in getrennten Bereichen vor, die auch im Lichtmikroskop zu erkennen sind (siehe Abb. 1.6).

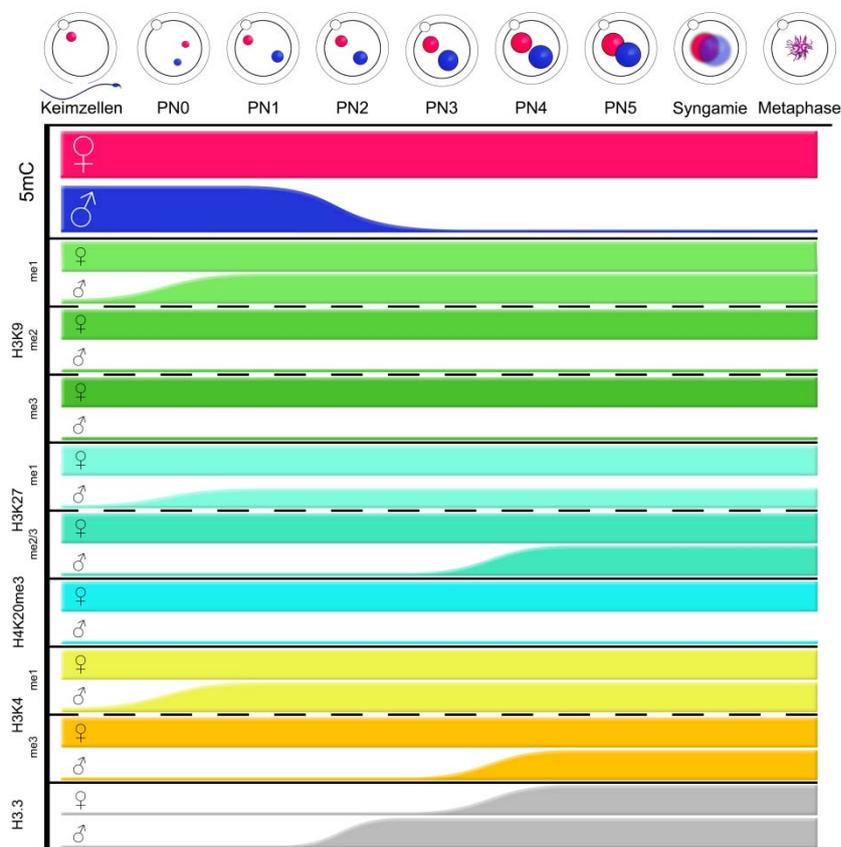


**Abb. 1.6 | Lichtmikroskopische Aufnahme einer Eizelle und einer Zygote der Maus.** Diese Abbildung zeigt repräsentative Beispiele einer unbefruchteten Eizelle und einer Zygote. Beide Zellen sind von der *Zona pellucida* (Eihülle) umgeben, welche die Eizelle vor artfremder Befruchtung und Polyspermie schützt. In der Zygote sind der paternale und maternale Pronukleus zu erkennen, wobei der maternale Pronukleus sich stets in der Nähe des zweiten Polkörpers befindet. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Zp = *Zona pellucida*, Maßstabsbalken = 20 µm.

Sowohl der maternale als auch der paternale Pronukleus sind in der Zygote vom gleichen Ooplasma umgeben. Dadurch wird die Entwicklung der Zygote in den ersten Stunden nach der Befruchtung hauptsächlich von maternalen Faktoren gesteuert, die in der reifenden Eizelle auf Vorrat produziert werden. Hierzu zählen sowohl maternale Enzyme als auch maternale Transkripte. Die zygotische Genaktivierung weniger Gene erfolgt erst sehr spät in der reifenden Zygote und der Großteil der embryonalen Genaktivierung beginnt im 2-Zell-Stadium (Zeng *et al.*, 2004).

Die Zygote kann in sogenannte pronukleäre Stadien eingeteilt werden (Adenot *et al.*, 1997), welche Auskunft über den momentanen Entwicklungsstand der Zygote geben können. Diese Unterscheidung erfolgt nach morphologischen Gesichtspunkten und entspricht der

zunehmenden Dekondensation und Annäherung der paternalen und maternalen Pronuklei (siehe Abb. 1.7 und Lepikhov *et al.*, 2010). Während dieser Reifung der Zygote erfolgt die dynamische Aneignung bestimmter Histonmodifikationen, die teilweise dem maternalen oder paternalen Chromatin zugeordnet werden können. Die während des Protamin-Histon-Austauschs eingebauten Histone im paternalen Chromatin weisen bereits eine starke Acetylierung auf (Adenot *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2002). Das maternale Chromatin der reifen Eizelle ist im Vergleich zum paternalen Chromatin hypoacetyliert und enthält verschiedene Typen von Histonmethylierungen (Arney *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005). In den ersten Stunden nach der Befruchtung erwirbt der paternale Pronukleus Mono-Methylierungen von Lysinen, wie H3K4me1, H3K9me1 und H3K27me1 (Lepikhov *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005). Während der weiteren Entwicklung der Zygote kommt es zur sehr dynamischen Markierung von Histonmodifikationen der beiden elterlichen Pronuklei, die zu einer teils asymmetrischen Verteilung aktiver und repressiver Histonmodifikationen führen (Lepikhov *et al.*, 2004; van der Heijden *et al.*, 2005). Während die stabilen repressiven Markierungen H3K9me2/3, H3K27me3 und H4K20me3 eher das maternale Chromatin kennzeichnen, ist das paternale Chromatin durch eher aktive Markierungen charakterisiert. Diese Asymmetrie kann auch in der präferentiellen Akkumulation der Histonvariante H3.3 im paternalen Genom während der frühen PN2-PN3 Stadien gefunden werden (Torres-Padilla *et al.*, 2006; Lepikhov *et al.*, 2010).



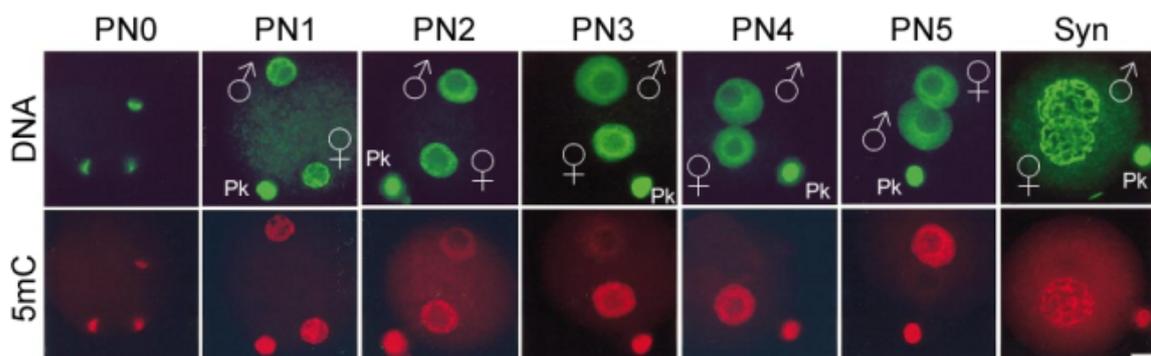
**Abb. 1.7 | Dynamische Reprogrammierung epigenetischer Information im ersten Zellzyklus der Säugetierentwicklung.** Diese Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der epigenetischen

Veränderungen der DNA Methylierung und bestimmter Histonmodifikationen und Histonvarianten in der Mauszygote (Lepikhov *et al.*, 2010, verändert).

Eine weitere wichtige Besonderheit der epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote ist die schnelle und umfassende DNA Demethylierung des paternalen Genoms, während das maternale Genom davon zunächst weniger betroffen scheint (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002; Wossidlo *et al.*, 2010). Auf diesen Umstand wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen. Die dynamischen und zum größten Teil asymmetrischen epigenetischen Veränderungen des paternalen und maternalen Chromatins der Zygote sind in Abb. 1.7 dargestellt.

### 1.3 DNA DEMETHYLIERUNG IN ZYGOTEN HÖHERER SÄUGETIERE

Die dynamische Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote wurde in verschiedenen Studien durch immunhistochemische und molekulargenetische Analysen untersucht. Dabei wurde von Mayer *et al.* (2000) und Santos *et al.* (2002) die DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus der Mauszygote mit Antikörperfärbungen gegen 5mC gezeigt (Mayer *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). Hier konnte der nahezu komplette Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus festgestellt werden, welches eine genomweite Demethylierung des paternalen Genoms in der Mauszygote suggeriert. Anhand von Zygoten, die durch *in vitro* Fertilisation (IVF) von Eizellen gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass dieser Verlust von 5mC-Signal bereits sechs bis acht Stunden nach der Befruchtung im PN3-Stadium nachweisbar ist (siehe Abb. 1.8 und Santos *et al.*, 2002). Diese schnelle Demethylierung deutet auf einen aktiven, enzymatisch gesteuerten und replikationsunabhängigen Prozess hin. Daraufhin wurde neben der Mauszygote auch in der Ratte, dem Kaninchen, dem Schwein, dem Rind und dem Menschen der Verlust von 5mC-Antikörpersignal im paternalen Pronukleus festgestellt (Dean *et al.*, 2001; Fulka *et al.*, 2004; Lepikhov *et al.*, 2008). Dieser Befund weist auf die evolutionäre Konservierung und die besondere Bedeutung der DNA Demethylierung in der Zygote höherer Säugetiere (*Eutheria*) hin.



**Abb. 1.8 | Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus der Mauszygote.** Gezeigt sind repräsentative Mauszygoten, die durch *in vitro* Fertilisation zu bestimmten pronukleären Stadien fixiert und mit 5mC-Antikörpern (rot) und einem interkalierenden DNA Fluorophor (grün, YOYO-1)

analysiert wurden. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Maßstabsbalken = 10 µm (Santos *et al.*, 2002, verändert).

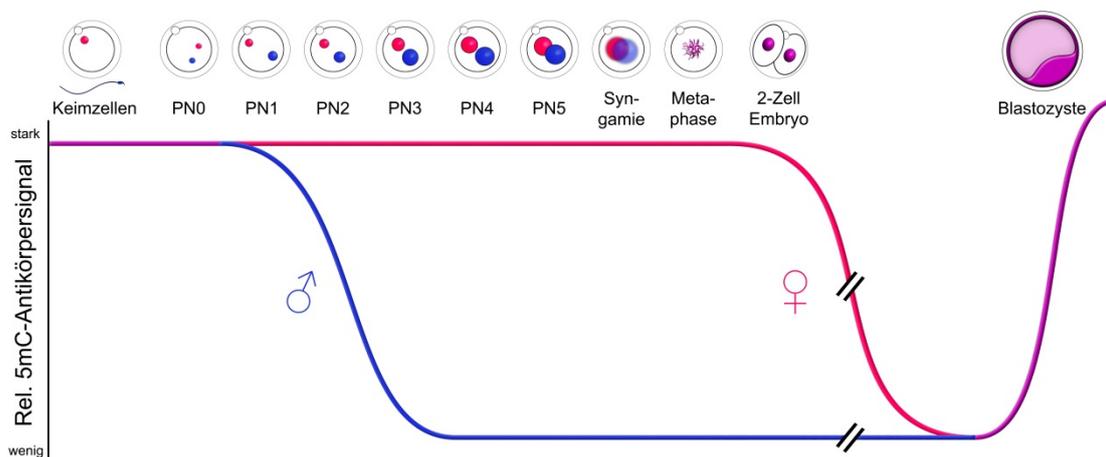
Um einzelne Sequenzen im Genom der Zygote genauer auf mögliche epigenetische Reprogrammierung durch DNA Demethylierung zu analysieren und um einen Antikörper unabhängigen Nachweis zu erbringen, wurden bestimmte DNA Sequenzen im Mausgenom während der Entwicklung der Zygote mittels Bisulfit-Sequenzierung näher untersucht. In der Studie von Oswald *et al.* (2000) wurde der erste Beweis durch Bisulfit-Sequenzierung erbracht, dass bestimmte Gene, die im Spermium stark methyliert vorliegen, sehr früh nach der Befruchtung der Eizelle demethyliert werden (Oswald *et al.*, 2000). Das gleiche Gen auf dem maternalen Allel hingegen zeigte keine Änderung des methylierten Status. Folglich konnte die DNA Demethylierung bestimmter paternaler Gene auch unabhängig von dem dynamischen Verlust des 5mC-Antikörpersignals mittels Bisulfit-Sequenzierung gezeigt werden.

Der genomweite Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus deutet darauf hin, dass auch repetitive, retrotransposable Sequenzen von der Demethylierung betroffen sein könnten. Diese Elemente liegen in bis zu tausendfachen Kopien im Säugergenom zerstreut vor und repräsentieren den Hauptanteil der Sequenzen, die durch 5mC epigenetisch stillgelegt sind (Bird, 1986; Yoder *et al.*, 1997). In der Tat haben Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung dieser repetitiven Elemente gezeigt, dass Line1 (Long interspersed nucleotide element 1), ETn (early retrotransposons) und perizentromerische Satellitensequenzen bereits in der Zygote demethyliert werden (Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Allerdings zeigten andere repetitive Elemente wie IAPs (engl. intracisternal A particles) erst in der späteren Präimplantationsentwicklung eine Reduktion ihres DNA Methylierungslevels. Anscheinend ist die DNA Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote ein gerichteter Prozess, der nicht alle methylierten CpG-Dinukleotide gleichermaßen betrifft.

In späteren Präimplantationsembryonen hat die IF-Analyse ergeben, dass die 5mC-Signalintensität in den Zellkernen vom 2-Zell Embryo bis zur Morula mit jeder Zellteilung abnimmt (Rougier *et al.*, 1998; Dean *et al.*, 2001). Dieser sukzessive Verlust von 5mC-Signal bestätigte frühere Analysen mittels methylierungsensitiver Restriktionsendonukleasen und deutet auf einen passiven Mechanismus der DNA Demethylierung hin (Monk *et al.*, 1987; Howlett *et al.*, 1991). Im Anschluss an die passive Demethylierung erfolgt die *de novo* Methylierung der ICM in der Blastozyste, welches mit einem verstärkten 5mC-Signal in der ICM verbunden ist, während das TE ein deutlich schwächeres Signal zeigt (Kafri *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 2002). Der dynamische Verlust von 5mC-Signal in der frühen Präimplantationsentwicklung ist in Abb. 1.9 schematisch dargestellt.

Der schnelle Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus der Zygote und die Demethylierung bestimmter Gene und repetitiver Elemente deutet auf die Beteiligung aktiver, enzymatischer Prozesse hin. Dieser als „aktive Demethylierung“ bezeichnete Vorgang konnte bisher trotz intensiver Forschung nicht aufgeklärt werden und keine der vorgeschlagenen

putativen „Demethylasen“ konnten letztendlich bestätigt werden (Morgan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010). Allerdings wurden zwei wichtige Faktoren in dem Prozess der aktiven Demethylierung identifiziert. Die Deletion von PGC7 (auch Dppa3 oder Stella genannt) führt in Zygoten auch zum Verlust von 5mC-Signal im maternalen Pronukleus (Nakamura *et al.*, 2007). Damit konnte gezeigt werden, dass PGC7 den maternalen Pronukleus vor der Demethylierung schützt. Neben diesem protektiven Faktor konnte auch ein Faktor gefunden werden, welcher die Demethylierung des paternalen Pronukleus fördert. Durch den siRNA vermittelten Knockdown des Proteins EIp3 wurde der Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus verhindert (Okada *et al.*, 2010). Beide Faktoren können jedoch nicht den Mechanismus der aktiven Demethylierung erklären. Interessanterweise kann PGC7 in beiden parentalen Pronuklei gefunden werden und EIp3 besitzt keine direkte katalytische Aktivität, um spezifisch 5mC zu demethylieren. Die vor kurzem veröffentlichte Entdeckung der „sechsten Base“ des Genoms und der dafür verantwortlichen Enzyme könnte neues Licht in das Dunkel dieser „Black Box“ werfen.



**Abb. 1.9 | Dynamischer Verlust von 5mC-Antikörpersignal in der frühen Präimplantationsentwicklung der Maus.** Gezeigt ist der relative Verlust von 5mC-Signal des paternalen (blaue Linie) und maternalen Genoms (rote Linie) in der frühen Embryogenese der Maus nach Santos *et al.*, 2002. Das paternale Genom zeigt bereits in der Zygote den schnellen Verlust von 5mC-Signal, während das maternale Genom erst mit Beginn der zweiten Zellteilung bis zum Morulastadium schrittweise an Signalstärke verliert. Diese unterschiedliche Dynamik suggeriert die Beteiligung einer aktiven, enzymatischen DNA Demethylierung des paternalen Genoms, während das maternale Genom durch passive, replikationsabhängige Demethylierung reprogrammiert wird. In der frühen Blastozyste kann das 5mC-Signal wieder verstärkt in der inneren Zellmasse entdeckt werden (lila Linie).

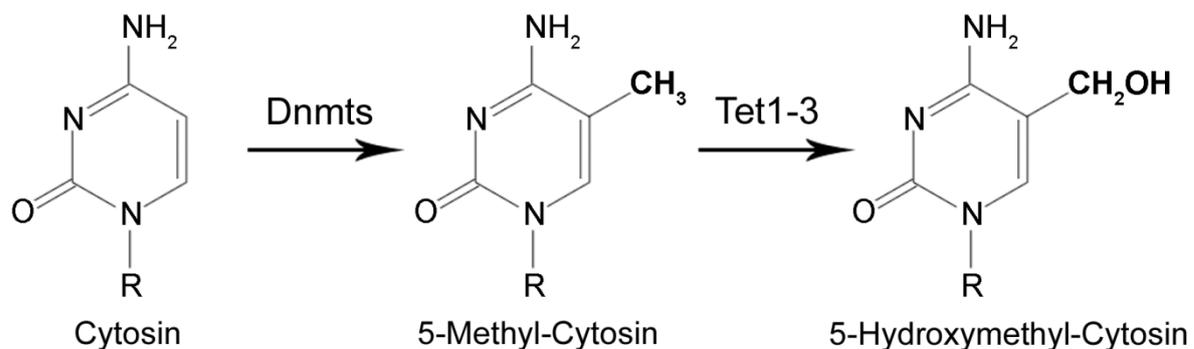
## 1.4 DIE „SECHSTE BASE“ 5-HYDROXYMETHYL-CYTOSIN

Im Jahr 2009 veröffentlichten zwei unabhängige Forschergruppen im Fachjournal Science, dass neben den Nukleotiden A, C, G, T und 5mC noch eine weitere konstitutive Base des Säugergenoms existiert (Kriaucionis *et al.*, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). Diese „sechste Base des Genoms“ wurde als 5-Hydroxymethyl-Cytosin (5hmC) identifiziert und in embryonalen Stammzellen und in Purkinje Neuronen des Kleinhirns der Maus in erstaunlich hohen Mengen

gefunden. Der Anteil von 5hmC im Genom von embryonalen Stammzellen und Purkinje Neuronen kann bis zu 0,03% und 0,6% aller Cytosine ausmachen (Tahiliani *et al.*, 2009; Kriaucionis *et al.*, 2009). Dies erscheint auf den ersten Blick wenig, aber im Vergleich zu etwa 4.5% an 5mC aller Cytosine in Zellen höherer Säugetiere ist diese Zahl erstaunlich hoch (Globisch *et al.*, 2010). Während die Funktion von 5mC als wichtiger epigenetischer Marker bereits gut erforscht ist, ist über die biologische Funktion von 5hmC bisher nur sehr wenig bekannt.

Im Jahr 1993 wurde im Genom von afrikanischen Trypanosomen (parasitäre Protozoen, welche die afrikanische Schlafkrankheit auslösen können) die Base  $\beta$ -D-Glukosylhydroxymethyl-Uracil gefunden (Gommers-Ampt *et al.*, 1993). Diese Base, auch „Base J“ genannt, ist das Produkt der Oxidation von Thymin durch die beiden Dioxygenasen JBP1 und JBP2 (Borst *et al.*, 2008). Ausgehend von Struktur- und Sequenzprofilen der katalytischen Oxygenase-Domäne dieser beiden Proteine wurden in der Studie von Tahiliani *et al.* (2009) durch *in silico* Vorhersagen die menschlichen Dioxygenasen der Tet Proteinfamilie gefunden (Tahiliani *et al.*, 2009). Zusammen mit den Ergebnissen von Ito *et al.* (2010) konnte gezeigt werden, dass Tet1, Tet2 und Tet3 die oxidative Umwandlung von 5mC zu 5hmC katalysieren (siehe Abb. 1.10 und Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Tet Proteine gehören zu der Gruppe der Eisen (II) /  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen, die 5mC mittels molekularen Sauerstoffs zu 5hmC oxidieren. Zudem besitzen Tet1 und Tet3 eine CXXC-Domäne, welche zwischen unmethyliertem und methyliertem Cytosin unterscheiden kann (Tahiliani *et al.*, 2009).

Durch die Identifizierung der für eine Modifizierung von 5mC verantwortlichen Proteine ist die Existenz von 5hmC im Säugergenom nicht mehr nur eine seltene Folge endogener oxidativer DNA-Schäden (siehe Privat *et al.*, 1996; Pratt *et al.*, 2006), sondern auch die Konsequenz gesteuerter, aktiver Prozesse. Die Entdeckung von 5hmC in embryonalen Stammzellen könnte neben 5mC einen weiteren wichtigen epigenetischen Faktor darstellen, der für die Regulation von DNA bindenden Faktoren und letztendlich Modulation der Genexpression eine besondere Rolle spielen könnte (Globisch *et al.*, 2010).



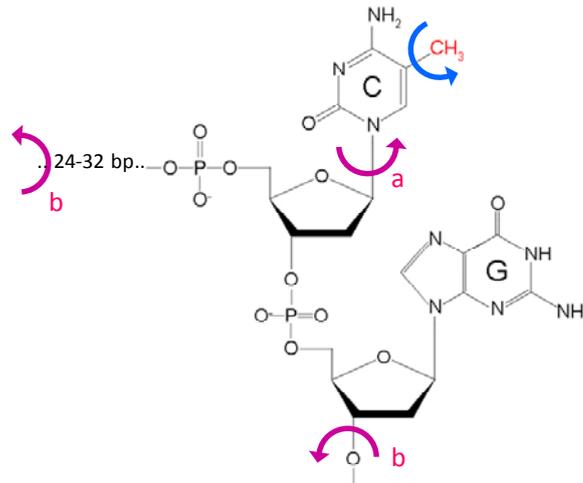
**Abb. 1.10 | Biochemie des 5-Hydroxymethyl-Cytosin.** Natives Cytosin wird von DNA Methyltransferasen (Dnmts) zu 5mC umgewandelt. 5mC kann erneut durch die Dioxygenasen Tet1-3 zu 5hmC konvertiert werden.

Eine umfassende Oxidation von 5mC zu 5hmC durch die Tet1-3 Dioxygenasen in der Zygote könnte zur aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus beitragen. Dabei könnte 5hmC als Intermediat einer aktiven DNA Demethylierung über verschiedene Wege zum nativen, demethylierten Cytosin führen. Über die Existenz von 5hmC in der Zygote war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nichts bekannt. Der Tet1 Knockdown durch RNA-Interferenz (RNAi) im 2-Zell Embryo der Maus führte allerdings zu einer fehlerhaften Entwicklung der ICM in der Blastozyste (Ito *et al.*, 2010), welches auf eine wichtige Beteiligung von 5hmC während der frühen Präimplantationsentwicklung von Säugetieren hindeutet.

## 1.5 MÖGLICHE MECHANISMEN DER AKTIVEN DNA DEMETHYLIERUNG

Seit der Entdeckung der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote höherer Säugetiere wurden zahlreiche Kandidaten als mögliche „Demethylase“ vorgeschlagen und wieder verworfen. In seinem ironischen Aufsatz „The Colorful History of Active DNA Demethylation“ beschreiben S. Ooi und T. Bestor (2008) mehrere erfolglose Versuche, dem Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung auf die Spur zu kommen (Ooi *et al.*, 2008). Die wachsende Anzahl an Hinweisen deutet auf einen komplexen, mehrstufigen Prozess. Dabei bezeichnet der historisch gewachsene Begriff „aktive DNA Demethylierung“ die enzymatische Umwandlung von 5mC zu letztendlich nativem, unmethyliertem Cytosin. Eine Konversion von bspw. 5mC zu 5hmC wäre in diesem Sinne keine aktive Demethylierung, sondern ein möglicher Zwischenschritt.

Als potentieller Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung kann grundsätzlich zwischen der direkten, „*bona fide*“ Demethylierung und der indirekten Demethylierung unterschieden werden (siehe Abb. 1.11 und Morgan *et al.*, 2005). Die Hypothese der direkten aktiven Demethylierung beinhaltet die enzymatische Abspaltung der Methyl-Gruppe des 5mC durch eine „*bona fide*“ Demethylase, während die Base selbst (Cytosin) unverändert bleibt. Die indirekte aktive Demethylierung geht von der Hypothese aus, dass durch die enzymatische Abspaltung der Base oder mehrerer Nukleotide ein neues, natives Desoxycytidin über DNA Reparaturwege eingebaut wird.



**Abb. 1.11 | Direkte und indirekte aktive DNA Demethylierung.** In der Hypothese der direkten Demethylierung erfolgt die direkte Abspaltung der Methyl-Gruppe des 5-Methyl-Cytosins über putative „*bona fide*“ Demethylasen (blauer Pfeil). Die indirekte Demethylierung (rote Pfeile) beinhaltet entweder die Exzision der Nukleobase (a) über spezielle DNA Glykosylasen mit anschließender Reparatur der abasischen Stelle über die Basenexzisionsreparatur oder die Exzision von 24-32 bp über die Nukleotidexzisionsreparatur (b).

### 1.5.1 DIREKTE AKTIVE DNA DEMETHYLIERUNG

Die Möglichkeit der direkten aktiven Demethylierung erfolgt über eine putative „*bona fide*“ Demethylase, die zur enzymatischen Abspaltung der Methyl-Gruppe oder deren Derivate führt.

Die einfachste Möglichkeit der aktiven Demethylierung wäre die direkte enzymatische Abspaltung der Methyl-Gruppe des 5mC. Das Methyl-CpG-bindende Protein MBD2 wurde als erstes Protein veröffentlicht, welches die schnelle hydrolytische Abspaltung der Methyl-Gruppe katalysieren soll (Bhattacharya *et al.*, 1999). Allerdings konnte diese Demethylierung von verschiedenen Gruppen nicht reproduziert werden und die Deletion von MBD2 in Mäusen zeigte weiterhin den Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus der betroffenen Zygoten (Santos *et al.*, 2002). Außerdem wurde berichtet, dass MBD2 methylierte DNA stabil bindet, welches eine mögliche „*bona fide*“ Demethylaseaktivität in Frage stellt (Ng *et al.*, 1999). Eine oxidative Umwandlung von 5mC zu 5hmC (durch beispielsweise Tet Enzyme) könnte jedoch die hydrolytische Abspaltung der Hydroxyl-Gruppe begünstigen. Das Sauerstoffatom der Hydroxyl-Gruppe des 5hmC erleichtert dabei den nukleophilen Angriff im Vergleich zur potentiellen direkten Abspaltung der Methyl-Gruppe des 5mC. Dies würde in der Konsequenz zur Abspaltung von Formaldehyd und unmethyliertem Cytosin führen (Wu *et al.*, 2010). Diese Reaktion ist allerdings aufgrund der weiterhin sehr stabilen C-C Verbindung energetisch eher unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit der direkten „Dehydroxymethylierung“ von 5hmC zu Cytosin könnte durch DNA Methyltransferasen erfolgen, wie *in vitro* Experimente gezeigt haben (Liutkeviciute *et al.*, 2009). Dabei erfolgt in der Abwesenheit eines exogenen Aldehyds die

Abspaltung von Formaldehyd durch DNA (5-Cytosin) Methyltransferasen. Diese Reaktion konnte bisher *in vivo* allerdings nicht gezeigt werden.

In der Veröffentlichung von Okada *et al.* (2010) wurde der Elongator Komplex Elp3 als ein essentieller Faktor der paternalen DNA Demethylierung in der Zygote identifiziert (Okada *et al.*, 2010). Der Knockdown von Elp3 mit siRNAs in Zygoten hat ergeben, dass durch den Verlust von Elp3 eine weniger starke Verminderung des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus erfolgt. Dabei wurden durch Mutationsexperimente gezeigt, dass die Fe-S abhängige radikalische SAM-Domäne von Elp3 in diesem Vorgang eine wichtige Rolle spielt. Durch die Aktivität der radikalischen SAM-Domäne könnte Elp3 die Bildung eines 5'-Deoxyadenosyl Radikals katalysieren. Dieses Radikal könnte hypothetisch mit 5mC interagieren und ein 5mC Radikal erzeugen (Wu *et al.*, 2010). Über die Interaktion mit einem Wassermolekül kommt es zur Bildung von 5hmC, welches über DNA Methyltransferasen wieder zu Cytosin umgewandelt werden könnte (siehe oben). Allerdings ist die initiale Reaktion der radikalischen SAM-Domäne nur unter anaeroben Bedingungen möglich und diese Domäne wird auch für die Stabilität von Elp3 benötigt (Greenwood *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010), welches die enzymatische Bedeutung von Elp3 für die aktive Demethylierung in Frage stellt.

In der kürzlich erschienen Studie von Ito *et al.* (2011) und He *et al.* (2011) konnte gezeigt werden, dass die Tet-Proteine in der Lage sind, 5hmC über 5-Formyl-Cytosin (5fC), 5-Carboxyl-Cytosin (5caC) zu oxidieren (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011). Dadurch könnte 5mC auch durch eine progressive Oxidation zu 5fC oder 5caC und einer Deformylierung oder Decarboxylierung zu Cytosin umgewandelt werden (Pratt *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2011). Jedoch ist die Existenz dieser oxidativen Zwischenprodukte in der Zygote bisher nicht nachgewiesen worden. Die hier dargelegten möglichen Mechanismen der direkten aktiven Demethylierung sind in Abb. 1.12 skizziert.

### 1.5.2 INDIREKTE AKTIVE DNA DEMETHYLIERUNG

Neben der Möglichkeit der direkten Demethylierung durch putative *bona fide* Demethylasen stehen mehrere Varianten der indirekten Demethylierung über DNA Reparaturmechanismen. Hierbei werden nach einer möglichen weiteren Modifikation des 5mC das Nukleosid oder mehrere Nukleotide entfernt und durch konstitutive DNA Reparaturwege mit einem nativen Desoxycytidin ersetzt.

Eine einfache Möglichkeit wäre hier die enzymatische Spaltung der N-glykosidischen Bindung der Base und der Desoxyribose durch eine 5mC spezifische DNA Glykosylase. In Blütenpflanzen ist dieser Mechanismus der aktiven Demethylierung über DNA Glykosylasen bestens untersucht (Gehring *et al.*, 2006; Ponferrada-Marin *et al.*, 2009). Hier kommt es zur Exzision von 5mC durch die DNA Glykosylasen DEMETER und ROS1 (Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002). Die so entstandene abasische oder apurine/apyrimidine Stelle (AP-Stelle) wird anschließend über die Reparaturwege der Basenexzisionsreparatur (BER) durch ein

Desoxycytidin ersetzt (David *et al.*, 1998). Auf die BER wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. In höheren Säugetieren konnten bisher keine homologen Proteine für DEMETER und ROS1 gefunden werden. Mögliche Kandidaten wären die Thymin DNA Glykosylase (TDG) und das Methyl-Binde-Domäne-Protein 4 (MBD4). Beide Enzyme sind an der Reparatur von T:G Basenfehlpaarungen beteiligt, welche durch die spontane Deaminierung von 5mC entstehen können (Zhu *et al.*, 2000). *In vitro* Experimente haben allerdings gezeigt, dass TDG und MBD4 in Bezug auf 5mC:G nur eine sehr geringe katalytische Aktivität besitzt (Hardeland *et al.*, 2003; Cortazar *et al.*, 2007) und die Deletion von MBD4 in Mäusen zeigt auch weiterhin den Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus der Zygote (Santos *et al.*, 2004). Durch die oxidative Umwandlung von 5mC zu 5hmC könnte eine für 5hmC spezifische DNA Glykosylase zur indirekten Demethylierung von 5mC führen. In der Tat wurde über die Aktivität einer 5hmC spezifischen DNA Glykosylase im Thymus von Kälbern berichtet (Cannon *et al.*, 1988). Das dazu erforderliche Enzym konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Eine weitere Möglichkeit der indirekten Demethylierung von 5mC über DNA Reparaturwege beinhaltet die enzymatische Deaminierung von 5mC zu Thymin. Diese Deaminierung kann durch DNA Deaminasen wie AID (Activation-induced deaminase) oder Enzyme der Apobec-Familie katalysiert werden (Morgan *et al.*, 2004). Die aus der Deaminierung resultierende T:G Basenfehlpaarung könnte anschließend durch DNA Glykosylasen und BER durch den Einbau von Desoxycytidin repariert werden. Hinweise auf die Beteiligung von DNA Deaminasen an der aktiven Demethylierung wurden in mehreren Studien erbracht. So konnte durch den Knockdown von AID in „Interspecies Heterokaryons“<sup>1</sup> die Demethylierung der Pluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog unterbunden werden und die Deletion von AID in Mäusen zeigte eine verminderte genomweite Demethylierung von murinen PGCs (Bhutani *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2010). Außerdem konnte in Zygoten von *Danio rerio* (Zebrafisch) durch die Ko-Transfektion von AID oder Proteinen der Apobec-Familie zusammen mit der DNA Glykosylase MBD4 eine verstärkte DNA Demethylierung beobachtet werden (Rai *et al.*, 2008). Allerdings benötigt AID zur effizienten Deaminierung von 5mC einzelsträngige DNA (Morgan *et al.*, 2004) und AID und Apobec1 Knockout-Mäuse sind weiterhin lebensfähig und zeigen keinen Phänotyp (Morrison *et al.*, 1996; Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). Erst kombinierte Knockoutstudien könnten die Rolle von AID, Apobec Proteinen und MBD4 an der aktiven Demethylierung beweisen. 5mC könnte auch durch die DNA Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b in Abwesenheit von SAM deaminiert werden, wie *in vitro* Experimente gezeigt haben (Shen *et al.*, 1992; Zingg *et al.*, 1996; Metivier *et al.*, 2008). Allerdings müsste dabei die lokale Konzentration an SAM

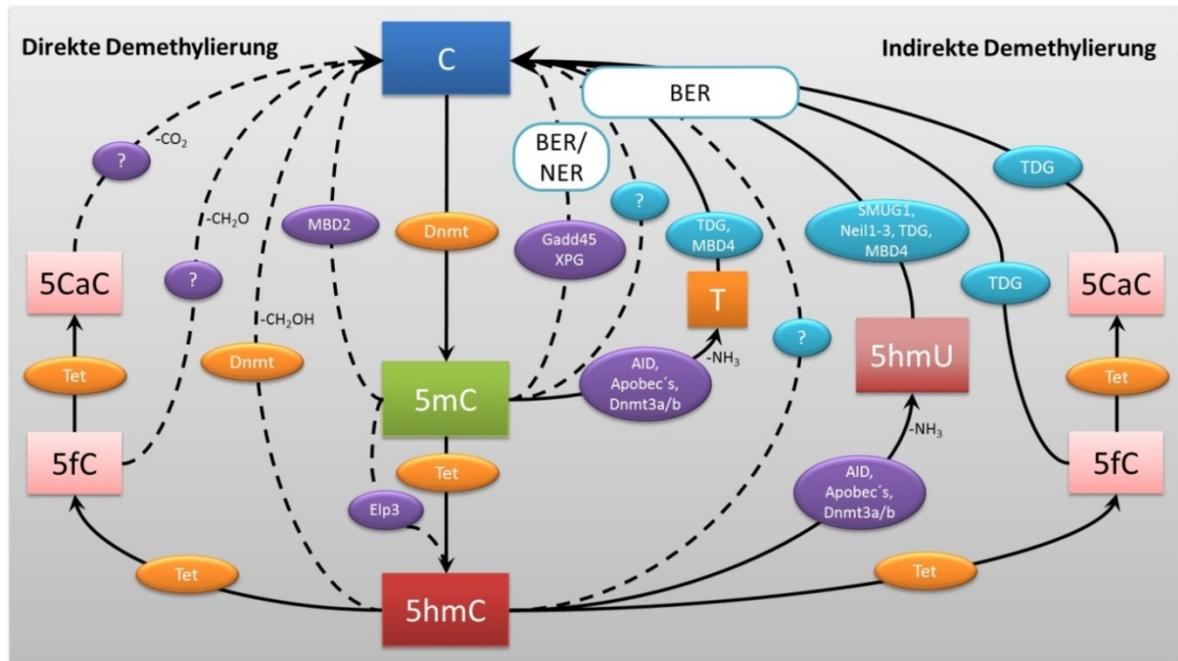
---

<sup>1</sup> „Interspecies Heterokaryons“ ist ein engl. Begriff für Zellen, die durch die Fusion von verschiedenen Zelltypen zweier unterschiedlicher Spezies hervorgehen; im konkreten Fall wurden menschliche Fibroblasten mit murinen embryonalen Stammzellen fusioniert. Dieses Verfahren ermöglicht die Erzeugung von pluripotenten Stammzellen aus differenzierten somatischen Zellen

für diese enzymatische Aktivität sehr gering sein und die inhibitorische Konzentration an SAH (S-Adenosyl-L-Homocystein) nicht zu hoch. Da SAM ein essentieller Bestandteil vieler biologischer Prozesse in der Zelle ist, wird diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich angesehen (Gehring *et al.*, 2009). Durch die Umwandlung von 5mC zu 5hmC könnte die Deaminierung und Exzision durch DNA Glykosylasen auch über 5hmC erfolgen. Dabei würde zunächst 5hmC durch AID oder Apobec-Enzyme zu 5hmU deaminiert. 5hmU könnte im Anschluss von den DNA Glykosylasen SMUG1 (single-strand-selective monofunctional Uracil DNA glycosylase 1), MBD4, NEIL1-3 oder TDG entfernt und mittels BER durch natives Desoxycytidin ersetzt werden (Boorstein *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2005). In der Tat wurde in einer kürzlich erschienen Studie die Beteiligung von AID und TDG an der „Dehydroxymethylierung“ über die Deaminierung und BER in verschiedenen Geweben gezeigt (Cortellino *et al.*, 2011). In der Zygote konnte dieser Mechanismus jedoch bisher nicht gefunden werden.

Die indirekte DNA Demethylierung in der Zygote könnte auch über die progressive Oxidation von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC mit anschließender BER der 5caC:G Basenpaarung erfolgen. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde berichtet, dass die Deletion der DNA Glykosylase TDG in ESCs zur Akkumulation von 5caC führt (He *et al.*, 2011). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die progressive Oxidation von 5mC zu 5caC durch Tet-Enzyme und die Exzision von 5caC durch TDG mit anschließender BER an der indirekten aktiven Demethylierung in der Zygote beteiligt ist. Die Existenz dieser oxidativen Intermediate im Genom der Zygote konnten allerdings bisher nicht nachgewiesen werden.

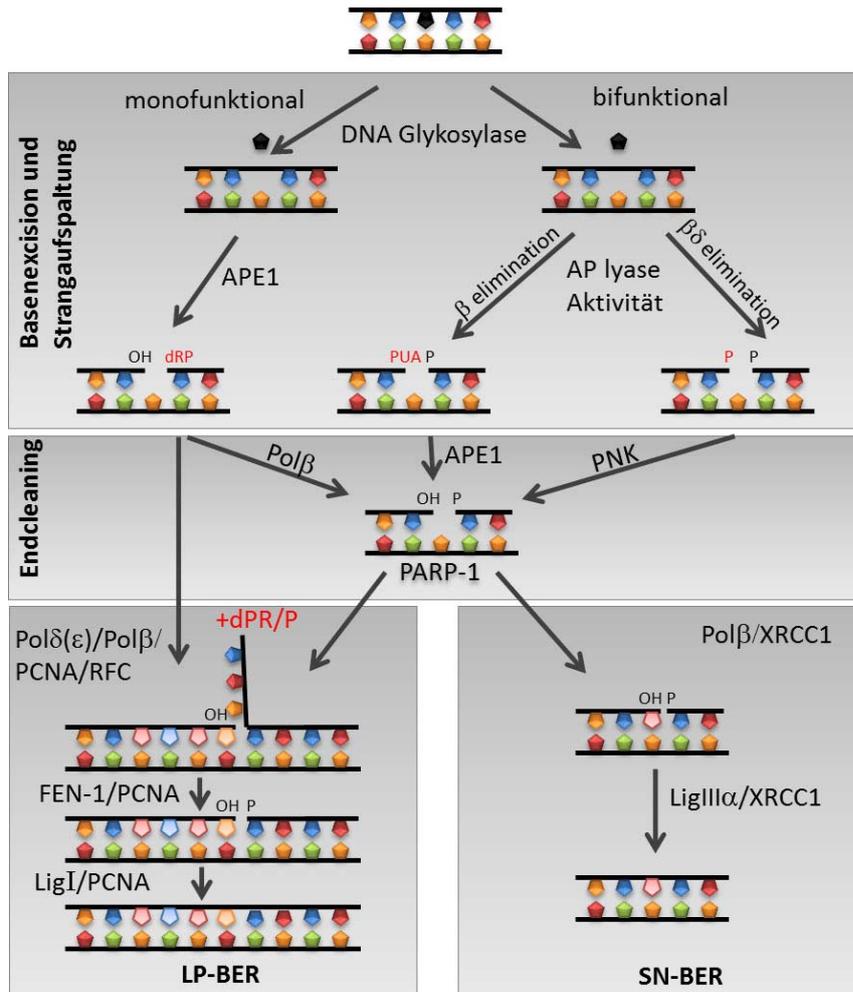
Neben der BER könnte die indirekte aktive DNA Demethylierung auch über Faktoren der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erfolgen. Der genaue Ablauf der NER wird im übernächsten Kapitel näher erläutert. In der Studie von Barreto *et al.* (2007) wurde anhand von methylierten Reporterplasmiden gezeigt, dass Gadd45a zusammen mit dem NER-Faktor XPG (engl. xeroderma pigmentosum group G-complementing protein) zur Demethylierung des Plasmids und zur Aktivierung des Reportergens führt (Barreto *et al.*, 2007). Gadd45a ist ein durch BRCA1 und p53 induziertes Gen, welches an der primären Signalisierung von DNA Schäden, der Zellzyklus-Kontrolle, der Apoptose und im NER eine wichtige Rolle spielt (Zhan, 2005; Wu *et al.*, 2010). Die Überexpression von Gadd45a in Säugerzellen führt zur Demethylierung einzelner Gene und zum genomweiten Verlust von 5mC-Signal, während der Knockdown zu einer Hypermethylierung führt (Barreto *et al.*, 2007). Die Interaktion von Gadd45a und XPG deutet auf die Beteiligung der NER an der aktiven Demethylierung hin. Allerdings wurde auch gezeigt, dass XPG *in vitro* mit bifunktionalen DNA Glykosylasen interagiert und dadurch auch zur Aktivierung der BER sorgen könnte (Klungland *et al.*, 1999). Jedoch konnte eine unabhängige Studie die gezeigte DNA Demethylierung durch Gadd45a nicht reproduzieren und Gadd45a-KO Mäuse zeigen keinen Effekt auf die genomweite und genspezifische DNA Demethylierung (Jin *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2009). Die hier angesprochenen Möglichkeiten der indirekten aktiven Demethylierung über DNA Reparaturwege sind in Abb. 1.12 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.12 | Mögliche Wege der direkten und indirekten aktiven DNA Demethylierung.** Gezeigt sind potentielle Wege einer aktiven Demethylierung von 5mC zu Cytosin oder von 5mC über 5hmC zu Cytosin. Gestrichelte Pfeile zeigen kontrovers diskutierte, bzw. noch nicht experimentell bewiesene Wege der aktiven Demethylierung.

### 1.5.2.1 BASENEXZISIONSREPARATUR (BER)

Die Mehrzahl der angesprochenen möglichen Mechanismen zur indirekten Demethylierung beinhalten die BER zur Reparatur der AP-Stelle und Insertion eines Desoxycytidins. Die BER ist damit von zentraler Bedeutung für eine potentielle indirekte Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote. Die BER erfolgt über mehrere Schritte und benötigt die Aktivität mehrerer hochspezialisierter Enzyme. In diesem Kapitel sind der Ablauf und die besonderen Eigenschaften der BER genauer dargestellt (siehe auch Abb. 1.13).



**Abb. 1.13 | Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur (BER).** Gezeigt ist der schematische Ablauf der BER mit der Unterscheidung in monofunktionale/bifunktionale DNA Glykosylasen und SN-BER (engl. single nucleotide BER) und LP-BER (engl. long patch BER) (nach Hegde *et al.* (2008a), verändert).

Die BER ist maßgeblich an der Reparatur von beschädigten Basen, AP-Stellen und ESBs in der DNA beteiligt (Lindahl *et al.*, 1999). Im ersten Schritt der BER kommt es zur Eliminierung der beschädigten oder abnormalen Nukleobase durch DNA Glykosylasen, welche die  $\beta$ -glykosidische Bindung zwischen Base und Desoxyribose trennen (Mitra *et al.*, 1997). DNA Glykosylasen binden in der kleinen Furche der DNA, biegen den DNA Strang mit der beschädigten Base und „flippen“ die abnormale Base aus der großen Furche des DNA Doppelstrangs in die jeweilige katalytische Tasche des Enzyms (Huffman *et al.*, 2005). Trotz der großen Diversität der beschädigten Basen ist nur eine kleine Anzahl von DNA Glykosylasen an deren Reparatur beteiligt. Bisher wurden etwa zehn verschiedene DNA Glykosylasen in humanen Zellen gefunden, deren Substratspezifität allerdings breit gefächert ist und auch überlappen kann (Zharkov *et al.*, 2003). Dabei kann hier zwischen monofunktionalen und bifunktionalen DNA Glykosylasen unterschieden werden (siehe Abb. 1.13 und Hegde *et al.*, 2008a). Monofunktionale Glykosylasen generieren eine AP-Stelle, welche von der apurinen/apyrimidinen Endonuklease APE1 erkannt und gespalten wird

(Doetsch *et al.*, 1990). Bifunktionale DNA Glykosylasen besitzen eine intrinsische Lyase-Aktivität (McCullough *et al.*, 2001). Dadurch sind sie in der Lage, die Base und die resultierende AP-Stelle in einem Schritt über  $\beta$ -Elimination oder  $\beta\delta$ -Elimination ohne die Mithilfe von APE1 zu spalten (Gerlt *et al.*, 1993).

Im nächsten Zwischenschritt der BER kommt es zum transienten Erscheinen einer DNA Einzelstranglücke, die in Abhängigkeit von der jeweiligen DNA Glykosylase-Aktivität durch unterschiedlich modifizierte 3'- und 5'-Enden charakterisiert ist. Durch die Aktivität von monofunktionalen Glykosylasen und APE1 wird eine Einzelstranglücke generiert, die ein 3'-OH und ein 5'-Desoxyribose-Phosphat (dRP) Strangbruchende besitzt. Bifunktionale Glykosylasen können entweder durch  $\beta$ -Elimination eine 5'-dRP mit 3'-Phosphat oder durch  $\beta\delta$ -Elimination eine 5'-Phosphat und „3' phospho  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde“ (PUA) Einzelstranglücke katalysieren (Wiederhold *et al.*, 2004). Diese unterschiedlich modifizierten 3'- und 5'- Enden können anschließend von APE1 zu 3'-OH und 5'-Phosphat umgewandelt werden, damit eine DNA Polymerase ein komplementäres Nukleotid einbauen kann. Dabei kann diese Umwandlung auch unabhängig von APE1 durch die intrinsische dRP-Lyase Aktivität der DNA Polymerase  $\beta$  oder durch eine Polynukleotid-Kinase (PNK) erfolgen. Bifunktionale DNA Glykosylasen z.B. der Neil-Enzym-Familie besitzen eine  $\beta\delta$ -Lyase Aktivität und sind auf die weitere Prozessierung durch die PNK angewiesen (Das *et al.*, 2006).

Je nach Modifikation des 5'-Endes werden im weiteren Verlauf der BER zwei verschiedene Wege eingeschlagen (Hegde *et al.*, 2008a). Dabei kann zwischen der SN-BER („single nucleotide BER“) und der LP-BER („long patch BER“) unterschieden werden. Im SN-BER wird das 5'-dRP der 1-Nukleotid-Lücke durch die intrinsische dRPase Aktivität von DNA Polymerase  $\beta$  zu 5'-Phosphat gespalten und ein komplementäres Nukleotid eingefügt (Prasad *et al.*, 1998). Durch die anschließende Aktivität der Ligase III wird der verbliebene DNA Einzelstrangbruch geschlossen und die BER der schadhaften Base beendet. Der LP-BER wird dann eingeschlagen, wenn durch eine weitere Umwandlung des 5'-dRP der Einzelstranglücke durch APE1 oder PNK die intrinsische dRP-Lyase Aktivität der DNA Polymerase  $\beta$  das blockierte 5'-Ende nicht mehr entfernen kann (Piersen *et al.*, 1996). In diesem Fall nutzt der LP-BER Faktoren der DNA Replikation um die Einzelstranglücke zu schließen. Dabei werden die benötigten Enzyme von RFC („Replication factor C“) und PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) rekrutiert und das blockierte 5'-Ende durch FEN-1 („5'-flap endonuclease 1“) etwa 2-8 Nukleotide lang aus der DNA geklappt und abgespalten (Matsumoto, 2001; Levin *et al.*, 2004). FEN-1 ist während der DNA Replikation für das Entfernen der 5'-RNA Primer der Okazaki Fragmente zuständig. Anschließend wird die entstandene 2-8 bp große Einzelstranglücke mittels DNA Polymerase  $\beta$  oder durch die replikativen DNA Polymerasen  $\delta/\epsilon$  aufgefüllt und der Einzelstrangbruch durch die Ligase I geschlossen (Levin *et al.*, 2000). Der LP-BER ist folglich im Gegensatz zur SN-BER durch das Ersetzen von 2-8 Nukleotiden und durch Faktoren der DNA Replikation gekennzeichnet (Klungland *et al.*, 1997).

### 1.5.2.2 NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER)

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) könnte neben der BER auch als Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung in Betracht gezogen werden.

Die NER ist der Hauptreparaturweg sperriger und voluminöser DNA Schäden, die zur Inhibition der DNA Replikation, Mutationen im Leseraster und Punktmutationen führen können. Diese Schäden können durch Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung und mutagene Substanzen entstehen. Im Wesentlichen kommt es in der NER nach der Schadenserkenkung zu zweiseitigen ESBs, welche die Schadensstelle flankieren. Dadurch wird in Eukaryoten ein 24-32 bp großes Oligomer entfernt und durch DNA Polymerasen die resultierende Einzelstranglücke aufgefüllt. Durch Ligation der DNA Einzelstrang-Enden ist die NER abgeschlossen (Sancar *et al.*, 2004).

## 1.6 ZIELSETZUNG

Die frühe Embryogenese von Säugetieren ist durch dramatische epigenetische Veränderungen gekennzeichnet. Kurz nach der Befruchtung der Eizelle mit dem Spermium werden die epigenetischen Programme der Keimzellen in der Zygote und frühen Präimplantationsembryonen gelöscht und in ein totipotentes Potential überführt. Dabei kommt es zur umfassenden Reprogrammierung der DNA Methylierung des paternalen Genoms der Zygote höherer Säugetiere. Dieser, als aktive Demethylierung bezeichnete Prozess, geschieht innerhalb nur eines Zellzyklus und ist das Resultat aktiver, enzymatischer Prozesse.

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war es, den bis dahin noch weitgehend unbekanntem molekularen Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms der Zygote auf die Spur zu kommen. Als experimentelles Modellsystem wurde hierzu das manipulierbare System der frühen Mausentwicklung gewählt. Durch *in vitro* Fertilisation und Mikromanipulationen von Maus-Eizellen und frühen Präimplantationsembryonen sollten potentielle Prozessabläufe präzisen Stadien der frühen Säugetierentwicklung zugeordnet werden. Die geringe Zahl gewinnbarer Eizellen und früher Embryonalstadien der Maus stellte dabei eine große Herausforderung dar. Im Verlauf der experimentellen Arbeiten galt es daher, neue Ansätze für embryologische und immunologische Manipulationstechniken zu entwickeln bzw. diese zu optimieren und mit neuartigen Strategien der Immun-Detektion zu kombinieren. Eine erste Zielsetzung der Arbeit war es, durch immunhistochemische Analysen den Ablauf der DNA-Demethylierung präziser, d.h. quantitativ und qualitativ einzugrenzen. Im Weiteren sollten zentrale, neu entdeckte DNA-Modifikationstypen aufgespürt und im Zusammenhang mit dem Verlust von 5-Methyl-Cytosin analysiert werden. Um die möglichen Mechanismen der DNA Methylierung aufzudecken, sollte schließlich die Präsenz und Dynamik von Schlüsselfaktoren der DNA Reparaturwege während Phasen der Demethylierung identifiziert werden. Hier galt es eine mögliche Verbindung von DNA Reparaturvorgängen mit aktiven Demethylierungsprozessen des paternalen Pronukleus in der Zygote nachzuweisen oder zu widerlegen. Um diesem Ziel näher zu kommen, galt es mögliche Enzyme/Kandidaten einer aktiven Demethylierung des paternalen Genoms durch gezielte Inhibitionsexperimente auszuschalten und die Auswirkung dieser Manipulation quantitativ und qualitativ zu erfassen. Schließlich sollte durch vergleichende Experimente mit Embryonen anderer Säugetiere und durch Analyse „geklonter“ Mausembryonen die Konservierung der Mechanismen studiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 ANTIKÖRPER

##### 2.1.1.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

<b>Antigen</b>	<b>Klonalität – Spezies</b>	<b>Konz. IF</b>	<b>Bezugsquelle</b>
5hmC	Polyklonal, Kaninchen, KatNr. 39769, LotNr. 10310001	1:100	Active Motif, La Hulpe, Belgien
	Monoklonal, Ratte, Klon 63.3	1:100	Wolf Reik, Babraham Institute, Cambridge, UK Adrian Bird, Wellcome Trust Centre, Edinburgh, UK
5mC	Monoklonal, Maus, Klon 7I12	0.2 µg/ml	Dirk Schübeler, FMI Basel, Schweiz
	Monoklonal, Maus, Klon 33D3	1:100	Eurogentec, Köln, Deutschland
	Monoklonal, Maus, Klon 33D3, KatNr. NA81	1:2000	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
APE1	Polyklonal, Kaninchen, Kat.Nr. sc-5572	1:100	SantaCruz, Heidelberg, Deutschland
BrdU	FITC konjugiert, Mono- klonal Ratte, Klon BU1/75 (ICR1)	1:200	Abcam, Cambridge, UK
DNA (einzelstr.)	Monoklonal, Maus, Klon F7-26, KatNr. MAB3299	0.5 µg/ml	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
	Polyklonal, Kaninchen, LotNr. 0I-112	0.5 µg/ml	IBL, Gunma, Japan
ERCC1	Polyklonal, Kaninchen	1:100	W.Vermeulen, Universität Amsterdam, Niederlande
Gadd45a	Monoklonal, Maus	1:100	Christoph Niehrs, DKFZ Heidelberg, Deutschland
	Polyklonal, Kaninchen	1:50	Prof. Dr. Christoph Niehrs, DKFZ Heidelberg, Deutschland
H2A.X	Polyklonal, Kaninchen	1:2500	Abcam, Cambridge, UK
γH2A.X	Polyklonal, Kaninchen, LotNr. L6022404	1:200	USBiological, Hamburg, Deutschland
	Monoklonal, Maus	1:2000	Biozol, Eching, Deutschland

	Monoklonal, Maus, LotNr. 33332, KatNr. 16-202A	1:500	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
H3K9me2	Polyklonal, Kaninchen	1:500	Thomas Jenuwein, MPI Freiburg, Deutschland
PARP-1	Monoklonal, Maus, Klon 5A5	1:100	BioLegend, San Diego, USA
TDG	Polyklonal, Kaninchen	1:100	Guo-Liang Xu, Shanghai, China
TFIIH	Polyklonal, Kaninchen	1:100	SantaCruz, Heidelberg, Deutschland
XPC	Polyklonal, Kaninchen	1:100	W.Vermeulen, Universität Amsterdam, Niederlande
XRCC1	Polyklonal, Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK

### 2.1.1.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Antigen	Fluorophor - Spezies	Konz.	Bezugsquelle
Maus IgG (H+L)	A488 konj., Ziege, Huhn	10 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaninchen IgG (H+L)	Rhodamine Red-X konj., Esel (IgG H+L), KatNr. 711-295-152	15 µg/ml	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Suffolk, UK

### 2.1.2 CHEMIKALIEN

Chemikalie	Bezugsquelle
<sup>14</sup> C-dCTP	Perkin Elmer, Rodgau-JH, Deutschland
[α- <sup>32</sup> P]-dCTP	Perkin Elmer, Rodgau-JH, Deutschland
Acidic Tyrode's	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua bidest.	Hauseigene MilliQ-Anlage
Aqua bidest., RNase frei	Ambion, Darmstadt, Deutschland
BER-Inhibitor CRT0044876	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA, Embryo getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chromschwefelsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland

Demecholcin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dextran, Tetramethylrhodamin konj.	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethyldichlorosilan in Toluol (DMDCS)	Supelco, Bellefonte, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dynabeads Oligo-dT	Dynal, Oslo, Norway
EdCTP, 5-Ethynyl-2'-Deoxycytidintri- phosphat	Prof. Michal Hocek, Academy of Sciences of the Czech Republic, Tschechische Republik
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flusssäure, 48 wt. %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fotoemulsion Amersham Hypercoat LM-1	GE Healthcare, München, Deutschland
Glukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
hCG (Ovogest)	Interved, Unterschleißheim, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kodak Entwickler	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kodak Fixierer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Milchsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mineralöl, Embryo getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mounting Medium Vectashield	Vector Labs, Loerrach, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NEB Puffer 2	New England Biolabs, USA
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

PMSG (Intergonan)	Interved, Unterschleißheim, Deutschland
Polyvinylpyrrolidone, Embryo getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PCR-Puffer B	Solis BioDyne, Tarta, Estland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Quecksilber	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Spermin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Spermidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.3 ENZYME

DNA Polymerase I aus E. coli	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNAseI, RNAse frei	Promega, Mannheim, Deutschland
HotFire DNA Polymerase	Solis BioDyne, Tarta, Estland
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.4 EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit benutzten HEK-293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller-Lantzsch der Universitätsklinik Homburg zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen wurde von Beate Schmitt in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Walter durchgeführt.

### 2.1.5 INSTRUMENTE, GERÄTE UND BESONDERE VERBRAUCHSMATERIALEN

<b>Instrument/Gerät/Material</b>	<b>Hersteller</b>
Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Borosilikat-Glasröhrchen (GC100TF-10)	Harvard Apparatus, UK
Borosilikat-Glasröhrchen (GC100T-15)	Harvard Apparatus, USA
CellTram Air	Eppendorf, Deutschland
Cell Tram Vario	Eppendorf, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator, „InCu Safe“	Sanyo, Wood Dale, USA
Femtojet	Eppendorf, Deutschland
Glaskapillaren (Ringcaps 50 µl)	Hirschmann, Deutschland
IVF-Schalen	BD-Biosciences, Deutschland
Mikromanipulator Transferman NK2	Eppendorf, Deutschland
Mikroschmiede, De Fonbrune Typ	Technical Products International
Needle-Puller, Model P-87	Sutter, Novato, USA

PCR-Cycler	Eppendorf, Deutschland
Piezo-Drill, PMAS-CT 150	Prime Tech, Japan
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Objektträger mit Vertiefungen	Menzel, Deutschland
SMZ 800 Stereomikroskop	Nikon, Deutschland
Waagen	Sartorius, Bradford, USA

### 2.1.6 KULTURMEDIEN

<b>Kulturmedium</b>	<b>Bezugsquelle</b>
KSOM (EmbryoMax KSOM)	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
M16-Medium	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
M2-Medium	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
M2-Medium (ohne BSA, mit 1% PVP)	Eigene Herstellung nach (Nagy, 2003)

Für die IVF wurde das KSOM mit zusätzlichem BSA (3 mg/ml) und Glukose (auf 5.56 mM) angereichert. Das KSOM für die Kapazitation der Spermien enthielt zusätzliches BSA (30 mg/ml). Das selbsterstellte M2-Medium ohne BSA wurde über mehrere Stocklösungen erstellt (Nagy, 2003). Das PVP wurde erst frisch am jeweiligen Versuchstag dazugegeben. Die verwendeten Kulturmedien wurden nach Herstellung sterilfiltriert.

### 2.1.7 LÖSUNGEN UND PUFFER

Blockierlösung	BSA	1%
	Triton X-100	0.1%
	NaN <sub>3</sub>	0.05%
	in 1x PBS lösen	
Lysis Puffer	Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
	LiCl	500 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	0.5%
	DTT	5 mM
Nick-Translationsmix	EdCTP, dATP, dTTP, dGTP	50 µM
	NEB Puffer 2 (10x)	5 µl
	BSA (10mg/ml)	0,5µl
	DNA Polymerase I (20 U)	2 µl
	ad 50 µl Aqua bidest.	
PBS (10x, pH 7.4) (ohne Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.7 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g

	ad 1 l Aqua bidest.	
Permeabilisierungslösung	Triton X-100	0.2%
	NaN <sub>3</sub>	0.05%
	in 1x PBS lösen	
Probenpuffer (6x)	Bromphenolblau	0.25% (w/v)
	Xylen-Cyanol	0.25% (w/v)
	Saccharose	40%
Silanisierungslösung	3-Amino-Propyltriethoxysilan	1 ml
	Aceton	49 ml
TAE-Puffer (10x)	TRIS	0.4 M
	EDTA	0.01 M
	Essigsäure	0.2 M
	auf pH 8.3 einstellen	
Waschpuffer I	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	LiCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	0.1%
Waschpuffer II	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	LiCl	150 mM
	EDTA	1 mM

## 2.1.8 MÄUSE

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse entstammen der hauseigenen Tierzucht und wurden von Inzuchtmäusen des Maustammes *Mus musculus domesticus* F<sub>1</sub>(C57BL/6×DBA) oder F<sub>1</sub>(C57BL/6×CBA) der Firma Elevage Janvier, LeGenest St. Isle herangezogen. Zur Superovulation wurden 6-8 Wochen alte Weibchen mit PMSG/hCG Hormonen injiziert und die für die Spermienisolation zur IVF benutzten Böcke waren 10-18 Wochen alt.

## 2.1.9 OLIGONUKLEOTIDE, siRNAs UND GRÖßENSTANDARD FÜR AGAROSEGELE

### 2.1.9.1.1 PRIMER-SEQUENZEN

**Tab. 2.1 | Sequenzen der verwendeten Primer für die RT-PCR**

Gen	Vorwärts-Primer (5´-3´)	Rückwärts-Primer (5´-3´)
Tet1	GAGGGAAAAGAAGCCCAAAG	AAATTGGCATCACAGCTTCC
Tet2	GAGCCAAAAGAGGAAGAGAGAC	AATGAGCAGAGAAGTCCAAACAT
Tet3	TCCGAGTTCCTACCTGCGATTGTG	CTTCCCCTCCTTGCCCGTGTAGATG
Polr2a	ACCAAAGAGAAGGGCCATGGCG	TTCTGCATGGCACGGGGTAAGC

### 2.1.9.1.2 SEQUENZEN DER VERWENDETEN siRNAs

**Tab. 2.2 | Sequenzen der verwendeten siRNAs**

Gen	Sense-Sequenz (5'-3')
Tet1	AAGAAGCAGTGTACACATAAT
Tet1	GCAGATGGCCGTGACACAAAT (Ito <i>et al.</i> , 2010)
Tet2	AAGGCCTGTGATGCTGATAAT
Tet2	GGATGTAAGTTTGCCAGAAGC (Ito <i>et al.</i> , 2010)
Tet3	AAGCGCAACCTATTCTTGAA
Scrambled	GCCTGAGCGATTATAACCTTT

### 2.1.9.1.3 GRÖßENSTANDARD

Als Größenstandard zur Bestimmung von der Länge von PCR-Produkten wurde die 100 bp Leiter von Fermentas verwendet.

### 2.1.10 REAKTIONSKITS

Für die Detektion von inkorporiertem EdU/EdC wurde der „Click-it Edu Alexa fluor ® 488 Imaging Kit“ der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 EXPERIMENTELLES ARBEITEN MIT MÄUSEN UND MAUSEMBRYONEN

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Mäusen wurden nach den Vorschriften der Deutschen Tierschutzverordnung in Absprache mit der zuständigen Tierschutzbeauftragten des Saarlandes vorgenommen. Für den tiergerechten Umgang mit Mäusen wurde nach § 9 Abs. 1 Satz 4 gemäß Tierschutzgesetz vom 25. Mai 1998 eine Ausnahmegenehmigung für das Durchführen von subkutanen und intraperitonealen Injektionen und die Tötung von Mäusen durch zervikale Dislokation erlangt.

### 2.2.2 SUPEROVULATION VON MAUSWEIBCHEN

Zur Gewinnung von möglichst vielen entwickelten Maus-Eizellen wurden F<sub>1</sub>(C57BL/6×DBA) oder F<sub>1</sub>(C57BL/6×CBA) Weibchen durch hormonelle Stimulation in den Ovarialzyklus gebracht. Hybride Mausweibchen eignen sich dabei erfahrungsgemäß besser für die Superovulation vieler Eizellen als beispielsweise reine Inzuchtlinien. Diese Superovulation erfolgte durch zwei intraperitoneale Hormoninjektionen zu genau festgelegten Zeitpunkten. Die dabei genau einzuhaltende zeitliche Abfolge der beiden Injektionen wird mit dem jeweiligen Tag/Nacht Zyklus der Maustierhaltung (hier von 6<sup>00</sup> bis 18<sup>00</sup> Uhr) abgestimmt. Die erste Hormoninjektion von 5 IU PMSG (engl. pregnant mare serum gonadotropin) zur Stimulation möglichst vieler Eizellen erfolgte zwischen 21<sup>00</sup> und 23<sup>00</sup> Uhr.

Die zweite Hormongabe von 5 IU hCG (engl. human chorionic Gonadotropin) zur Stimulation des Eisprungs wurde 46 bis 48 h später verabreicht.

### 2.2.3 *IN VITRO* FERTILISATION UND KULTIVIERUNG DER MAUSEMBRYONEN

Die Gewinnung von Zygoten und späteren Präimplantationsembryonen der Maus erfolgte durch die *in vitro* Fertilisation (IVF) und durch die natürliche Befruchtung durch Verpaarung der Weibchen mit Böcken. Die IVF hat dabei gegenüber der natürlichen Verpaarung den großen Vorteil, dass der Befruchtungszeitpunkt sehr genau festgelegt werden kann und dadurch bestimmte pronukleäre Stadien der Zygote und frühe Präimplantationsembryonen zu reproduzierbaren Zeitpunkten erhalten werden können. Zudem kann durch die IVF die Entwicklung von Zygoten und frühen Embryonen durch die Inhibition bestimmter Stoffwechselwege und Enzyme mittels chemischer Reagenzien und durch Mikroinjektionen von beispielsweise siRNAs, mRNAs und GFP-Fusionsproteinen zu bestimmten Stadien beeinflusst werden.

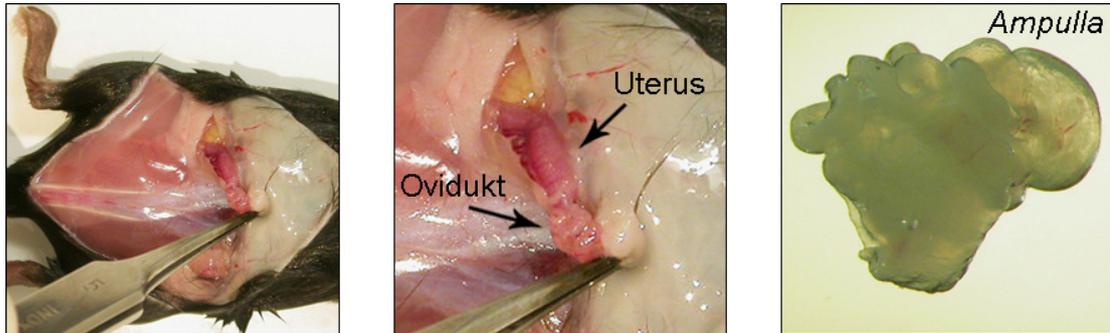
Die Präparation der Spermien und Eizellen von Mäusen wurde entsprechend der Anleitung von A. Nagy (2003) durchgeführt (Nagy, 2003). Dabei wurde der Bock 13 h nach der Injektion der Weibchen mit hCG durch zervikale Dislokation getötet und der *Vas deferens* mit der *Cauda epididymis* präpariert (siehe Abb. 2.1). Nach der Punktierung der *Cauda epididymis* wurden die Spermien in 400  $\mu$ l im CO<sub>2</sub>-Inkubator äquilibriertem, mit 30 mg/ml BSA modifiziertem KSOM-Medium ~1.5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in IVF-Schalen kapazitiert.



**Abb. 2.1 | Präparation des *Vas deferens* und der *Cauda epididymis* eines Mausbocks.** Nach zervikaler Dislokation des Bocks wurden durch peritoneale Schnitte der Hoden und der *Vas deferens* (Samenleiter) freigelegt. Nach der Präparation des *Vas deferens* wurde die *Cauda epididymis* mit den reifen Spermien punktiert und in äquilibriertem Kulturmedium für ~1.5 h kapazitiert.

Reife Eizellen von superovulierten Mausweibchen wurden 14 h nach der hCG Injektion isoliert. Dabei erfolgte nach der Präparation und Punktierung des Ovidukts (Eileiter, siehe Abb. 2.2) die Isolation der Kumulus-Eizellen Komplexe in 400  $\mu$ l äquilibriertem KSOM-Medium. Durch die Zugabe von 20  $\mu$ l kapazitierten, an der Oberfläche schwimmenden Spermien wurde die künstliche Befruchtung eingeleitet. Die weitere Kultivierung der

Embryonen erfolgte in modifiziertem KSOM in IVF-Schalen bei 37°C in einer mit Luftfeuchtigkeit gesättigten Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft.



**Abb. 2.2 | Präparation des Ovidukts eines Mausweibchens.** Zur Isolation der Eizellen superovulierter Weibchen wurden 14 h nach der Hormongabe von hCG die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und der Ovidukt (rechtes Bild) präpariert. Superovulierte Weibchen besitzen nach erfolgreicher Superovulation bis zu 30 Eizellen in der geschwollenen *Ampulla*.

#### 2.2.3.1.1 MANIPULATIONEN WÄHREND DER KULTIVIERUNG DER EMBRYONEN

Für die Inhibition von DNA Polymerasen und DNA Topoisomerasen wurden *in vitro* befruchtete Zygoten<sup>2</sup> 2 h vor der Fixierung zu bestimmten pronukleären Stadien mit 3 µg/ml Aph oder 10 µM Cpt inkubiert. Zur Induktion von DNA Schäden wurden Zygoten mit 5mM MMS 1 h vor der Fixierung behandelt. Für die Inhibition von APE1 wurde der Inhibitor CRT0044876 in einer End-Konzentration von 10 µM 5 h vor der Fixierung zu den Zygoten oder den HEK293T-Zellen gegeben.

#### 2.2.4 GEWINNUNG VON SCNT 1-ZELL MAUSEMBRYONEN

Die geklonten 1-Zell Embryonen wurden in einer Kollaboration mit Dr. Vittorio Sebastiano und Dr. Michele Boiani aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans Schöler vom Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster gewonnen. Der SCNT wurde dabei wie in Boiani *et al.* 2002 beschrieben durchgeführt (Boiani *et al.*, 2002).

#### 2.2.5 GEWINNUNG VON KANINCHEN- UND RINDERZYGOTEN

Die in dieser Arbeit analysierten Kaninchen- und Rinderzygoten wurden in einer Kollaboration mit Dr. Valeri Zakhartchenko von der Molekularen Tierzucht Abteilung der Ludwig-Maximilian Universität, München gewonnen. Die untersuchten Kaninchenzygoten stammen aus „Zika“ Auszuchtstämmen und wurden durch natürliche Verpaarung nach Standardprozedur gewonnen (Shi *et al.*, 2004). Rinderzygoten wurden durch IVF nach Standardverfahren erhalten (Hiendleder *et al.*, 2004).

<sup>2</sup> Anmerkung: Der Begriff „*in vitro* befruchtete Zygote“ müsste korrekterweise „Zygoten, die durch *in vitro* Befruchtung einer Eizelle hervorgehen“ lauten, da eine Zygote per Definition aus einer Befruchtung hervorgeht. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird zukünftig in dieser Arbeit auf diese Formulierung verzichtet.

### 2.2.6 EDU, EDCTP AND BRDU INKORPORATIONSEXPERIMENTE

Zur Analyse der Inkorporation von markierten Nukleotiden wie EdU/EdCTP und BrdU während der S-Phase von frühen Mausembryonen wurden 50  $\mu\text{M}$  EdU/EdCTP bzw. 25 mg/ml BrdU 30 min vor Fixierung zum Kulturmedium gegeben. Die Detektion von eingebautem EdU/EdCTP erfolgte nach Standardprotokoll des Herstellers für den „Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit“ (Invitrogen). Für die Detektion von BrdU wurden fixierte Zygoten für 10 min bei RT mit 4N HCl inkubiert. Nach anschließender Neutralisation mit Tris-HCl (pH 8.0) und einem zweiten Fixierungsschritt mit 3.7% PFA wurden die Embryos bei 4°C ÜN in Blockierlösung inkubiert. Die IF-Analyse mit BrdU-Antikörpern erfolgte nach Standardprotokoll wie unten beschrieben.

### 2.2.7 IMMUNFLUORESZENZANALYSEN

Zygoten wurden zu bestimmten pronukleären Stadien von PN0 bis zur Metaphase gesammelt. Die Klassifikation der PN-Stadien erfolgte dabei nach Adenot *et al.* (1997) und Santos *et al.* (2002), in welcher die pronukleäre Morphologie und die Stunden nach der Fertilisation (hours post fertilization, hpf) in Betracht gezogen wurden (Adenot *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2002). *In vitro* fertilisierte 2-Zell Embryonen wurden zu bestimmten Zellzyklusphasen (20 hpf für die G1-, 24 hpf für die S- und 28 hpf für die G2-Phase) fixiert. Spätere Präimplantationsstadien wurden zumeist über natürliche Verpaarung gewonnen, da hier der genaue Zeitpunkt der Befruchtung keine Rolle gespielt hat. Die Handhabung von Zygoten und frühen Präimplantationsembryonen erfolgte durch selbst erstellte, mit DMDCS (Dimethyldichlorosilan in Toluol) silikanisierte Glaskapillaren (Ringcaps 50  $\mu\text{l}$  von Hirschmann). Dabei wurden die Embryonen unter dem Binokular in silikanisierten Objektträgern mit Vertiefungen in die jeweiligen Lösungen von 15 bis 150  $\mu\text{l}$  Volumen mundpipettiert.

Zu den zu analysierenden Zeitpunkten wurde nach einem kurzem Waschschrift in vorgewärmtem M2-Medium die *Zona pellucida* durch eine vorsichtige Behandlung für ~10-30 sec in „Acidic Tyrode's“-Lösung entfernt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Embryonen standardgemäß in 3.7% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 20 min bei RT. Nach der Permeabilisierung (0.2% Triton X-100 in PBS) für 10 min bei RT wurden die fixierten Embryonen bei 4°C ÜN in einer Blockierlösung (1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS) zur Verminderung unspezifischer Antikörperbindungen inkubiert.

Zur Immunfluoreszenzanalyse von Kumulus-Zellen mit  $\gamma\text{H2A.X}$ -Antikörpern wurden diese nach der Isolation von Eizellen in M2-Medium gesammelt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm für 5 min bei RT wurden die konzentrierten Zellen einmal mit M2-Medium gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  oder 5 mM MMS 1 h vor der Fixierung inkubiert. Anschließend wurden die Kumulus-Zellen 3x mit PBS gewaschen und auf einen silanisierten Objektträger pipettiert. Zur Silanisierung wurden saubere Objektträger 30-60 sec in Silanisierungslösung getaucht und bis zur Verwendung

staubfrei aufbewahrt. Die auf dem silanisierten Objektträger haftenden Kumulus-Zellen wurden anschließend nach vorsichtigem Absaugen des PBS mit 3.7% PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert, 10 min permeabilisiert und bei 4°C ÜN mit Blockierlösung inkubiert. Für die IF-Analyse von HEK293T-Zellen wurden diese Zellen auf sterilen Deckgläsern in 6-Well-Platten kultiviert und alle nachfolgenden Schritte mit den Zellen auf den Deckgläsern durchgeführt.

Die fixierten Embryonen und Zellen wurden nach der Inkubation in Blockierlösung bei 4°C ÜN in Blockierlösung mit primären Antikörpern für 3 bis 4 h bei RT inkubiert. Nach mehreren Waschrissen in Blockierlösung für ~2 h bei RT erfolgte die Inkubation mit sekundären Antikörpern für 2 h bei RT. Die Zygoten wurden anschließend mehrmals in Blockierlösung gewaschen und in einem 0.5 µl Tropfen Mounting Medium Vectashield mit 0.5 mg/ml DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) oder 2 mg/ml Propidiumiodid auf einen Objektträger mundpipettiert. Nach dem Auflegen eines Deckglases und dem luftdichten Verschließen mit Nagellack wurden die Embryonen in einem Zeiss Axiovert 200 M invertierten Fluoreszenzmikroskop mit einer Schwarz/Weiß Digitalkamera analysiert. Die Bilder wurden mit der AxioVision-Software von der Firma Zeiss pseudokoloriert und gegebenenfalls über eine Z-Stapel-Analyse untersucht (~20 Stapel mit 0.4 µm Dicke pro Embryo). Zur Quantifizierung der Signalstärke von Antikörpersignalen wurden die integralen Signalintensitäten von paternalen oder maternalen Pronuklei verrechneter Z-Stapel-Aufnahmen mit der ImageJ-Software ausgewertet.

### 2.2.7.1 5mC- UND 5hmC-IMMUNFLUORESZENZANALYSE

Für die Analyse des 5mC- und 5hmC-Gehalts mittels Antikörpern muss die zu untersuchende DNA weitestgehend einzelsträngig vorliegen, damit die Antikörper ihre jeweiligen Epitope optimal erkennen können. Für *in situ* Hybridisierungen werden die fixierten Zygoten und frühen Präimplantationsembryonen daher stark saurem Milieu ausgesetzt (2N HCl für 30 min (Santos *et al.*, 2002) oder 4N HCl für 10 min), welches hauptsächlich zu einer Depurinierung der DNA führt. Dies hat den Nachteil, dass herkömmliche, in doppelsträngige DNA interkalierende Fluorophore wie 4,6-diamidino-2-Phenylindole (DAPI), Propidiumiodid oder YOYO1 die DNA kaum noch binden können und keine oder nur ein sehr schlechtes Signale erhalten werden. Als alternative Vorgehensweise wurde in dieser Arbeit anstelle des interkalierenden DNA-Fluorophors weitestgehend ein ssDNA-Antikörper benutzt, der bei den gewählten Denaturierungsbedingungen ein gutes DNA-Signal bei gleichzeitig optimalen 5mC- bzw. 5hmC-Signalen liefert. Im Verlauf der Experimente wurden die Denaturierungsbedingungen für 5mC- und 5hmC-Antikörper optimiert. Eine Behandlung der fixierten und permeabilisierten Zellen bei 4°C mit 4N HCl für 15 min bei RT erwies sich als optimal. Nach der Neutralisation in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) für 10 min bei RT erfolgte eine zweite Fixierung in 3.7% PFA in PBS für 20 min bei 4°C.

Um eine gegenseitige sterische Maskierung des Epitops des 5mC- und 5hmC-Antikörpers in der gleichen Immunfärbung auszuschließen, wurden beide Antikörperfärbungen im gleichen

Embryo nacheinander und in Kontrollexperimenten in alternierender Reihenfolge durchgeführt. In diesen alternierenden Doppel-IF-Analysen wurden keine qualitativen/quantitativen Unterschiede beider Antikörpersignale festgestellt.

## 2.2.8 INJEKTION VON siRNAs IN EIZELLEN UND BEFRUCHTUNG DURCH INTRACYTOPLASMATISCHE SPERMIENINJEKTION (ICSI)

Die Injektion von siRNAs in Maus-Eizellen und die anschließende Befruchtung durch ICSI geschah nach folgendem zeitlichem Ablauf:

### ▪ 3 TAGE VOR DER INJEKTION

Für die Gewinnung von Eizellen wurden die Weibchen superovuliert. Dies geschah durch die erste Hormonstimulation mit der intraperitonealen Injektion von PMSG um 19<sup>30</sup>.

### ▪ 1 TAG VOR DER INJEKTION

An diesem Tag wurde das Kulturmedium falls nötig frisch angesetzt. Das verwendete, selbst erstellte M2-Medium ohne BSA mit 1% PVP wurde maximal 3 Wochen lang benutzt. Um 19<sup>30</sup> wurde die zweite Hormongabe mit hCG zur Superovulation der Weibchen verabreicht und das modifizierte KSOM-Medium zur Kultivierung der Eizellen und Zygoten im Inkubator äquilibriert.

Falls nötig wurden an diesem Tag auch die jeweiligen siRNA Stocklösungen frisch angesetzt. Dazu wurden 10fach konzentrierte Stocklösungen mit den 100fach konzentrierten Sense- und Antisense-siRNAs mit RNase freiem Aqua bidest. hergestellt. Das Annealing der einzelsträngigen Sense- und Antisense-RNA-Oligos erfolgte im Wasserbad für 5 min bei 70°C. Nach 30 min langsamen Abkühlens wurden die siRNAs bis zur Verwendung bei -20°C weggefroren.

Zur Injektion von siRNAs in Eizellen wurden am gleichen Tag spezielle „Injektionsnadeln“ hergestellt. Dazu wurden Borosilikat-Glasröhrchen (GC100TF-10) im Sutter-Puller in einem U-förmigen Filament gezogen. Hierbei wurden folgende Einstellmöglichkeiten verwendet:

Temperatur	Ramp-Test + 5
Zugkraft	80
Geschwindigkeit	80
Zeit	180
Druck	200

### ▪ TAG DER INJEKTION UND ICSI

Nach der Präparation der Kumulus-Eizell-Komplexe um 9<sup>30</sup> wurden die Eizellen mit einer Hyaluronidase-Behandlung (300 µg/ml) in M2-Medium ohne BSA und 1% PVP von den Kumulus-Zellen befreit. Die Injektion der siRNAs gegen Tet1-3 und der „scrambled“-Kontroll-siRNA (Sequenzen siehe Tab. 2.2) erfolgte nach den Anweisungen von Okada *et al.*, 2010. Dabei wurden je 2 µM konzentrierte siRNAs mit Dextran-Tetramethyl-Rhodamin (zur Kontrolle der Injektion) in Eizellen und Zygoten ko-injiziert. Dazu wurden etwa 10 Eizellen pro Durchgang im Fluoreszenzmikroskop in einem M2-1% PVP Tropfen platziert. Mit einer Halterkapillare wurden einzelne Eizellen angesaugt und mit der selbsterstellten Injektionsnadel injiziert. Für die Injektion wurde der Femtojet der Firma Eppendorf verwendet und je nach Beschaffenheit der Injektionsnadel ein möglichst geringer Injektionsdruck ausgeübt, um die Eizellen nicht zu gefährden. Die injizierten Eizellen wurden anschließend in 400 µl äquilibriertes, modifiziertes KSOM überführt und bis zur Befruchtung mittels ICSI für 8 h in Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft für eine effiziente RNAi inkubiert.

Nach 6 h Inkubation wurde das Fluoreszenzmikroskop für die ICSI vorbereitet. Dafür wurden speziell angefertigte ICSI-Kapillaren (Borosilikat-Glasröhrchen, GC100T-15) angebracht, die zuvor im Sutter Puller (boxed Filament) mit folgenden Parametern erstellt wurden:

Temperatur	Ramp-Test + 5
Zugkraft	100
Geschwindigkeit	100
Zeit	50
Druck	400

Diese ICSI-Kapillaren wurden nach einem kurzem Waschschrift mit Flusssäure und Isopropanol anschließend in der Mikroschmiede so bearbeitet, dass sie ein gebogenes und sehr scharfes, glattes Ende mit ~4 µm Innendurchmesser aufwiesen. Das Ende der ICSI-Kapillare wurde daraufhin mit Quecksilber etwa 1 cm lang aufgefüllt. Nach der Installation der ICSI-Kapillare am Eppendorf-Manipulator wurde die reibungslose Beweglichkeit des Quecksilbers getestet, um eine erfolgreiche ICSI zu gewährleisten.

Etwa 45 min vor der ICSI (~18<sup>15</sup>) wurden die Spermien isoliert und für ~45 min in 400µl KSOM (mit BSA) kapazitiert. Anschließend wurden 50 µl Spermienlösung mit 50 µl 12% PVP in PBS in einer sterilen Spritze mit spitzer Nadel resuspendiert. 1 µl dieser gescherten Spermienlösung wurde in einen 5 µl Tropfen mit 12% PVP in PBS gegeben.

Die mit den siRNA injizierten Eizellen wurden nach 8 h Inkubation (~19<sup>00</sup>) einmal in M2 mit 1% PVP gewaschen und in kleinen Gruppen nach Standardprozedur durch ICSI befruchtet (siehe Nagy, 2003; Yoshida *et al.*, 2007). Dabei erfolgte das Durchbohren der *Zona pellucida* und des Oolemma mit der ICSI-Kapillare durch möglichst wenige und schwache Impulse des Piezo-Drills, um die Eizelle nicht zu beschädigen. Nach der Injektion eines

Spermienkopfes in das Zytoplasma der Eizelle wurden die daraus hervorgehenden Zygoten bis zur Fixierung im gewünschten Entwicklungsstadium im Inkubator bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft kultiviert.

### 2.2.9 MODIFIZIERTER NICK-TRANSLATIONS-TEST

Zum Nachweis von DNA Einzelstrangbrüchen wurde der modifizierte Nick-Translations-Test an Zygoten angewendet. Dabei wurden *in vitro* befruchtete Zygoten in M2-Medium gewaschen und mit 0.2% Triton X-100 in PBS für 1 min bei RT permeabilisiert und einem milden Chromatin Dekondensationsschritt ausgesetzt. In diesem Schritt wurden die Zygoten mit M2-Medium für 20 min bei 37°C inkubiert, welches 0.3 mM Spermin, 2.5 mM Spermidin und 1 mg/ml Heparin enthielt. Nach einer PFA-Fixierung wurden die Zygoten zweimal mit NEB2 Puffer (New England Biolabs) mit BSA für 30 min bei RT gewaschen. Als Positiv-Kontrolle wurden fixierte Zygoten mit DNaseI (0.5 µg/100µl) für 10 min bei RT behandelt. Anschließend wurden die Zygoten mit dem Nick-Translationsmix (siehe Abschnitt 2.1.7) für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion von eingebautem EdCTP wurde mit dem „Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit“ von Invitrogen durchgeführt. Das EdCTP wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michal Hocek, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Tschechische Republik synthetisiert.

### 2.2.10 AUTORADIOGRAPHIE VON RADIOAKTIV MARKIERTEM

#### DESOXYCYTIDINTRIPHOSPHAT IN PRÄIMPLANTATIONSEMBRYONEN

Zur Detektion von radioaktiv markiertem Desoxycytidintriphosphat im paternalen Pronukleus der Mauszygote, welches über mögliche Reparaturwege der aktiven DNA Demethylierung in das Genom inkorporiert werden könnte, wurden autoradiographische Verfahren mit Hilfe einer flüssigen Fotoemulsion angewandt.

Dazu wurden die *in vitro* befruchteten Eizellen kurz nach der Befruchtung (2 hpf) zunächst mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (~9,5 MBq) im Kulturmedium in einem Inkubator im Radioaktivlabor bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zygoten oder 2-Zell Embryonen mehrmals mit M2-Medium gewaschen und anschließend nach der Entfernung der *Zona pellucida* mit einer 3.7%igen PFA-Lösung in PBS fixiert. Nach einer Permeabilisierung der fixierten Embryonen wurden diese auf silanisierte Objektträger pipettiert und für 5 min mit eiskaltem Methanol beträufelt. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die auf den Objektträger fixierten Embryonen in der Dunkelkammer mit der bei 43°C erwärmten, zähflüssigen Fotoemulsion durch Eintauchen überschichtet. Nach 24 h bei 4°C im Dunkeln wurden die Objektträger für 4 min im Entwicklungsbad, 30 sec in dest. Wasser und 8 Minuten im Fixierbad behandelt. Zur Anfärbung der DNA wurden Objektträger nach einen Waschschriff mit dest. Wasser mit einem Mounting-Medium Vectashield mit DAPI für 10 min inkubiert. Die Analyse der durch

die Radioaktivität schwarzgefärbten Silberkörnchen der Fotoemulsion erfolgte im invertierten Fluoreszenzmikroskop.

Da die zähflüssige Eigenschaft der auf einer Gelatine-Basis bestehenden Fotoemulsion ein Eindringen in die Zygoten und die 2-Zell Embryonen verhinderte, wurden die paternalen und maternalen Pronuklei der *in vitro* befruchteten Zygoten durch Mikromanipulation operativ entnommen und auf einem silanisierten Objektträger fixiert. Dazu wurden die Zygoten nach der Inkubation mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP ab 2 hpf in ein Kulturmedium mit Cytochalasin B (5  $\mu$ g/ml), Demecolcin (20x) bzw. Nocodazol (2  $\mu$ g/ml) und einer 1:200 Verdünnung von Hoechst 33342 für 30 min inkubiert. Nach 10x Waschen in M2-Medium wurden die Zygoten durch selbst erstellte ICSI-Kapillaren (siehe Kapitel 2.2.8) enukleiert. Die autoradiographische Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

Um einer möglichen Metabolisierung des [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP zu umgehen (siehe Ergebnisteil) wurden *in vitro* befruchtete Zygoten als nächstes mit  $^{14}$ C-dCTP (~2MBq) inkubiert. Anstelle einer PFA-Fixierung oder der operativen Entnahme der elterlichen Pronuklei wurden die Zygoten mit der Tarkowski-Methode auf den Objektträgern fixiert (verändert nach Tarkowski, 1966). Hierzu wurden die Zygoten mehrmals mit M2-Medium gewaschen, die *Zona pellucida* mit Ac. Tyrode's entfernt und in einer 0,001 N HCl in 0,1% Tween 20 in Wasser auf den silanisierten Objektträger transferiert. Durch mehrere Tropfen eiskalter Methanol:Essigsäure Lösung (3:1) wurden die DNA der Zygoten auf dem Objektträger fixiert und sonstige Bestandteile entfernt. Die autoradiographische Analyse mit der Fotoemulsion erfolgte wie beschrieben. Dabei wurden hier die Objektträger bis zur Entwicklung des Fotofilms 2 Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### 2.2.11 RNA ISOLATION VON OOZYTEN UND RT-PCR

Zur Analyse der Existenz von Tet Transkripten in reifen Eizellen wurden von Eizellen (n=20, F<sub>1</sub>(C57BL/6 $\times$ DBA)) die mRNA isoliert und mittels RT-PCR auf Tet1-3 Transkription überprüft.

#### 2.2.11.1.1 RNA ISOLATION

Dazu wurden die von superovulierten Weibchen isolierten Eizellen in einem möglichst geringen Volumen mit M2-Medium gesammelt und mit 30  $\mu$ l Lysis Puffer für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l Dynabeads Oligo-dT und 10 min Inkubation bei RT durch sanftes Schütteln wurden die magnetischen Kügelchen im Magnetständer vom Überstand getrennt. Danach wurden die Dynabeads 1x mit 100  $\mu$ l Waschpuffer I und 3x mit 100  $\mu$ l Waschpuffer II gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit 11  $\mu$ l DEPC Wasser bei 65°C für 2 min.

#### 2.2.11.1.2 REVERSE TRANSKRIPTION (RT)

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit folgendem Reaktionsansatz mit den Reagenzien der Firma Promega:

5 µl	RNA
4 µl	Reaktionspuffer (5x)
3 µl	dNTP's (10 mM je)
0.2 µl	Random Primer (500 ng/µl)
0.4 µl	RNAsin
0.75 µl	M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 20 µl	Aqua bidest

Vor Zugabe der RNA wurde diese für 10 min bei 70°C inkubiert. Die RT-Reaktion wurde für 1.5 h bei 37°C inbubiert. Als Kontrolle dienten jeweils ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT minus Kontrolle) und ein Ansatz aller eingesetzten Reagenzien ohne RNA (Wasserkontrolle).

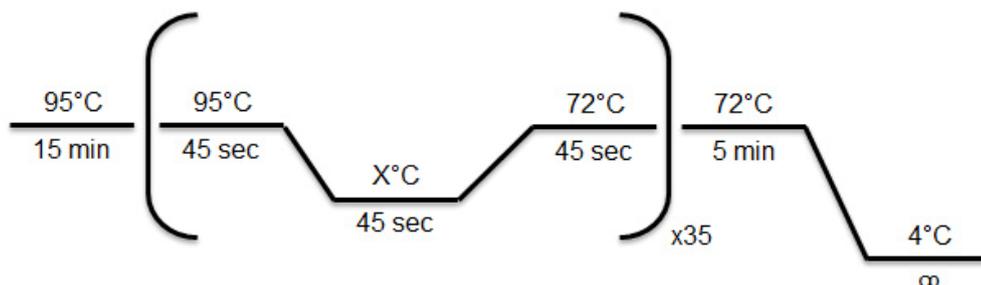
### 2.2.11.1.3 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

Zur Amplifikation und semiquantitativen Bestimmung der Tet Transkripte in reifen Mauseizellen wurde die cDNA mit Primern für Tet1-3 und Polr2a als Haushaltsgen durchgeführt. Dafür wurden folgende Reaktionsansätze pipettiert:

PCR Ansatz:

2 µl	PCR-Puffer B (10x)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0.4 µl	dNTPs (10 mM je)
0.6 µl	Vorwärts-Primer (10 µM)
0.6 µl	Rückwärts-Primer (10 µM)
0.5 µl	HotFire DNA Polymerase
1 µl	Templat / Wasser
ad 20 µl	Aqua bidest.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:



Die Annealing-Temperatur X betrug für Tet1-Primer 51.4°C, für Tet2-Primer 55.5°C, für Tet3-Primer 58,1°C und für Polr2a-Primer 58.1°C.

### 2.2.11.1.4 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER PCR-PRODUKTE

Die Größenauffrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1.5%igem TAE-Agarosegel in einer Gelelektrophorese-Kammer. Dazu wurden 7 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch (50 V) aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten PCR-Produkte wurde ein Längenstandard auf dem gleichen Agarosegel aufgetrennt. Nach anschließender Färbung der DNA im Ethidiumbromid-Färbebad erfolgte die Bildaufnahme unter UV-Licht in der Geldokumentationskammer.

## 2.2.12 BIOINFORMATISCHE ANALYSEN

### 2.2.12.1.1 DATENBANKENRECHERCHE UND ONLINETOOLS

Folgende Datenbanken und Onlinetools wurden für die Erstellung dieser Arbeit herangezogen:

- NCBI-Datenbank zur Sequenzanalyse von Tet1-3 mRNA, BLAST-Suche und Literaturrecherche
- USCS-Genome-Browser zur Sequenzanalyse von Tet1-3 mRNA
- Antikörper-Online Datenbank zur Antikörper-Suche (<http://www.antikoerper-online.de>)
- „siRNA Selection Program“ vom Whitehead Institute, Boston, USA zum Entwurf der siRNAs (Yuan *et al.*, 2004, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>)
- „Scramble siRNA“ von InvivoGen zum Entwurf der scrambled siRNA (<http://www.sirnazizard.com/scrambled.php>)

### 2.2.12.1.2 *IN SILICO* ENTWURF VON siRNAs GEGEN TET PROTEINE

Die Sequenzen für die in dieser Studie benutzten siRNAs gegen Tet1-3 wurden teilweise aus der Literatur entnommen und teilweise mit dem „siRNA Selection Program“ entworfen. Für den Knockdown von Tet1 und Tet2 wurden je eine siRNA aus der Publikation von Ito *et al.* (2010) verwendet (Ito *et al.*, 2010). Für Tet3 war zum Zeitpunkt dieser Studie keine veröffentlichte siRNA bekannt. Als Kriterium für den *in silico* Entwurf der siRNAs mit dem „siRNA Selection Program“ wurden die empfohlenen Vorgaben von der Laborhomepage von Thomas Tuschl (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) verwendet. Dabei wurde als bevorzugte Basenabfolge der siRNAs das Muster „N2[CG]N8[AUT]N8[AUT]N2“ mit dTdT an den überhängenden 3'-Enden der Sense- und Antisense-Stränge der 23 bp langen siRNA verwendet. Der GC-Gehalt sollte zwischen 30-52% liegen. In der anschließenden Auswahlliste möglicher siRNAs wurden jene mit möglichst niedrigem thermodynamischen Wert und mit komplementärer Zielsequenz zur kodierenden Region im 3'-Bereich der jeweiligen mRNA bevorzugt ausgewählt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die

ausgewählte siRNAs keine andere Zielsequenzen mit gleicher Basenabfolge besitzen. Für das Design der „scrambled siRNA“, welche eine identische Basenpaarzusammensetzung wie die siRNA von Tet3 besitzt, wurde das „Scramble siRNA“ Onlinetool benutzt. Dieses Tool erstellt eine siRNA mit gleichem Basenpaargehalt, jedoch ohne komplementäre mRNA des jeweiligen Zielorganismus.

### 2.2.12.1.3 SOFTWARE

In dieser Arbeit wurde für die Auswertung der Ergebnisse das Microsoft Office Paket 2003 und 2010 benutzt. Für die Bedienung des Fluoreszenzmikroskops, der Bildaufnahme und der Verrechnung von Z-Stapeln wurde die AxioVision-Software der Firma Zeiss verwendet. Das Primer-Design erfolgte mit der Oligo 6 Software. Für die Quantifizierung von Antikörpersignalen wurde die ImageJ-Software verwendet.

## 2.2.13 STATISTIK

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit der Software von Excel™ (Microsoft) durchgeführt. Der arithmetische Mittelwert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} = m; X = \text{Messwert}; n = \text{Probenzahl}$$

Zur Berechnung der 5mC- und 5hmC-Signale wurden die mit ImageJ ermittelten integralen Signalintensitäten von 5mC- und 5hmC-Signalen in paternalen und maternalen Pronuklei mit dem jeweiligen DNA-Antikörpersignal normalisiert und das arithmetische Mittel gebildet. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte nach folgender Formel:

$$\sqrt{\sum \frac{(X - \bar{X})^2}{(n - 1)}}; X = \text{Messwert}, n = \text{Probenzahl}$$

Für den Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpersignalen verschiedener PN-Stadien wurde zunächst durch einen F-Test überprüft, ob die Varianzen beider Stichprobenmengen signifikant unterschiedlich sind. Der F-Test wurde nach folgender Formel mit Excel berechnet:

$$F = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2}$$

Bei  $P < 0.05$  im F-Test wurden ungleiche Varianzen angenommen und ein Zweistichproben T-Test nach Student mit ungleichen Varianzen mit Excel durchgeführt. Dabei wurde für „Matrix 1“ und „Matrix 2“ die jeweilige Datenreihe an Antikörpersignalen verwendet. Als „Seitenzahl“ wurde die Zahl 2 für einen zweiseitigen Test benutzt und der Typ wurde mit 3 für zwei Stichproben und ungleiche Varianz angegeben.

Bei  $P \geq 0.05$  im F-Test wurden gleiche Varianzen beider Stichprobenmengen angenommen und ein Zweistichproben T-Test nach Student mit gleichen Varianzen mit Excel

durchgeführt. Hier wurden ebenfalls für beide Matrizes die beiden Datenreihen mit Antikörpersignalen angegeben und ein zweiseitiger Test mit Seitenzahl 2 verwendet. Als Typ wurde in diesem Fall 2 für zwei Stichproben mit gleicher Varianz angegeben. Die Signifikanzgrenzen wurden von \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  und \*\*\* =  $p < 0.001$  definiert.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 DYNAMIK DER DNA DEMETHYLIERUNG IN DER MAUSZYGOTE

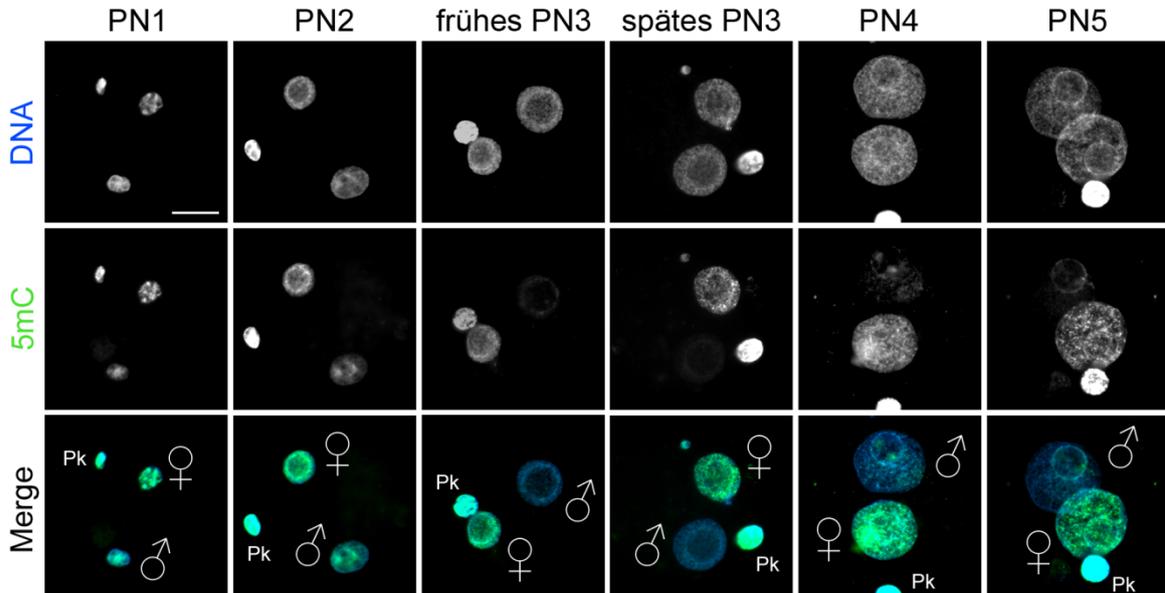
Die DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus der Mauszygote wurde anhand von Immunfluoreszenzanalysen (IF-Analysen) mit 5mC-Antikörpern gezeigt (Mayer *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). Der frühe und nahezu komplette Verlust des 5mC-Signals des paternalen Pronukleus suggeriert eine aktive, genomweite Demethylierung des paternalen Genoms. In der darauffolgenden Entwicklung von Präimplantationsembryonen wurde eine schrittweise Abnahme des 5mC-Signals bis zum Morula-Stadium festgestellt, welches auf das Fehlen der Erhaltungsmethylierung zurückgeführt wird und daher als Phase der passiven DNA Demethylierung bezeichnet wird (Rougier *et al.*, 1998; Bestor, 2000; Santos *et al.*, 2004). In diesem Kapitel wird zunächst die Dynamik des 5mC-Signals im paternalen und maternalen Genom der Zygote näher betrachtet.

#### 3.1.1 5-METHYL-CYTOSIN IMMUNFLUORESCENZANALYSE IN MAUSZYGOTEN

Die in der Veröffentlichung von Santos *et al.* (2002) gezeigte Dynamik des 5mC-Antikörpersignals im paternalen Pronukleus von *in vitro* befruchteten Mauszygoten deutet auf eine genomweite Demethylierung des paternalen Genoms bereits im PN3 Stadium (siehe Abb. 1.8 und Santos *et al.*, 2002). Das maternale Genom hingegen zeigte in dieser Veröffentlichung keinen sichtlich erkennbaren Verlust von 5mC-Signal in der sich entwickelnden Zygote.

Um diese geschlechterspezifische Dynamik der DNA Demethylierung in der Zygote näher zu bestimmen, wurde zunächst der dynamische Verlust von 5mC-Antikörpersignal in paternalen und maternalen Pronuklei genauer untersucht. Zudem sollte hierdurch die Dynamik der DNA Demethylierung von Zygoten mit den in dieser Arbeit benutzten Mausstämmen ( $F_1(C57BL/6 \times DBA)$  und  $F_1(C57BL/6 \times CBA)$  Männchen und Weibchen) bestimmt werden, da unveröffentlichte Beobachtungen leichte Schwankungen in der dynamischen DNA Demethylierung der Zygote in Abhängigkeit des benutzten Mausstammes festgestellt haben (persönliche Kommunikation Dr. Fatima Santos und Prof. Dr. Jörn Walter). Für diese Analyse wurde anstelle eines herkömmlichen, interkalierenden DNA Fluorophors ein DNA-Antikörper verwendet, welcher eine Optimierung der Denaturierungsbedingungen für den 5mC-Antikörper ermöglichte (siehe Methodenteil, Abschnitt 2.2.7.1). Das Ergebnis dieser IF-Analyse von *in vitro* befruchteten Zygoten ist in Abb. 3.1 dargestellt. Dabei wurden in dieser Arbeit keine qualitativen Unterschiede in der Dynamik der DNA Demethylierung zwischen beiden benutzten Mausstämmen festgestellt. Aufgrund der höheren Anzahl von Eizellen superovulierter  $F_1(C57BL/6 \times DBA)$  Weibchen wurden für die weiteren Analysen

dieser Mausstamm bevorzugt verwendet. Der Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus ist bereits im frühen PN3 deutlich zu erkennen. In den darauf folgenden Entwicklungsstadien PN4 und PN5 kann das paternale 5mC-Signal im perizentromerischen Heterochromatin, welches die „nucleolar precursor bodies“ (NPBs, engl. für die Vorläufer von Nukleolis) umgibt, detektiert werden. Der maternale Pronukleus hingegen zeigt ein durchgehend starkes 5mC-Signal.



**Abb. 3.1 | Verlust des 5mC-Antikörpersignals im paternalen Pronukleus der Zygote mit optimierten Denaturierungsbedingungen.** Gezeigt sind repräsentative Beispiele von *in vitro* befruchteten Mauszygoten, die zu bestimmten pronukleären Stadien fixiert und durch 15 min 4 N HCl-Behandlung denaturiert wurden. Anschließend wurden die Embryonen mit 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und DNA-Antikörpern (blau) durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Dabei wurden in allen pronukleären Stadien der Zygote die gleichen Belichtungszeiten für das jeweilige 5mC- und DNA-Signal benutzt. Bereits im PN2-Stadium zeigt der paternale Pronukleus deutlich weniger 5mC-Signal als der maternale, während im frühen PN3-Stadium das 5mC-Signal des paternalen Pronukleus kaum noch zu erkennen ist. In diesem und in späteren Stadien kann das paternale 5mC-Signal im perizentromerischen Heterochromatin, welches die NPBs umgibt, detektiert werden.  $N > 20$  pro PN-Stadium, ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$  (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).

### 3.1.2 DYNAMISCHER VERLUST VON 5mC-ANTIKÖRPERSIGNAL IN

#### PATERNALEN UND MATERNALEN PRONUKLEI DER MAUSZYGOTE

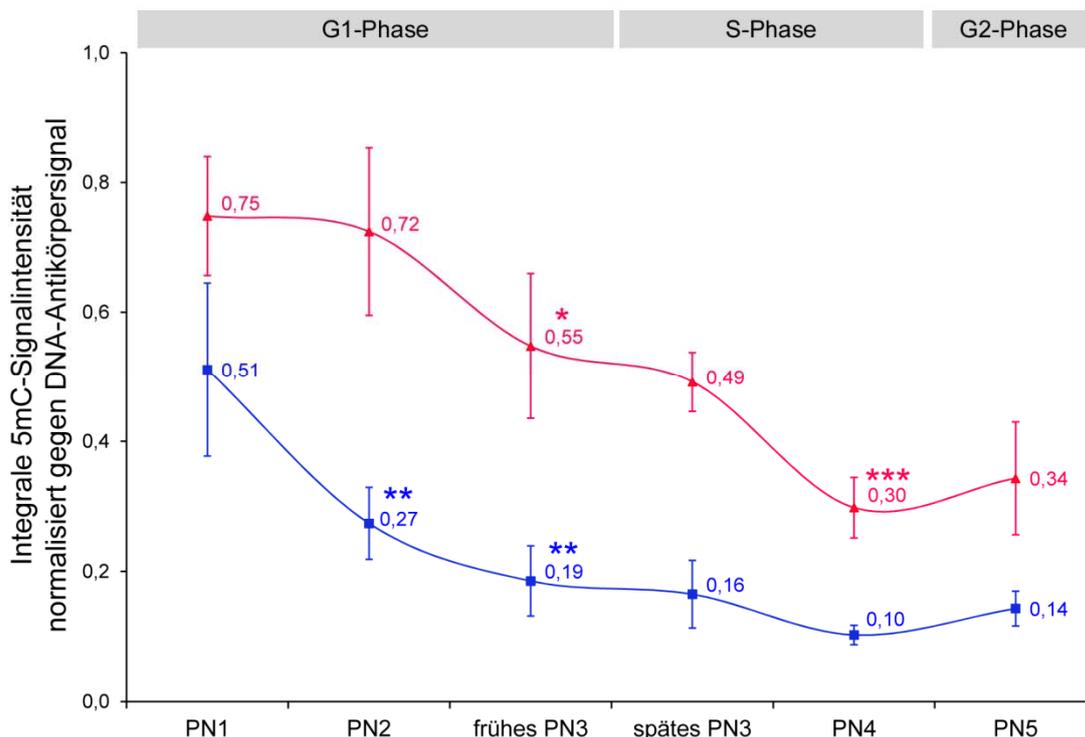
Als nächstes wurde der Versuch unternommen, die Dynamik des 5mC-Signals in paternalen und maternalen Pronuklei der sich entwickelnden Zygote genauer zu bestimmen. Eine genaue Aussage über die die Geschwindigkeit und den Umfang des Verlusts von 5mC-Signals in beiden parentalen Pronuklei ist mit mehreren Schwierigkeiten verbunden. Während der Reifung der Zygote gewinnen sowohl der paternale als auch der maternale Pronukleus im Zuge steigender Dekondensation erheblich an Volumen (siehe Abb. 3.1). Dadurch ist ein

Vergleich des 5mC-Signals von Zygoten in der G1-Phase (PN1 bis frühe PN3) mit Zygoten in der G2-Phase (PN5) nicht einfach. Zudem erfährt der paternale Pronukleus zumeist eine größere Volumenänderung als der maternale, welches den direkten Vergleich beider elterlichen Pronuklei in der gleichen Zygote erschweren kann. Diese Volumenänderung der Pronuklei könnte zur Folge haben, dass die 5mC-Antikörper erleichterte bzw. erschwerte Zugänglichkeiten zu ihrem Epitop haben und sich dadurch in Abhängigkeit von der Größe des jeweiligen Pronukleus eine Befangenheit in der Aussagekraft des Signals ergeben könnte. Darüber hinaus gibt das menschliche Auge eine subjektive Wahrnehmung der verschiedenen Farbintensitäten wieder, welches eine objektive Aussage über einen dynamischen Signalverlust erschwert.

Die Quantifizierung des 5mC-Antikörpersignals des paternalen und maternalen Pronukleus in der Zygote mittels objektiver, softwaregestützter Analyse der verschiedenen Signalintensitäten kann die Dynamik des 5mC-Antikörpersignals unabhängig vom subjektiven, visuellen Eindruck darlegen. Dabei werden die integralen Signalstärken des Fluorophor-Signals ermittelt. Unter Annahme einer linearen Abhängigkeit von Größe und Signalintensität kann hierdurch eine verfälschte Aussage über zu vergleichende Signalstärken von sich entwickelnden Pronuklei vermieden oder zumindest vermindert werden. Die Benutzung von Antikörpern zur Detektion des DNA-Signals bietet zudem die Möglichkeit, das 5mC-Signal gegen ein DNA-Antikörpersignal normalisieren zu können. Hierbei werden die Signale zweier Antikörper verglichen, die beide einzelsträngige DNA zur Erkennung ihres Epitops und damit gleiche Denaturierungsbedingungen benötigen. Durch den Vergleich der beiden Antikörpersignale ist es möglich, eine unverfälschte Aussage über das 5mC-Signal verschiedener Pronuklei zu treffen, ohne auf das Problem der Zugänglichkeit des 5mC-Antikörpers zu seinem Epitop eingehen zu müssen. Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Vergleich von Immunfluoreszenzen zweier Embryonen sind die Bedingungen während der Aufnahme des Antikörpersignals. Um zum Beispiel das 5mC-Signal eines Pronukleus einer Zygote im PN1-Entwicklungsstadium mit dem einer Zygote im PN5-Stadium vergleichen zu können, müssen die Belichtungszeiten für das 5mC- und das DNA-Signal in beiden Embryonen gleich sein. Nur dann kann eine zuverlässige Aussage über die Dynamik des 5mC-Signals gemacht werden. Eine weitere wichtige Bedingung der Bildaufnahme ist die Verwendung von Z-Stapeln anstelle von Aufnahmen in nur einer Z-Ebene. Die Berechnung des Antikörpersignals unter Berücksichtigung aller Signale in der Z-Ebene einzelner Pronuklei gewährleistet, dass die räumliche Orientierung beider Pronuklei im fixierten Embryo das Ergebnis der anschließenden Quantifizierung nicht beeinträchtigt.

In Abb. 3.2 ist die Quantifizierung des 5mC-Signals normalisiert gegen DNA Antikörpersignal von paternalen und maternalen Pronuklei der reifenden Zygote gezeigt. Bereits kurz nach der Befruchtung ist das 5mC-Signal im paternalen Pronukleus im PN1-Stadium deutlich schwächer als das maternale Signal. In der weiteren G1-Phase von PN1- bis zum frühen PN3-Stadium zeigt der paternale Pronukleus den größten Verlust von 5mC-Signal (62.7%), während in den darauffolgenden Zellzyklusphasen keine signifikante Änderung

mehr erfolgt. Insgesamt verliert der paternale Pronukleus vom PN1- bis PN5-Stadium 72.5% an Signalintensität (Auf die Bestimmung des Zellzyklus wird in Kapitel 3.1.3 eingegangen). Der maternale Pronukleus hingegen verliert kontinuierlich an 5mC-Signalstärke. Dies wird nur dann offensichtlich, wenn das 5mC-Signal gegen das entsprechende DNA-Signal und normalisiert wird, wohingegen das menschliche Auge subjektiv einen anderen Eindruck vermittelt (vergleiche Abb. 3.1). In der späten G1-Phase verliert das maternale 5mC-Signal 26.7% an Intensität, welches in der darauf folgenden S- und G2-Phase eine weitere Reduktion erfährt. Damit verliert der maternale Pronukleus 54.7% an 5mC-Signalintensität während der Entwicklung der Zygote bis zur G2-Phase.

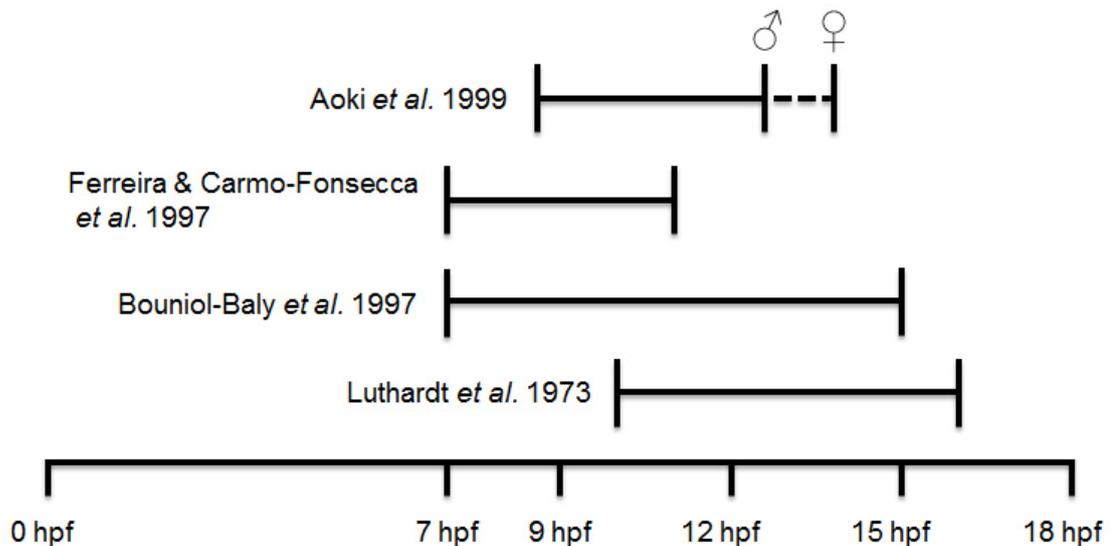


**Abb. 3.2 | Quantifizierung des 5mC-Signals paternaler und maternaler Pronuklei der Mauszygote.** Die integrale Signalstärke des 5mC-Signals paternaler (blaue Linie) und maternaler (rote Linie) Pronuklei (siehe Abb. 3.1) normalisiert gegen das jeweilige DNA-Antikörpersignal zeigt den Verlust von 5mC-Signal von *in vitro* befruchteten Mauszygoten. Der paternale Pronukleus verliert bereits in der G1-Phase erheblich an 5mC-Signal, während das maternale 5mC-Signal stetig an Intensität verliert. Die Bestimmung des Zellzyklus erfolgte anhand der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3. Für diese Quantifizierung wurden 3 bis 9 Embryonen von 2 bis 3 IVF Experimenten pro PN-Stadium analysiert (siehe Anhang, Tab. 8.1). Sterne zeigen signifikante Änderungen gemäß Student T-Test (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ) und Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (Wossidlo *et al.*, 2010, verändert).

### 3.1.3 BESTIMMUNG DER S-PHASE IN DER MAUSZYGOTE

Die passive DNA Demethylierung vom 2-Zell Embryo bis zur Morula durch die fehlende Erhaltungsmethylierung durch Dnmt1 ist abhängig von der DNA Replikation (Rougier *et al.*, 1998; Bestor, 2000). Da der Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus der Zygote bereits wenige Stunden nach der Befruchtung der Eizelle erfolgt, wurde dieser Vorgang als

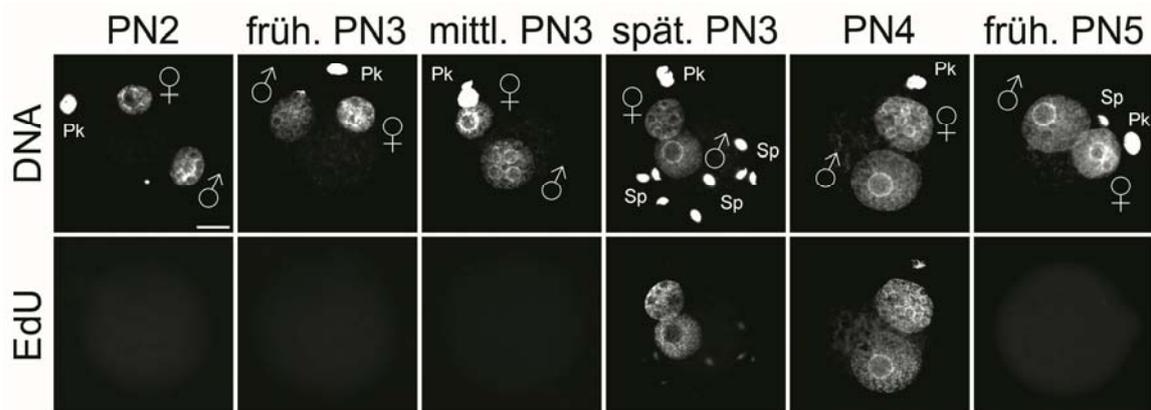
replikationsunabhängig und daher als „aktive DNA Demethylierung“ bezeichnet (Mayer *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). Um diesen Verlust von 5mC-Signal in Abhängigkeit zur Entwicklungsstufe der reifenden Zygote genauer zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang von DNA Demethylierung und DNA Replikation näher zu analysieren, ist es erforderlich, die einzelnen PN-Stadien der Zygote den jeweiligen Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2-Phase) zuordnen zu können. Dies kann durch die Bestimmung des genauen Start- und Endpunkts der DNA Replikation (S-Phase) der Zygote durch die Verwendung von markierten Nukleotiden erfolgen. Der Einbau dieser Nukleotide in das Genom kann anschließend auf verschiedene Weise detektiert werden. In der Literatur werden der Beginn und das Ende der S-Phase in der Mauszygote kontrovers diskutiert (siehe Abb. 3.3).



**Abb. 3.3 | Beginn und Dauer der S-Phase von Mauszygoten werden in der Literatur kontrovers diskutiert.** Gezeigt sind der Beginn und die Dauer der DNA Replikation von Mauszygoten nach Befruchtung der Eizelle veröffentlicht in Luthardt *et al.* (1973), Bouniol-Baly *et al.* (1997), Ferreira *et al.* (1997) und Aoki *et al.* (1999). Dabei wurden in diesen Studien unterschiedliche Befruchtungsmethoden (natürliche Verpaarung oder *in vitro* Befruchtung), unterschiedlich markierte Nukleotide und verschiedene Detektionsmethoden benutzt.

Anscheinend führt die Analyse der zeitlichen Bestimmung der S-Phase von Mauszygoten in den zuvor veröffentlichten Studien in Abhängigkeit der Befruchtungsmethode (natürliche Verpaarung oder *in vitro* Befruchtung von Eizellen superovulierter Weibchen), des verwendeten markierten Nukleotids und der Detektionsmethode zu verschiedenen Ergebnissen. Da in dieser Arbeit hauptsächlich Zygoten von *in vitro* befruchteten Eizellen analysiert wurden und eine genaue Charakterisierung des Zellzyklus für die Interpretation verschiedener Stoffwechselwege und biochemischer Prozesse in Zusammenhang mit der aktiven DNA Demethylierung zwingend notwendig ist, wurde zunächst der Beginn und das Ende der DNA Replikation von *in vitro* befruchteten Mauszygoten mit dem in dieser Studie benutzten Stammhintergrund (F1(C57Bl/6xCBA) Männchen und Weibchen) und der vor Ort benutzten IVF-Technik genauer untersucht.

Dazu wurden neben dem herkömmlich verwendeten Nukleotid BrdU auch die markierten Nukleotide 5-Ethynyl-Desoxyuridin (EdU) oder 5-Ethynyl-Desoxycytidin (EdC) benutzt. Die Verwendung von EdU und EdC zur Bestimmung der S-Phase bieten im Unterschied zu BrdU den Vorteil, dass die Detektion im Genom keine Denaturierung benötigt, welche eine weitere Analyse der gleichen Probe von beispielsweise Histonmodifikationen oder anderen Zellzyklusmarkern erschweren bzw. verhindern kann. Die Detektion der inkorporierten Nukleotide EdU oder EdC erfolgte über eine „Click-iT“ Reaktion, wodurch ein Fluorophor kovalent über eine Azid-Gruppe an die Ethynyl-Gruppe des EdU gebunden wird, welches in einer mehrfach höheren Sensitivität gegenüber der herkömmlichen BrdU-Methode resultiert (siehe Click-iT-Detektion, Invitrogen). Zur genauen zeitlichen Bestimmung des Anfangs und Ende der DNA Replikation wurden *in vitro* befruchtete Mauszygoten 30 min vor der Fixierung zu bestimmten PN-Stadien mit EdU oder EdC inkubiert („Pulse Labelling“) und deren Einbau ins Genom der Zygote mittels Click-iT Reaktion analysiert. Abb. 3.4 zeigt beispielhaft den dynamischen Einbau von EdU in das Genom der Mauszygote – für EdC wurden die gleichen Resultate erzielt.



**Abb. 3.4 | Bestimmung der S-Phase von Mauszygoten durch „Pulse Labelling“ mit EdU.** Gezeigt sind repräsentative Beispiele von *in vitro* befruchteten Zygoten, die jeweils 30 min vor der Fixierung zu definierten PN-Stadien mit 5-Ethynyl-Desoxyuridin (EdU) inkubiert wurden. Der Einbau von EdU wurde mittels Click-iT Reaktion mit einem Fluorophor detektiert. Beide elterlichen Pronuklei zeigen den Einbau des markierten Nukleotides erst im späten PN3-Stadium (8,5 hpf) und bereits im frühen PN5-Stadium (12,5 hpf) ist die Replikation der elterlichen Genome abgeschlossen. Damit beträgt die S-Phase von *in vitro* befruchteten Zygoten nicht mehr als vier Stunden.  $N > 10$  pro PN-Stadium; mindestens drei unabhängige IVFs pro PN-Stadium; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Sp = Spermium, Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$  (Wossidlo *et al.*, 2010, verändert).

Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl der paternale als auch der maternale Pronukleus die markierten Nukleotide synchron im späten PN3-Stadium (8,5 hpf) in Ihr Genom integrieren. Zudem konnte bereits im frühen PN5-Stadium (12,5 hpf) kein Einbau von markierten Nukleotiden detektiert werden, welches auf den Beginn der G2-Zellzyklusphase hindeutet. Damit erfolgt die DNA-Replikation von *in vitro* befruchteten Mauszygoten mit dem in dieser Studie benutzen Stammhintergrund und verwendeten IVF-Methode in einem

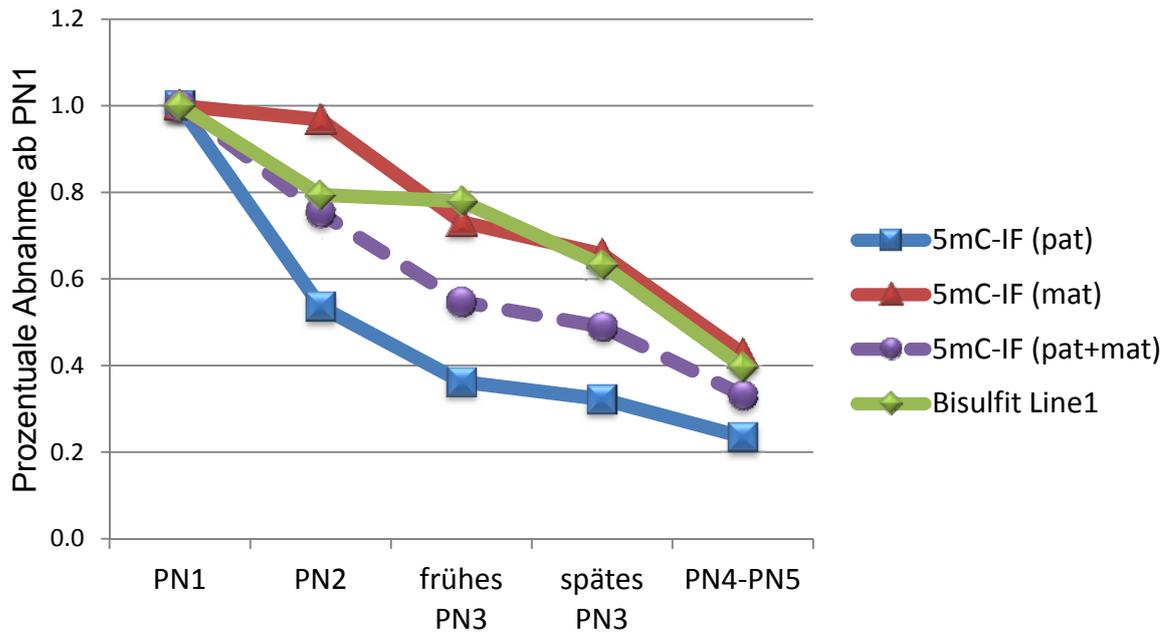
sehr kurzen Zeitraum von etwa vier Stunden vom späten PN3- bis einschließlich PN4-Stadium.

Der Vergleich des dynamischen Verlusts von 5mC-Antikörpersignal des paternalen Pronukleus mit dem Zellzyklus von *in vitro* befruchteten Eizellen macht deutlich, dass die DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus der Mauszygote ein aktiver, replikationsunabhängiger Vorgang ist, der bereits vor Beginn der DNA Replikation der Zygote zum nahezu kompletten Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus führt (siehe Abb. 3.2).

### 3.1.4 UNTERSCHIEDE IN DER DYNAMIK DER DNA-DEMETHYLIERUNG DURCH DIE 5mC-IMMUNFLUORESZENZANALYSE UND BISULFIT- SEQUENZIERUNG

Um das Ausmaß der DNA Demethylierung in der Zygote auch molekular zu erfassen wurde neben eingehenden 5mC-Antikörper IF-Analysen die DNA Methylierung auch mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Entgegen früherer Versuche wurden dazu Zygoten zu bestimmten Stadien gesammelt und die DNA Demethylierung repetitiver Sequenzen entlang der Entwicklungsstadien verfolgt. Analog zu früheren Experiment konnte in der Tat in G2 Zygoten (PN4-5) eine deutliche Reduktion der Gesamt-Methylierung an Line 1 Elementen festgestellt werden (Wossidlo *et al.*, 2010, siehe auch Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Die detaillierte Auswertung der einzelnen pronukleären Stadien zeigt jedoch bemerkenswerte neue Aspekte in der Dynamik der DNA Demethylierung von Line1 Elementen (siehe Abb. 3.5, grüne Linie und originale Daten in Wossidlo *et al.*, 2010); diese Sequenzierungen wurden von Frau Julia Arand, einer Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter, durchgeführt). Kurz nach der Befruchtung der Zygote ist eine erste Phase der Demethylierung während der (späten) G1-Phase und eine ausgeprägtere zweite während der S-Phase zu beobachten.

Der Vergleich der Dynamik der DNA Demethylierung von Line1 Elementen mit den Daten der Immunfluoreszenzanalyse zeigt deutliche Unterschiede auf. Dem schnellen Verlust des Antikörpersignals im frühen PN3-Stadium steht eine eher moderate Reduktion des Methylierungslevels gemäß Bisulfit-Sequenzierung gegenüber (siehe Abb. 3.5). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass zwischen dem Verlust von 5mC (gezeigt durch 5mC IF-Analysen) und der Detektion unmethylieren Cytosins (gezeigt durch die Bisulfit-Sequenzierung) eine weitere Zwischenform bzw. Modifikation des 5mC vorliegen könnte.

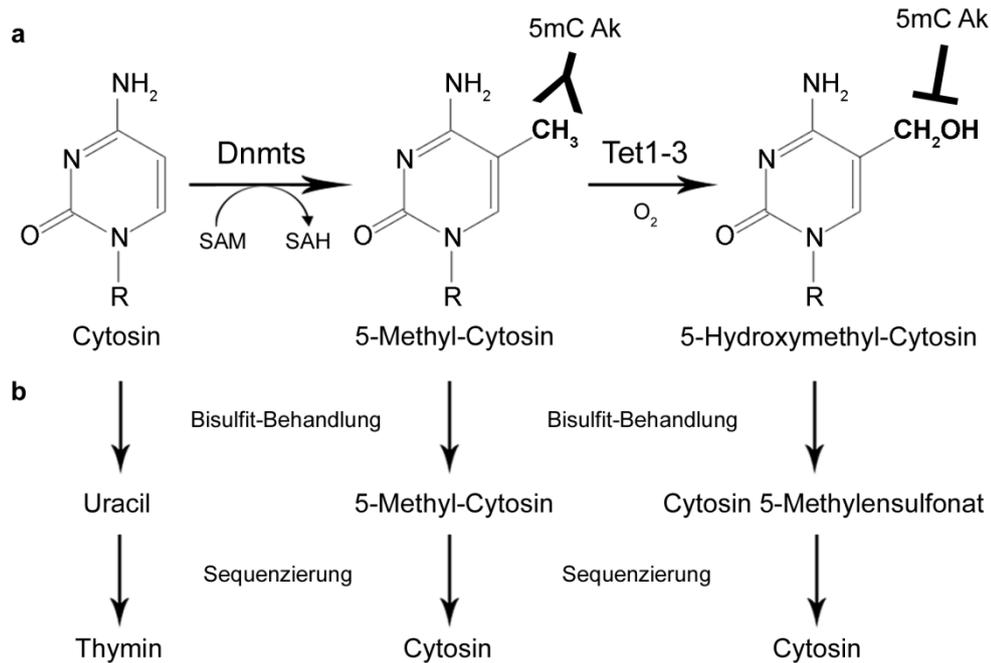


**Abb. 3.5 | Unterschiede in der dynamischen DNA Demethylierung der Zygote analysiert durch 5mC-Immunfluoreszenzen und der Bisulfit-Sequenzierung von Line1 Elementen.** Der dynamische Verlust des durchschnittlichen Methylierungslevels von Line1 Elementen (grün, prozentualer Verlust des durchschnittlichen CpG-Methylierungslevel errechnet aus Wossidlo *et al.*, 2010, Abb. 1) zeigt eine langsamere Demethylierung als der Verlust des 5mC-Signals des paternalen Pronukleus der Mauszygote (blau, prozentualer Verlust der 5mC-Immunfluoreszenzwerte aus Abb. 3.1; die Werte für PN4/PN5 wurden für den Vergleich mit den Daten der Bisulfit-Sequenzierung gemittelt). Auch der gemittelte prozentuale Verlust des paternalen und maternalen 5mC-Signals (lila) zeigt eine schnellere Dynamik als die Analyse durch Bisulfit-Sequenzierung des CpG-Methylierungslevels von Line1 Elementen.

### 3.2 5-HYDROXYMETHYL-CYTOSIN IN DER FRÜHEN EMBRYOGENESE

Die Entdeckung von 5hmC als sechste Base des Genoms und die Fähigkeit von Tet Proteinen zur Konversion von 5mC zu 5hmC weist auf die Möglichkeit hin, dass die enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC an der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote beteiligt sein könnte (Kriaucionis *et al.*, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Eine umfangreiche Konversion von 5mC zu 5hmC in der Zygote würde die Diskrepanz zwischen dem schnellen Verlust von 5mC-Antikörpersignal und den zur gleichen Zeit noch erhöhten Methylierungslevel der Bisulfit-Analyse von Line1 oder ETn Elementen (Wossidlo *et al.*, 2010) erklären (siehe Abb. 3.5): Zum einen würde die Konversion von 5mC zu 5hmC das Epitop für den 5mC-Antikörper maskieren, da der Antikörper die oxidierte Methylgruppe nicht mehr erkennen kann (Tahiliani *et al.*, 2009). Zum anderen kann die Bisulfit-Sequenzierung nicht zwischen 5mC und 5hmC unterscheiden, da 5hmC in der Bisulfitreaktion zu Cytosin 5-Methylsulfonat (CMS) umgewandelt wird und gleich dem 5mC der Deaminierung widersteht, wodurch in der späteren Sequenzierreaktion ein ursprünglich methyliertes Cytosin vorgetäuscht wird (Hayatsu *et al.*, 1979; Huang *et al.*,

2010). In Abb. 3.6 sind die erläuterten Zusammenhänge anhand von Strukturformeln schematisch dargestellt.



**Abb. 3.6 | Das Verhalten von 5-Hydroxymethyl-Cytosin in der 5mC-Immunfluoreszenz und Bisulfit-Sequenzierung.** (a) Die Konversion von 5mC zu 5hmC maskiert das Epitop für den 5mC-Antikörper und könnte durch den Verlust von 5mC-Signal eine Demethylierung vortäuschen. (b) In der Bisulfit-Reaktion reagiert 5hmC zu Cytosin 5-Methylensulfonat (CMS), welches in der anschließenden PCR-Amplifikation und Sequenzierungsreaktion ein ursprünglich methyliertes Cytosin vortäuscht.

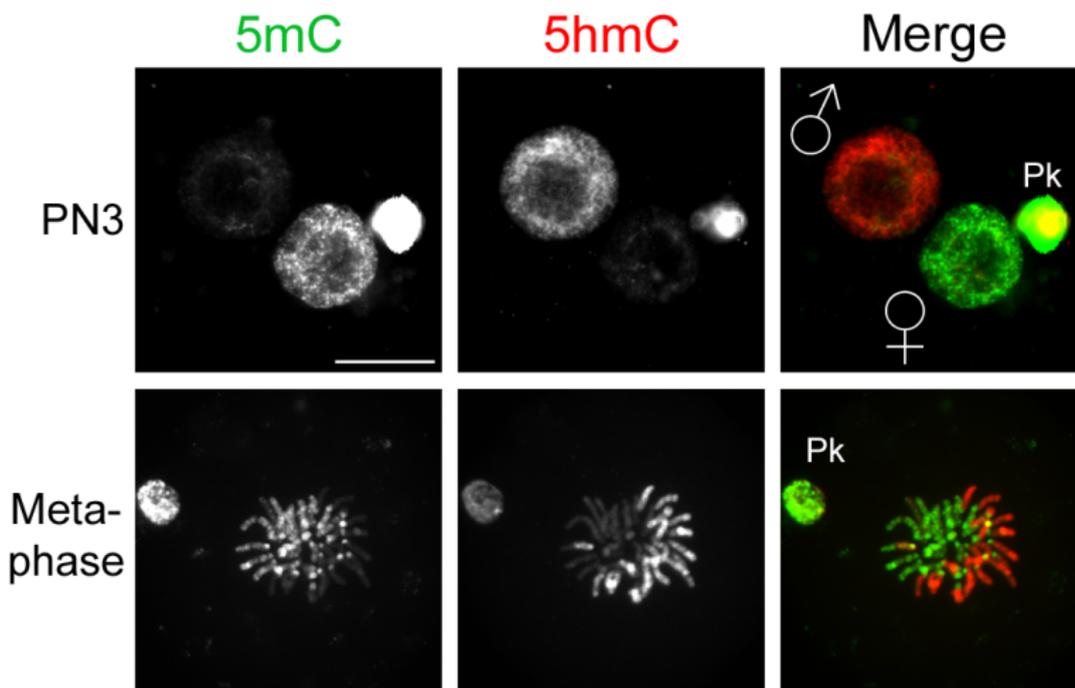
### 3.2.1 DYNAMISCHES ERSCHEINEN VON 5HMC IN DER MAUSZYGOTE

Um eine mögliche Beteiligung von 5hmC an der Reprogrammierung von 5mC in der Zygote zu untersuchen, wurde zunächst die Existenz von 5hmC in der Mauszygote überprüft. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen 5hmC an fixierten, denaturierten Mausembryonen durchgeführt.

Die in dieser Studie benutzten 5hmC-Antikörper benötigen für die Detektion ihres Epitops einzelsträngige DNA und somit die gleichen Denaturierungsbedingungen wie die in Abschnitt 3.1.1 benutzten 5mC-Antikörper. Dies bietet den Vorteil, die denaturierten Embryonen auf beide Modifikationen hin untersuchen zu können. In Abb. 3.7 ist die IF-Analyse von 5hmC und 5mC von Mauszygoten im PN3- und Metaphase-Stadium gezeigt.

Dabei wurden zur Detektion von 5hmC sowohl monoklonale Maus- als auch polyklonale Kaninchen-Antikörper verwendet. Beide Antikörper zeigen in der IF-Analyse von späten Mauszygoten ein intensives 5hmC-Signal (für die IF-Analyse des monoklonalen Ratten-Antikörpers von Prof. Dr. Wolf Reik / Prof. Dr. Adrian Bird siehe Anhang, Abb. 8.1). Aufgrund starker unspezifischer Kreuzreaktionen des monoklonalen 5hmC-Antikörpers mit 5mC (persönliche Kommunikation Prof. Dr. Anjana Rao, Harvard Medical School, Boston, USA) wurden in den weiteren Experimenten dieser Arbeit die 5hmC-Antikörper von Active

Motif verwendet. Das 5hmC-Signal der PN3 Zygote ist bevorzugt im paternalen Pronukleus zu finden, während das 5mC-Signal kaum noch zu detektieren ist. Die umgekehrte Situation befindet sich im maternalen Pronukleus: ein starkes 5mC-Signal ist mit einem kaum wahrnehmbarem 5hmC-Signal assoziiert. Die IF-Analyse von Zygoten kurz vor der Zellteilung in der Metaphase zeigt ebenfalls die reziproke Verteilung von 5hmC und 5mC auf paternalen und maternalen Chromosomen. Die paternalen Chromosomen sind mit einem starken 5hmC-Signal gekennzeichnet, während auf den maternalen Chromosomen das 5mC-Signal vorherrscht (für das 5mC-Signal auf maternalen Chromosomen siehe Mayer *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bilden hierbei die perizentromerischen Regionen. Hier sind beide Modifikationen anzutreffen, welches in einer gelben Färbung resultiert. Interessanterweise zeigt ein Metaphase-Chromosom sowohl Bereiche mit 5hmC- als auch 5mC-Signal. Dieses Chromosom könnte entweder ein Crossing-Over durchlaufen haben oder aber es könnte sich um ein X-Chromosom handeln, welches in der frühen Embryonalentwicklung durch X-Inaktivierung eine besondere epigenetische Reprogrammierung durchlaufen wird. Augenscheinlich werden paternale und maternale Genome in der Zygote epigenetisch unterschiedlich durch 5hmC und 5mC modifiziert.



**Abb. 3.7 | Die sechste Base 5hmC kann bevorzugt im paternalen Genom von Mauszygoten detektiert werden.** Gezeigt sind repräsentative Beispiele einer Mauszygote im PN3-Stadium (~8 hpf) und in der Metaphase (~18 hpf), die mit 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt wurden. Der Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus einer PN3 Zygote (siehe auch Abb. 3.1) ist mit dem Erscheinen von 5hmC-Signal assoziiert. Im Metaphase-Stadium sind maternale Chromosomen mit 5mC-Signal angefärbt (siehe auch Mayer *et al.*, 2000) und paternale Chromosomen mit 5hmC. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2011).

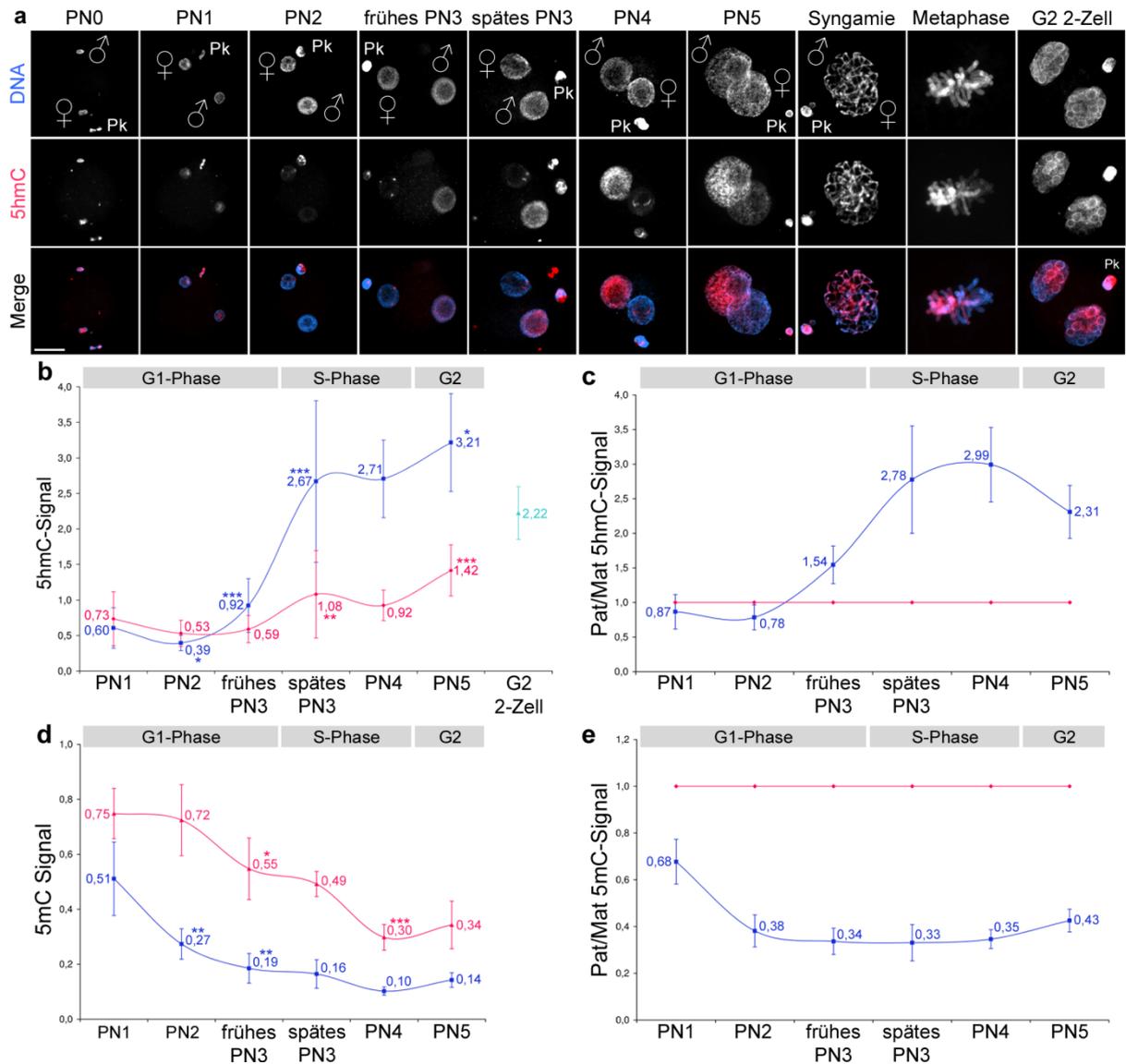
Das 5mC-Signal des paternalen Pronukleus der Zygote ist bereits im frühen PN3 kaum noch zu detektieren, während das 5hmC-Signal stark vorhanden ist (Abb. 3.1 und 3.7). Deshalb wurde zunächst das dynamische Erscheinen von 5hmC in der gesamten Entwicklung der Zygote näher untersucht, um einen zeitlichen und genomspezifischen Zusammenhang zwischen 5mC-Signalverlust und 5hmC-Signalgewinn herleiten zu können. Hierzu wurden Zygoten mittels IF analysiert, die durch *in vitro* Fertilisation präzise zu allen pronukleären Stadien fixiert wurden (siehe Abb. 3.8a). Die relativen Änderungen der IF-Signale paternaler und maternaler Pronuklei wurden durch softwaregestützte Signalquantifizierungen analysiert, wobei gleich der 5mC-Analyse für jeden untersuchten Embryo die gleichen Fixierungs-, Denaturierungs- und Bildaufnahmebedingungen eingehalten wurden (siehe Abb. 3.8b/c).

Kurz nach der Befruchtung der Eizelle durch das Spermium in PN0 und dem Protamin-Histon Austausch in PN1 (Santos *et al.*, 2002) zeigen paternale und maternale Pronuklei ähnlich starke 5hmC-Signale. Das 5hmC-Signal in beiden Pronuklei nimmt daraufhin leicht ab. In der weiteren Entwicklung der Zygote bis zur ersten Zellteilung wird die Intensität, die Verteilung und das Verhältnis von 5hmC- und 5mC-Signalen in paternalen und maternalen Pronuklei zunehmend verschieden. Der paternale Pronukleus zeigt bereits in der späten G1-Phase (frühes PN3-Stadium) einen rasanten Anstieg des 5hmC-Signals, welches bis zu Beginn der S-Phase (spätes PN3-Stadium) auf die siebenfache Intensität ansteigt, während das 5mC-Signal verschwindet (Abb. 3.1, 3.8b-e). Der maternale Pronukleus hingegen zeigt ähnliche, aber weniger stark ausgeprägte Änderungen. Auch hier nimmt das 5hmC-Signal in der späteren Entwicklung mit Beginn der S-Phase leicht zu, während das 5mC-Signal leicht abnimmt (Wossidlo *et al.*, 2011).

Beide Pronuklei zeigen nicht nur verschiedene 5hmC-Signalstärken während der Entwicklung der Zygote, sondern auch Besonderheiten in der Signalverteilung innerhalb der Pronuklei bis zur späten S-Phase. Während 5hmC im paternalen Pronukleus im ganzen Nukleoplasma verteilt ist (mit Ausnahme der NPBs, welche kein 5hmC-Signal zeigen (siehe auch Abb. 3.7), zeigen sich im maternalen Pronukleus 5hmC-Signale konzentriert in heterochromatischen Ringen um die NPBs. Mit Beginn der S-Phase bis zur ersten Zellteilung zeigt der maternale Pronukleus auch zunehmend verteiltes 5hmC-Signal im gesamten Nukleoplasma. Dabei kann das paternale 5hmC-Signal während der S-Phase etwa dreifach intensiver als das maternale detektiert werden. In der späten G2-Phase erreichen beide Pronuklei das stärkste 5hmC-Signal. Das präferentiell paternale 5hmC-Signal bleibt auch im 2-Zell Embryo erhalten. Die diploiden Nuklei von 2-Zell Embryonen in der G2-Phase zeichnen sich durch ein intensiveres 5hmC-Signal in einer Kernhälfte aus, welche höchstwahrscheinlich paternale dekondensierte Chromosomen darstellt (hierauf wird in Abschnitt 3.2.4 näher eingegangen).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle gesagt werden, dass der Verlust von 5mC-Signal im Genom der Mauszygote mit dem Gewinn von 5hmC-Signal einhergeht. Der paternale Pronukleus ist von dieser Dynamik am stärksten betroffen; allerdings können auch im

maternalen Pronukleus ähnliche, aber weniger stark ausgeprägte Zusammenhänge gefunden werden.



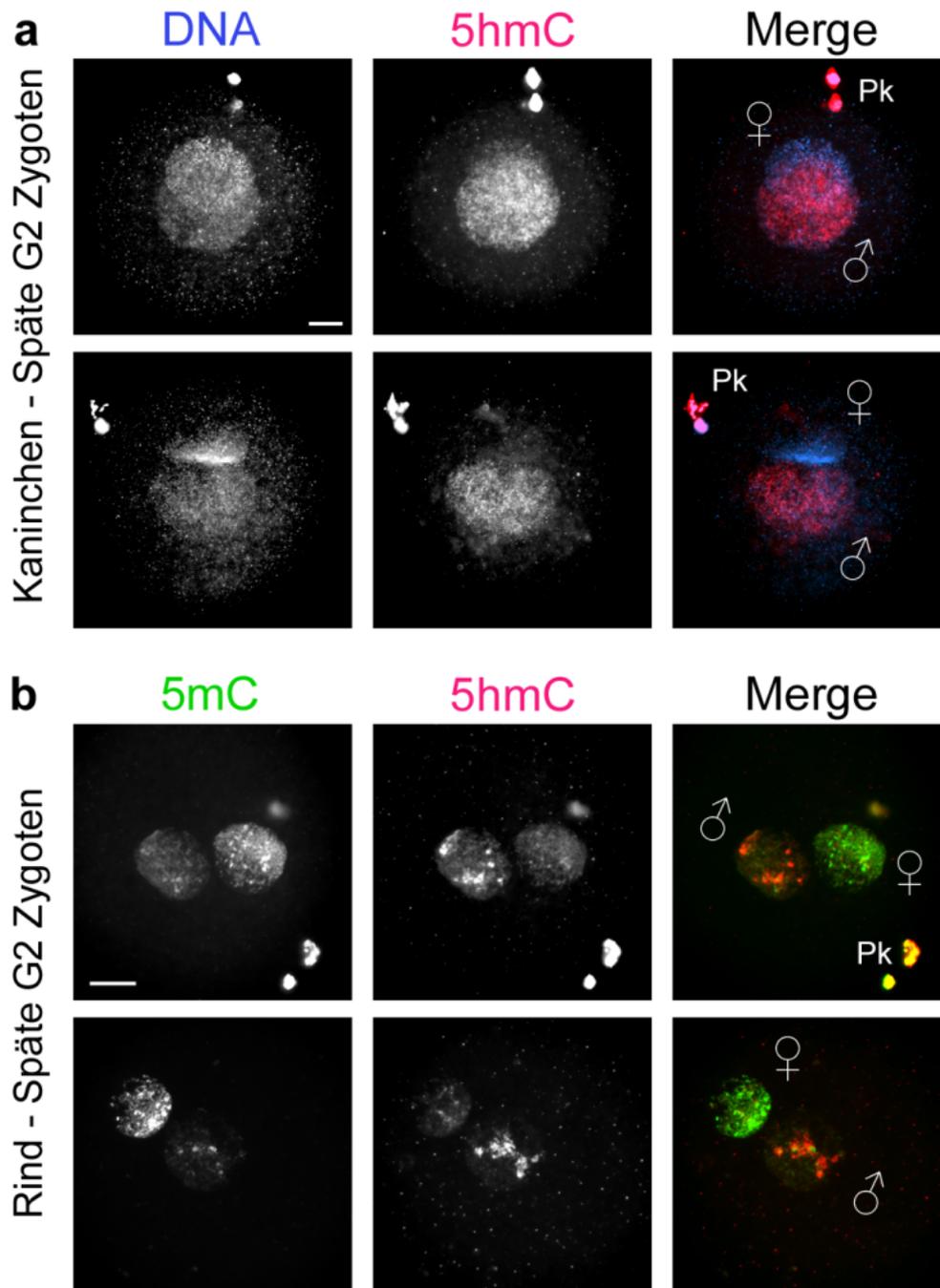
**Abb. 3.8 | Dynamisches Erscheinen von 5hmC-Signal in frühen Präimplantationsembryonen der Maus.** (a) Gezeigt sind repräsentative Beispiele von *in vitro* befruchteten Zygoten und einem 2-Zell Embryo, die mit DNA- (blau) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) angefärbt wurden. Der paternale Pronukleus zeigt ab dem frühen PN3-Stadium ein bis zum PN5-Stadium stark zunehmendes 5hmC-Signal. Im maternalen Pronukleus kann ebenfalls ein leichter Anstieg des 5hmC-Signals festgestellt werden, wobei hier das Signal in den mittleren Stadien konzentriert um das perizentromerische Heterochromatin zu sehen ist. (b) Die Quantifizierung von 5hmC-Signal normalisiert gegen das DNA-Antikörpersignal zeigt den starken Anstieg des paternalen Signals in der späten G1- bis zur G2-Phase. Auch das maternale Genom zeigt eine zunehmende 5hmC-Signalintensität. Dazu wurden 12-18 Embryonen von 3-5 IVF Experimenten pro PN-Stadium analysiert (siehe Anhang, Tab. 8.2). (c) Der Vergleich von paternalem/maternalem 5hmC-Signal (maternales 5hmC-Signal auf 1 gesetzt) zeigt die ansteigende Asymmetrie von paternalem zu maternalem 5hmC-Signal bereits in der späten G1-Phase. In (d) sind zum Vergleich die 5mC-Quantifizierung und (e) der Vergleich paternales/maternales 5mC gezeigt (Abb. 3.2). Sterne zeigen signifikante Änderungen gemäß Student T-Test (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ) und Fehlerbalken zeigen

Standardabweichungen. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20 µm (Abb. aus Wossidlo *et al.* (2011), verändert).

### 3.2.2 5hmC IN KANINCHEN- UND RINDERZYGOTEN

Mit der reziproken Dynamik von 5hmC und 5mC in der Mauszygote stellt sich nun die Frage, ob 5hmC auch in Zygoten von anderen Säugetieren vorkommt, bei denen eine aktive DNA Demethylierung festgestellt wurde. Dazu wurde die Präsenz von 5hmC mittels IF-Analysen in Kaninchen- und Rinderzygoten untersucht, von denen berichtet wurde, dass in diesen ebenfalls das paternale Genom aktiv demethyliert wird (siehe Anhang, Abb. 8.2 und Dean *et al.*, 2001; Lepikhov *et al.*, 2008). Die Analyse von Kaninchen- und Rinderzygoten in der späten G2-Phase mit 5hmC-Antikörpern hat gezeigt, dass auch in diesen beiden Säugetieren 5hmC vorkommt (siehe Abb. 3.9). Dabei ist hier ebenfalls der Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus mit dem Gewinn von 5hmC-Signal verbunden. Bemerkenswert für die Analyse der Kaninchenzygoten ist, dass hier der erheblich größere, paternale Pronukleus auch das stärkere 5hmC-Signal zeigt. Die besondere Schwierigkeit in der IF-Analyse von Kaninchenzygoten besteht darin, dass der paternale Pronukleus stets eine erheblich größere Volumenänderung in der Zygote durchläuft als der maternale Pronukleus. Dadurch haben sich kontroverse Diskussionen über den Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus ergeben. Kritiker der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus in der Kaninchenzygote argumentieren, dass der 5mC-Signalverlust eventuell nur auf die größere Volumenänderung des paternalen Pronukleus (veränderte Zugänglichkeit des Epitops für den 5mC-Antikörper zwischen paternalem und maternalem Pronukleus) und nicht auf eine aktive DNA Demethylierung zurückzuführen ist. Dem zum Widerspruch steht das starke 5hmC-Signal im größeren paternalen Pronukleus.

In den analysierten Rinderzygoten zeigt ebenfalls der paternale Pronukleus den stärkeren 5hmC-Signalgewinn. Interessanterweise zeigt die Verteilung von 5hmC im paternalen Pronukleus Unterschiede im Vergleich zu Maus und Kaninchen. Hier ist das 5hmC-Signal in konzentrierten Punkten innerhalb des Pronukleus zu finden.



**Abb. 3.9 | 5hmC kann auch in Kaninchen- und Rinderzygoten detektiert werden.** Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von (a) Kaninchenzygoten und (b) Rinderzygoten im späten G2-Stadium, die mit 5hmC- (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) und DNA- (blau) bzw. 5mC-Antikörpern (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt wurden. Die hier verwendeten Kaninchenzygoten wurden dabei durch Verpaarung superovulierter Häsinnen gewonnen. Die gezeigten Rinderzygoten sind durch *in vitro* Befruchtung von *in vitro* maturierten Eizellen hervorgegangen. In beiden Spezies kann 5hmC bevorzugt im paternalen Pronukleus der Zygoten im G2-Stadium festgestellt werden. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2011).

### 3.2.3 EPIGENETISCHE REPROGRAMMIERUNG DER DNA METHYLIERUNG VON GEKLONTEN 1-ZELL EMBRYONEN

Mit dem dynamischen Erscheinen von 5hmC in der Zygote von höheren Säugetieren stellt sich die Frage, ob die Generierung von 5hmC durch Faktoren der Eizelle erfolgt und/oder vom paternalen Genom oder paternalen Faktoren im Spermium bewerkstelligt bzw. beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung von geklonten 1-Zell Embryonen der Maus näher untersucht.

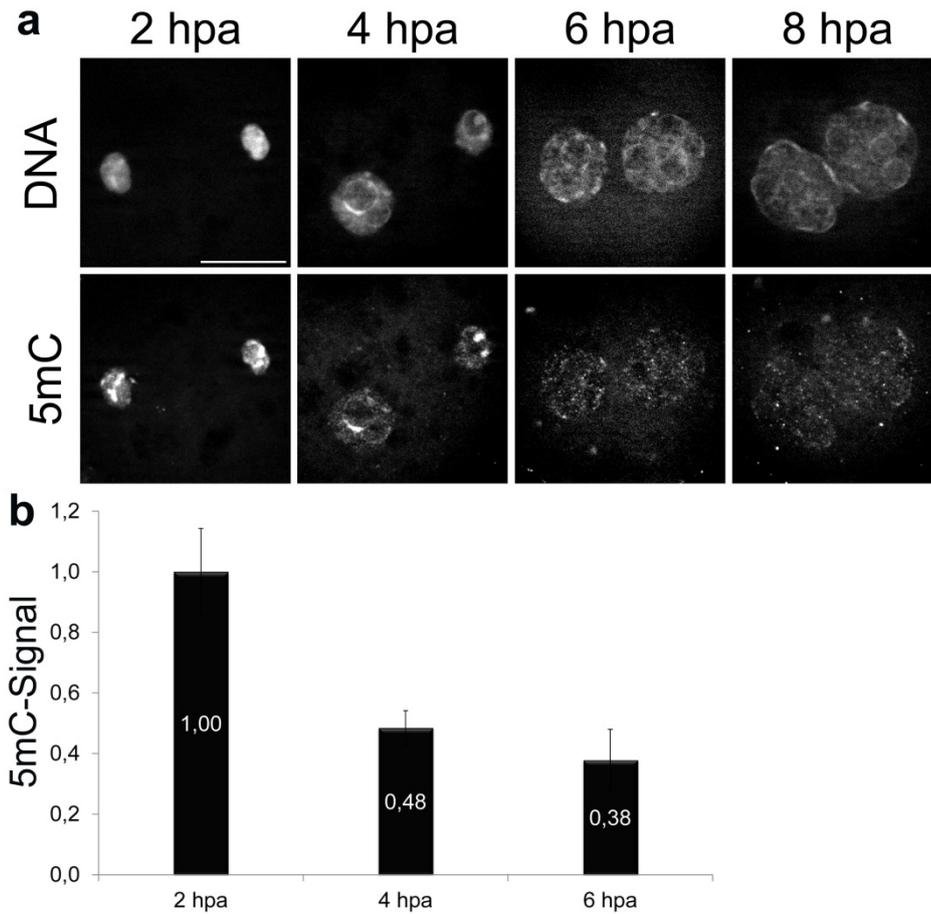
Geklonte Embryonen sind ein sehr interessantes Modell für die Studie von epigenetischen Veränderungen im frühen Präimplantationsstadium von Säugetieren, da hier das Zytoplasma der Eizelle (Ooplasma) ohne den Einfluss des maternalen Genoms und des Spermiums für die Reprogrammierung des somatischen Genoms sorgen muss. Wie bereits in der Veröffentlichung von Lepikhov *et al.* und Kang *et al.* gezeigt, findet auch in klonierten 1-Zell Embryonen vom Kaninchen und Rind eine DNA Demethylierung statt (Kang *et al.*, 2001; Lepikhov *et al.*, 2008). Diese Demethylierung erfolgt allerdings nicht immer im gleichen Ausmaß und ist anscheinend nicht sehr effizient (Dean *et al.*, 2001; Lepikhov *et al.*, 2008).

Die hier untersuchten klonierten Mausembryonen wurden in einer Kollaboration mit Dr. Vittorio Sebastiano und Dr. Michele Boiani von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans Schöler am Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin in Münster analysiert. Dabei wurden die geklonten Embryonen durch „somatic cell nuclear transfer“ (SCNT) gewonnen. Bei dieser Methode wird ein somatischer, diploider Zellkern in eine Eizelle injiziert, in der zuvor das maternale Genom entfernt wurde („Enukleation“). Der jeweils verwendete somatische Zellkern wurde von Kumulus-Zellen isoliert; eine spezialisierte Zelle, welche für die Nährstoffversorgung der wachsenden Eizelle verantwortlich ist und routinemäßig im SCNT-Verfahren benutzt wird, da sie während der Gewinnung der Eizellen ebenfalls leicht isoliert werden kann.

#### 3.2.3.1 DNA DEMETHYLIERUNG IN SCNT 1-ZELL EMBRYONEN

Zunächst wurde die DNA Demethylierung von geklonten 1-Zell Embryonen der Maus genauer analysiert. Über den Umfang und die Dynamik der DNA Demethylierung dieser Embryonen war zu Beginn dieser Studie nichts bekannt.

Deshalb wurde zunächst die genomweite DNA Demethylierung von geklonten 1-Zell Embryonen (ab hier vereinfacht nur noch „Klone“ genannt) mittels 5mC-IF genauer untersucht. Dazu wurden Klone 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Aktivierung der Eizelle (hours *post* activation, hpa) fixiert, denaturiert und mit 5mC-Antikörpern analysiert (siehe Abb. 3.10).



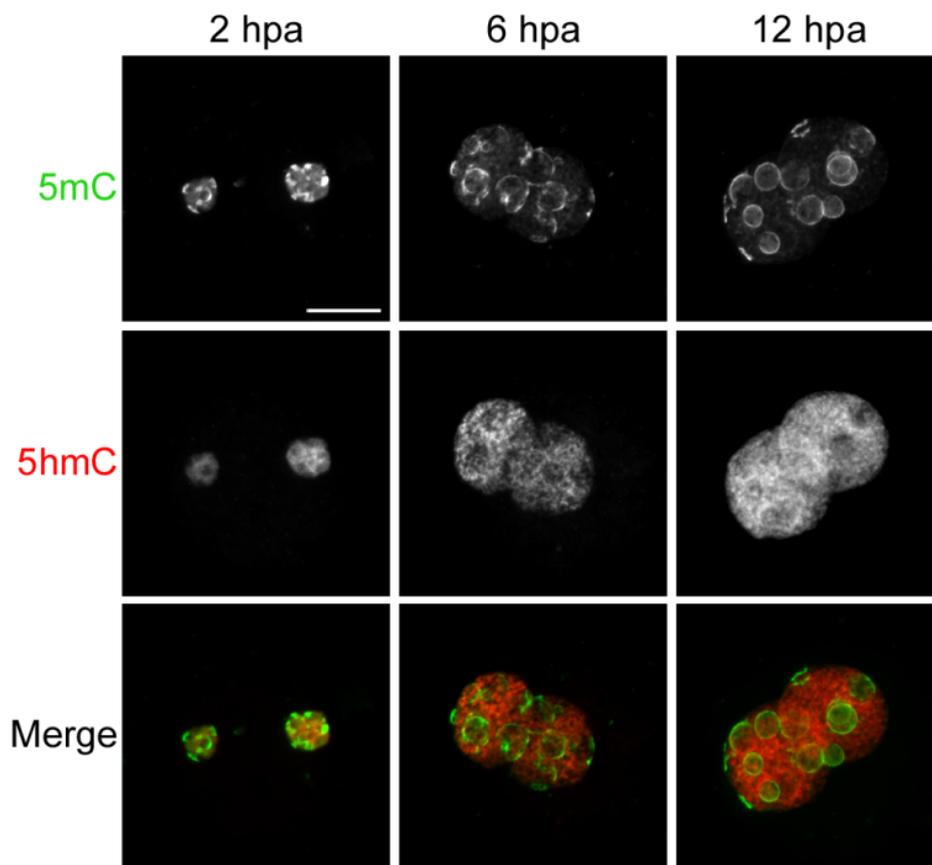
**Abb. 3.10 | Verlust von 5mC-Signal in geklonten 1-Zell Embryonen der Maus.** (a) Gezeigt sind repräsentative Beispiele von SCNT-Mausembryonen, die 2, 4, 6 und 8 h nach Aktivierung (hpa) fixiert wurden und mit 5mC-Antikörpern (monoklonaler Mausantikörper von Eurogentec) und Propidiumjodid (interkalierender DNA-Farbstoff) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt wurden. Beide Pseudopronuklei der SCNT-Embryonen verlieren das 5mC-Signal sehr früh nach der Aktivierung der Eizellen. (b) Die Quantifizierung des 5mC-Signals beider Pseudopronuklei normalisiert gegen DNA-Signal ( $n = 4$  pro Zeitpunkt, siehe Anhang, Tab. 8.3) zeigt bereits 4 hpa eine Abnahme der genomweiten DNA Methylierung auf 48%. Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{M}$  (Wossidlo *et al.*, 2010).

Bereits 2 hpa hat die enukleierte Eizelle die Chromosomen des diploiden Zellkerns der Kumulus-Zelle in zwei Pseudopronuklei separiert. Die Trennung der einzelnen Chromosomen erfolgt durch den Spindelapparat der Eizelle und gewährleistet nicht immer den gleichen Chromosomensatz in den entstandenen Pseudopronuklei (persönliche Kommunikation Dr. Michele Boiani und Sun *et al.*, 2007). Beide Pseudopronuklei zeigen in diesem frühen Stadium ein starkes 5mC-Signal ähnlich dem von Kumulus-Zellen. Dieses Signal beider Pseudopronuklei verringert sich 4 hpa auf 48% und bleibt im perizentromerischen Heterochromatin stärker gefärbt. Bei 6 hpa zeigt das 5mC-Signal eine weitere Abnahme auf 38% verglichen mit 2 hpa. Damit zeigen beide Pseudopronuklei von SCNT-Embryonen einen schnellen Verlust von 5mC-Signal ähnlich dem von paternalen Pronuklei der Mauszygote. Dieser Verlust erfolgt etwa 2 Stunden schneller als der Verlust im paternalen Genom der Zygote, welches in etwa dem Zeitraum entspricht, in dem in der Zygote der Protamin-Histon

Austausch erfolgt. Zudem erfolgt der Verlust von 5mC-Signal von Klonen gleich dem von Zygoten in der G1-Phase (auf den Zellzyklus von Klonen wird in Abschnitt 3.3.1.5 genauer eingegangen). Das Ooplasma von Eizellen der Maus ist also in der Lage ohne die Beteiligung des maternalen oder paternalen Genoms oder paternalen Faktoren des Spermiums die DNA Demethylierung der Pseudopronuklei einzuleiten.

### 3.2.3.2 5mC IN SCNT 1-ZELL EMBRYONEN DER MAUS

Als nächstes wurde entsprechend der Untersuchung von Mauszygoten das Erscheinen von 5hmC in Klonen analysiert. Dazu wurden SCNT-Embryonen 2, 6, und 12 hpa fixiert, denaturiert und mit 5mC- und 5hmC-Antikörpern durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt (siehe Abb. 3.11).



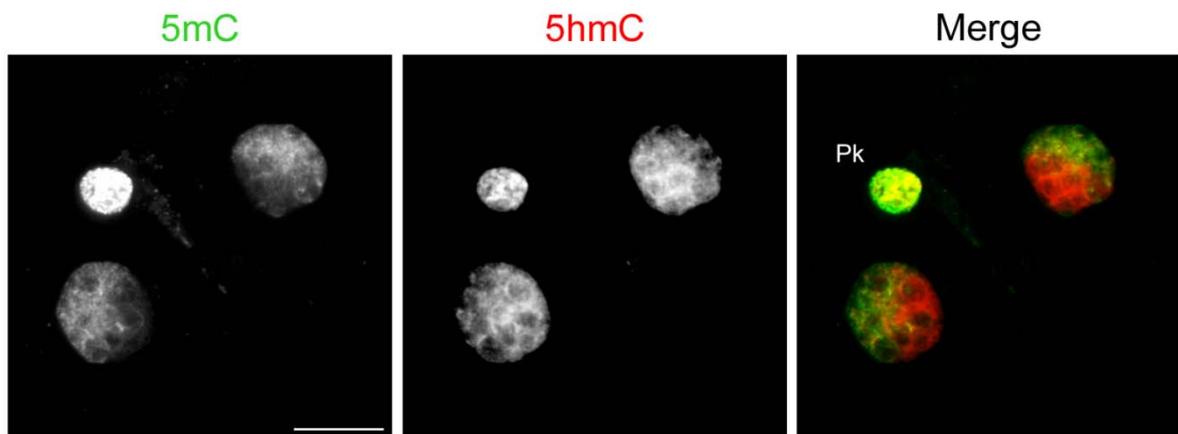
**Abb. 3.11 | 5mC- und 5hmC-Signal in geklonten 1-Zell Embryonen der Maus.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von SCNT-Embryonen 2, 6 und 12 hpa, die mit 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt wurden. Dabei wurden >15 SCNT-Embryonen pro Zeitpunkt analysiert, die durch die Injektion von Zellkernen aus Kumulus-Zellen in enukleierte Eizellen der Maus gewonnen wurden. Das 5mC-Signal ist ab 6 hpa nur noch im perizentromerischen Heterochromatin um die NPBs zu detektieren und nimmt von 2 bis 12 hpa im Nukleoplasma stetig ab. Das 5hmC-Signal ist bei 2 hpa in beiden Pseudopronuklei moderat zu detektieren, um daraufhin bis 12 hpa stark zuzunehmen. Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2011).

Bei 2 hpa zeigen beide Pseudopronuklei ein starkes 5mC- und ein moderates 5hmC-Signal, welches darauf hindeutet, dass auch Kumulus-Zellen 5hmC enthalten. Ab der späten G1-Phase (6 hpa, siehe Abschnitt 3.3.1.5) ist das 5mC-Signal nur noch im perizentromerischen Heterochromatin um die NPBs zu detektieren, während das 5hmC-Signal in der frühen G2-Phase (12 hpa) sehr stark in beiden Pseudopronuklei zu detektieren ist.

Folglich ist der Verlust von 5mC-Signal auch während der Entwicklung von geklonten 1-Zell Embryonen mit einem Gewinn von 5hmC-Signal verbunden, wie bereits am Beispiel von Zygoten höherer Säugetiere gezeigt wurde. Aufgrund der geringen Anzahl von SCNT Embryos wurde auf eine Quantifizierung der IF-Signale verzichtet.

### 3.2.4 5HMC IN DER SPÄTEREN PRÄIMPLANTATIONSENTWICKLUNG DER MAUS

Die paternalen und maternalen Unterschiede von 5hmC- und 5mC-Signal in der Zygote sind auch noch im 2-Zell Embryo aufzufinden. Hier liegt das 5hmC-Signal innerhalb eines Zellkerns eines Blastomers auf einer Kernhälfte konzentriert vor, während das 5mC-Signal die andere Kernhälfte charakterisiert (siehe Abb. 3.12 und 3.8a). Offensichtlich liegen paternale und maternale Chromosomen im Zellkern von 2-Zell Embryonen weiterhin in getrennten Bereichen vor.

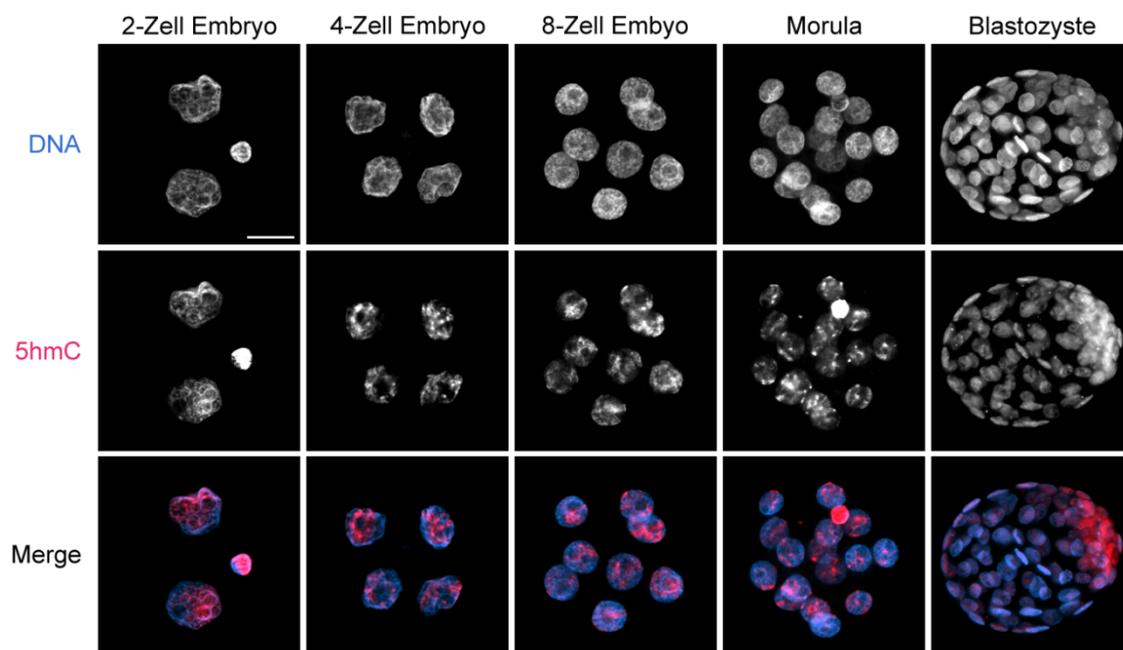


**Abb. 3.12 | 5mC und 5hmC im 2-Zell Embryo.** Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel eines 2-Zell Embryos in der G1-Phase, der mit 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) durch IF-Analyse untersucht wurde. 5mC- und 5hmC-Antikörper markieren jeweils eine Hemisphäre der beiden diploiden Zellkerne. N > 15 ; Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20 µm.

Die Quantifizierung des 5hmC-Signals von 2-Zell Embryonen in der G2-Phase, d.h. nach einer zweiten Replikation des Genoms, zeigt etwa den durchschnittlichen Wert von paternalen und maternalen PN5 Pronuklei der Zygote (Abb. 3.9b). Dies deutet darauf hin, dass das 5hmC-Signal in der G1- und S-Phase des 2-Zell Embryos nicht weiter verändert wurde.

Damit stellt sich die Frage, ob 5hmC ein Intermediat der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote darstellt und beispielsweise durch weitere Oxidationsschritte zu nativem Cytosin

abgebaut wird oder ob 5hmC auch in der späteren Präimplantationsentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Um diese Frage zu beantworten wurden die Präimplantationsembryonen der Maus vom 2-Zell Embryo bis zur Blastozyste mit 5hmC-Antikörpern untersucht (siehe Abb. 3.13). Dabei wurde festgestellt, dass 5hmC während der gesamten Präimplantationsentwicklung detektiert werden kann. Während der Entwicklung vom 2-Zell Embryo bis zur Morula zeigt das 5hmC-Signal eine kontinuierliche Konzentration des Signals. In den kompakten Zellkernen der Morula schließlich ist das 5hmC-Signal nur noch in stark konzentrierten Foci (engl. für „punktförmiges Signal“) zu entdecken. In der Blastozyste hingegen steigt das 5hmC-Signal in der inneren Zellmasse wieder stark an. 5hmC scheint demnach auch in späteren Entwicklungsphasen der Embryogenese von höheren Säugetieren eine wichtige Rolle zu spielen.



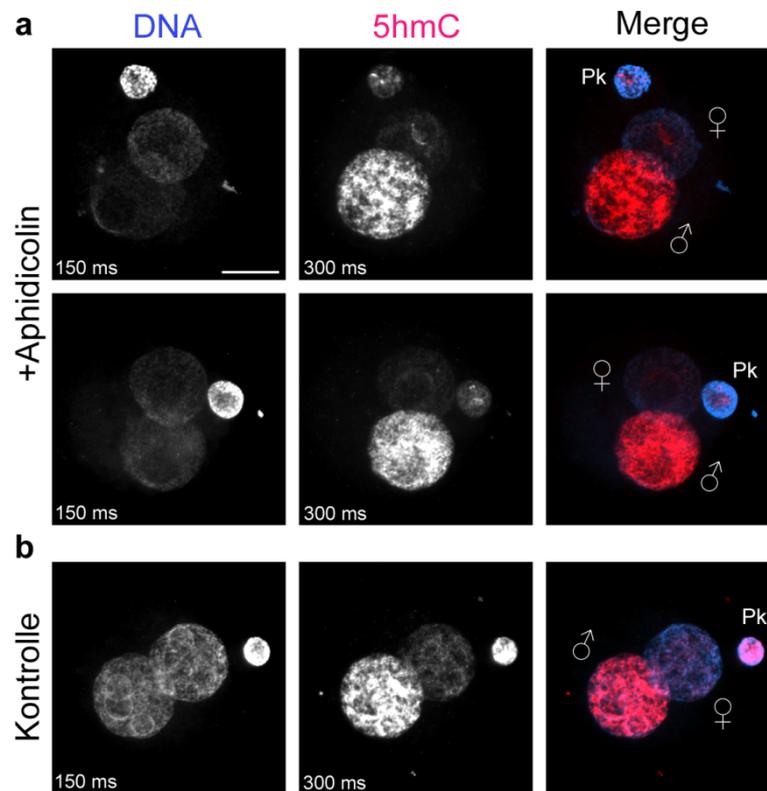
**Abb. 3.13 | 5hmC-Signal in Präimplantationsembryonen der Maus.** Gezeigt sind repräsentative Beispiele von Präimplantationsembryonen der Maus vom 2-Zell Embryo bis zur Blastozyste, die mit DNA- (blau, monoklonaler Maus-Antikörper) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) untersucht wurden. Das 5hmC-Signal wird während der Entwicklung vom 2-Zell Embryo bis zur Morula mit jeder weiteren Zellteilung zerstreuter und punktförmiger. In der Blastozyste steigt das 5hmC-Signal in der inneren Zellmasse wieder stark an.  $N > 10$  pro Stadium; Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.5 DIE AKKUMULATION VON 5HM $\dot{C}$ ERFOLGT UNABHÄNGIG VON DER DNA REPLIKATION

Der paternale Pronukleus zeigt bereits in dem frühen PN3-Stadium einen starken Anstieg von 5hmC-Signal (siehe Abb. 3.8b-c). Dies deutet auf ein von der DNA-Replikation unabhängiges Ereignis hin. Die höchste Steigerung der 5hmC-Signalintensität erfolgt allerdings über die S-Phase bis in die G2-Phase. Um den Zusammenhang zwischen der Akkumulation von 5hmC und der DNA-Replikation in der Zygote näher zu untersuchen, wurde die S-Phase von

Zygoten mittels Aphidicolin (Aph) blockiert. Aph inhibiert die DNA-Replikation durch die kovalente Bindung an die katalytische Domäne von DNA-Polymerasen, wodurch eine Synthese von neuen DNA-Strängen unterbunden wird (auf die Wirkungsweise von Aph wird in Abschnitt 3.3.1.3 näher eingegangen).

Wie in Abb. 3.14 gezeigt wird, führt die Inkubation von *in vitro* befruchteten Zygoten mit Aph von der späten G1-Phase bis zur G2-Phase zu einem stark reduzierten DNA-Signal im Vergleich zur Kontrollgruppe, welches eine erfolgreiche Inhibition der DNA-Replikation andeutet (siehe auch Abschnitt 3.3.1.3). Allerdings hat die Inhibition der S-Phase durch Aph keinen Einfluss auf die weiter voranschreitende Dekondensation und pronukleäre Reifung der Zygoten zum PN5-Stadium. Sowohl Aph behandelte Zygoten und Zygoten der Kontrollgruppe im G2-Stadium zeigen keinen qualitativen Unterschied in der Intensität und Verteilung des 5hmC-Signals. Die Akkumulation von 5hmC-Signal in der Zygote erfolgt demnach unabhängig von Faktoren der DNA-Replikation.



**Abb. 3.14 | Das Erscheinen von 5hmC-Signal erfolgt replikationsunabhängig.** (a) Gezeigt sind *in vitro* befruchtete Mauszygoten, die von der späten G1-Phase bis zur Fixierung in der G2-Phase mit dem DNA-Polymerase Inhibitor Aphidicolin inkubiert und anschließend mit 5hmC- (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) und DNA-Antikörpern (blau, monoklonaler Maus-Antikörper von Millipore) analysiert wurden. Das 5hmC-Signal paternaler und maternaler Pronuklei zeigt die gleiche Intensität und Verteilung wie die Zygote der Kontrollgruppe ohne Aphidicolin (b). Das DNA-Signal der Aphidicolin behandelten Gruppe ist in paternalen und maternalen Pronuklei aufgrund der Inhibition der DNA-Replikation kaum zu detektieren, während die Polkörper und die unbehandelte Zygote ein starkes DNA-Signal zeigen. Zum direkten Vergleich beider Gruppen sind die jeweiligen Belichtungszeiten für die 5hmC- und DNA-IF gleich hoch gewählt worden (300 und 150 ms). N > 20 pro Gruppe, ♂ = paternaler and ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2011).

### 3.2.6 EXPRESSION VON TET PROTEINEN IN EIZELLEN UND EMBRYONEN

Mit dem Verschwinden von 5mC-Signal und dem Erscheinen von 5hmC-Signal in der Zygote liegt die Vermutung nahe, dass 5mC durch die enzymatische Aktivität von Tet Proteinen zu 5hmC umgewandelt wird (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Allerdings haben *in vitro* Experimente mit DNA Methyltransferasen gezeigt, dass 5hmC auch unabhängig von 5mC entstehen kann. Ein natives Cytosin kann *in vitro* durch DNA Methyltransferasen in Abwesenheit von S-adenosyl-L-methionine (SAM) und einem exogenen Aldehyd als Substrat zu 5hmC oxidiert werden (Liutkeviciute *et al.*, 2009). Theoretisch könnte auch der für die paternale Demethylierung essentielle Faktor Elp3 durch dessen radikalische SAM-Domäne zur Konversion von 5mC zu 5hmC beitragen (siehe Einleitung, Kapitel 1.5 und Okada *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

Aus diesem Grund wurde zunächst die Existenz von Tet Proteinen in der Eizelle näher analysiert. Die reverse Transkription und anschließende Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) mit Primern für Tet1, Tet2 und Tet3 zeigte, dass Tet Transkripte in der Eizelle vorhanden sind (exemplarisch für Tet3 siehe Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 | Starke Präsenz von Tet3 Transkripten in der Eizelle.** Gezeigt sind Gel-Elektrophorese Aufnahmen der RT-PCR von 20 Eizellen der Maus mit Primern für Tet3 (siehe Materialteil, Tab. 2.1). Als Kontrolle ist die RT-PCR von Transkripten des konstitutiven Gens Polr2a gezeigt. Tet3 Transkripte sind im Vergleich zum konstitutiven Polr2a Transkript auffällig stark in der Eizelle repräsentiert. + = mit RT; - = ohne RT; K = Wasserkontrolle.

Um eine genauere Aussage über die relative Menge an Tet1, Tet2 und Tet3 Transkripten zu erhalten, wurde eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in den relevanten Zelltypen durchgeführt. Dieser Versuch wurde von Dr. Joana Marques in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf Reik vom Babraham Institut in Cambridge, UK, ausgeführt (siehe Wossidlo *et al.*, 2011). Diese Analyse hat gezeigt, dass die Transkripte der drei Tet Proteine unterschiedlich stark in den untersuchten Zelltypen vertreten sind. Dabei wurde zum Vergleich der relativen Menge von Transkripten die jeweilige Tet Expression von embryonalen Stammzellen (ESCs) als Referenzwert benutzt. Tet1 mRNA konnte in Eizellen und in der Zygote nur sehr schwach detektiert werden. Tet2 zeigt einen leicht höheren Expressionslevel in diesen Zellen, ist aber noch deutlich unterrepräsentiert im Vergleich zur Menge in ESCs. Tet3 hingegen wird in Eizellen und in Zygoten sehr stark transkribiert und ist in 2-Zell Embryonen nur noch in geringen Mengen zu detektieren. Folglich sind die verantwortlichen Enzyme für die dynamische Entstehung von 5hmC in der Eizelle und

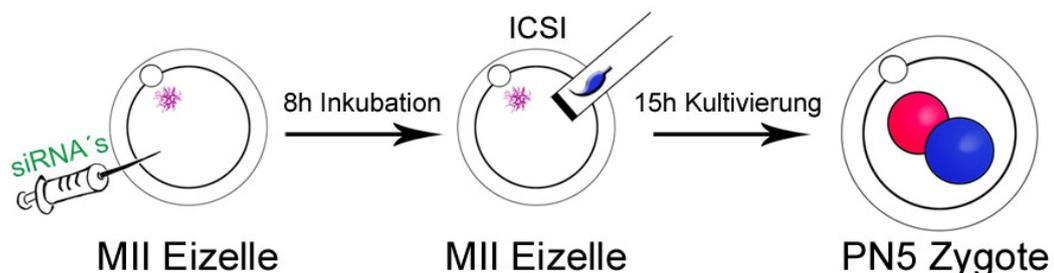
Zygote vorhanden. Tet3 scheint in diesem Entwicklungsstadium eine besondere Rolle zu spielen.

### 3.2.7 DER KNOCKDOWN VON TET TRANSKRIPTEN IN DER EIZELLE

#### VERMINDERT DEN VERLUST VON 5mC-SIGNAL IN DER ZYGOTE

Die Existenz von Tet Transkripten in der Eizelle und der Zygote weist auf die enzymatische Oxidation („Hydroxylierung“) von 5mC zu 5hmC durch Tet Proteine hin. Um die Beteiligung von Tet Proteinen am Verlust von 5mC und dem Erscheinen von 5hmC zu beweisen, wurden Knockdown-Experimente von Tet1, Tet2 und Tet3 durchgeführt.

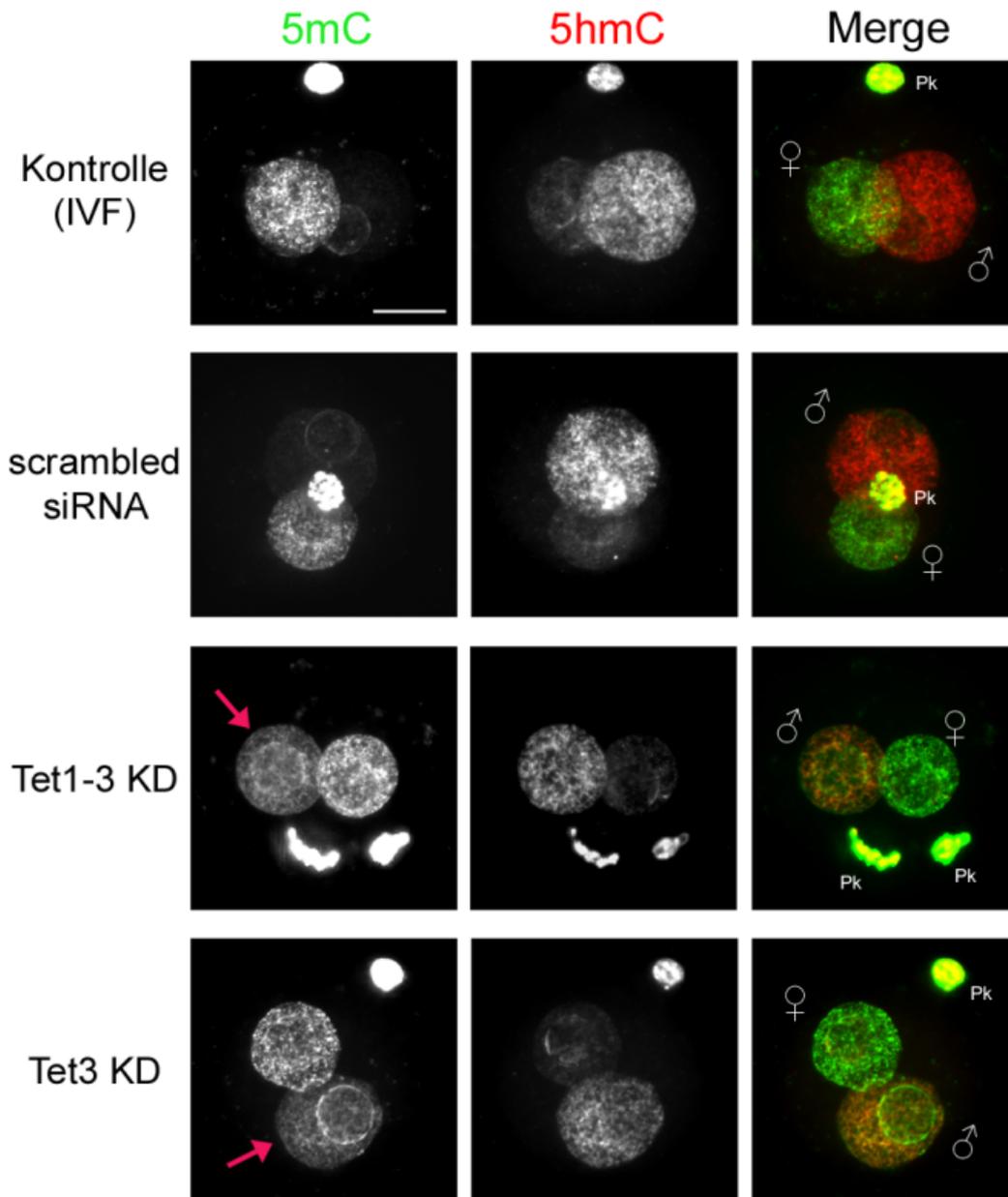
Bei einem Gen-Knockdown (KD) handelt es sich um die Störung der Genexpression durch RNA Interferenz (RNAi), bei der durch antisense RNA (dies können längere „short hairpin RNAs“ (shRNAs) oder 21 bp große „small interfering RNAs“ (siRNAs) sein) eine komplementäre mRNA durch die Bildung eines RNA-Doppelstrangs von der RNAi-Enzymmaschinerie abgebaut und somit die Translation bestimmter Gene verhindert wird. Diese Verhinderung der Genexpression kann je nach benutzter siRNA oder shRNA verschieden effizient sein. Gute RNAi KD-Experimente erzielen bis zu 80% Verlust der Genexpression und die Kombination von mehreren verschiedenen siRNAs oder shRNAs gegen eine bestimmte mRNA kann diese Genexpression völlig unterdrücken. Diese Methode stellt eine schnelle Alternative zum Gen-Knockout (KO) dar, welcher zwar zum völligen Verlust eines Gens führt, aber erst durch langwierige und aufwendige Manipulationen und Züchtungen über mehrere Generationen hinweg etabliert werden muss. Für den KD von Tet1 und Tet2 wurde jeweils eine Kombination aus veröffentlichten siRNA-Sequenzen und eine mit spezieller Software entworfene siRNA benutzt. Für Tet3 war zu diesem Zeitpunkt noch keine funktionierende siRNA-Sequenz bekannt und deshalb wurde hier nur eine speziell entworfene siRNA benutzt (auf das Design der siRNAs wird im Methodenteil in Abschnitt 2.2.12 genauer eingegangen). In Abb. 3.16 ist der schematische Versuchsablauf der RNAi von Tet Proteinen in der Zygote nach Okada *et al.* (2010) gezeigt (Okada *et al.*, 2010).



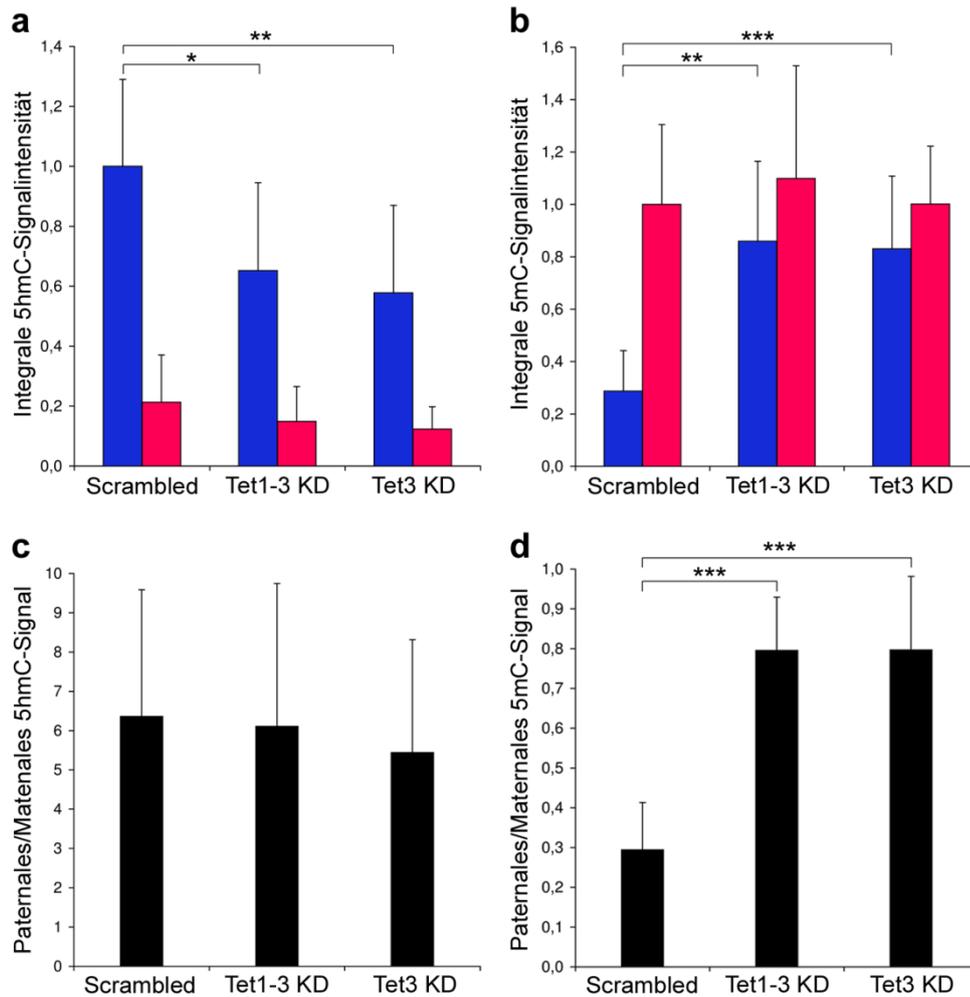
**Abb. 3.16 | Schematischer Versuchsablauf der RNA-Interferenz von Tet Proteinen in der Zygote.** Dieses Schema zeigt den experimentellen Versuchsablauf der RNA-Interferenz (RNAi) von Tet Proteinen in der Zygote nach Okada *et al.*, 2010. Für den Knockdown von Tet1-3 wurden small interfering RNAs (siRNAs) in Metaphase II arretierte Eizellen injiziert. Nach 8 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Eizellen durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) befruchtet und im PN5-Stadium (15 hpi ICSI) mit 5mC- und 5hmC-IF untersucht.

Der KD von Tet Proteinen muss dabei schon in der reifen Eizelle vor der Befruchtung erfolgen, da erste Versuche mit Mikroinjektionen von siRNAs gegen Tet1-3 in frühe *in vitro* befruchtete Zygoten (2 hpf) keinen signifikanten Einfluss auf eine gestörte Tet Aktivität in der G2-Phase dieser Zygoten gezeigt haben (Daten nicht gezeigt). Wie bereits in Abschnitt 3.2.6 beschrieben, sind Tet1, Tet2 und Tet3 Transkripte bereits in der Eizelle vorhanden und deshalb kann eine RNAi-Strategie in der frühen Zygote die frühe Translation dieser Transkripte wahrscheinlich nicht verhindern. Daher wurden Metaphase II arretierte Eizellen der Maus mit siRNAs gegen Tet Proteine injiziert. Nach 8 h Inkubation (benötigter Zeitraum für eine effektive RNAi nach Yamagata *et al.*, 2011) wurden die Eizellen durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) befruchtet und 15 h bis zur G2-Phase kultiviert. Eine „scrambled“ siRNA, also eine siRNA mit zufälliger Basenanordnung, die zu keiner mRNA komplementär ist, wurde als Kontrolle injiziert. Die hier benutzte scrambled siRNA besitzt dabei die gleiche Basenzusammensetzung wie die der Tet3 siRNA. Die in der G2-Phase fixierten Zygoten wurden anschließend durch 5mC- und 5hmC-IF analysiert (siehe Abb. 3.17).

Die IF-Analyse des 5hmC-Signals von Zygoten, die von Tet1-3 KD Eizellen abstammen, zeigt im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine Abnahme des Signals in paternalen und maternalen Pronuklei (Abb. 3.17 und Quantifizierung in Abb. 3.18a/c). In Übereinstimmung mit der starken Expression von Tet3 in Eizellen und der Zygote zeigt die Injektion von Tet3 siRNAs alleine die gleichen Effekte. Tet3 ist folglich in hohem Maße an der Entstehung von 5hmC in der Zygote beteiligt. Am auffälligsten ist der Effekt der RNAi von Tet Proteinen in der Analyse des 5mC-Signals zu erkennen. Hier zeigen die paternalen Pronuklei ein bemerkenswert starkes 5mC-Signal in Zygoten, die von Tet1-3 KD oder Tet3 KD Eizellen abstammen (Abb. 3.17 und 3.18b/d). Dieser Versuch beweist, dass der Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus der Zygote hauptsächlich von der enzymatischen Oxidation durch Tet Proteine zu 5hmC abhängt. In Zygoten, in denen durch die RNAi kein Tet3 vorhanden ist, ist diese Reaktion gestört. Im Gegensatz zu den starken Veränderungen im paternalen Pronukleus zeigen die Tet KDs keine signifikante Änderung des 5mC-Signals des maternalen Pronukleus (Abb. 3.18b). Der Großteil an 5mC des maternalen Pronukleus scheint also vor der enzymatischen Aktivität von Tet3 geschützt zu sein.



**Abb. 3.17 | Der Tet KD in Eizellen beeinflusst das 5hmC- und 5mC-Signal von Zygoten.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und 5hmC-IF-Analysen (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Active Motif) von Zygoten im PN5-Stadium (G2-Phase), die von Tet1-3 siRNA injizierten Eizellen abstammen und durch ICSI befruchtet wurden. Als Kontrollgruppen sind *in vitro* befruchtete Zygoten (IVF) und Zygoten gezeigt, deren Eizellen mit „scrambled“ siRNAs (siRNAs mit zufälliger Basenzusammensetzung ohne bestimmte Zielsequenz) injiziert wurden. Tet1-3-KD (Tet1-3 Knockdown) und Tet3-KD Zygoten zeigen ein abgeschwächtes 5hmC-Signal in beiden elterlichen Pronuklei. Rote Pfeile zeigen den verminderten Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus von Tet KD abstammenden Zygoten. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Maßstabsbalken = 20 µm (Wossidlo *et al.*, 2011).



**Abb. 3.18 | Quantifizierung von 5hmC- und 5mC-Signalen paternaler und maternaler Pronuklei von Zygoten, die von mit „scrambled“ und Tet1-3 siRNA injizierten Eizellen abstammen.** (a) Die Quantifizierung der integralen 5hmC-Signalintensität paternaler und maternaler Pronuklei zeigt, dass Zygoten mit Tet1-3 KD und Zygoten mit Tet3 KD eine signifikante Reduktion des 5hmC-Signals im paternalen Pronukleus aufzeigen. Der maternale Pronukleus zeigt ebenfalls eine tendenzielle Abnahme des 5hmC-Signals durch den Tet1-3 KD und Tet3 KD. (b) Paternale Pronuklei von Zygoten mit Tet1-3/Tet3-KD zeigen einen stark verminderten Verlust von 5mC-Signal im Vergleich zur Kontrollgruppe. (c) Das paternale/maternale Verhältnis von 5hmC-Signal zeigt keine signifikante Veränderung durch den Tet1-3 KD oder Tet3 KD. Die Verminderung von Tet Proteinen betrifft folglich das paternale und maternale 5hmC-Signal gleichermaßen. (d) Das Verhältnis von paternalem zu maternalem 5mC-Signal hingegen zeigt einen signifikanten Einfluss des Tet1-3 KD und Tet3 KD auf das paternale 5mC-Signal. Blaue Balken repräsentieren IF-Signal paternaler Pronuklei und rote Balken maternaler Pronuklei. Zur Quantifizierung der 5mC- und 5hmC-Signale wurden 8-9 ICSI abstammende PN5-Zygoten pro Gruppe analysiert. Sterne zeigen signifikante Änderungen gemäß Student T-Test (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ) und Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (Wossidlo *et al.*, 2011).

### 3.3 DNA DEMETHYLIERUNG UND DNA REPARATUR IN DER ZYGOTE

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass ein Großteil des 5mC der Zygote zu 5hmC konvertiert wird. Das paternale Genom ist von dieser Umwandlung am stärksten betroffen, welches den nahezu kompletten Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus in der G1-Phase erklärt (Abb. 3.1). Die Analyse der DNA Methylierung mittels Bisulfit-Sequenzierung kann nicht zwischen 5mC und 5hmC unterscheiden (Huang *et al.*, 2010) und wahrscheinlich repräsentiert ein Großteil der durch Bisulfit-Sequenzierung detektierten CpG-Methylierung in späten Zygoten nicht 5mC sondern 5hmC. Dennoch weisen z.B. die repetitiven Line1 Elemente bereits während der G1-Phase bis in die G2-Phase hinein einen signifikant steigenden Anteil an unmethylierten Sequenzen auf (siehe Wossidlo *et al.*, 2010, Abb. 1). Auch einzelne Gene wie Igf2 (DMR2) und TKZ751 zeigen mehr unmethylierte Cytosine in der späten Mauszygote als im Spermium (Oswald *et al.*, 2000). Dies deutet auf eine aktive, enzymatisch prozessierte DNA Demethylierung hin und spricht gegen eine rein passive Demethylierung. Die Umwandlung von 5mC zu 5hmC könnte hierbei ein Zwischenschritt der aktiven Demethylierung sein.

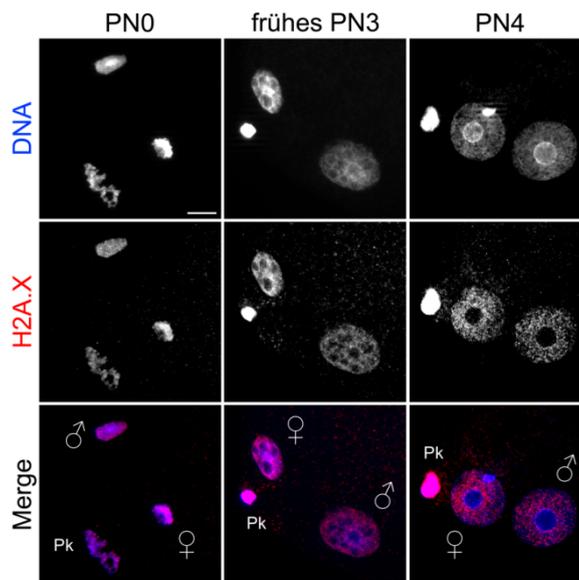
Die aktive DNA Demethylierung von 5mC über 5hmC könnte über eine direkte Dehydroxymethylierung oder einer weiteren Modifikation der hydroxylierten Methyl-Gruppe erfolgen (siehe Einleitung, Abb. 1.12). Da bisher in der Zygote keine putative Demethylase bzw. Dehydroxymethylase bestätigt werden konnte, die in der Lage ist, die Methyl-Gruppe des 5mC oder die Methanol-Gruppe des 5hmC direkt abzuspalten, wurde in dieser Arbeit die Beteiligung indirekter Demethylierungswege zur aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms der Zygote genauer untersucht. Die Hypothese der indirekten DNA Demethylierung beinhaltet die Exzision der (eventuell weiter modifizierten) Base oder des Nukleotids und die anschließende Inkorporation eines nativen Desoxycytidins durch konstitutive DNA Reparaturwege (siehe Abb. 1.12 und Morgan *et al.*, 2005; Ooi *et al.*, 2008; Gehring *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010).

#### 3.3.1 DER DNA STRANGBRUCHMARKER $\gamma$ H2A.X

Um die Beteiligung von DNA Reparaturwegen an der aktiven DNA Demethylierung zu untersuchen, wurde zunächst das Vorkommen von transienten DNA-Einzelstrangbrüchen (ESBs) während der Phase der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote näher betrachtet. Diese ESBs sind Bestandteil der BER und der NER, welche beide mögliche Reparaturwege der indirekten DNA Demethylierung sind. Ein mittlerweile häufig benutzter Marker von DNA Strangbrüchen ist  $\gamma$ H2A.X. Diese Histonmodifikation geht aus der Phosphorylierung von Serine<sup>139</sup> der H2A-Histonvariante H2A.X hervor, die in Säugetieren konserviert vorkommt und DNA Strangbrüche markiert (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). H2A.X ist abhängig vom Zelltyp in der Größenordnung von 2-25% aller H2A-Histone in Säugetieren vertreten und  $\gamma$ H2A.X wurde als DNA-Doppelstrangbruchmarker beschrieben, der für die weitere Rekrutierung von DNA Reparaturfaktoren eine wichtige Rolle spielt (Rogakou *et al.*, 1998).

$\gamma$ H2A.X markiert einen etwa 2 Megabasen großen Bereich der DNA um einen Strangbruch herum und kann durch Immunfluoreszenzen detektiert werden. Das Antikörpersignal kann im Falle von DNA Strangbrüchen in einzelnen Punkten (Foci) im Zellkern gefunden werden, wobei ein Punkt einen Strangbruch repräsentiert (Sedelnikova *et al.*, 2002). Diese Foci kolo-kalisieren mit DNA Reparaturfaktoren und Zellzyklusproteinen wie Rad50, 53BP1, MDC1 und BRCA1 (Paull *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001). Das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X kann bereits innerhalb einer Minute nach der Induktion von DNA Schäden durch beispielsweise ionisierende Strahlung detektiert werden (Rogakou *et al.*, 1998).  $\gamma$ H2A.X ist auch an der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) beteiligt, die durch meiotische Rekombination, V(D)J Rekombination, Apoptose und blockierten Replikationsgabeln entstehen können (Kuzminov, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Die Histonmodifikation  $\gamma$ H2A.X wurde anfänglich ausschließlich mit DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in Verbindung gebracht, aber spätere Arbeiten haben gezeigt, dass  $\gamma$ H2A.X auch an der Reparatur von DNA-Einzelstranglücken beteiligt ist, welche während der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) auftreten (Matsumoto *et al.*, 2007). Das volle Spektrum der von  $\gamma$ H2A.X abhängigen Effekte ist sicherlich noch nicht vollständig erfasst (Wossidlo *et al.*, 2010).

Um das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X in der Zygote zu untersuchen, wurde zunächst das konstitutive Vorkommen von H2A.X in der Mauszygote überprüft (siehe Abb. 3.19). Antikörper spezifisch für die native Histonvariante H2A.X zeigen sowohl in paternalen als auch in maternalen Pronuklei ein gleichmäßiges IF-Signal in der sich entwickelnden Zygote (siehe auch Ziegler-Birling *et al.*, 2009). Damit kann das Auftreten von  $\gamma$ H2A.X unabhängig von einer möglichen räumlichen (paternaler/maternaler Pronukleus) oder zellzyklusabhängigen Fluktuationen des H2A.X überprüft werden.



**Abb. 3.19 | Die native Histonvariante H2A.X ist während der Entwicklung der Mauszygote in beiden elterlichen Pronuklei gleichermaßen zu finden.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Zygoten im PN0- (kurz nach der Befruchtung), frühen PN3- (späte G1-Phase) und PN4-Stadium (S-Phase), die mit H2A.X-Antikörpern (rot) durch Immunfluoreszenz analysiert

wurden. Das H2A.X-Signal kann in paternalen und maternalen Pronuklei der Zygote gleichermaßen detektiert werden.  $N > 10$  pro Stadium; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$  (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).

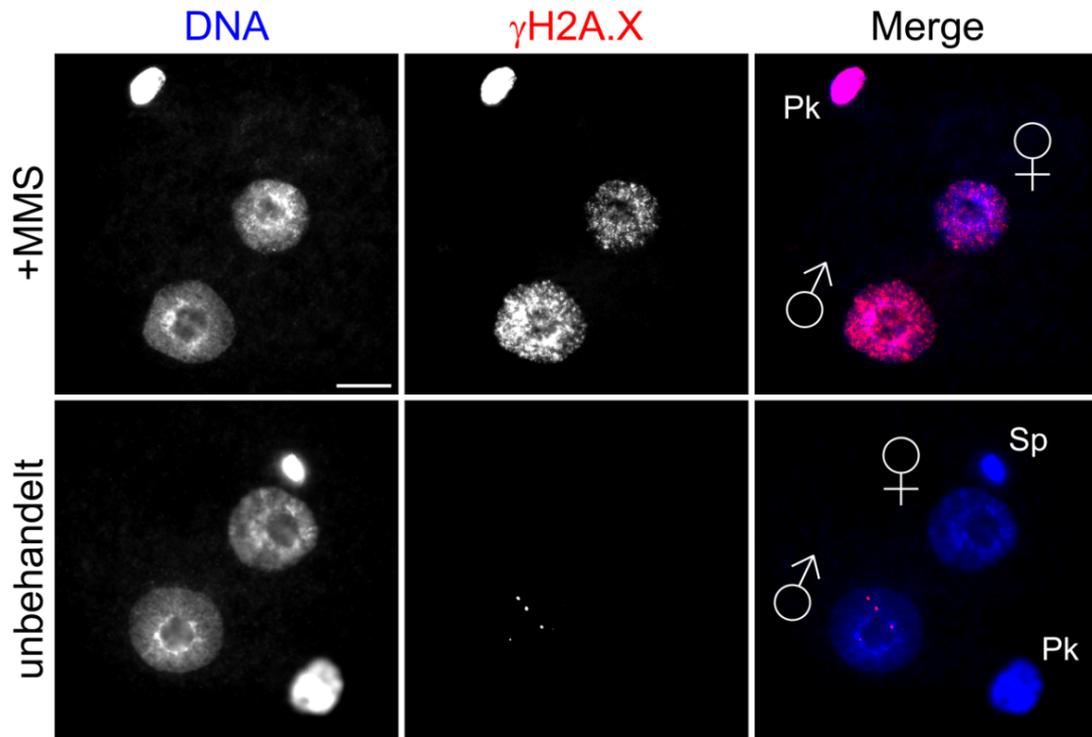
### 3.3.1.1 INDUKTION VON DNA STRANGBRÜCHEN UND $\gamma\text{H2A.X}$

Zunächst wurde die Fähigkeit der Mauszygote überprüft, auf DNA Schäden, insbesondere DNA Strangbrüche, durch die Bildung von  $\gamma\text{H2A.X}$ -Foci reagieren zu können. DNA Strangbrüche können durch die mutagenen und zytotoxischen Reagenzien Methylmethansulfonat (MMS) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hervorgerufen werden. Dabei ist die Induktion von DNA Strangbrüchen durch MMS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf verschiedene Wirkungsweisen zurückzuführen. MMS ist ein alkylierendes Mutagen, welches hauptsächlich Guanin (zu 7-Methylguanin) und Adenin (zu 3-MethylAdenin) methyliert (Beranek, 1990). Dies führt zu Basenfehlpaarungen und Blockade der DNA Replikation. DNA Schäden, die durch alkylierende Reagenzien hervorgerufen werden, werden hauptsächlich von der Basenexcisionsreparatur (BER) repariert (Lindahl *et al.*, 1999). Dieser Reparaturweg generiert ESBs als Zwischenschritt zum Einbau eines neuen Nukleotids.  $\text{H}_2\text{O}_2$  hingegen schädigt die DNA durch die Bildung von Hydroxylradikalen durch intrazelluläre Reaktion mit Übergangsmetallen (Halliwell *et al.*, 1990). Diese äußerst reaktiven Radikale greifen die Desoxyribose der DNA an und führen zu ESBs und DSBs (Halliwell *et al.*, 1991).

In einem Kontrollexperiment mit somatischen Zellen (hier Kumulus-Zellen von der Maus) wurde die Induktion von  $\gamma\text{H2A.X}$ -Signal durch MMS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht (siehe Anhang, Abb. 8.3). Die Inkubation von Kumulus-Zellen mit MMS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultiert in einem starken  $\gamma\text{H2A.X}$ -Signal. MMS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind also geeignete Mutagene, um in Zygoten das Erscheinen von  $\gamma\text{H2A.X}$ -Signal als Antwort auf die Induktion von DNA Strangbrüchen zu testen. In den folgenden Experimenten wurde bevorzugt MMS verwendet, da dies durch die Alkylierung der Basen in der DNA primär zur Aktivierung des BER-Reparaturweges führt, welcher für diese Studie von großem Interesse ist. *In vitro* befruchtete Mauszygoten wurden 1 h vor der Fixierung im frühen PN3-Stadium (späte G1-Phase) mit MMS inkubiert und mit  $\gamma\text{H2A.X}$ -Antikörpern analysiert (siehe Abb. 3.20).

Durch die Induktion von DNA Strangbrüchen mittels MMS kommt es zu einer massiven  $\gamma\text{H2A.X}$ -Antwort in paternalen und maternalen Pronuklei früher PN3 Zygoten. Die Mauszygote in der späten G1-Phase ist also in der Lage auf DNA Schäden zu reagieren und besitzt die erforderlichen DNA Reparaturwege, um eine  $\gamma\text{H2A.X}$ -Antwort zu erzeugen.

Diese induzierte DNA Reparatur-Aktivität findet zu einem Entwicklungsstand der Zygote statt (späte G1-Phase), in welcher der paternale Pronukleus das 5mC-Signal verliert (siehe Abb. 3.1 und 3.4). Die Zygoten der Kontrollgruppe zeigen auch ohne die Induktion von DNA Strangbrüchen reproduzierbar wenige  $\gamma\text{H2A.X}$ -Foci ausschließlich im paternalen Pronukleus. Dies deutet auf das transiente Vorkommen von DNA Strangbrüchen während der aktiven Demethylierung des paternalen Pronukleus hin.



**Abb. 3.20 | Die Induktion von DNA Schäden in der frühen Mauszygote führt zu massivem Auftreten von  $\gamma$ H2A.X-Signal.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Zygoten im frühen PN3-Stadium (späte G1-Phase), die 1 h vor der Fixierung mit dem alkylierenden Mutagen Methylmethansulfonat (MMS) inkubiert wurden. Das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X wurde durch indirekte IF-Analyse mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper) analysiert. In der MMS behandelten Gruppe kann  $\gamma$ H2A.X in beiden Pronuklei detektiert werden. In der unbehandelten Kontrollgruppe sind wenige  $\gamma$ H2A.X-Foci ausschließlich im paternalen Pronukleus zu sehen. N > 20 pro Gruppe; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Sp = Spermium; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

### 3.3.1.2 DYNAMIK UND PARENTALE ASYMMETRIE VON $\gamma$ H2A.X IN DER ZYGOTE

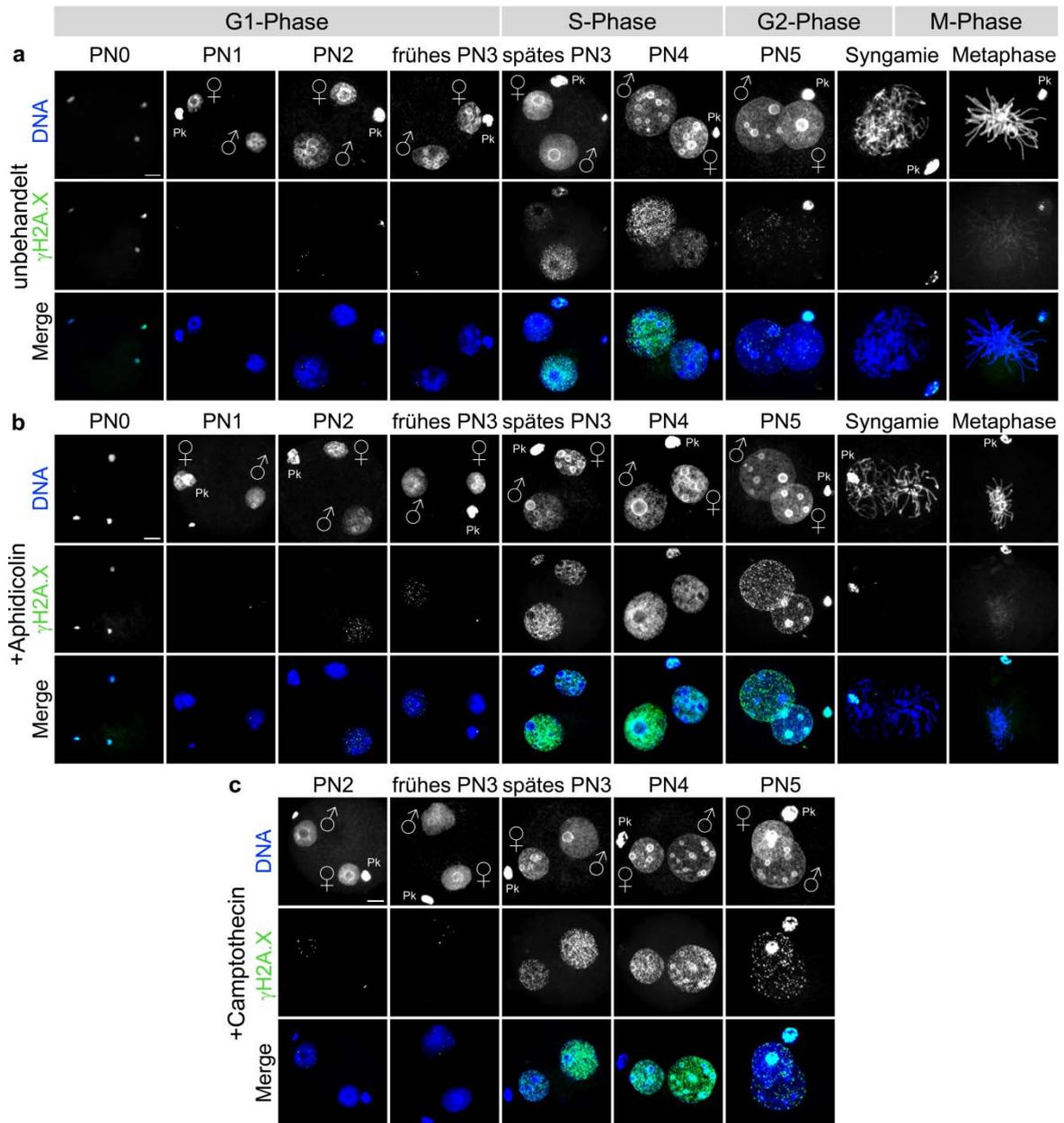
Die Detektion von einzelnen  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus von Mauszygoten in der späten G1-Phase (siehe Abb. 3.20) weist auf aktive Reparaturvorgänge im paternalen Genom hin. Diese Reparatur-Aktivität findet zeitgleich während des Verlusts von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus statt. Um eine mögliche Kausalität zwischen der aktiven DNA Demethylierung und dem Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci zu untersuchen, wurde zunächst das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X während der gesamten Entwicklung der Zygote analysiert (siehe Abb. 3.21a). Kurz nach der Befruchtung in PN0 zeigen beide kondensierten elterlichen Genome ein starkes  $\gamma$ H2A.X-Signal. In dem mittleren PN1-Stadium (~4 hpf) kann daraufhin kein  $\gamma$ H2A.X-Signal mehr detektiert werden. In der weiteren G1-Phase vom PN2 bis zum frühen PN3-Stadium können wenige, zählbare  $\gamma$ H2A.X-Foci ausnahmslos im paternalen Pronukleus gefunden werden (siehe auch Abb. 3.23). Daraufhin kommt es in der S-Phase (spätes PN3-Stadium bis zum PN4-Stadium) zu einem massiven Anstieg von  $\gamma$ H2A.X-Foci vorherrschend im paternalen Pronukleus (siehe auch Anhang, Abb. 8.5). In dieser Phase sind auch erstmalig  $\gamma$ H2A.X-Foci im maternalen Pronukleus zu sehen. Während der weiteren Entwicklung der Zygote geht die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X-Foci wieder zurück, wobei der

paternale Pronukleus weiterhin mehr  $\gamma$ H2A.X-Foci zeigt als der maternale. In der späten PN5-Phase und während dem Verschmelzen beider elterlichen Genome in der Syngamie können keine  $\gamma$ H2A.X-Signale detektiert werden. Zygoten in der Metaphase zeigen ein schwaches  $\gamma$ H2A.X-Signal an den Telomerregionen der Chromosomen.

Die Identifikation der paternalen und maternalen Pronuklei zur geschlechtsspezifischen Zuordnung des  $\gamma$ H2A.X-Signals erfolgte dabei durch morphologische Gesichtspunkte. Der paternale Pronukleus von Mauszygoten ist zumeist größer als der maternale und der maternale Pronukleus ist stets näher zum zweiten Polkörper (dieser geht aus einem haploiden Chromosomensatz der Metaphase II arretierten Eizelle hervor). Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung des paternalen und maternalen Pronukleus unabhängig von der Morphologie der Pronuklei bietet eine IF-Analyse mit H3K9me2. Diese Modifikation kann in der Zygote nur im maternalen Pronukleus detektiert werden und kann zur Unterscheidung der elterlichen Genome herangezogen werden (siehe Anhang, Abb. 8.6 und Lepikhov *et al.*, 2004).

Um einen möglichen Einfluss der IVF auf das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X in der Zygote auszuschließen, wurde die Dynamik des  $\gamma$ H2A.X-Signals von *in vitro* befruchteten Zygoten mit Zygoten, die aus einer Verpaarung abstammen, verglichen und kein Unterschied festgestellt.

Zusammenfassend konnte ein sehr dynamisches Erscheinen des DNA Strangbruchmarkers  $\gamma$ H2A.X in der Entwicklung der Mauszygote festgestellt werden. Das paternale Genom zeigt in der Zygote wesentlich mehr  $\gamma$ H2A.X-Signale als das maternale. In der späten G1-Phase, während des Verlusts von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus, können  $\gamma$ H2A.X markierte Strangbrüche ausschließlich im paternalen Genom detektiert werden.



**Abb. 3.21 | Dynamisches Erscheinen und parentale Asymmetrie von  $\gamma$ H2A.X-Signalen in verschiedenen pronukleären Stadien der Mauszygote.** (a) Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Zygoten, die zu bestimmten PN-Stadien fixiert und mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (grün) untersucht wurden. (b) Zur Inhibition von DNA Polymerasen wurden *in vitro* befruchtete Zygoten 2 h vor Fixierung mit Aph inkubiert. Die Inhibition führte im paternalen Pronukleus zu einer Verstärkung der  $\gamma$ H2A.X-Foci in der späten G1-Phase (siehe Kapitel 3.3.1.3). (c) Zur Inhibition der Topoisomerase I wurden *in vitro* befruchtete Zygoten 2 h vor Fixierung mit Camptothecin kultiviert. Cpt verstärkt  $\gamma$ H2A.X-Foci nur während der S-phase (siehe Kapitel 3.3.1.4). Im Anhang sind vergrößerte Darstellungen der Zygoten im frühen PN3-Stadium gezeigt (siehe Anhang, Abb. 8.4).  $N > 20$  pro PN-Stadium, mindestens drei unabhängige IVFs pro PN-Stadium; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (Wossidlo *et al.*, 2010).

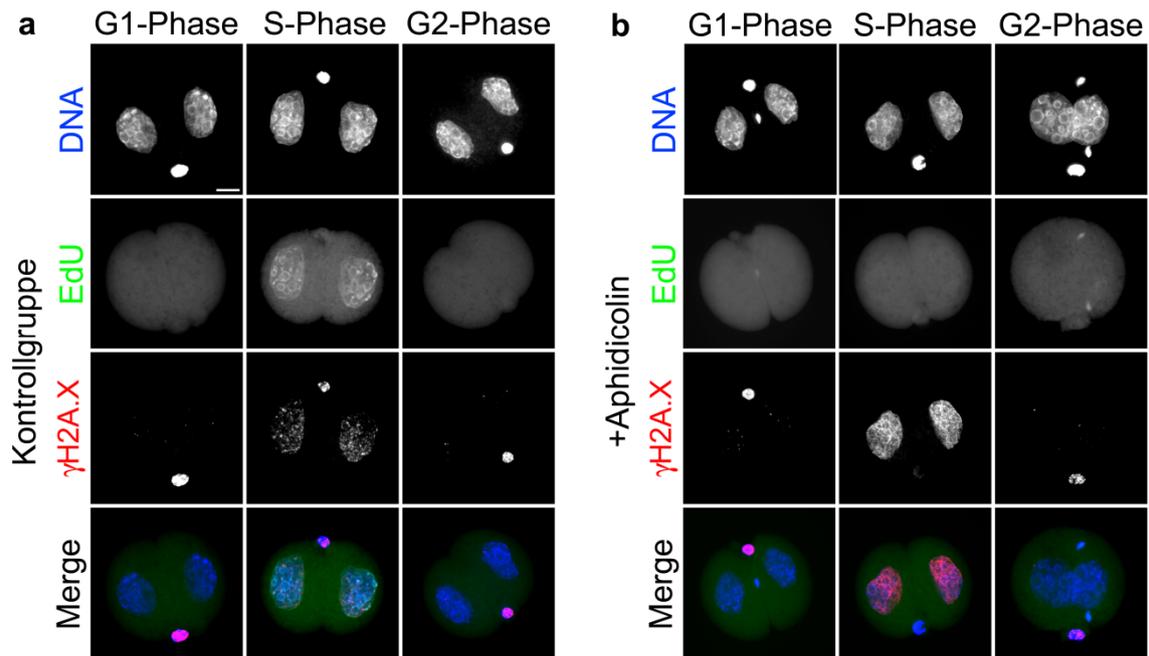
### 3.3.1.3 DIE INHIBITION VON DNA POLYMERASEN BEEINFLUSST PRÄREPLIKATIVE UND REPLIKATIVE $\gamma$ H2A.X-FOCI

Um das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Signalen während der aktiven DNA Demethylierung im paternalen Pronukleus auf DNA Reparaturvorgänge zurückzuführen, wurden im nächsten Schritt DNA Polymerasen durch Aphidicolin (Aph) inhibiert. Aph ist ein Nukleotid-Analog, welches mit dem Einbau von Desoxycytidintriphosphat (dCTP) konkurriert und sowohl replikative DNA Polymerasen als auch viele DNA Reparatur assoziierte DNA Polymerasen inhibiert (Berger *et al.*, 1979; Krokan *et al.*, 1981). DNA Polymerasen sind ein essentieller Bestandteil von DNA Reparaturprozessen und eine Inhibition dieser führt zu einer Anhäufung reparaturbedingter DNA Strangbrüche, welche durch  $\gamma$ H2A.X detektiert werden können (am Beispiel der NER siehe Matsumoto *et al.*, 2007).

*In vitro* befruchtete Mauszygoten wurden 2 h vor Fixierung zu bestimmten PN-Stadien mit Aph inkubiert und mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern analysiert (siehe Abb. 3.21b). Auffallend hierbei ist vor allem die erhöhte Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus von PN2 und frühen PN3 Zygoten (siehe auch Abb. 3.23 und Anhang, Abb. 8.4). Diese Anhäufung von  $\gamma$ H2A.X-Foci geschieht in der G1-Phase und ist damit unabhängig der DNA Replikation. Während der S-Phase im späten PN3- und PN4-Stadium erreicht das  $\gamma$ H2A.X-Signal durch die Inhibition mit Aph in paternalen und maternalen Pronuklei die höchste Intensität. Diese Steigerung zeichnet sich durch eine unzählbar hohe Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci aus, wobei hier der paternale Pronukleus wiederum das stärkste Signal zeigt. Im PN5-Stadium nimmt die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X-Foci wieder ab und in der Syngamie und Metaphase zeigt Aph keine Beeinflussung des  $\gamma$ H2A.X-Signals.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass durch die Inhibition von DNA Polymerasen die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X-Foci in bestimmten Entwicklungsphasen der Zygote beeinflusst werden kann. Diese Beeinflussung in der G1-Phase ist auf den paternalen Pronukleus beschränkt und diese präreplikative Inhibition von DNA Polymerasen bedeutet, dass während der Phase des Verlusts von 5mC-Signal im paternalen Genom DNA Reparaturvorgänge stattfinden. In der anschließenden S-Phase sind beide elterlichen Pronuklei von der Inhibition betroffen, wobei hier das paternale Genom das stärkere  $\gamma$ H2A.X-Signal zeigt.

Die durch Aph erhöhte Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus in der G1-Phase scheint ein für Zygoten spezifisches Ereignis zu sein. 2-Zell Embryonen der Maus zeigen die Verstärkung von  $\gamma$ H2A.X-Foci durch Aph nur in der S-Phase (siehe Abb. 3.22).

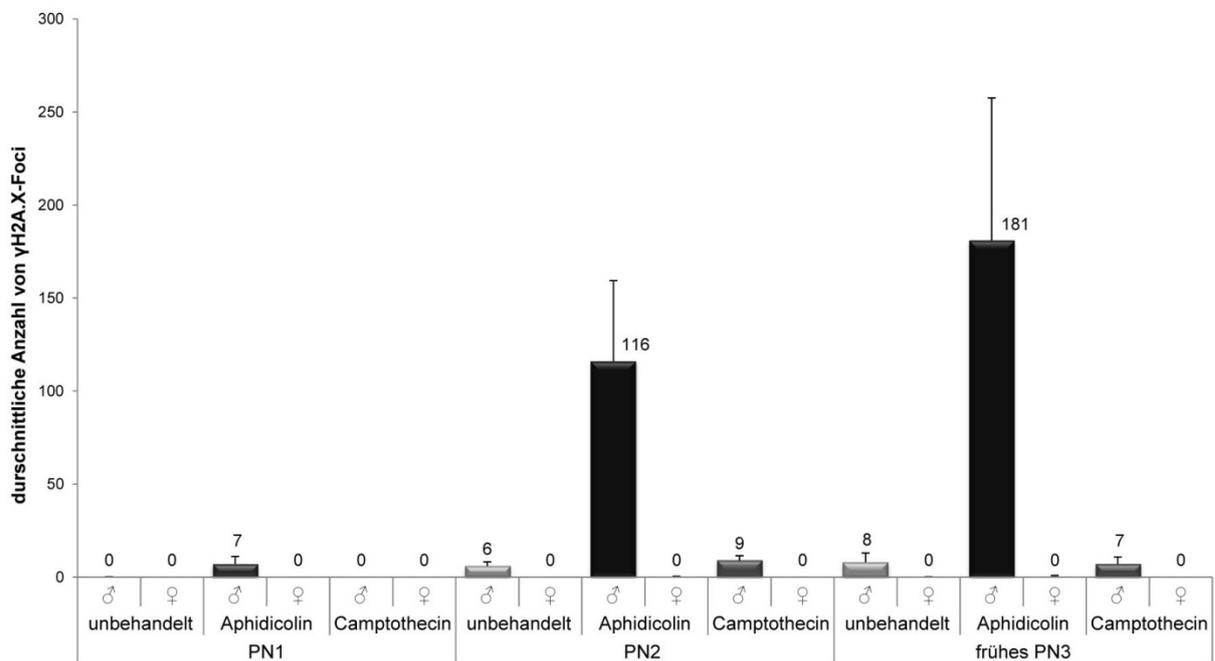


**Abb. 3.22 | 2-Zell Embryonen zeigen keinen Einfluss von Aph auf das  $\gamma$ H2A.X-Signal in der G1-Phase.** (a) *In vitro* befruchtete 2-Zell Embryonen der Maus wurden vor der Fixierung in der G1-, S- und G2-Phase mit EdU inkubiert und anschließend mit Click-iT-Reaktion (grün) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot) untersucht. 2-Zell Embryonen in der G1- und der G2-Phase (kein Einbau von EdU) zeigen nur wenige  $\gamma$ H2A.X-Foci, während in der S-Phase ein starkes  $\gamma$ H2A.X-Signal zu sehen ist. (b) *In vitro* befruchtete 2-Zell Embryonen wurden 2 h vor Fixierung mit Aph inkubiert. Durch die Inhibition von DNA Polymerasen kann kein Einbau von EdU in der S-Phase detektiert werden. In der G1-Phase von 2-Zell Embryonen findet durch die Inhibition mit Aph im Unterschied zur Zygote keine Verstärkung der  $\gamma$ H2A.X-Foci statt. N > 20 pro Gruppe; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).

#### 3.3.1.4 DIE ENTSTEHUNG VON PRÄREPLIKATIVEN UND REPLIKATIVEN $\gamma$ H2A.X-FOCI IN DER ZYGOTE ERFOLGT DURCH UNTERSCHIEDLICHE PROZESSE

Die starke Anhäufung von  $\gamma$ H2A.X-Foci in der G1- und S-Phase von Zygoten durch die Inhibition von DNA Polymerasen mit Aph könnte durch die Beteiligung verschiedener Prozesse erfolgen, die für die Akkumulation von DNA Strangbrüchen verantwortlich sein können. Da Aph sowohl replikative als auch DNA Reparatur assoziierte DNA Polymerasen inhibiert, wurde die Entstehung von  $\gamma$ H2A.X in Zusammenhang mit der DNA Replikation näher untersucht. Um gezielt die DNA Replikation zu blockieren wurden Zygoten mit Camptothecin (Cpt) inkubiert. Cpt ist ein Inhibitor von Topoisomerasen des Typ I, welche für das Entwinden des DNA Doppelstrangs vor der Replikationsgabel verantwortlich sind (Wang, 2002). Dabei inhibiert Cpt die Religation des DNA Einzelstrangbruches, der durch die Topoisomerase I transient vorgenommen wird, um die Verdrehung der DNA („Supercoiling“) vor der Replikationsgabel zu entspannen und eine progressive DNA Replikation zu erlauben. Durch die Inhibition mit Cpt kommt es schließlich zu blockierten Replikationsgabeln und zur Anhäufung von DSBs, die auch durch  $\gamma$ H2A.X detektiert werden können (Furuta *et al.*, 2003).

*In vitro* befruchtete Mauszygoten wurden 2 h vor der Fixierung zu bestimmten pronukleären Stadien mit Cpt inkubiert und mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern analysiert (siehe Abb. 3.21c). Verglichen mit der unbehandelten und der mit Aph behandelten Gruppe (siehe Abb. 3.21a/b) führt die Inhibition mit Cpt zur Verstärkung von  $\gamma$ H2A.X-Foci nur im späten PN3- bis zum PN4-Stadium (S-Phase). Im Gegensatz zur Inhibition mit Aph werden durch Cpt die  $\gamma$ H2A.X-Foci von Zygoten in PN2 oder frühen PN3 nicht beeinflusst (siehe auch Abb. 3.23). Das verstärkte Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Signalen im PN2- und frühen PN3-Stadium durch Aph geschieht demnach unabhängig von der DNA Replikation und deutet auf die Beteiligung von DNA Reparaturvorgängen zeitgleich zum Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus hin.

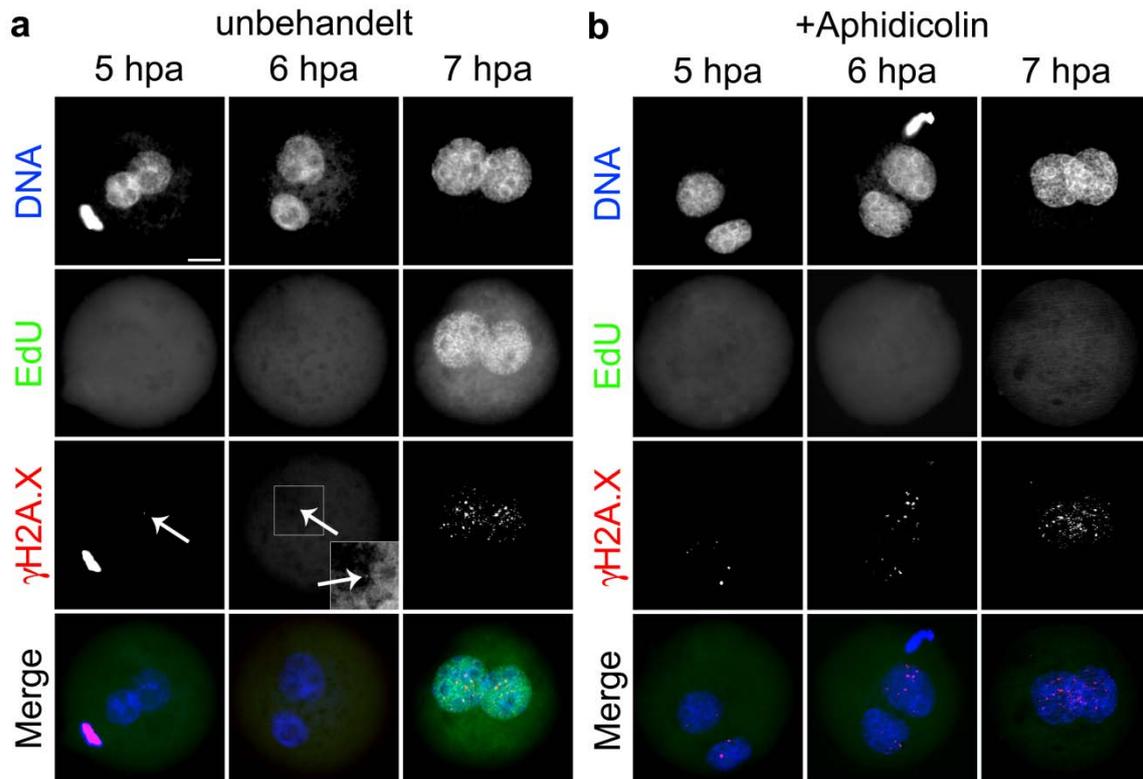


**Abb. 3.23 | Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci in paternalen und maternalen Pronuklei der G1-Phase von Mauszygoten.** Der Graph zeigt die durchschnittliche Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci in unbehandelten, mit Aphidicolin und mit Camptothecin behandelten Zygoten (jeweils 2 h vor der Fixierung) in der G1-Phase. Die mit Aphidicolin blockierten Zygoten zeigen ausschließlich im paternalen Pronukleus einen starken Anstieg von  $\gamma$ H2A.X-Signal (siehe Anhang, Tab. 8.4).  $N > 20$  pro Stadium; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus (Wossidlo *et al.*, 2010).

### 3.3.1.5 $\gamma$ H2A.X-SIGNALE WÄHREND DER ENTWICKLUNG VON GEKLONTEN 1-ZELL EMBRYONEN

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 gezeigt wurde, zeigen SCNT 1-Zell Embryonen der Maus einen aktiven Verlust von 5mC-Signal und den Gewinn von 5hmC-Signal in beiden Pseudopronuklei. Um auch hier eine Verbindung zwischen aktiver DNA Demethylierung und DNA Reparaturvorgängen näher zu durchleuchten, wurden SCNT 1-Zell Embryonen auf das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X untersucht. Die hierzu analysierten Klone wurden wiederum in einer Kollaboration mit Vittorio Sebastiano und Michele Boiani von der Arbeitsgruppe Hans Schöler des Max-Planck-Instituts in Münster gewonnen.

Die S-Phase von SCNT Embryonen beginnt bei 7 hpa, welches durch den Einbau von EdU angezeigt wird (siehe Abb. 3.24a). Ähnlich dem Erscheinen von wenigen  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus von Zygoten (siehe Abb. 3.23) können in der G1-Phase von Klonen sehr wenige  $\gamma$ H2A.X-Foci detektiert werden. Die Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci in Klonen ist dabei etwa 5-10fach geringer als im paternalen Pronukleus der Zygote. Durch die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aph kommt es analog zu dem Verhalten von Zygoten zu einer verstärkten Anzahl von  $\gamma$ H2A.X-Foci in der G1- und S-Phase (siehe Abb. 3.24b).



**Abb. 3.24 | Dynamisches Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Signalen in geklonten 1-Zell Embryonen.** (a) SCNT Embryonen der Maus wurden 1 h vor der Fixierung bei 5, 6 und 7 hpa mit EdU inkubiert und mittels Click-iT-Reaktion (grün) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot) analysiert. Ähnlich der Dynamik von  $\gamma$ H2A.X in Zygoten zeigen Klone mit Beginn der S-Phase bei 7 hpa ein verstärktes  $\gamma$ H2A.X-Signal. (b) Die Inhibition durch Aph 2 h vor der Fixierung blockiert den Einbau von EdU und führt zu einem verstärkten Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci in der G1- und S-Phase. Pfeile zeigen einzelne  $\gamma$ H2A.X-Foci; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010).

### 3.3.2 EINZELSTRANGBRÜCHE IM PATERNALEN PRONUKLEUS VON ZYGOTEN DER G1-PHASE

Das  $\gamma$ H2A.X-Signal wurde in ersten Veröffentlichungen nur mit DNA Doppelstrangbrüchen in Verbindung gebracht (Rogakou *et al.*, 1998). In der Studie von Matsumoto *et al.* (2007) wurde daraufhin zum ersten Mal von  $\gamma$ H2A.X im Kontext von DNA Einzelstranglücken berichtet (Matsumoto *et al.*, 2007). Damit ist  $\gamma$ H2A.X nicht nur ein Marker für DNA Doppelstrangbrüche, sondern könnte auch für die Signalisierung von DNA Einzelstrangbrüchen verantwortlich sein. Das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci

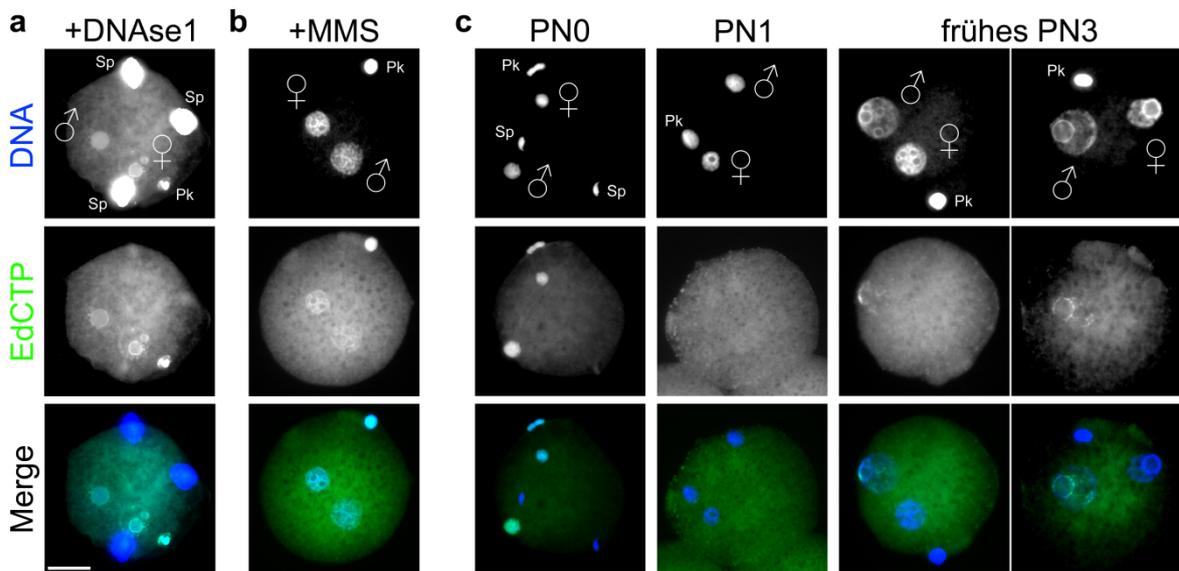
einzig im paternalen Pronukleus in der G1-Phase von Zygoten deutet auf die Existenz von ESBs und Reparaturmechanismen während Phasen der aktiven DNA Demethylierung hin.

Um das transiente Auftreten von ESBs im paternalen Pronukleus in der G1-Phase der Zygote unabhängig vom  $\gamma$ H2A.X-Signal zu verifizieren, wurden *in vitro* befruchtete Zygoten mit einem modifizierten Nick-Translation-Assay analysiert (siehe Methoden, Abschnitt 2.2.9 und Wossidlo *et al.*, 2010). Dabei werden Zygoten kurz vor der Fixierung einem Chromatin Dekondensationsschritt ausgesetzt, durch welches die DNA im Chromatin für nachfolgende enzymatische Reaktionen zugänglich gemacht wird. Bei diesem Chromatin Dekondensationsschritt werden durch basische Moleküle wie Heparin, Spermin und Spermidin die Histone und DNA bindende Proteine von der DNA verdrängt. Ohne diesen Schritt konnte durch eine Nick-Translation in fixierten Zygoten kein Signal erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Der Nick-Translation-Assay ist ein *in vitro* Nachweis für ESBs und wurde für aufgereinigte DNA entwickelt (Rigby *et al.*, 1977). In diesem Test wird die Eigenschaft der DNA Polymerase I aus *Escherichia coli* benutzt, ESBs zu detektieren und durch die intrinsische 5'-3' Exonukleaseaktivität etwa zehn Nukleotide zu entfernen, die dann anschließend durch neue Nukleotide ersetzt werden. Dadurch wird der DNA Strangbruch nicht geschlossen, sondern in 5'-3' Richtung verschoben. Durch die Benutzung von markierten Nukleotiden (hier 5-Ethynyl-Desoxycytidin, EdC) kann im Anschluss der Strangbruch nachgewiesen werden.

*In vitro* befruchtete Zygoten wurden in einem Kontrollexperiment im frühen PN3-Stadium fixiert und anschließend mit DNaseI behandelt. Die Analyse mittels modifiziertem Nick-Translation-Assay zeigt in beiden elterlichen Pronuklei ein starkes Nick-Translations-Signal, welches auf die Existenz massiver ESBs hindeutet (siehe Abb. 3.25a). Im nächsten Schritt wurden *in vitro* befruchtete Zygoten 1 h vor der Chromatin Dekondensation und Fixierung im frühen PN3-Stadium mit MMS behandelt. Diese Induktion von DNA Schäden durch ein alkylierendes Mutagen führte ebenfalls zu einem starken Nick-Translations-Signal, respektive zu einem starken Auftreten von ESBs in paternalen und maternalen Pronuklei (siehe Abb. 3.25b), während die Detektion von DNA Doppelstrangbrüchen durch einen TUNEL-Test keine Signale zeigte (persönliche Kommunikation mit Dr. Konstantin Lepikhov). Mit diesen beiden Kontrollexperimenten konnte die zuverlässige *in situ* Detektion von ESBs von fixierten Zygoten gezeigt werden.

Daraufhin wurden als nächstes *in vitro* befruchtete Zygoten der frühen G1-Phase auf das natürliche Vorkommen von ESBs getestet (siehe Abb. 3.25c). In PN0 zeigen beide elterlichen Genome ein starkes Nick-Translations-Signal. Dies stimmt mit den starken  $\gamma$ H2A.X-Signalen während der Phase der Chromatin Dekondensation und des Protamin-Histon-Austauschs überein (siehe Abb. 3.21a). In PN1 können in beiden Pronuklei keine Strangbrüche detektiert werden, welches wiederum mit der Abwesenheit von  $\gamma$ H2A.X-Foci in diesem Stadium einhergeht. In der frühen PN3-Phase können ESBs ausschließlich in paternalen Pronuklei gefunden werden.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass in der G1-Phase von Zygoten in zwei verschiedenen Phasen ESBs detektiert werden können. Die erste Phase in PN0 erfolgt zeitgleich mit der Chromatin Dekonsensation und dem Protamin-Histon-Austausch. Diese Strangbrüche repräsentieren Reparaturereignisse in Folge der Aktivität von Topoisomerasen, welche für die beiden genannten Prozesse eine wichtige Rolle spielen (Wang, 2002). In der zweiten Phase können die ESBs ausschließlich im paternalen Genom gefunden werden; dies passiert synchron zum Verlust von 5mC-Signal des paternalen Pronukleus. Die aktive DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus der Mauszygote ist folglich mit dem zeitgleichen Erscheinen von ESBs verbunden.



**Abb. 3.25 | DNA Einzelstrangbrüche in der G1-Phase von Mauszygoten.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Zygoten, die mit dem modifizierten Nick-Translation-Assay auf die Existenz von DNA Einzelstrangbrüchen (ESBs) untersucht wurden. Dabei wurde 5-Ethynyl-Desoxythymidin (EdC) als Substrat für die DNA Polymerase I vermittelte Inkorporation von Nucleotiden benutzt, welches durch Click-iT-Reaktion mit einem Fluorophor markiert wurde. (a) *In vitro* befruchtete Zygoten im PN3-Stadium wurden nach der Fixierung mit DNaseI behandelt. Durch diese Induktion von ESBs kommt es zum Einbau von EdC in beide elterlichen Pronuklei. (b) *In vitro* befruchtete Zygoten im frühen PN3-Stadium wurden 1 h vor Chromatin Dekondensation und Fixierung mit MMS behandelt. Diese *in vivo* Induktion von DNA Schäden führt zur Detektion von EdC-Signal in paternalen und maternalen Pronuklei. (c) IVF Zygoten in der G1-Phase zeigen ein dynamisches Erscheinen von ESBs. In PN0 zeigen beide elterlichen Genome die Anwesenheit von ESBs, während im PN1-Stadium keine ESBs zu detektieren sind. Im frühen PN3-Stadium zeigen ausschließlich paternale Pronuklei die Gegenwart von ESBs. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Sp = Spermium; Maßstabsbalken = 20 µm (siehe Wossidlo *et al.*, 2010, verändert).

### 3.3.3 DNA REPARATURFAKTOREN WÄHREND DER AKTIVEN DNA

#### DEMETHYLIERUNG

Das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci und ESBs im paternalen Pronukleus in der G1-Phase von Zygoten suggeriert eine Beteiligung von DNA Reparaturprozessen an der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms. Diese indirekte Demethylierung über DNA

Reparaturwege könnte durch Faktoren der BER oder NER erfolgen (siehe Einleitung, Abschnitt 1.5.2). Aus diesem Grund wurde die Mauszygote auf die Präsenz von DNA Reparaturfaktoren untersucht, die an der Entstehung bzw. Reparatur dieser Strangbrüche beteiligt sein könnten und mit einer indirekten DNA Demethylierung bzw. dem Verlust von 5mC in Verbindung gebracht werden können.

### 3.3.3.1 FAKTOREN DER BASENEXZISIONSREPARATUR (BER)

Zunächst wurden wichtige Faktoren der BER auf das dynamische Erscheinen in der Zygote zeitgleich zur Detektion von  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus der späten G1-Phase überprüft. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen bestimmte Faktoren der BER zu genau definierten Entwicklungsstadien der Zygote durchgeführt.

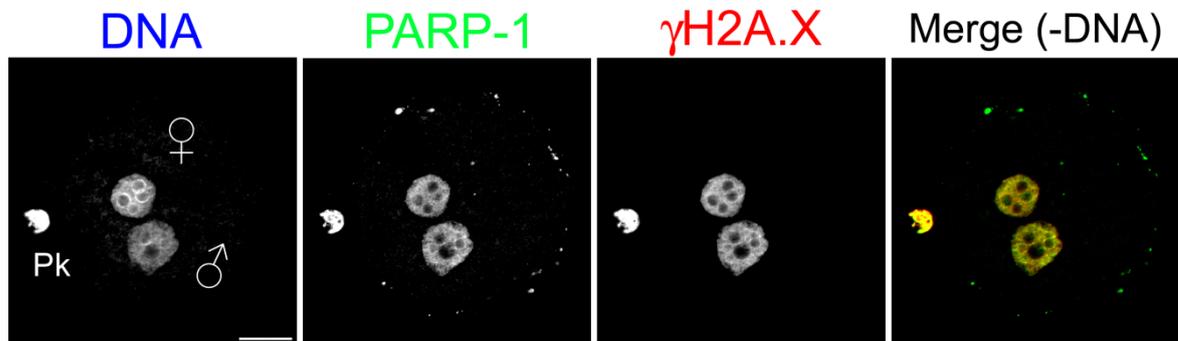
#### 3.3.3.1.1 KO-LOKALISATION VON PARP-1 UND $\gamma$ H2A.X-SIGNALEN

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) ist ein molekularer Sensor von ESBs und ist unter anderem für die Rekrutierung von XRCC1 im Reparaturweg der SN-BER verantwortlich (Masson *et al.*, 1998; Godon *et al.*, 2008). XRCC1 dient daraufhin als Plattform für DNA Polymerase  $\beta$  und Ligase III (Hegde *et al.*, 2008a).

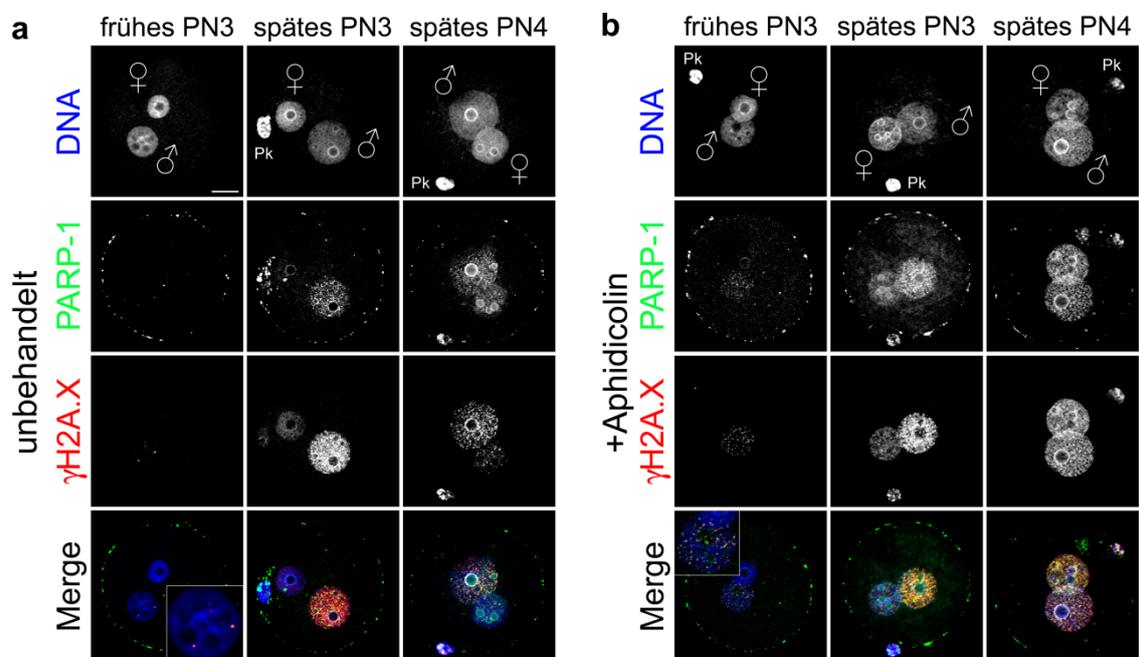
In einem Kontrollversuch wurde zunächst das Erscheinen von PARP-1 Antikörpersignalen durch die Induktion von DNA Schäden mittels MMS untersucht. Dies sollte auch zur Qualitätskontrolle der verwendeten PARP-1-Antikörper dienen, da, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 mittels modifiziertem Nick-Translation-Assay gezeigt wurde, MMS zur massiven Induktion von ESBs durch Aktivierung des BER führt (siehe auch Lundin *et al.*, 2005). *In vitro* befruchtete Mauszygoten wurden 1 h vor der Fixierung in der späten G1-Phase (frühes PN3-Stadium) mit MMS inkubiert und mit PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse untersucht (siehe Abb. 3.26). Die Induktion von ESBs durch MMS erzeugt ein starkes PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Signal in paternalen und maternalen Pronuklei. Der in dieser Studie benutzte Antikörper gegen PARP-1 zeigt eine starke Kreuzreaktion mit dem Oolemma. Eine Aufnahme mit Z-Stapeln und der anschließenden Software-gestützten Verrechnung auf eine Ebene (ohne die Berücksichtigung der obersten und untersten Z-Ebenen mit ausschließlich Oolemma-Signal) kann dieses Problem umgehen. Allerdings zeigt das PARP-1-Signal hierdurch ein ringförmiges IF-Signal um das Zytoplasma herum.

Als nächstes wurden *in vitro* befruchtete Zygoten in der späten G1- und S-Phase auf das natürliche Vorkommen von PARP-1 untersucht (siehe Abb. 3.27). In der späten G1-Phase sind PARP-1-Foci ko-lokalisierend mit  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus zu detektieren. Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aph verstärkt in diesem präreplikativen Stadium sowohl PARP-1 als auch ko-lokalisierende  $\gamma$ H2A.X-Signale. Auch während der S-Phase können PARP-1 Signale präferentiell im paternalen Pronukleus festgestellt werden.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass der für die BER wichtige Faktor PARP-1 in der Zygote im paternalen Pronukleus mit  $\gamma$ H2A.X-Foci ko-lokalisiert. Dies deutet auf das transiente Erscheinen von ESBs und aktiver BER während der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms hin.



**Abb. 3.26 | Die Induktion von DNA Schäden durch MMS erzeugt starke PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Signale.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Mauszygoten, die 1 h vor Fixierung im frühen PN3 Stadium (späte G1-Phase) mit MMS behandelt wurden und anschließend mit PARP-1 (grün) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot) durch IF-Analyse untersucht wurden. Beide elterlichen Pronuklei zeigen starke Signale für PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X. Die in dieser Studie benutzten Antikörper gegen PARP-1 zeigen eine starke Kreuzreaktion mit dem Oolemma, welche sich durch ein ringförmiges IF-Signal in Z-Stapel verrechneten Aufnahmen äußert. N > 20; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).



**Abb. 3.27 | Ko-Lokalisation von PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Signalen.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Mauszygoten im frühen PN3-, späten PN3- und im späten PN4-Stadium, die mit PARP-1 (grün) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot) analysiert wurden. Die Aufnahmen zeigen verrechnete Z-Stapel-Aufnahmen. Diese Kreuzreaktion ist deswegen als Ring um die Zygote zu erkennen. (a) Die PARP-1-Foci und  $\gamma$ H2A.X-Foci ko-lokalisieren in der späten G1-Phase (frühes

PN3-Stadium) im paternalen Pronukleus. In der S-Phase (spätes PN3- bis spätes PN4-Stadium) sind sowohl PARP-1 als auch  $\gamma$ H2A.X-Signale bevorzugt im paternalen Pronukleus zu detektieren. (b) Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aphidicolin 2 h vor Fixierung verstärkt sowohl PARP-1 als auch ko-lokaliserte  $\gamma$ H2A.X-Foci. N > 20 pro PN-Stadium und Gruppe; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010).

### 3.3.3.2 FAKTOREN DER NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER)

Neben der BER kann auch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) als Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung in Betracht gezogen werden. Deshalb wurden in dieser Studie auch Faktoren der NER auf die Existenz in der Zygote mit indirekter Immunfluoreszenzanalyse und verschiedenen Fixierungstechniken untersucht. Die IF-Analysen der wichtigen NER-Faktoren XPC, ERCC1 und TFIIH sowie die putative Demethylase Gadd45a (Barreto *et al.*, 2007) hat mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern außer einem moderaten Hintergrundsignal kein aussagekräftiges Signal in paternalen oder maternalen Pronuklei ergeben (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.4 EINBAU VON NUKLEOTIDEN IM PATERNALEN PRONUKLEUS DER ZYGOTE WÄHREND DER AKTIVEN DEMETHYLIERUNG IN DER G1-PHASE

Die Hypothese der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms der Zygote über mögliche Mechanismen der DNA Reparatur beinhaltet den Austausch des 5mC oder modifizierten 5mC (5hmC, 5hmU, 5fC, 5CaC, usw.) mit nativem Desoxycytidin. Der Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus ist bereits in der späten G1-Phase nahezu abgeschlossen und die Bisulfit-Sequenzierung von Line1 Elementen zeigt schon in der späten G1-Phase einen signifikanten Verlust des CpG-Methylierungslevels (siehe Kapitel 3.1 und Wossidlo *et al.*, 2010). Folglich sollte im Falle der Beteiligung von DNA Reparaturwegen an der indirekten aktiven DNA Demethylierung bereits im späten G1-Stadium ein Einbau von Nukleotiden/Desoxycytidin erfolgen. Wie bereits in der Zellzyklus-Analyse von *in vitro* befruchteten Mauszygoten gezeigt wurde (Kapitel 3.1.2), konnte mit den markierten Nukleotiden BrdU, BrdC, BrdCTP, EdU und EdCTP kein vorzeitiger Einbau im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase detektiert werden. Auch Mikroinjektionen von einem mit Fluorophor direkt markierten Desoxycytidin (FITC-dCTP) in die frühe Zygote konnten keinen asymmetrischen Einbau im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase entdecken (Daten nicht gezeigt). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde dieses Resultat durch die Detektion von EdC erst zu Beginn der S-Phase im späten PN3-Stadium bestätigt (Guan *et al.*, 2011).

Deshalb wurde der Versuch unternommen, den Einbau von Nukleotiden im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase durch einen sensitiveren Nachweis zu erbringen. Dazu wurde radioaktiv markiertes Desoxycytidintriphosphat in das Kulturmedium von *in vitro*

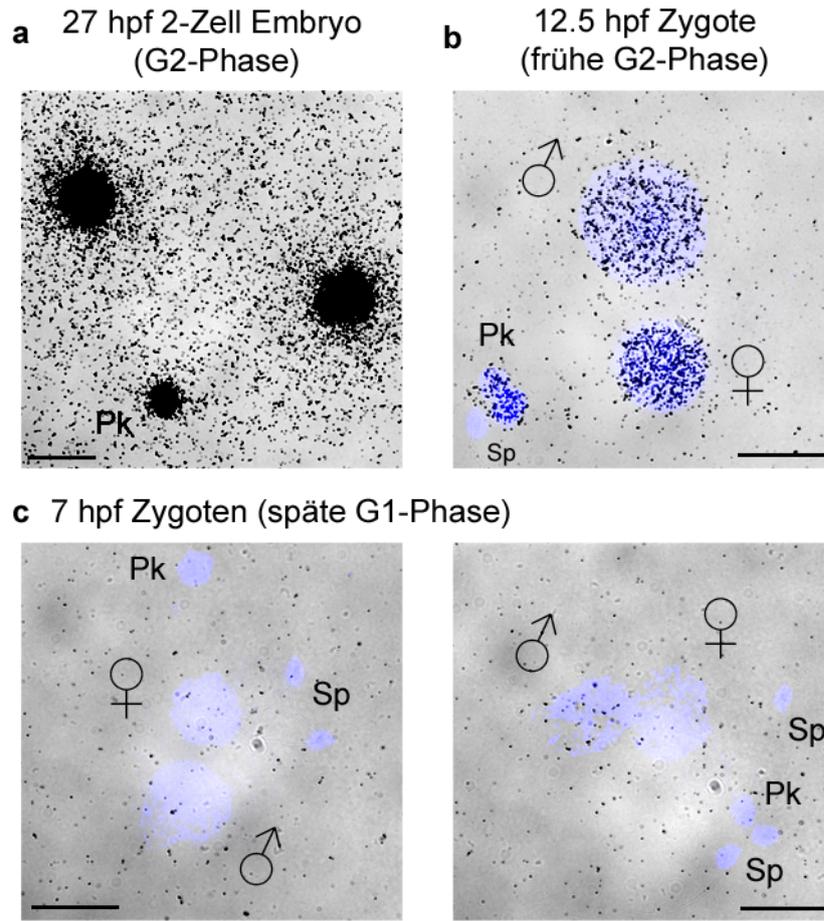
befruchteten Mauszygoten gegeben und der Einbau zu bestimmten Zellzyklusphasen autoradiographisch mit Hilfe einer Fotoemulsion untersucht (siehe Methodenteil, Kapitel 2.2.10).

Zunächst wurden in einem Kontrollexperiment *in vitro* befruchtete 2-Zell Embryonen untersucht, die bis zur Fixierung bei 26 hpf (frühe G2-Phase von *in vitro* befruchteten 2-Zell Embryonen) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP kultiviert wurden. Diese 2-Zell Embryonen, welche seit Beginn der Inkubation mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP bereits zwei S-Phasen durchlaufen haben, zeigten eine deutliche schwarze Färbung der Silberkörner der benutzten Fotoemulsion (siehe Anhang, Abb. 8.8). Dabei konnte das Signal nicht in den Zellkernen detektiert werden, sondern war auf der gesamten Oberfläche und in der Peripherie des 2-Zell Embryos verteilt aufzufinden. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist die zähflüssige Eigenschaft der auf einer Gelatine-Basis bestehenden Fotoemulsion, welche anscheinend nicht in den fixierten Embryo eindringen kann. Da die Embryonen nach einer herkömmlichen PFA-Fixierung durch eine anschließende Behandlung mit Methanol auf dem Objektträger fixiert wurden, besitzen sie weiterhin eine intakte Morphologie mit unversehrten Zellmembranen. Diese Zellmembran verhindert trotz der vorrausgehenden Versuche, die Zellmembran durch verschieden starke Permeabilisierungslösungen durchgängig zu machen, das Eindringen der zähflüssigen Fotoemulsion in die fixierten Embryonen. Die zähflüssige Eigenschaft der Fotoemulsion würde eine zuverlässige Aussage über einen asynchronen Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP im paternalen Pronukleus der G1-Zygote verhindern, da sich dadurch die Strahlungsquelle nicht einwandfrei lokalisieren lässt. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt die paternalen und maternalen Pronuklei der Zygote nach der Kultivierung mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP durch Mikromanipulation operativ entnommen und räumlich getrennt voneinander analysiert (siehe Anhang, Abb. 8.9). Als Negativkontrolle wurde eine kleine Probe an Zytoplasma entnommen und ebenfalls autoradiographisch untersucht. Die Analyse der Schwarzfärbung der Silberkörner zeigt, dass die manuell isolierten elterlichen Pronuklei einer Zygote im späten G1-Stadium (7 hpf) in diesem Experiment etwa gleich starke radioaktive Strahlung aufweisen. Die Untersuchung der Negativkontrolle (Zytoplasma) zeigte jedoch eine ähnliche Menge an schwarz gefärbten Silberkörnern, welches eine stichhaltige Aussage über einen asymmetrischen Einbau von Nukleotiden im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase verhindert. Anscheinend ist das Zytoplasma einer mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP kultivierten Zygote so stark mit dem Radionuklid belastet, dass ein Vergleich von paternalen und maternalen Pronuklei, welche durch die manuelle Entnahme von einer nicht unwesentlichen Menge an Zytoplasma umgeben sind, nicht möglich ist. Eine andere Erklärung könnte auch die Metabolisierung des leicht zugänglichen  $^{32}$ P in  $\alpha$ -Position des [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP von der Zygote und die daraus resultierende omnipräsente Strahlung der gesamten Zygote sein (vergleiche Anhang, Abb. 8.8).

Um eine mögliche Metabolisierung des [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP zu umgehen, wurden als nächstes *in vitro* befruchtete Zygoten mit  $^{14}$ C-dCTP kultiviert. Das  $^{14}$ C ist ein schwächeres Radionuklid als  $^{32}$ P und benötigt eine längere Inkubationszeit mit der Fotoemulsion,

verhindert aber eine einfache Metabolisierung der Strahlungsquelle durch den Stoffwechsel der Zygote. Als weitere Versuchsänderung wurden die Embryonen durch eine Tarkowski-Behandlung auf dem Objektträger fixiert (siehe Methodenteil und Tarkowski, 1966). Diese Methode führt zur Fixierung der nackten DNA auf dem Objektträger, welches den negativen Einfluss des möglicherweise kontaminierten Zytoplasmas verhindert. In Abb. 3.28 sind die Ergebnisse dieses Experiments gezeigt. *In vitro* befruchtete 2-Zell Embryonen im G2-Stadium, die ab 3 hpf mit  $^{14}\text{C}$ -dCTP im Kulturmedium inkubiert wurden, zeigen eine starke Schwarzfärbung der Silberkörner beider Zellkerne, welches auf einen massiven Einbau von  $^{14}\text{C}$ -dCTP in beiden Zellkernen hindeutet. Bemerkenswert ist hier auch die starke Strahlung des Polkörpers, welches auf eine aktive DNA Synthese in dieser besonderen Zelle hindeutet. *In vitro* befruchtete Zygoten im frühen G2-Stadium (12 hpf), welche bereits ihre DNA repliziert haben, zeigen einen gleichmäßig starken Einbau von  $^{14}\text{C}$ -dCTP in den maternalen und paternalen Pronuklei. Zygoten im späten G1-Stadium hingegen zeigen keinen markant unterschiedlichen Einbau von  $^{14}\text{C}$ -dCTP in paternale oder maternale Pronuklei verglichen mit dem Hintergrundsignal.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie kein signifikanter Einbau von Nukleotiden vor Beginn der S-Phase im paternalen Pronukleus nachgewiesen werden, welches möglicherweise gegen eine Beteiligung von DNA Reparaturprozessen an der aktiven Demethylierung in der späten G1-Phase spricht. Dieses Ergebnis könnte aber auch bedeuten, dass die aktive Demethylierung des paternalen Genoms während der G1-Phase nur bestimmte Gene oder Sequenzen betrifft, welche mit dieser Methode aufgrund unzureichender Sensitivität nicht nachgewiesen werden kann.



**Abb. 3.28 | Autoradiographie von Zellkernen *in vitro* befruchteter Embryonen.** Gezeigt sind repräsentative Pronuklei und Zellkerne von *in vitro* befruchteten Zygoten und 2-Zell Embryonen, die mit radioaktiv markierten  $^{14}\text{C}$ -Desoxycytidin kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten durch Autoradiographie analysiert wurden. 2-Zell Embryonen und Zygoten im G2-Stadium zeigen den massiven Einbau von  $^{14}\text{C}$ -dCTP repräsentiert durch die starke Schwarzfärbung des Fotofilms. Bemerkenswert ist hier der Einbau von Nukleotiden im Polkörper. Zygoten im späten G1-Stadium zeigen keinen wesentlichen Unterschied in der Schwarzfärbung der Silberkörner beider elterlichen Pronuklei im Vergleich zum Hintergrundsignal. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Sp = Spermium; Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ .

## 4 DISKUSSION

Die Entwicklung höherer Säugetiere ist durch zwei wichtige Phasen epigenetischer Reprogrammierung charakterisiert. Die erste Phase erfolgt während der Reifung der Urkeimzellen und führt zur Löschung der epigenetischen Markierungen und zur Etablierung des für Eizellen und Spermien spezifischen Epigenoms. Diese Reprogrammierung gewährleistet, dass die reifen Keimzellen die erforderlichen epigenetischen Profile zur Erzeugung einer totipotenten Zygote besitzen. In der zweiten Phase der epigenetischen Reprogrammierung werden die epigenetischen Programme der Keimzellen in der frühen Präimplantationsentwicklung gelöscht und in ein embryotypisches Epigenom reprogrammiert, welches im Wechselspiel mit genetischen Faktoren für die Regulation der Expression wichtiger Pluripotenzgene und der Steuerung der frühen Embryogenese verantwortlich ist. Nur durch diese epigenetische Reprogrammierung kann mit der Verwendung nur einer „Blaupause“ der genetischen Information einer Zelle ein komplexes, multizelluläres Säugetier entstehen.

Diese beiden Phasen der epigenetischen Reprogrammierung sind mit dramatischen Veränderungen des Chromatins verbunden. Hier kommt es zu genomweiten Umstrukturierungen von Histonmodifikationen und DNA Methylierungsmustern. Das paternale Genom der Zygote durchläuft dabei eine massive Reprogrammierung der DNA Methylierung innerhalb nur eines Zellzyklus. Dieser, als „aktive DNA Demethylierung“ bezeichnete Vorgang, ist für das Verständnis der molekularen Abläufe der epigenetischen Reprogrammierung in der heutigen Grundlagenforschung von fundamentaler Bedeutung. Neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet können bei vielen verschiedenen biologischen und medizinischen Fragestellungen einen wichtigen Beitrag leisten. Trotz der großartigen Erfolge in der Erzeugung von geklonten Organismen und pluripotenten Stammzellen durch die induzierte Reprogrammierung somatischer Zellkerne ist der genaue Mechanismus der epigenetischen Reprogrammierung noch nicht verstanden. Nur durch das Verstehen der molekularen Abläufe während Phasen der natürlichen epigenetischen Reprogrammierung in Säugetieren können wir zielgerichtet in dieses Geschehen eingreifen und für die Menschheit nutzbar machen.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb die molekularen Mechanismen der epigenetischen Reprogrammierung in frühen Präimplantationsembryonen untersucht. Gerade die aktive Demethylierung des paternalen Pronukleus in der Mauszygote ist ein sehr kontrovers diskutiertes Thema und es haben bereits mehrere Arbeitsgruppen vielversprechende Hypothesen und mögliche Kandidaten für eine putative Demethylase vorgeschlagen, jedoch keine konnte bisher bis ins Detail bewiesen werden. Durch die Möglichkeit der *in vitro* Fertilisation von Eizellen und der Kultivierung von Zygoten sollten

in dieser Arbeit genau definierte Stadien der Zygote und früher Präimplantationsembryonen der Maus auf mögliche Mechanismen der aktiven DNA Demethylierung untersucht werden.

Die wohl größte Schwierigkeit in der Aufklärung der Mechanismen der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus liegt in der begrenzten Zahl der zur Verfügung stehenden Eizellen und Embryonen. Dadurch können viele molekularbiologische Hochdurchsatzmethoden nicht angewandt werden, welche zur Identifikation und Quantifizierung bestimmter Faktoren genutzt werden könnten. So enthält das haploide Genom des paternalen Pronukleus der Mauszygote nur etwa 3 pg an DNA (Nagy, 2003) und durch die Superovulation einer typischen Labormaus können je nach Stammhintergrund 10-30 Eizellen gewonnen werden. Aufgrund dieser geringen Mengen an Versuchsobjekten sind die an frühen Präimplantationsembryonen durchgeführten Untersuchungen auf die Analyse weniger Embryonen beschränkt und erfordern die geübte Handhabung dieser nur im Mikroskop sichtbaren Zellen.

Eine wirkungsvolle Methode zur Identifikation bestimmter Faktoren der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote bietet hierbei die Immunfluoreszenzanalyse. Durch die äußerst sensitive Bindung von Antikörpern an ihr jeweiliges Epitop können einzelne Embryonen auf das Vorhandensein einer putativen DNA Demethylase oder Schlüsselfaktoren eines bestimmten Stoffwechselweges untersucht werden. Die hierfür benötigte Menge an Embryonen kann durch IVF-Experimente zu präzise definierten Entwicklungsstadien erhalten werden. Gepaart mit der Manipulation der Entwicklung der Zygote durch die Inhibition und Interaktion mit putativen Schlüsselfaktoren der aktiven Demethylierung können hierdurch potentielle Mechanismen der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus analysiert werden.

### 4.1 DIE GENOMWEITE DNA DEMETHYLIERUNG IN EINEM NEUEN LICHT

Die zentrale Entdeckung dieser Arbeit ist der Befund, dass während der genomweiten Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote höherer Säugetiere der Großteil des 5mC zu 5hmC „hydroxyliert“ wird. Im Lichte dieses Befundes muss der Begriff der „aktiven Demethylierung“ neu überdacht werden. Der historisch geprägte Begriff der aktiven Demethylierung bezeichnet die Umwandlung von 5mC zu unmodifiziertem Cytosin. Die massive Hydroxylierung von 5mC zu 5hmC zeigt jedoch, dass die Reprogrammierung von 5mC in der Zygote hauptsächlich über die Umwandlung zu 5hmC erfolgt. Man könnte folglich die Hydroxylierung von 5mC zu 5hmC als eine „epigenetische Demethylierung“ bezeichnen - die Methyl-Gruppe des 5mC ist zwar noch präsent, aber epigenetisch modifiziert.

Die epigenetische Funktion von 5hmC ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch konnten neueste Studien zeigen, dass 5hmC mit Euchromatin und aktiv transkribierten Genen (Ficz *et*

*al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011a) assoziiert ist, während eine andere Studie berichtet, dass 5hmC zur Repression von Genen führen kann (Robertson *et al.*, 2011). Eine weitere Studie zeigt, dass 5hmC in ESCs sowohl mit aktiven als auch mit repressiven Chromatinmodifikationen gefunden werden kann, welches zu einer schnellen An- oder Abschaltung von wichtigen Genen führen könnte (Pastor *et al.*, 2011). Diese Studien deuten darauf hin, dass 5hmC als weiterer epigenetischer Faktor neben 5mC an der Regulation der Genaktivität beteiligt ist.

Aus diesem Grund könnte die „epigenetische Demethylierung“ von 5mC zu 5hmC für die totipotente Zygote bereits ausreichend sein, um die Expression wichtiger Pluripotenzgene in der frühen Präimplantationsentwicklung zu regulieren. Diese Hydroxylierung des 5mC könnte außerdem gegenüber der aktiven Demethylierung zu nativem Cytosin den Vorteil besitzen, dass die epigenetische Markierung des modifizierten Cytosins weiterhin bestehen bleibt. Die Zelle könnte hierdurch das 5hmC als zeitlichen Puffer einer aktiven Demethylierung nutzen, um das betroffene Gen zu einem jeweils geeigneten späteren Entwicklungsstand zu dehydroxymethylieren. Möglicherweise könnte die Zelle diese Markierung auch nutzen, um die DNA Methylierung zum geeigneten Zeitpunkt wieder zu etablieren. Die Reversibilität der enzymatischen Oxidation von 5mC zu 5hmC ist bisher noch nicht beobachtet worden und inwiefern 5hmC die Aktivität der Erhaltungs- und *de novo* Methyltransferasen beeinflusst, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. *In vitro* Experimente haben hier ergeben, dass Dnmt1 5hmC nicht als Substrat für die Aufrechterhaltung während der DNA Replikation verwenden kann (Valinluck *et al.*, 2007). Jedoch wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Studie durch *in vitro* und *in silico* Analysen gezeigt, dass NP95 die sechste Base 5hmC erkennen und binden kann (Frauer *et al.*, 2011). NP95 ist für die Rekrutierung von Dnmt1 zu hemimethylierten CpG-Dinukleotiden verantwortlich und wird für die Aufrechterhaltung der DNA Methylierung während der DNA Replikation benötigt (Bostick *et al.*, 2007). Möglicherweise könnte NP95 auch für die Rekrutierung von Dnmt1 an „hemi-hydroxymethylierte“ CpG-Positionen verantwortlich sein. Dnmt1 könnte dadurch zur Wiederherstellung der DNA Methylierung der symmetrischen CpG-Position auf dem Gegenstrang führen. Interessanterweise zeigt diese Studie auch, dass die bisher unbekannt katalytische Aktivität von NP95 zu einer weiteren Modifikation von 5hmC beitragen könnte (Frauer *et al.*, 2011).

Mit diesen Überlegungen kann die DNA Demethylierung in der Zygote, bzw. die Umwandlung von 5mC zu nativem Cytosin, auch in einem weitaus geringeren Umfang stattfinden, als bisher vermutet wurde. Die bisher angenommene genomweite Demethylierung des paternalen Genoms betrifft wahrscheinlich nur bestimmte Gene und Sequenzen. Dies würde auch erklären, weshalb trotz intensiver Bemühungen vieler Wissenschaftler der genaue Mechanismus der aktiven Demethylierung noch nicht aufgeklärt werden konnte, da bisher die Erforschung der Demethylierung in der Zygote von genomweiten Ereignissen ausgegangen ist.

## 4.2 DER VERLUST VON 5mC-SIGNAL IM PATERNALEN UND MATERNALEN PRONUKLEUS DER ZYGOTE

Um eine Aussage über die genomweite Demethylierung in der Zygote treffen zu können, wurde zunächst der dynamische Verlust von 5mC-Signal in paternalen und maternalen Pronuklei genauer analysiert. Im Unterschied zu früheren Studien wurden hier die Denaturierungsbedingungen für den 5mC-Antikörper optimiert, um 5mC sensitiver detektieren zu können. Auch diese verbesserten Bedingungen bestätigten den deutlichen Verlust des 5mC-Signals bereits im frühen PN3-Stadium, wie von Santos *et al.* (2002) berichtet wurde (siehe Abb. 3.1 und Santos *et al.*, 2002). Bereits im frühen PN3-Stadium verliert der paternale Pronukleus 62.7% an 5mC-Signalintensität (siehe Abb. 3.2 und 3.5). Wie anhand von Zellzyklusanalysen mit EdU nachgewiesen werden konnte, liegt dieser Zeitpunkt noch vor dem Beginn der S-Phase (siehe Abb. 3.4). Dies zeigt, dass der Verlust von 5mC-Signal größtenteils ein aktiver, enzymatischer Prozess ist und unabhängig von passiven, replikationsabhängigen Ereignissen geschieht.

Allerdings konnten durch die optimierten Bedingungen auch Unterschiede zu früheren 5mC-Analysen festgestellt werden – der paternale Pronukleus zeigt auch in der weiteren Entwicklung der Zygote eine 27,5%ige Restmethylierung. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die bisher angenommene genomweite Demethylierung (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002) des paternalen Pronukleus in der Zygote keineswegs das gesamte paternale Genom betrifft.

Erstaunlicherweise zeigt auch der maternale Pronukleus in der Quantifizierung einen Verlust von 5mC-Signal. Dieser Verlust kann auch in der G1-Phase detektiert werden, ist aber über die S-Phase hinweg deutlich stärker ausgeprägt (siehe Abb. 3.2). Damit konnte gezeigt werden, dass entgegen der bisherigen Annahme (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000) nicht nur das paternale Genom demethyliert wird, sondern auch das maternale Genom von dieser Aktivität betroffen ist. Zudem verlieren sowohl der paternale als auch der maternale Pronukleus vom frühen PN3- bis zum PN4-Stadium etwa die Hälfte an Signalintensität, welches die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung beider elterlichen Genome nicht nur auf die G1-Phase der Zygote beschränkt.

Die optimierte 5mC-Immunfluoreszenzanalyse hat zudem ergeben, dass vor allem das perizentromerische Heterochromatin, welches die NPBs umgibt, von der epigenetischen Demethylierung des paternalen Genoms ausgeschlossen ist. In Pflanzen und in *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass diese Regionen sehr genarm und durch einen hohen Gehalt an retrotransposablen Elementen gekennzeichnet sind (Myser *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). Die Stilllegung dieser repetitiven Elemente durch DNA Methylierung ist ein wichtiger Schutz vor der Reaktivierung retrotransposabler Sequenzen, die durch Rekombinationsereignisse die Integrität des Genoms gefährden könnten. Zudem können im perizentromerischen Heterochromatin auch die repetitiven Sequenzen für die 5S rRNA

gefunden werden, welche für die Proteinsynthese erforderlich sind (Mathieu *et al.*, 2003). Die Stilllegung dieser Sequenzen durch die DNA Methylierung ist ein wichtiger Prozess, um diese tandemartigen repetitiven Sequenzen vor unerwünschten Rekombinationsereignissen zu schützen (Schmitz *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde folglich gezeigt, dass der Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus geringer ausfällt, als zuvor angenommen wurde (siehe Mayer *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). Zudem wird das paternale 5mC größtenteils zu 5hmC hydroxyliert - daher ist der Anteil der DNA Demethylierung zu nativem Cytosin am Verlust des 5mC-Signals fragwürdig. Allerdings konnte die DNA Demethylierung in der Zygote auch unabhängig vom 5mC-Signalverlust gezeigt werden. In der Veröffentlichung von Okada *et al.* (2010) wurde die CXXC-Domäne von Mll1 als EGFP-Fusionsprotein kloniert und zur Detektion unmethylierter Cytosine in der Zygote benutzt (Okada *et al.*, 2010). Diese CXXC-Domäne bindet mit starker Affinität an unmethylierte CpG-Dinukleotide und zeigt eine zunehmende Lokalisation im paternalen Pronukleus während der Entwicklung der Zygote (Okada *et al.*, 2010). Auch die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierungen bestimmter Gene und repetitiver Sequenzen konnten die DNA Demethylierung von 5mC in der Zygote teilweise bestätigen (Oswald *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010). Hier wurde berichtet, dass ein ins Genom eingeschleustes Transgen (*TKZ751*) im paternalen Genom der Zygote demethyliert wird (Oswald *et al.*, 2000). Auch die Bisulfit-Analyse repetitiver Elemente hat ergeben, dass Line1 in der Zygote ebenfalls demethyliert wird (Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010), welches den Anstieg an CXXC-EGFP-Signal im paternalen Pronukleus erklärt, da Line1 Elemente in mehrtausendfacher Zahl im Säuger genom integriert sind (Yoder *et al.*, 1997). Jedoch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die meisten imprinteten Gene und die retrotransposablen Elemente IAP und ETn keine Verminderung ihres Methylierungslevels während der Entwicklung der Zygote aufweisen (Reik *et al.*, 2001b; Lane *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010). Die Ergebnisse zweier Studien zeigen außerdem, dass Spermien in ihren Promotoren bereits sehr ähnliche Methylierungsmuster im Vergleich zu pluripotenten Stammzellen besitzen (Farthing *et al.*, 2008; Smallwood *et al.*, 2011).

Eindeutige Beweise für eine genomweite Demethylierung des paternalen Pronukleus in der Zygote sind bisher noch nicht erbracht worden. Die bisher veröffentlichten Daten und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten eher auf eine gerichtete DNA Demethylierung bestimmter Gene und Sequenzen im paternalen Genom hin. Erst genomweite DNA Methylierungsanalysen in späten Zygoten und Präimplantationsembryonen könnte diese wichtige Wissenslücke schließen und den Begriff der „genomweiten Demethylierung“ klären.

## 4.3 5HMC IN DER ZYGOTE UND IN DER FRÜHEN

### PRÄIMPLANTATIONSENTWICKLUNG

Die von Tahaliani *et al.* (2009) und Kriaucionis *et al.* (2009) veröffentlichte Entdeckung von 5hmC als sechste Base des Genoms in Säugerzellen ist ein wichtiger Meilenstein in der Geschichte der Epigenetik (Kriaucionis *et al.*, 2009; Tahaliani *et al.*, 2009). Mit der Identifizierung der für die Konversion von 5mC zu 5hmC verantwortlichen Enzyme Tet1-3 (Tahaliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010) bestand die Möglichkeit, dass die enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC an der DNA Demethylierung in der Zygote beteiligt sein könnte. Diese Umwandlung zu 5hmC würde die Unterschiede zwischen dem dynamischen Verlust von 5mC-Signal und den Ergebnissen der Bisulfit-Sequenzierung von Line1 Elementen erklären (siehe Abb. 3.5 und 3.6). Aus diesem Grund wurde die Beteiligung von 5hmC an der DNA Demethylierung in der Zygote von Säugetieren in dieser Studie genauer untersucht.

Die Immunfluoreszenzanalyse mit verschiedenen 5hmC-Antikörpern konnte die Existenz dieser sechsten Base in der Mauszygote aufdecken (Abb. 3.7, 3.8 und Anhang, Abb. 8.1) und zwei unabhängige Publikationen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Iqbal *et al.*, 2011; Ruzov *et al.*, 2011). Dabei wurde 5hmC als vorherrschende Modifikation des paternalen Pronukleus in der Zygote mehrerer höherer Säugetiere gefunden (siehe Abb. 3.9). Die Generierung von 5hmC im paternalen Genom von Maus-, Kaninchen- und Rinderzygoten deutet auf eine konservierte epigenetische Rolle in der Reprogrammierung der DNA Methylierung der frühen Säugetierembryogenese hin.

Bemerkenswert an dieser Untersuchung waren die speziellen Muster der 5mC- und 5hmC-Signale in den Pronuklei von Rinderzygoten. Diese Zygoten zeigen im Unterschied zu den untersuchten Maus- und Kaninchenzygoten ein punktförmiges 5mC- und 5hmC-Signal. Dabei wurden die analysierten Rinderzygoten durch *in vitro* Befruchtung *in vitro* maturierter Eizellen gewonnen. Möglicherweise könnte durch die unterschiedliche Befruchtungsmethode und die *in vitro* Maturation der verwendeten Eizellen die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung über 5hmC beeinflusst werden. Dieser Effekt könnte aber auch ein artspezifischer Effekt sein, der nur auf Rinderembryonen beschränkt ist (siehe auch Beaujean *et al.*, 2004). Zur Klärung dieser Frage müssten die 5mC- und 5hmC-Signale *in vivo* befruchteter Rinderzygoten mit denen von *in vitro* befruchteten Rinderzygoten verglichen werden, welche in dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

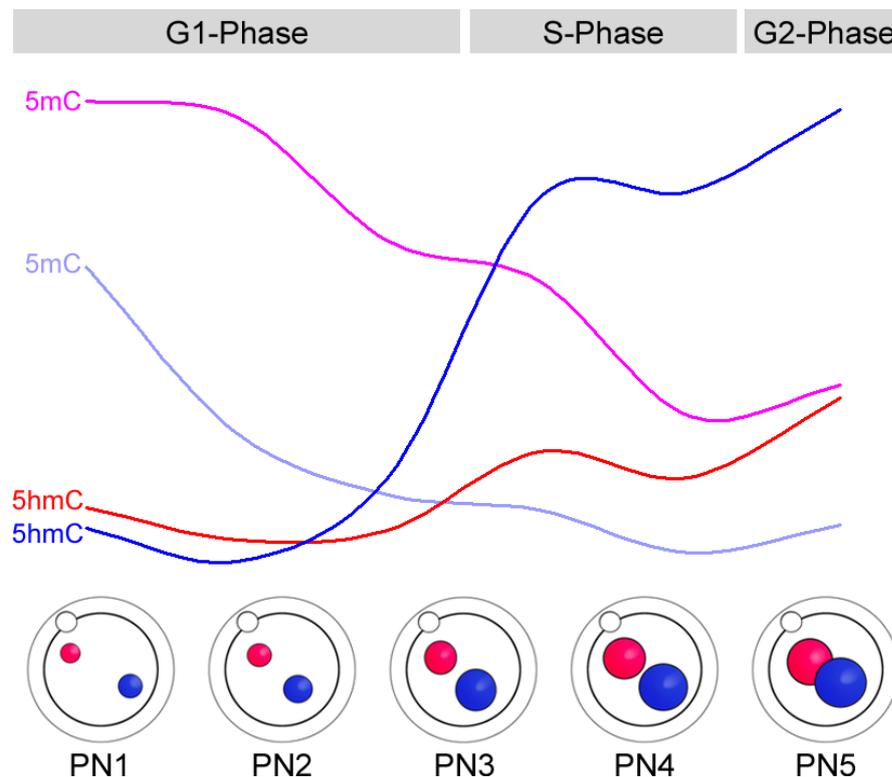
#### 4.3.1 DER VERLUST VON 5MC IST MIT DEM GEWINN VON 5HMC

##### VERBUNDEN

Ein Vergleich der Dynamiken des 5mC- und 5hmC-Signals (siehe Abb. 4.1) unterstreicht die generelle Bedeutung dieser sechsten Base des Säuger-genoms in der frühen Embryogenese. Hier konnte gezeigt werden, dass der Verlust von 5mC-Signal in der Zygote mit dem Gewinn

von 5hmC-Signal einhergeht. Diese Dynamik ist im paternalen Pronukleus deutlich stärker ausgeprägt, kann aber auch im geringeren Ausmaß im maternalen Pronukleus festgestellt werden (siehe Abb. 4.1).

Aufgrund der verschiedenen Sensitivitäten der 5mC- und 5hmC-Antikörper kann hier kein direkter Vergleich der jeweiligen Signalintensitäten diskutiert werden. Die kurze zeitliche Verzögerung zwischen dem schnellen Verlust des 5mC-Signals von PN1 bis PN2 und dem starken Anstieg des 5hmC-Signals im frühen PN3-Stadium verleitet allerdings zur Spekulation, dass in dieser Phase bereits eine Dehydroxymethylierung über eine mögliche weitere Modifikation wie 5hmU oder 5fC und 5caC stattfinden könnte.



**Abb. 4.1 | Dynamischer Verlust von 5mC-Signal und Gewinn an 5hmC-Signal in paternalen und maternalen Pronuklei.** Gezeigt sind die dynamischen Veränderungen der paternalen (hellblaue und dunkelblaue Linie) und maternalen (pinke und rote Linie) 5mC- und 5hmC-Signalstärken in der sich entwickelnden Mauszygote. Der Verlust des 5mC-Signals beider elterlichen Pronuklei ist mit dem Gewinn an 5hmC-Signal assoziiert.

#### 4.3.2 DIE EPIGENETISCHE REPROGRAMMIERUNG IN DER ZYGOTE ERFOLGT DURCH FAKTOREN DER EIZELLE

In dieser Studie wurde auch untersucht, ob das dynamische Erscheinen von 5hmC in der Zygote höherer Säugetiere von Faktoren der Eizelle abhängt und/oder die Präsenz von paternalen Chromosomen oder paternalen Faktoren des Spermiums benötigt. Dazu wurde die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung von SCNT 1-Zell Embryonen der Maus analysiert.

Die Analyse der DNA Demethylierung in SCNT 1-Zell Embryonen ergab, dass in diesen Klonen das Ooplasma der enukleierten Eizelle in der Lage ist, beide Pseudopronuklei zu demethylieren (siehe Abb. 3.10). Wie bereits in Zygoten beobachtet konnte dieser Verlust von 5mC-Signal bereits in der G1-Phase detektiert werden. Damit erfolgt dieser Verlust etwa 2 h schneller als in einer Zygote und könnte auf den fehlenden Protamin-Histon-Austausch des Spermiums zurückzuführen sein, welcher in etwa die gleiche Zeitspanne benötigt (Santos *et al.*, 2002). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Protamin-Histon-Austausch des Spermiums kein essentielles Ereignis für die Reprogrammierung der DNA Methylierung darstellt.

Die Bisulfit-Sequenzierung von Line1 und ETn Elementen dieser Klone zeigte interessanterweise keine signifikanten Änderungen des CpG-Methylierungslevels (diese Bisulfit-Analysen wurden von Frau Julia Arand in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Walters durchgeführt, siehe Wossidlo *et al.*, 2010, Abb. 5). Dies könnte auf die Notwendigkeit einer weniger stark ausgeprägten Reprogrammierung von somatischen Zellkernen hindeuten oder das Problem der ineffizienten Reprogrammierung von Klonen aufzeigen. Möglicherweise könnte dieser Befund auch durch die verschieden modifizierten und verpackten Genome von somatischen Zellen und Spermien zustande kommen. Spermien sind hauptsächlich mit Protaminen verpackt und besitzen nur einen sehr kleinen Anteil an Histonen (1% in der Maus, siehe Brykczynska *et al.*, 2010). Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von Histonmodifikationen an der gerichteten DNA Demethylierung in der Zygote sein.

Die erneute Diskrepanz zwischen dem Verlust des 5mC-Signals und den Ergebnissen der Bisulfit-Sequenzierung deutete ähnlich zu der Problematik in Zygoten auch in Klonen auf die Beteiligung von 5hmC an der DNA Demethylierung hin. Die 5hmC-Immunfluoreszenzanalyse von Klonen bestätigte diese Vermutung. Wie bereits in der Zygote höherer Säugetiere gezeigt werden konnte, ist auch in Klonen der Verlust von 5mC-Signal mit dem Gewinn an 5hmC verbunden (siehe Abb. 3.11). Diese Analyse konnte darlegen, dass der Verlust von 5mC und die Generierung von 5hmC ein von dem Ooplasma höherer Säugetiere gesteuerter Prozess ist, der unabhängig vom maternalem und paternalem Genom und paternalen Faktoren des Spermiums stattfindet. Exogene Genome wie das paternale Genom von Spermien oder das injizierte Genom einer somatischen Zelle werden hydroxymethyliert. Anscheinend gehört die Erzeugung von 5hmC zum epigenetischen „Standard-Programm“ einer Eizelle höherer Säugetiere.

### 4.3.3 5HMC IN DER SPÄTEREN PRÄIMPLANTATIONSENTWICKLUNG

Die Akkumulation von 5hmC in der späten G2-Phase der Zygote höherer Säugetiere wirft die Frage auf, wie stabil diese Modifikation in der frühen Präimplantationsentwicklung ist und welche Rolle diese in der weiteren Embryogenese einnimmt.

Die 5hmC-Immunfluoreszenzanalyse von 2-Zell Embryonen in der G1- und G2-Phase zeigte, dass auch hier 5hmC detektiert werden kann. Interessanterweise ist das 5hmC-Signal

in 2-Zell Embryonen auf eine Kernhälfte konzentriert, während die andere Hälfte 5mC charakterisiert (siehe Abb. 3.8a und 3.12). Anscheinend sind paternale und maternale Chromosomen im 2-Zell Embryo in weiterhin getrennten Bereichen im gleichen Zellkern lokalisiert. Die biologische Bedeutung dieser Kompartimentalisation ist unklar, könnte jedoch auf eine besondere nukleäre Organisation transkriptionsaktiver und inaktiver Bereiche hinweisen. Wie in der Veröffentlichung von Probst *et al.* (2010) berichtet wurde, erfolgt in der späten Zygote und im 2-Zell Embryo die Transkription von perizentromerischen Satellitensequenzen (Probst *et al.*, 2010). Die Expression dieser Elemente ist eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung des embryonalen perizentromerischen Heterochromatins und wird interessanterweise durch die spezifische Transkription der Forward bzw. Reversen Transkripte dieser Satellitensequenzen reguliert (Probst *et al.*, 2010). Wie in Abb. 3.7 gezeigt wurde, kann sowohl 5hmC als auch 5mC an den perizentromerischen Regionen von Zygoten in der Metaphase detektiert werden. Diese bivalente Markierung könnte auf die unterschiedliche epigenetische Markierung der Forward und Reversen perizentromerischen Satelliten-Sequenzen hinweisen. FISH-Analysen im 2-Zell Embryo zeigten außerdem, dass die Forward Transkripte der perizentromerischen Sequenzen ebenfalls eine Kompartimentalisation in den diploiden Zellkernen aufweisen und durch die Analyse mit H3K9me2-Antikörpern konnte diese Hemisphäre den paternalen Chromosomen zugeordnet werden (Probst *et al.*, 2010). Das Vorkommen sowohl von 5hmC als auch 5mC in diesen Sequenzen auf den paternalen Chromosomen könnte für die Regulation der Transkription dieser Elemente und damit für die Etablierung des perizentromerischen Heterochromatins in der frühen Embryogenese eine wichtige Bedeutung spielen.

Die Quantifizierung der 5hmC-Immunfluoreszenzanalyse von 2-Zell Embryonen in der G2-Phase ergab, dass hier das 5hmC-Signal den durchschnittlichen Wert paternaler und maternaler Signalintensitäten der G2-Zygote besitzt. Das bedeutet, dass es im 2-Zell Embryo zu keiner weiteren Veränderung der Gesamtmenge von 5hmC kommt (siehe Abb. 3.8b). Dieser Befund ist mit dem Rückgang der Transkription von Tet3 im 2-Zell Embryo verbunden (Wossidlo *et al.*, 2010). Die massive Erzeugung von 5hmC scheint somit ein auf die Zygote beschränkter Prozess zu sein. Allerdings müssten auch spätere Präimplantationsstadien auf den Gehalt mit 5hmC-Signal quantifiziert werden, um diese Aussage auf die gesamte Präimplantationsentwicklung ausdehnen zu können. Die Quantifizierung dieser mehrzelligen Embryonen müsste durch die Bildanalyse einzelner Zellkerne erfolgen, da sich diese Zellkerne in der Bildaufnahme des gesamten Embryos überlappen und somit keine unverfälschte Analyse gemacht werden kann. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnte diese Untersuchung jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Die qualitative IF-Analyse späterer Präimplantationsembryonen mit 5hmC-Antikörpern hat ergeben, dass 5hmC bis zur Blastozyste in den Zellkernen gefunden werden kann (siehe Abb. 3.13). Interessanterweise kommt es vom 2-Zell Embryo bis zur Morula zu einer von Zellteilung zu Zellteilung sukzessiven Konzentration des 5hmC-Signals, welches in der Morula nur noch als stark konzentriertes, punktförmiges Signal detektiert werden konnte.

Anscheinend erfolgt in späteren Präimplantationsembryonen keine stärkere Hydroxymethylierung der Zellkerne. Diese Dynamik könnte auf eine Nicht-Aufrechterhaltung von 5hmC während der DNA Replikation späterer Präimplantationsembryonen und einer daraus resultierenden „Verdünnung“ des Signals mit jeder Zellteilung hinweisen. Knockdown-Experimente von Tet1-3 Proteinen und DNA Methyltransferasen/NP95 im 2-Zell Embryo könnten diese Hypothese überprüfen.

In der Blastozyste erfolgt daraufhin die erneute Generierung von 5hmC in der ICM (siehe Abb. 3.13). Die Zellen des Trophoektoderms, die im Wesentlichen zur Bildung der Plazenta beitragen, scheinen von dieser Aktivität nicht betroffen zu sein. Diese Entdeckung ist umso erstaunlicher als zum gleichen Zeitpunkt auch die *de novo* Methylierung der ICM detektiert werden kann (Dean *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). Anscheinend ist die ICM von Blastozysten durch das Vorhandensein beider epigenetischer Modifikationen gekennzeichnet. Durch diese beiden Markierungen könnten die ESCs der ICM eine sogenannte bivalente Chromatinstruktur aufweisen, welche diese Zellen in die Lage versetzt, besonders schnell bestimmte Gene in einen transkriptionell aktiven oder repressiven Zustand zu überführen.

Das dynamische Erscheinen von 5hmC von der Zygote bis zur Blastozyste deutet darauf hin, dass 5hmC nicht nur ein Intermediat der DNA Demethylierung in der Zygote höherer Säugetiere ist, sondern auch in späteren Präimplantationsstadien eine wichtige Rolle spielt. In der Tat konnte von Ito *et al.* (2010) berichtet werden, dass der Knockdown von Tet1 im 2-Zell Embryo zur einer fehlerhaften Bildung der ICM führt (Ito *et al.*, 2010). Anscheinend ist die Regulation der Dynamik von 5hmC in der Präimplantationsentwicklung ein wichtiger epigenetischer Faktor für die Differenzierung der einzelnen Blastomere früher Präimplantationsembryonen in ICM und TE. Dabei könnte die Expression wichtiger Pluripotenzgene wie Oct4 oder Cdx2 von dieser Dynamik des 5hmC betroffen sein. Allerdings berichtet eine neuere Studie, dass Tet1 für eine normale Embryogenese nicht zwingend notwendig ist (Dawlaty *et al.*, 2011). Erst kombinierte Knockout-Experimente mit allen drei Tet-Enzymen werden den Einfluss von 5hmC auf die frühe Präimplantationsentwicklung aufklären.

## 4.4 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HYDROXYMETHYLIERUNG UND DEMETHYLIERUNG

Als nächstes stellte sich die Frage, welcher Zusammenhang zwischen dem Verlust des 5mC-Signals und dem Gewinn an 5hmC-Signal besteht. Die Studien von Tahaliani *et al.* (2009) und Ito *et al.* (2010) haben die Dioxygenasen Tet1-3 als Enzymklasse für die enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC identifiziert (Tahaliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Interessanterweise wurden aber auch DNA Methyltransferasen und der für die DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus benötigte Faktor Elp3 für diese Umwandlung vorgeschlagen (siehe Einleitung, Kapitel 1.5 und (Okada *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). Um die Generierung von 5hmC besser zu charakterisieren, wurde zunächst der dynamische

Anstieg von 5hmC-Signal in Relation zum Zellzyklus genauer untersucht. Die Inhibition der DNA Replikation mit Aphidicolin hat ergeben, dass 5hmC auch unabhängig von Faktoren der DNA Replikation der Zygote generiert wird (siehe Abb. 3.14). Die Entstehung von 5hmC ist also ein vom Zellzyklus unabhängiger Vorgang - dieser Befund deutet auf eine Trennung der epigenetischen Reprogrammierung durch Hydroxylierung vom Zellzyklus der Zygote hin.

Aufgrund der vermehrten Hinweise in der aktuellen Literatur über die Beteiligung der Dioxygenasen Tet1-3 an der enzymatischen Umwandlung von 5mC zu 5hmC wurde in dieser Arbeit die Existenz von Tet1-3 Transkripten in den relevanten Zellen analysiert. Tatsächlich konnten Tet Transkripte in der Zygote gefunden werden - und zwar hauptsächlich Tet3 (siehe Abb. 3.15 und Wossidlo *et al.*, 2011). In einer Kollaboration mit Dr. Joana Marques von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf Reik vom Babraham Institut in Cambridge, UK, konnte gezeigt werden, dass Tet3 Transkripte im Vergleich zur Transkription in ESCs überproportional stark in Eizellen und Zygoten der Maus repräsentiert sind und Tet1 und Tet2 eher eine untergeordnete Rolle in dieser Entwicklungsphase zu haben scheinen (siehe Wossidlo *et al.*, 2011). Bemerkenswert an dieser Untersuchung war auch der schnelle und starke Rückgang der Tet3 Transkripte im 2-Zell Embryo. Dieser Verlust bekräftigt die Vermutung, dass die Entstehung von 5hmC hauptsächlich auf die Zygote beschränkt ist.

In dieser Arbeit konnte daraufhin in KD-Experimenten gezeigt werden, dass der KD von Tet1-3, aber auch der von Tet3 alleine, zu einer Verminderung des 5hmC-Signals in der Zygote führt (siehe Abb. 3.17 und 3.18a). Dabei ist sowohl der paternale als auch der maternale Pronukleus von dieser Verminderung betroffen, wie das unveränderte Verhältnis von paternalem und maternalem 5hmC-Signals zeigt (siehe Abb. 3.18c). Allerdings ist die Verminderung des maternalen 5hmC-Signals so gering, dass die Messung der Signalstärke zu keiner signifikanten Veränderung durch die Tet-KDs führte (siehe Abb. 3.18a). Das weiterhin detektierbare 5hmC-Signal in den Tet-KD Zygoten deutet auf einen nicht sehr effektiven KD der Tet Transkripte durch die injizierte siRNA hin. Möglicherweise könnte aber auch in der späten Zygote die *de novo* Transkription von Tet1-3 erfolgen. Durch KO-Experimente von Tet Proteinen könnte diese Beobachtung geklärt werden.

Die IF-Analyse des 5mC-Signals der Tet-KD Zygoten zeigte jedoch bemerkenswerte Änderungen im paternalen Pronukleus (siehe Abb. 3.17 und 3.18b/c). Durch den KD von Tet1-3 und den KD von Tet3 alleine konnte der Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus verhindert werden. Damit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Verlust des 5mC-Signals hauptsächlich von der Konversion zu 5hmC von Tet Proteinen abhängt. Tet3 scheint in diesem Prozess die Hauptrolle zu spielen, jedoch müssten Kontrollexperimente mit Tet1-2 KD-Experimenten oder KO-Experimenten diese Vermutung erst bestätigen, welche im zeitlichen Rahmen dieser Studie nicht mehr durchgeführt werden konnten. Die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote erfolgt demnach maßgeblich über die Modifikation der Methylgruppe des 5mC durch die Dioxygenase Tet3.

#### 4.4.1 UNTER DEM SCHUTZMANTEL VON STELLA

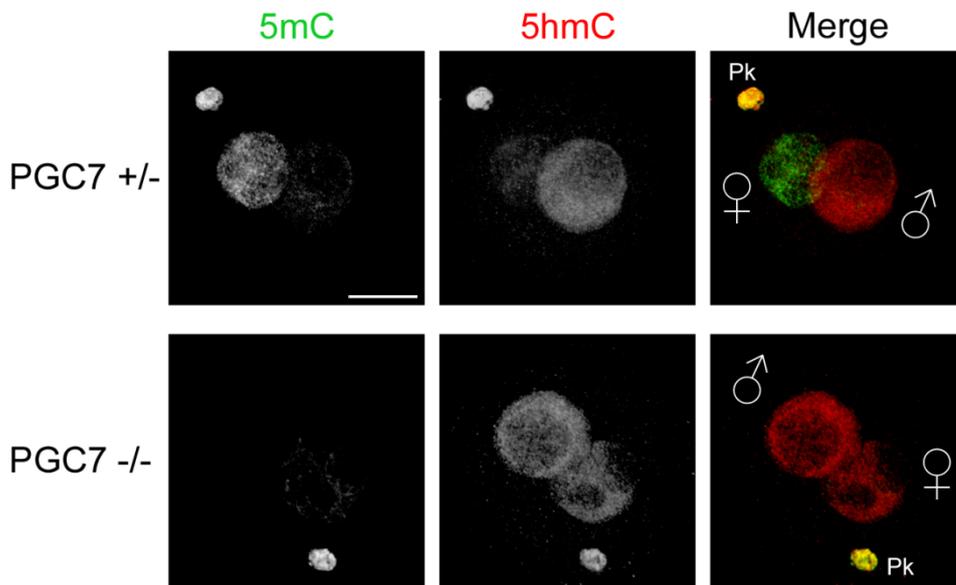
Im Unterschied zu den drastischen Veränderungen des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus in Tet3-KD Zygoten zeigte der maternale Pronukleus keine signifikanten Veränderungen des 5mC-Signals in diesen Zygoten (siehe Abb. 3.18b). Allerdings, wie bereits anhand der dynamischen Abnahme des 5mC-Signals und dem Anstieg an 5hmC-Signal in beiden elterlichen Genomen gezeigt werden konnte (siehe Abb. 4.1), ist auch das maternale Genom von dieser Reprogrammierung betroffen. Jedoch erfolgt diese Änderung des maternalen Genoms nicht im gleichen Umfang wie die des paternalen Genoms (~2facher maternaler Anstieg von 5hmC gegenüber einem ~7fachem paternalem Anstieg während der Entwicklung der Zygote, siehe Abb. 3.8b). Anscheinend ist der Großteil des maternalen Genoms vor der enzymatischen Oxidation durch Tet3 geschützt. Diese Beobachtung hat die Frage aufgeworfen, durch welche Faktoren oder Mechanismen der maternale Pronukleus vor der Aktivität von Tet3 geschützt werden kann.

In der Studie von Nakamura *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass der maternale Faktor PGC7/Dppa3/Stella den maternalen Pronukleus vor der Demethylierung bewahrt (Nakamura *et al.*, 2007). Die Deletion von PGC7 führte hier zum Verlust des 5mC-Signals im paternalen und im maternalen Pronukleus der Mauszygote. Um zu untersuchen, ob die Erzeugung von 5hmC durch die schützende Aktivität von PGC7 beeinflusst wird, wurden in einer Kollaboration mit Dr. Toshinobu Nakamura und Prof. Dr. Toru Nakano von der Osaka Universität, Japan, PGC7<sup>-/-</sup> Zygoten auf das Erscheinen von 5mC und 5hmC überprüft (siehe Abb. 4.2 und Wossidlo *et al.*, 2011). Diese Analysen konnten zeigen, dass in PGC7<sup>-/-</sup> Zygoten auch der maternale Pronukleus deutlich an 5hmC-Signal gewinnt, während das 5mC-Signal in beiden elterlichen Pronuklei verschwindet. Mit diesem Experiment konnte bewiesen werden, dass PGC7 den maternalen Pronukleus vor der enzymatischen Oxidation durch Tet3 beschützt. Allerdings scheint nicht das ganze maternale Genom von PGC7 geschützt zu sein, da in der späten Mauszygote auch der maternale Pronukleus an 5hmC gewinnt.

Interessanterweise zeigen auch die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung repetitiver Elemente und imprinteter Gene in PGC7<sup>-/-</sup> Zygoten die Demethylierung von IAPs und vieler maternal imprinteter Gene (Nakamura *et al.*, 2007). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass PGC7 den maternalen Pronukleus nicht nur vor der enzymatischen Oxidation durch Tet Proteine bewahrt, sondern auch die DNA Demethylierung dieser Gene und repetitiver Sequenzen verhindert. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass beide Prozesse verknüpft sind – die Hydroxylierung von 5mC zu 5hmC ist somit sehr wahrscheinlich ein Intermediat der aktiven DNA Demethylierung. Allerdings könnte PGC7 sowohl die Aktivität der Tet Enzyme als auch bestimmte Faktoren der DNA Demethylierung getrennt voneinander beeinflussen. Erst die Bisulfit-Analyse von Tet-KD oder besser Tet-KO Zygoten könnte hier Klarheit schaffen.

Interessanterweise kann PGC7 sowohl in maternalen als auch in paternalen Pronuklei der Zygote nachgewiesen werden und die Ergebnisse der Bisulfit-Analyse von PGC7<sup>-/-</sup> Zygoten

zeigen auch die Demethylierung weniger paternal imprinteter Gene (Nakamura *et al.*, 2007). PGC7 ist folglich auch für den Schutz bestimmter Gene des paternalen Genoms vor der DNA Demethylierung zuständig. Höchstwahrscheinlich betrifft diese Protektion auch die Hydroxylierung dieser wenigen, bestimmten Gene vor der Aktivität der Tet Enzyme.



**Abb. 4.2 | Akkumulation von 5hmC im maternalen Pronukleus von PGC7<sup>-/-</sup> Zygoten.** Gezeigt sind repräsentative *in vitro* befruchtete Zygoten in der G2-Phase, die von PGC7-Knockout Mäusen abstammen und mit 5mC- (grün) und 5hmC-Antikörpern (rot, polyklonaler Antikörper von Active Motif) durch Immunfluoreszenz analysiert wurden. Zygoten, die von Eizellen aus PGC7<sup>-/-</sup> Weibchen abstammen, zeigen den Anstieg des 5hmC-Signals auch im maternalen Pronukleus. N > 20; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20 µm (Wossidlo *et al.*, 2011).

Dieser Schutzmantel von PGC7, der vor der Hydroxylierung und aktiven Demethylierung bestimmter Gene und Sequenzen bewahrt, breitet sich allerdings größtenteils über das maternale Genom aus, während das paternale Genom und das Genom somatischer Zellkerne in SCNT 1-Zell Embryonen durch PGC7 weniger geschützt wird. Damit stellt sich die Frage, welche Faktoren PGC7 dazu bringen, präferentiell den maternalen Pronukleus vor der enzymatischen Oxidation und Demethylierung zu bewahren. Eine plausible Möglichkeit könnte eine unterschiedliche Chromatinstruktur der verschiedenen betroffenen Genome sein.

Vergleicht man die Chromatinstruktur und das epigenetische Profil des maternalen Genoms mit dem von Spermien und somatischen Zellkernen, so können hier viele Unterschiede entdeckt werden. Das maternale Chromatin einer reifen Eizelle höherer Säugetiere ist durch viele repressive, heterochromatische Histonmodifikationen gekennzeichnet (Lepikhov *et al.*, 2010). Diese Histonmodifikationen betreffen hauptsächlich die Methylierung von Lysinen des Histon H3. In der Zygote können diese repressiven Histonmodifikationen wie H3K9me2 und H3K27me auch weiterhin im maternalen Pronukleus gefunden werden, während der paternale Pronukleus keine dieser Markierungen

aufweist (Reik *et al.*, 2003; Lepikhov *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005). Im starken Unterschied zu Eizellen sind Mausspermien dicht mit Protaminen verpackt und besitzen nur noch etwa 1% an Histonen (Bryczynska *et al.*, 2010). Kurz nach der Befruchtung während des Protamin-Histon-Austauschs werden die von der Eizelle zur Verfügung gestellten Histone für die Etablierung des paternalen Chromatins verwendet. Dieser maternale Histonvorrat besitzt keine repressiven Histonmodifikationen wie H3K9me2 und H3K27me; ist allerdings stark acetyliert (Adenot *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2002). Dadurch ist das paternale Chromatin im Gegensatz zum maternalen Chromatin hauptsächlich durch eine aktive, offene Chromatinstruktur gekennzeichnet. Diese Unterschiede in der Chromatinstruktur könnten dafür verantwortlich sein, dass PGC7 durch diese Markierungen selbst oder durch Kofaktoren, welche diese Modifikationen binden, zu diesen Stellen rekrutiert wird. In der Tat konnten in mehreren Publikationen Zusammenhänge zwischen der Histonmethylierung von H3K9 und der DNA Methylierung gefunden werden (Tamaru *et al.*, 2001; Reik *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003; Ooi *et al.*, 2007; Schlesinger *et al.*, 2007; Mohn *et al.*, 2008). Durch eine Inhibition/Knockout der verantwortlichen Histonmethyltransferasen könnte hier der Zusammenhang zwischen Histonmodifikationen und der Protektion durch PGC7 auf die epigenetische Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote aufgedeckt werden.

Interessanterweise sind die verbliebenen 1% der Histone im Mausspermium mit entwicklungsbiologisch wichtigen Genen assoziiert (Hammoud *et al.*, 2009; Bryczynska *et al.*, 2010). Diese verbliebenen aktiven und repressiven Histonmodifikationen könnten für die Rekrutierung von PGC7 zu wichtigen paternalen Genen, wie paternal imprinteter Gene, führen und somit gezielt die Hydroxylierung und die Demethylierung dieser Gene verhindern. Welcher molekulare Mechanismus hinter der Protektion von PGC7 vor der Aktivität der Tet Enzyme steckt, ist jedoch bisher nicht geklärt.

Diese Überlegungen machen deutlich, dass je nach epigenetischem Profil der Chromatinstruktur des exogenen Genoms (Spermium oder somatischer Zellkern), die Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote beeinflusst werden kann. Möglicherweise liegt in diesem Zusammenhang die Schwierigkeit einer effizienten epigenetischen Reprogrammierung somatischer Zellkerne verborgen.

## 4.5 AKTIVE DNA DEMETHYLIERUNG UND DNA REPARATUR IM PATERNALEN PRONUKLEUS

Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, dass während der Entwicklung der Zygote höherer Säugetiere ein Großteil des paternalen 5mC der Zygote durch Tet3 zu 5hmC oxidiert wird, während das maternale Genom größtenteils von dieser Hydroxylierung durch PGC7 geschützt ist. Die umfangreiche enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC ist im biologischen Sinne bereits eine „aktive Demethylierung“ des Genoms, da die epigenetische Funktion von 5mC

sehr wahrscheinlich durch 5hmC verändert bzw. sogar ins Gegenteil verkehrt wird (siehe Ficiz *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011a; Xu *et al.*, 2011).

Neben der massiven Umwandlung von 5mC zu 5hmC im paternalen Pronukleus der Zygote konnte durch die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung in mehreren Veröffentlichungen die DNA Demethylierung einzelner repetitiver Elemente und bestimmter paternaler Gene zu nativem Cytosin entdeckt werden (Oswald *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010). Allerdings wurde bisher kein Hinweis gefunden, dass auch maternale Gene und Sequenzen in der Zygote zu unmodifiziertem Cytosin demethyliert werden. Die veröffentlichte Demethylierung retrotransposabler Elemente erlaubt aufgrund der repetitiven Natur dieser Sequenzen keine allelspezifische Zuordnung zum paternalen oder maternalen Genom und das maternale Genom der Eizelle zeigt bereits eine deutliche Hypomethylierung dieser repetitiven Elemente (Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010). Zudem zeigte die Vererbung eines Transgens (*TKZ751*) im Falle der maternalen Weitergabe keine Veränderung des Methylierungsstatus in der Bisulfit-Sequenzierung (Oswald *et al.*, 2000). Der Verlust von maternalem 5mC-Signal in der Zygote geschieht demnach wahrscheinlich ausschließlich über die Hydroxylierung und nicht über eine Demethylierung. Die in der Literatur berichtete Demethylierung der Zygote kann mit den bisherigen Daten der Bisulfit-Sequenzierung nur auf das paternale Genom bezogen werden.

Wie bereits in Kapitel 4.2 und 4.4.1 hingewiesen wurde, ist die DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus keineswegs ein genomweiter Vorgang, welcher alle methylierten CpG-Dinukleotide betrifft. Die wohl eher gerichtete Demethylierung des paternalen Genoms zu nativem Cytosin könnte über aktive, enzymatische oder passive, replikationsabhängige Mechanismen geschehen (siehe Abb. 1.2). Der dynamische Verlust des paternalen 5mC-Signals in der Zygote ist bereits im frühen PN3-Stadium nahezu abgeschlossen und die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung von Line1 Elementen zeigen bereits zum gleichen Zeitpunkt einen geringen, aber signifikanten Verlust des CpG-Methylierungslevels (siehe Abb. 3.2 und 3.5 und Wossidlo *et al.*, 2010). Dies deutet daraufhin, dass die DNA Demethylierung bestimmter Sequenzen in der späten G1-Phase des paternalen Pronukleus von Mauszygoten ein aktiver, enzymatischer Prozess ist.

In dieser Arbeit kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass die Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote auch unabhängig von 5hmC als Intermediat stattfinden könnte. Jedoch wurde von mehreren Gruppen die Demethylierung von Line1 Elementen in der Zygote berichtet (Lane *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wossidlo *et al.*, 2010) und da diese repetitiven Sequenzen mehrtausendfach im Säugergenom integriert sind, sollte die Demethylierung dieser Elemente einen nicht unwesentlichen Teil des Verlusts von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus repräsentieren. In Tet-KD Zygoten bleibt allerdings der Großteil des 5mC-Signals erhalten und dadurch ist es unwahrscheinlich, dass die Demethylierung von Line1 Elementen unabhängig von der Hydroxylierung zu 5hmC geschieht. Diese Überlegung und die Protektion von PGC7 vor der Hydroxylierung und

Demethylierung sprechen für die Annahme, dass die enzymatische Umwandlung von 5mC zu 5hmC als Zwischenschritt einer aktiven DNA Demethylierung in der Zygote erfolgt.

In der Literatur können neben einer möglichen aktiven Demethylierung allerdings auch Hinweise für eine passive Demethylierung des paternalen Genoms gefunden werden. In der Studie von Valinluck *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass 5hmC von Dnmt1 nicht als Substrat für die Erhaltungs-Methylierung während der Replikation erkannt werden kann (Valinluck *et al.*, 2007). Somit könnte die Konversion von 5mC zu 5hmC auch zu einer passiven Demethylierung von 5mC führen. Ein weiteres Indiz für die Möglichkeit einer passiven Demethylierung ist die Beobachtung, dass das CXXC-EGFP-Signal in der Veröffentlichung von Okada *et al.* (2010) erst während der Replikation maßgeblich ansteigt (Okada *et al.*, 2010). Allerdings könnte dies auch bedeuten, dass zwischen der Hydroxylierung von 5mC zu 5hmC und einer aktiven Demethylierung zu nativem Cytosin in der späten G1-Phase noch weitere Modifikationen wie 5hmU, 5fC oder 5caC existieren könnten. Die Existenz dieser Basen konnte bereits in ESCs und somatischen Zelllinien gezeigt werden (Cortellino *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011). Gegen die Möglichkeit der passiven Demethylierung des paternalen Genoms sprechen auch der steigende Anteil an mosaikal methylierter Sequenzen von Igf2, TKZ751 und Line1 Elementen (siehe Oswald *et al.*, 2000; Wossidlo *et al.*, 2010). Im Falle einer ausschließlich passiven Demethylierung sollten nur unmethylierte und vollständig methylierte Sequenzen vorliegen. Deshalb wird in dieser Studie von einer aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms ausgegangen, wobei auch eine Kombination von Mechanismen aktiver und passiver Demethylierung vorstellbar wäre.

Als möglicher Mechanismus der aktiven DNA Demethylierung kann zwischen der direkten und indirekten Demethylierung unterschieden werden (siehe Einleitung, Abb. 1.11 und 1.12). Aufgrund mangelnder Beweise für die Existenz einer putativen „*bona fide*“ Demethylase und der wachsenden Anzahl von Hinweisen auf einen komplexen, mehrstufigen Prozess der aktiven Demethylierung (Reik, 2007; Gehring *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010) wurde in dieser Studie die Beteiligung indirekter Demethylierungswege näher untersucht. Der Mechanismus der indirekten Demethylierung erfolgt über die Exzision der Base oder mehrerer Nukleotide und dem anschließenden Einbau von nativem Cytosin über DNA Reparaturwege. Um einen Hinweis auf die Beteiligung dieser indirekten DNA Demethylierung an der Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote zu erhalten, wurde der paternale Pronukleus auf Anzeichen von DNA Reparaturprozessen untersucht. DNA Reparaturwege wie die BER und die NER führen zu transienten DNA Strangbrüchen, welche für den Einbau eines neuen Nukleotids benötigt werden. Deshalb wurde das Auftreten von DNA Strangbrüchen im paternalen Pronukleus analysiert.

#### 4.5.1 DNA STRANGBRÜCHE WEISEN AUF REPARATURVORGÄNGE IM PATERNALEN PRONUKLEUS HIN

Zur Detektion von DNA Strangbrüchen zum Zeitpunkt der aktiven Demethylierung des paternalen Pronukleus wurde die phosphorylierte Histonvariante H2A.X durch IF-Analysen in der Zygote untersucht. Die Induktion von DNA Strangbrüchen durch das alkylierende Mutagen MMS führte zu einer starken  $\gamma$ H2A.X Antwort in beiden Pronuklei der Mauszygote in der späten G1-Phase (siehe Abb. 3.20). Dieses Ergebnis widerspricht der Studie von Yukawa *et al.* (2007), die zu der Schlussfolgerung kommt, dass die Mauszygote keine Möglichkeit besitzt, auf induzierte DNA Strangbrüche zu reagieren (Yukawa *et al.*, 2007). Dabei wurde durch ionisierende Strahlung die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen ausgelöst und kein  $\gamma$ H2A.X-Signal in Zygoten festgestellt. Bemerkenswert in dieser Studie ist die Beobachtung, dass zwei der für  $\gamma$ H2A.X verantwortlichen Kinasen (ATM und DNA-PK) in der Zygote aktiviert werden können. Allerdings wurde in der Studie von Yukawa *et al.* (2007) nur ein später Zeitpunkt natürlich befruchteter Zygoten auf das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Signal analysiert und deshalb ist den Autoren wahrscheinlich das Auftreten von transienten  $\gamma$ H2A.X-Signalen in früheren Phasen entgangen.

Die IF-Analyse des DNA Strangbruchmarkers  $\gamma$ H2A.X in der Entwicklung der Mauszygote hat ergeben, dass  $\gamma$ H2A.X-Foci präferentiell im paternalen Pronukleus von der G1-Phase bis zur frühen G2-Phase detektiert werden können (siehe Abb. 3.21a). Eine mögliche Fluktuation der nativen Histonvariante H2A.X im paternalen und maternalen Genom konnte durch eine IF-Analyse mehrerer Entwicklungsstadien der Zygote ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.19). Dieses dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Signalen wurde weniger ausführlich von zwei unabhängigen Studien bestätigt (Derijck *et al.*, 2006; Ziegler-Birling *et al.*, 2009). Interessanterweise konnten in der G1-Phase zum Zeitpunkt des größten Verlusts des 5mC-Signals im PN2- und frühen PN3-Stadium wenige  $\gamma$ H2A.X-Foci ausschließlich im paternalen Pronukleus detektiert werden (siehe Abb. 3.21a und 3.23). Dies deutet auf das transiente Auftreten von DNA Strangbrüchen im paternalen Pronukleus zum Zeitpunkt der aktiven Demethylierung hin.

Um die Beteiligung von DNA Reparaturwegen an der Entstehung dieser transienten  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus zu überprüfen, wurden DNA Polymerasen mit Aphidicolin inhibiert. DNA Polymerasen sind essentielle Enzyme von DNA Reparaturwegen und deren Inhibition durch Aph führt zu einer Akkumulation von nicht reparierten DNA Einzelstranglücken und Strangbrüchen (Krokan *et al.*, 1981; Matsumoto *et al.*, 2007). Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aphidicolin in der G1-Phase der *in vitro* befruchteten Zygoten zeigte erstaunliche Effekte auf das Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus. In der Tat konnte durch die Inhibition mit Aph die Anzahl der  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus in der G1-Phase deutlich erhöht werden (siehe Abb. 3.21b und 3.23). Auch in späteren Stadien konnte durch Aph eine Verstärkung der  $\gamma$ H2A.X-Foci hauptsächlich im paternalen Pronukleus beobachtet werden. In 2-Zell Embryonen jedoch konnte dieser

Effekt von Aph auf das  $\gamma$ H2A.X-Signal der G1-Phase nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.22). Dies zeigt, dass die DNA Strangbrüche im paternalen Pronukleus der G1-Phase ein für die Zygote typisches Ereignis ist und deutet auf eine Beteiligung von DNA Reparaturprozessen an der aktiven Demethylierung des paternalen Pronukleus.

Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aph hat hingegen keinen Einfluss auf den Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus der Zygote in der späten G1-Phase (siehe Anhang, Abb. 8.7). Dies spricht keineswegs gegen die indirekte Demethylierung über DNA Reparaturwege, da die Inhibition von DNA Polymerasen nur zu einer Blockade der abschließenden DNA Reparatur der indirekten aktiven Demethylierung führt und nicht auf die initialen Schritte der aktiven Demethylierung des 5mC (Exzision der Base oder mehrerer Nukleotide) eingreifen kann.

Da Aphidicolin nicht nur DNA Reparatur assoziierte sondern auch replikative DNA Polymerasen inhibiert, wurde als nächstes der Einfluss der DNA Replikation auf die Entstehung von  $\gamma$ H2A.X-Foci durch die Inkubation von Zygoten mit Cpt untersucht. Cpt führt zu einer Inhibition von DNA Topoisomerasen und zu arretierten Replikationsgabeln, die durch  $\gamma$ H2A.X-Foci signalisiert werden (Furuta *et al.*, 2003). Die Inkubation *in vitro* befruchteter Zygoten mit Cpt während der Entwicklung der Zygote hat ergeben, dass hier nur während der S-Phase eine Verstärkung des  $\gamma$ H2A.X-Signals beobachtet werden kann, während in der späten G1-Phase ähnlich zur unbehandelten Kontrollgruppe nur wenige  $\gamma$ H2A.X-Foci detektiert werden können (siehe Abb. 3.21a/c und 3.23). Diese Analyse zeigt, dass das verstärkte Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci in der G1-Phase durch die Inhibition von DNA Polymerasen mit Aph unabhängig von der DNA Replikation erfolgt und sehr wahrscheinlich auf aktive DNA Reparaturereignisse zurückzuführen ist.

Welche DNA Reparatur assoziierte DNA Polymerase von der Inhibition mit Aph betroffen ist, konnte in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Frühere Studien haben berichtet, dass Aph keinen inhibitorischen Einfluss auf die DNA Polymerase  $\beta$  ausübt (Berger *et al.*, 1979), welche die wichtigste DNA Polymerase in der BER darstellt. Die IF-Analysen mit Antikörpern gegen diese DNA Polymerase haben zudem gezeigt, dass das Enzym stark im Zytoplasma der Zygote vertreten ist, aber von beiden elterlichen Pronuklei ausgeschlossen ist (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information). Neben der DNA Polymerase  $\beta$  wurden auch andere Aph sensitive DNA Polymerasen gefunden, die alternativ die Rolle der DNA Polymerase  $\beta$  in der BER übernehmen können, aber in zeitlichem Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden konnten.

Die Untersuchung der epigenetischen Reprogrammierung von geklonten 1-Zell Embryonen der Maus hat gezeigt, dass hier die beiden Pseudopronuklei ebenfalls aktiv demethyliert werden (siehe Abb. 3.10). Um die Beteiligung von DNA Reparaturwegen auch an der aktiven Demethylierung von Klonen zu überprüfen, wurde auch in Klonen das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci analysiert. In der Tat zeigte die Analyse dieser Klone, dass auch hier Phasen der aktiven Demethylierung mit  $\gamma$ H2A.X-Signalen einhergehen und durch Aph verstärkt werden können (siehe Abb. 3.24). Dabei ist das Auftreten von

$\gamma$ H2A.X-Foci in Klonen weniger stark ausgeprägt, als dies in Zygoten festgestellt werden konnte. Möglicherweise deutet dies auf die weniger effiziente epigenetische Reprogrammierung des somatischen Zellkerns hin. Leider können aufgrund mangelnder nicht-invasiver Methoden keine Aussagen über die erfolgreiche epigenetische Reprogrammierung der untersuchten, fixierten Klone gemacht werden. Diese Analyse deutet darauf hin, dass die aktive Demethylierung in der Zygote bzw. in SCNT 1-Zell Embryonen über transiente Strangbrüche und konstitutive DNA Reparaturereignisse stattfindet.

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Detektion von  $\gamma$ H2A.X-Foci ist die Art des signalisierten DNA Strangbruches. In frühen Veröffentlichungen wurde  $\gamma$ H2A.X als Marker für die Signalisierung von äußerst letalen DNA Doppelstrangbrüchen angesehen (Rogakou *et al.*, 1998). Erst neuere Studien zeigen, dass  $\gamma$ H2A.X auch an der Signalisierung von ESBs beteiligt sein kann (Matsumoto *et al.*, 2007). Um die Art der durch  $\gamma$ H2A.X signalisierten Strangbrüche zu analysieren und einen von  $\gamma$ H2A.X unabhängigen Beweis für die Existenz transienter DNA Einzelstrangbrüche zu erbringen, wurden *in vitro* befruchtete Zygoten mit einem modifiziertem Nick-Translations-Test analysiert. In einem Kontrollexperiment führte die Induktion von ESBs durch MMS zu einem positiven Nick-Translations-Signal in den elterlichen Pronuklei der frühen Mauszygote (siehe Abb. 3.25b), während der TUNEL-Test, der für die Detektion von DNA Doppelstrangbrüchen entwickelt wurde, im gleichen Stadium keine Signale zeigt (persönliche Kommunikation Dr. Konstantin Lepikhov). Da die MMS-Behandlung in frühen Zygoten auch zu einem verstärkten  $\gamma$ H2A.X-Signal in beiden elterlichen Pronuklei führt (siehe Abb. 3.20), bestätigt das positive Nick-Translations-Signal die Vermutung, dass  $\gamma$ H2A.X-Foci nicht nur DNA Doppelstrangbrüche, sondern auch DNA Einzelstrangbrüche markieren.

Die Analyse von Zygoten in der späten G1-Phase mit dem modifizierten Nick-Translations-Test konnte das Auftreten von Einzelstrangbrüchen ausschließlich im paternalen Pronukleus bestätigen (siehe Abb. 3.25c). Zygoten im PN1-Stadium zeigten keine Nick-Translations-Signale, welches auf die *de novo* Entstehung der Strangbrüche in der späten G1-Phase hinweist und mögliche präexistierende DNA Schäden im Genom des Spermiums ausschließt. Auch der Protamin-Histon-Austausch kann für die Generierung dieser ESBs ausgeschlossen werden, da dieser bereits in PN0 erfolgt (Santos *et al.*, 2002).

Das dynamische Erscheinen von  $\gamma$ H2A.X-Foci und DNA Einzelstrangbrüchen im paternalen Genom in der späten G1-Phase ist ein starkes Indiz für die Beteiligung von DNA Reparaturprozessen während der aktiven Demethylierung des paternalen Pronukleus. Replikative, präexistierende DNA Schäden und der Protamin-Histon-Austausch können als Ursache für diese transienten, *de novo* entstehenden Strangbrüche ausgeschlossen werden. Mit diesem Hinweis auf eine indirekte aktive Demethylierung wurden als nächstes gezielt Faktoren der BER und der NER auf die Existenz in der Zygote und im paternalen Pronukleus analysiert.

## 4.5.2 DIE BASENEXZISIONSREPARATUR ALS BESTANDTEIL DER AKTIVEN DEMETHYLIERUNG

Die IF-Analyse wichtiger Faktoren der BER in der Mauszygote ergab, dass der Strangbruchsensor PARP-1 mit  $\gamma$ H2A.X-Foci im paternalen Pronukleus ko-lokalisierend detektiert werden kann (siehe Abb. 3.27). PARP-1 ist für die Rekrutierung von XRCC1 im SN-BER verantwortlich und in der Studie von Hajkova *et al.* (2010) konnte XRCC1 zum Zeitpunkt des Verlusts von 5mC im paternalen Pronukleus gefunden werden (Hajkova *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse deuten auf das transiente Erscheinen von DNA Strangbrüchen und eine aktive BER im paternalen Pronukleus während Phasen der aktiven Demethylierung. Das  $\gamma$ H2A.X-Signal könnte zur Rekrutierung von Faktoren der BER wie PARP-1 sorgen, während PARP-1 die abschließende SN-BER der Einzelstranglücke über XRCC1 einleitet. Interessanterweise wurde der Studie von Hajkova *et al.* (2010) auch gezeigt, dass die Inhibition von PARP-1 zu einem verminderten Verlust von paternalem 5mC-Signal führt (Hajkova *et al.*, 2010). Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass durch die Inhibition von PARP-1 eine Akkumulation von Reparaturfaktoren stattfindet und durch diese Akkumulation die Exzision der symmetrischen Base des CpG-Dinukleotids gestört wird. Allerdings konnte dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit mit dem gleichen Inhibitor nicht reproduziert werden und PARP-1 inhibierte Zygoten zeigten weiterhin den Verlust von 5mC-Signal (Daten nicht gezeigt).

Neben PARP-1 wurde auch die Präsenz der apurinischen Endonuklease APE1 in Zygoten untersucht. APE1 ist ein wichtiger Faktor der BER und ist für die Verarbeitung von AP-Stellen verantwortlich. AP-Stellen werden durch die Aktivität von monofunktionalen DNA Glykosylasen generiert. Im Unterschied zu bifunktionalen DNA Glykosylasen, welche eine intrinsische  $\beta$ -Lyase Domäne besitzen und die AP-Stelle direkt spalten können (Madhusudan *et al.*, 2005), benötigen monofunktionale Glykosylasen die Mithilfe von APE1 (siehe Einleitung, Kapitel 1.5.2.1). Durch den Beweis der Beteiligung von APE1 an der BER-Aktivität in der Zygote könnte dadurch ein Hinweis auf den beteiligten Typ der DNA Glykosylase erhalten werden. Die IF-Analyse mit Antikörpern gegen APE1 lieferte jedoch keine aussagenkräftigen Signale in der frühen Mauszygote (Daten nicht gezeigt). Daher wurde im nächsten Schritt ein spezifischer Inhibitor für APE1 verwendet. Dieser Inhibitor blockiert die AP-Endonuklease-Aktivität von APE1 und sorgt dadurch für eine Akkumulation AP-Stellen (Madhusudan *et al.*, 2005). Interessanterweise führte die Inkubation von somatischen Zelllinien (Hek293T-Zellen) mit diesem Inhibitor zu einer Akkumulation von  $\gamma$ H2A.X-Foci (Daten nicht gezeigt). Anscheinend werden nicht nur DNA Strangbrüche, sondern auch AP-Stellen in der DNA durch  $\gamma$ H2A.X signalisiert. Das gleiche Experiment in Mauszygoten zeigte jedoch keinen Effekt auf die  $\gamma$ H2A.X-Signale des paternalen Pronukleus (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass APE1 nicht an der BER im paternalen Pronukleus teilnimmt und bifunktionale DNA Glykosylasen an der aktiven Demethylierung beteiligt sein könnten. Allerdings müsste dieser wage Hinweis erst durch

beispielsweise Knockdown-Studien von APE1 bestätigt werden. In der Veröffentlichung von Hajkova *et al.* (2010) konnte mit einem Inhibitor für APE1 der Verlust von 5mC-Signal vermindert werden (Hajkova *et al.*, 2010); dieser Befund konnte aber in dieser Arbeit nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit bzw. schlechter Antikörpersensitivitäten konnten keine aussagekräftigen IF-Signale von putativen DNA Glykosylasen erhalten werden. Die in dieser Studie getesteten Antikörper gegen TDG und MBD4 lieferten moderate, in der ganzen Zygote verteilte IF-Signale (Daten nicht gezeigt). Durch den Knockdown von potentiellen Kandidaten in der Eizelle oder durch molekularbiologisch markierte, *in vitro* synthetisierte Fusionsproteine könnte die verantwortliche DNA Glykosylase identifiziert werden. Mögliche Kandidaten wären beispielsweise die bifunktionale Glykosylasen NEIL1-3 oder die monofunktionalen Glykosylasen SMUG1 und TDG, von welche gezeigt werden konnte, dass sie an der Exzision von 5hmU oder 5caC beteiligt sein können (Guo *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011).

Bemerkenswert an der IF-Analyse von PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Signalen in der Zygote war neben dem dynamischen Erscheinen im paternalen Pronukleus der G1-Phase die Beobachtung, dass beide Signale auch in späteren, replikativen und post-replikativen Stadien hauptsächlich im paternalen Pronukleus gefunden werden können. Dies könnte bedeuten, dass die BER auch in späteren Stadien zur aktiven Demethylierung in der Zygote beiträgt. Interessanterweise besitzt die Zygote keinen G1-S-Phase Kontrollpunkt, der in somatischen Zellen im Falle von DNA Schäden die Initiation der S-Phase blockiert (Shimura *et al.*, 2002; Baart *et al.*, 2004). Dadurch könnte in der Zygote auch während der progressiven DNA Replikation eine aktive DNA Demethylierung über DNA Reparaturwege erfolgen. In der Studie von Amouroux *et al.* (2011) wurde berichtet, dass oxidative DNA Schäden zur Rekrutierung der BER an offenen Chromatin Regionen führt (Amouroux *et al.*, 2010). Die starke enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC in Zygoten während der S-Phase und die eher offene Chromatinstruktur des paternalen Genoms könnte den gleichen Effekt haben.

Eine wichtiger Kritikpunkt der Beteiligung der BER an der indirekten aktiven Demethylierung ist die Befürchtung, dass durch die transienten ESBs, welche während der BER durch die Reparatur der AP-Stelle auftreten, im Falle der Demethylierung einer symmetrischen CpG-Position die Gefahr der Erzeugung eines DNA Doppelstrangbruchs (DSB) bestehen könnte. DSBs sind sehr letale Ereignisse, die zu schwerwiegenden Chromosomenabberationen führen können und von einer Zelle unbedingt vermieden werden sollten. Allerdings haben Blütenpflanzen und höhere Säugetiere im Unterschied zu Bakterien einen Schutzmechanismus entwickelt, um dieser Gefahr zu entgehen. So wird bspw. die menschliche AP-Endonuklease (APE1) durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer AP-Stellen oder  $\beta$ - $\delta$  ESBs (das Produkt bifunktionaler DNA Glykosylasen) an der -1, +3 oder +1 Stelle des gegenüberliegenden Stranges inhibiert (David-Cordonnier *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2009).

Neben den Faktoren der BER wurden in dieser Studie auch Schlüsselfaktoren der NER auf die Beteiligung an der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms in der G1-Phase von Zygoten analysiert. Die IF-Analysen von wichtigen NER-Faktoren zeigte mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern außer einem moderaten Hintergrundsignal kein aussagekräftiges Signal in paternalen oder maternalen Pronuklei (siehe auch Hajkova *et al.*, 2010).

#### 4.5.3 EINBAU VON NUKLEOTIDEN IM PATERNALEN PRONUKLEUS VOR BEGINN DER S-PHASE

Die indirekte aktive Demethylierung über DNA Reparaturwege beinhaltet den Austausch des 5mC oder des modifizierten 5mC (5hmC, 5hmU, 5fC, 5CaC) mit einem nativen Desoxycytidin. Die bisher dargelegten Hinweise auf die Beteiligung von DNA Strangbrüchen und Faktoren der BER an der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms sprechen für den Einbau von nativem Cytidin im paternalen Pronukleus vor Beginn der S-Phase. Allerdings konnte in dieser Studie auch mit radioaktiv markierten Nukleotiden kein bemerkenswert stärkerer Einbau von Desoxycytidin im paternalen Pronukleus in der späten G1-Phase im Vergleich zum maternalen Pronukleus nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.28). Dadurch kann die Aktivität der NER als möglicher Mechanismus der indirekten aktiven Demethylierung weitestgehend ausgeschlossen werden, da hier 24-32 bp ausgetauscht werden und diese auf jeden Fall durch diesen Test detektiert werden sollten. Dieses Resultat könnte jedoch auch ein Hinweis darauf sein, dass die aktive DNA Demethylierung in der G1-Phase nur ganz bestimmte, wenige Gene betrifft und der dadurch bedingte geringe Einbau von Nukleotiden aufgrund unzureichender Sensitivität nicht nachgewiesen werden konnte. Dies könnte bedeuten, dass der Hauptteil der indirekten aktiven Demethylierung in der S-Phase geschieht, welches durch die hohe Anzahl an PARP-1 und  $\gamma$ H2A.X-Signalen und die starke Hydroxylierung bekräftigt wird.

#### 4.6 MÖGLICHE MODELLE DER INDIREKTEN AKTIVEN DNA DEMETHYLIERUNG

Die in dieser Arbeit dargestellten Beweise der massiven Hydroxylierung des paternalen 5mC zu 5hmC und der zeitgleichen Präsenz von Faktoren der BER und DNA Strangbrüchen deuten auf folgende Modelle der epigenetischen Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Zygote höherer Säugetiere hin:

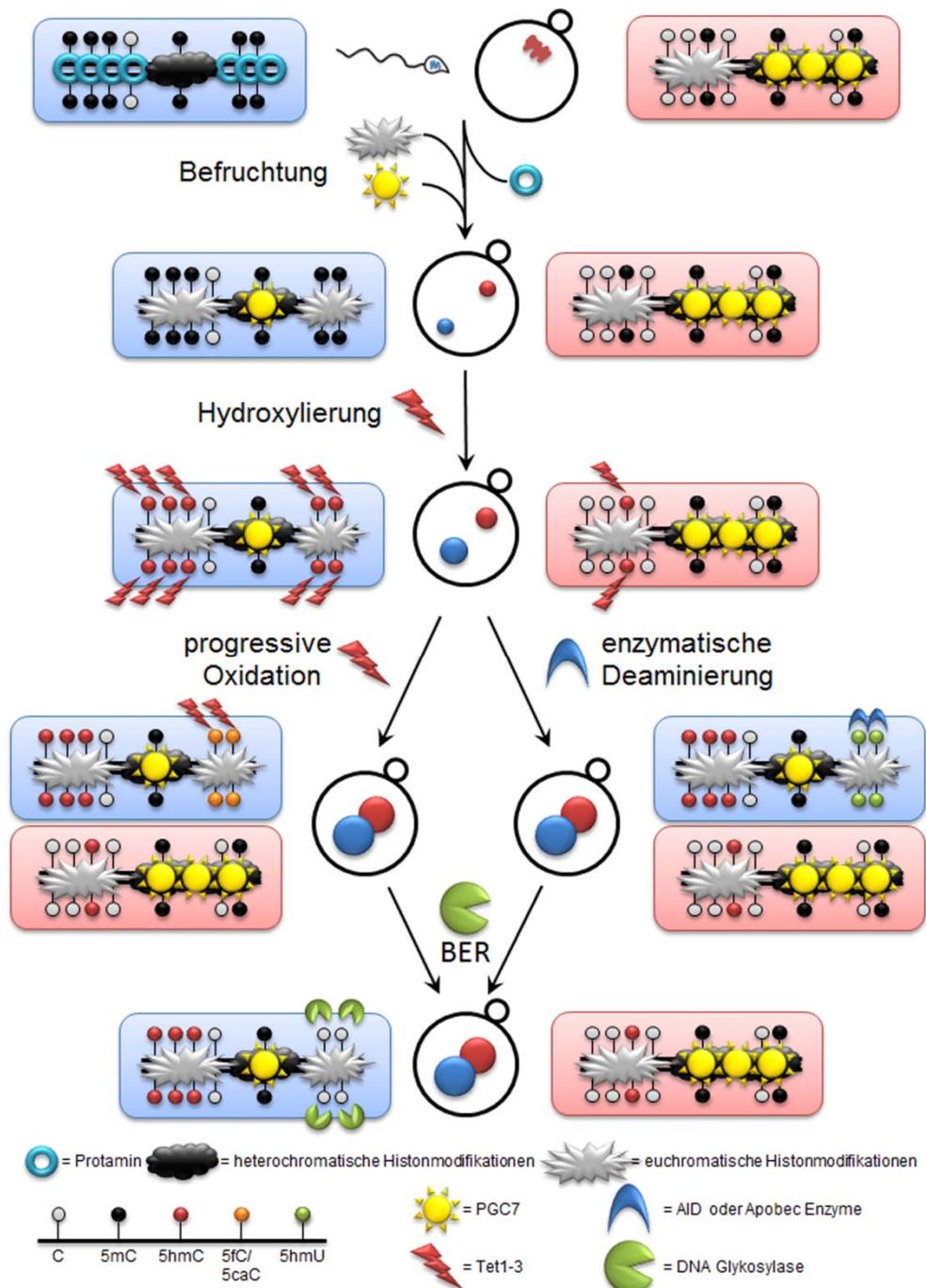
Kurz nach der Befruchtung der Eizelle mit dem Spermium wird durch die enzymatische Aktivität von Tet3 das 5mC des paternalen Genoms zu 5hmC oxidiert. Der größte Teil des maternalen Genoms und bestimmte Gene und repetitive Sequenzen des paternalen Genoms sind von dieser Hydroxylierung durch PGC7 geschützt. PGC7 wird dabei

höchstwahrscheinlich durch bestimmte heterochromatische Histonmodifikationen zu den jeweiligen Genen und repetitiven Sequenzen rekrutiert. Dies gewährleistet zudem, dass das maternale Genom der reifen Eizelle bis zur Befruchtung von der Oxidation vor Tet Enzymen geschützt bleibt und wichtige Gene wie maternale Imprints, Protoonkogene und retrotransposable Elemente durch die DNA Methylierung unterdrückt bleiben.

Während der weiteren Entwicklung der Zygote kommt es daraufhin zu einer aktiven Dehydroxymethylierung bestimmter paternaler Gene und repetitiver Sequenzen, während der Großteil an 5hmC unverändert bestehen bleibt und die „epigenetische Demethylierung“ bereits abgeschlossen ist. Nach dem aktuellen Kenntnisstand der Literatur und den Ergebnissen dieser Arbeit könnte diese Dehydroxymethylierung des paternalen Genoms höchstwahrscheinlich über folgende Wege erfolgen:

- a) Nach der massiven Hydroxylierung des paternalen Genoms durch Tet3 erfolgt durch Tet2 eine weitere progressive Oxidation von 5hmC zu 5fC und 5caC (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011). Durch eine anschließende Exzision der oxidierten Base 5caC durch eine DNA Glykosylase, dem transienten Auftreten von DNA Strangbrüchen und der SN-BER über PARP-1 wird ein natives Cytidin eingebaut und die aktive Demethylierung damit abgeschlossen (siehe Abb. 4.3). In diesem Modell könnte durch die Regulation der enzymatischen Aktivität von Tet2 oder durch bestimmte Histonmodifikationen die selektive Dehydroxymethylierung bestimmter 5hmC erfolgen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Tet1 und Tet3 keine ausgeprägte oxidative Aktivität besitzen, um 5hmC zu 5caC zu oxidieren (He *et al.*, 2011) und Transkripte von Tet2 sind nur in relativ kleinen Mengen in der Eizelle und Zygote vorhanden (Wossidlo *et al.*, 2011). Als mögliche DNA Glykosylase wurde in der Veröffentlichung von He *et al.* (2011) die monofunktionale DNA Glykosylase TDG identifiziert. Zudem wurde in einer kürzlich erschienen Publikation berichtet, dass TDG mit höherer Affinität die Basenpaarung 5fC:G bindet und somit möglicherweise die finale Oxidation von 5fC zu 5caC für die aktive Demethylierung nicht notwendig ist (Maiti *et al.*, 2011). Allerdings konnten IF-Analysen zeigen, dass TDG nicht in der Zygote gefunden werden kann (Daten nicht gezeigt und Hajkova *et al.*, 2010) und die in dieser Studie erhaltenen negativen Hinweise über die Beteiligung von APE1 deuten eher auf die Aktivität von bifunktionalen DNA Glykosylasen wie z.B. Neil1-3 hin, welche auch an der Reparatur oxidativer DNA Schäden beteiligt sind (Hegde *et al.*, 2008a; Hildrestrand *et al.*, 2009).
- b) In einem weiteren Modell könnte nach der massiven Hydroxylierung das 5hmC durch DNA Deaminasen wie AID oder Enzyme der Apobec-Familie deaminiert werden (Cortellino *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011). Das resultierende 5hmU könnte dann durch DNA Glykosylasen und die SN-BER mit einem unmodifizierten Cytidin ersetzt werden (siehe Abb. 4.3). In diesem Modell könnte durch die Regulation der DNA

Deaminierung die gezielte aktive Dehydroxymethylierung bestimmter 5hmC erfolgen. Allerdings wurde gezeigt, dass AID nur einzelsträngige DNA für die Deaminierung benutzen kann (Guo *et al.*, 2011). Dies könnte darauf hindeuten, dass in diesem Modell die aktive Dehydroxymethylierung während der DNA Replikation erfolgt. Als mögliche DNA Glykosylase könnte in diesem Modell SMUG1 und TDG dienen; allerdings sind beide monofunktionale DNA Glykosylasen, welches wiederum den APE1-Ergebnissen widersprechen würde. Möglicherweise könnten hier auch Neil1-3 Enzyme für die Exzision des 5hmU verantwortlich sein. Neil1 zeigt dabei hauptsächlich während der S-Phase eine große Affinität zu oxidierten Basen (Hegde *et al.*, 2008b)

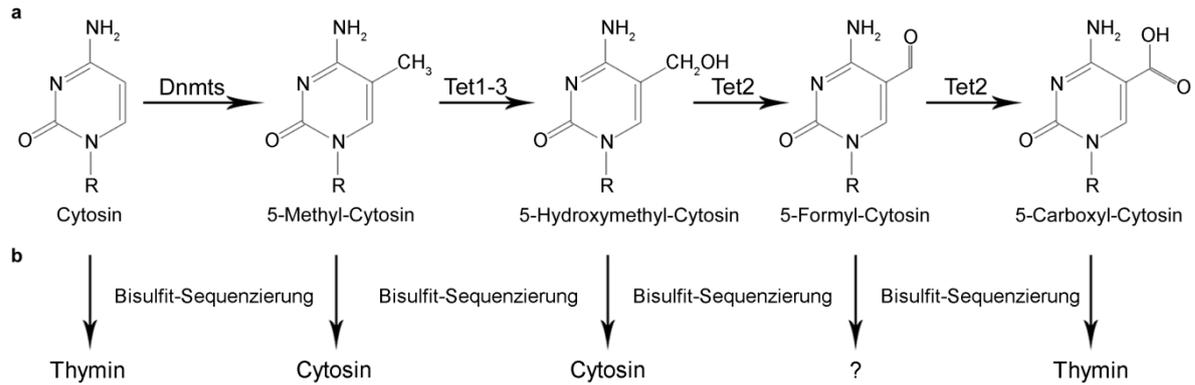


**Abb. 4.3 | Modell der indirekten aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus in der Mauszygote.** Das im paternale Genom (blau hinterlegt) ist im Spermium dicht mit Protaminen und sehr wenigen Histonen verpackt. Das im Vergleich zum Spermium hypomethylierte maternale Genom (rot hinterlegt) ist mit vielen heterochromatischen Histonmodifikationen markiert und durch PGC7 vor der Aktivität der Tet-Enzyme geschützt. Kurz nach der Befruchtung erfolgen der Protamin-Histon-Austausch des paternalen Genoms und die Akquisition acetylierter, euchromatischer Histonmodifikationen. Zeitgleich wird PGC7 zu bestimmten Regionen des paternalen Genoms durch die verbliebenen Histonmodifikationen in der Spermatogenese rekrutiert. Anschließend erfolgt die massive Hydroxylierung des 5mC, welches nicht durch PGC7 vor der Aktivität der Tet-Enzyme geschützt ist. Im paternalen Genom kommt es daraufhin zu einer indirekten aktiven „Dehydroxymethylierung“ bestimmter 5hmC über entweder eine progressive Oxidation mittels Tet-Enzymen oder über eine enzymatische Deaminierung. Das dabei entstandene 5fC/5caC oder 5hmU wird durch eine spezifische DNA Glykosylase und der BER mit einem nativen Desoxycytidin ersetzt.

## 4.7 PERSPEKTIVE

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben dazu beigetragen, ein kleines Puzzlestück der komplexen epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote höherer Säugetiere aufzudecken. Wie so oft in der Grundlagenforschung führen diese neuen Erkenntnisse wiederum zu neuen, interessanten Fragestellungen. So müsste für die weitere Aufklärung der aktiven Demethylierung durch gezielte und kombinierte Knockdown- oder besser Knockoutstudien von Tet Enzymen die Hydroxylierung mit den DNA Reparaturereignissen wie DNA Strangbrüche in Verbindung gebracht werden. Dadurch könnte die Beteiligung von 5hmC an der indirekten aktiven Demethylierung bewiesen werden.

Weiterhin könnte die Dynamik der aktiven DNA Demethylierung durch die IF-Analyse mit Antikörpern gegen 5fC, 5caC und 5hmU besser verstanden werden. Möglicherweise wird neben 5hmC auch 5fC, 5caC oder 5hmU in großen Mengen in der Zygote gebildet. Die Existenz der „siebten“ und „achten“ Base im Genom von ESCs (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011) deutet neben 5hmC auch darauf hin, dass die bisherigen Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung in der Literatur neu überdacht werden müssen (siehe Abb. 4.4). Durch eine progressive Oxidation von 5mC könnte eine sequentielle Abstufung der epigenetischen Funktion von 5mC erfolgen. Dadurch rückt eine stufenweise „epigenetische Demethylierung“ von 5mC in den Vordergrund der epigenetischen Regulation der Genaktivität. Durch die Aktivität von Tet Enzymen könnte hierdurch eine Art „epigenetischer Schalter“ für die schnelle und sehr fein regulierte Expression wichtiger Gene sorgen.



**Abb. 4.4 | Das Verhalten der fünften, sechsten, siebten und achten Base des Genoms in der Bisulfit-Analyse.** (a) Die progressive Oxidation von 5mC durch Tet Enzyme führt über 5hmC und 5fC zu 5caC. (b) Die Bisulfit-Behandlung dieser Basen und die anschließenden Sequenzierung führen je nach Base zu einem Thymin oder einem Cytosin. Dadurch verhält sich C = 5caC und 5mC = 5hmC, welches die Bedeutung von Bisulfit-Ergebnissen in ein neues Licht stellt (die Information über das Verhalten von 5caC in der Bisulfit-Analyse stammt aus He *et al.* 2011).

Eine wichtige Lücke im heutigen Kenntnisstand der epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote ist der Umfang der aktiven Demethylierung. Zurzeit sind keine eindeutigen Beweise vorhanden, die zeigen, in welchem Ausmaß die Demethylierung das paternale Genom betrifft. Die bisherigen Studien zeigen die Demethylierung einzelner Gene und Line1 Elemente. Die genaue Aufklärung der von der Demethylierung betroffenen Gene könnte dazu beitragen, die Bedeutung der epigenetischen Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Embryogenese zu verstehen. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch von „Parent-Offspring-Conflict“ und dem „Battle of Sexes“ gesprochen (Trivers, 1974; Reik *et al.*, 2001b). Die Mutter testet das Genom des Vaters, um die wertvollen Ressourcen für die Entwicklung eines Embryos nur dem besten genetischen Material zukommen zu lassen. Die epigenetische Reprogrammierung könnte hierdurch nicht nur für die Regulation wichtiger Pluripotenzgene zur Etablierung der Totipotenz verantwortlich sein, sondern auch eine Art „Qualitätskontrolle“ der paternalen Erbinformation darstellen.

Eine wichtige Frage, die sich im Zusammenhang mit der Demethylierung von repetitiven Elementen stellt, ist der biologische Sinn dieser Demethylierung. Die Methylierung dieser Elemente stellt normalerweise im Säugetier einen wichtigen Schutz vor der Reaktivierung dieser retrotransposablen Elemente dar, welche ansonsten zu äußerst schädlichen Rekombinationsereignissen führen würden (Yoder *et al.*, 1997; Pornthanakasem *et al.*, 2008). In diesem speziellen Fall konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression der Line1 Elemente in der frühen Präimplantationsentwicklung ein essentieller Vorgang für die Expression einer Reversen Transkriptase ist, die anscheinend für die Umstrukturierung des Chromatins und Relokation bestimmter Gene wichtig sind (Beraldi *et al.*, 2006). Ohne diese Reverse Transkriptase von Line1 kommt es zum Arrest im 2-Zell und 4-Zell Embryo. Es bleibt die Frage offen, welchen Einfluss diese Reverse Transkriptase auf das Genom und das Epigenom des frühen Präimplantationsembryos hat.

Nur durch die genaue Aufdeckung der molekularen Abläufe der natürlichen epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote höherer Säugetiere kann die Effizienz der induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen zu „Alleskönner-Zellen“ erhöht und für die regenerative Medizin nutzbar gemacht werden.

## 4.8 ABSTRACT

Das wesentliche Ziel dieser Studie war die Erforschung der molekularen Mechanismen der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote höherer Säugetiere. Als Modellsystem wurde hierzu die frühe Mausentwicklung gewählt, da diese durch die Möglichkeit der *in vitro* Fertilisation und Mikromanipulation die Analyse bestimmter Prozessabläufe zu präzisen Stadien der frühen Embryogenese von Säugern ermöglicht. Aufgrund der stets nur in geringer Zahl vorhandenen Eizellen und früher Embryonalstadien der Maus wurden neue Ansätze für die embryologische und immunologische Analyse entwickelt und bestehende optimiert.

Durch die Optimierung der immunhistochemischen Analyse von Mauszygoten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der dynamische Verlust des 5mC-Signals im paternalen Pronukleus bereits vor Beginn der DNA Replikation nahezu abgeschlossen ist. Diese Beobachtung macht deutlich, dass die Reprogrammierung der DNA Methylierung des paternalen Genoms über aktive, enzymatische Prozesse erfolgt. Ein weiteres Ergebnis der quantitativen IF-Analyse mit 5mC-Antikörpern ist der Befund, dass auch der maternale Pronukleus von dieser Aktivität betroffen ist. Damit ist die Reprogrammierung der DNA Methylierung in der Mauszygote kein rein paternaler Vorgang, sondern findet auch im geringeren Ausmaß im maternalen Genom statt. Die 27,5%ige Restmethylierung des paternalen Pronukleus deutet daraufhin, dass die aktive DNA Demethylierung keinesfalls ein genomweiter Prozess ist.

Die zentrale Entdeckung dieser Arbeit ist der Befund, dass ein Großteil des 5mC der Zygote zu 5hmC umgewandelt wird. Das paternale Genom ist von dieser Modifizierung am stärksten betroffen – diese Aktivität konnte aber auch im maternalen Genom festgestellt werden. In diesem Prozess konnte die Dioxygenase Tet3 als verantwortliches Enzym identifiziert werden. Durch den Knockdown von Tet3 in der Maus-Eizelle konnte hier der Verlust des 5mC-Signals in der Zygote vermindert werden. Die Immunfluoreszenzanalyse späterer Präimplantationsembryonen ergab, dass 5hmC nicht nur ein Intermediat der aktiven DNA Demethylierung in der Zygote ist, sondern auch in späteren Entwicklungsstadien eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Zusätzlich zur massiven enzymatischen Oxidation von 5mC wurden in dieser Arbeit experimentelle Hinweise auf die Beteiligung von DNA Reparaturvorgängen während Phasen der paternalen Demethylierung gefunden. Hier konnten im paternalen Pronukleus der frühen Mauszygote transiente DNA Strangbrüche detektiert werden, die durch die Inhibition von DNA Polymerasen, welche eine essentielle Rolle in der DNA Reparatur spielen, verstärkt

wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Strangbrüche mit dem Basenexcisionsreparatur-Faktor PARP-1 ko-lokalisieren, welches ein starkes Indiz für die Beteiligung der BER an der aktiven DNA Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote ist.

Die Analyse von Kaninchen-, Rinder- und geklonten Maus-Embryonen ergab zudem, dass auch in diesen Embryonen die Umwandlung von 5mC zu 5hmC stattfindet und Anzeichen von DNA Reparaturvorgängen zum Zeitpunkt der DNA Demethylierung gefunden werden können. Diese Befunde sind ein starker Hinweis darauf, dass beide Mechanismen der epigenetischen Reprogrammierung der DNA Methylierung in höheren Säugetieren evolutionär konserviert sind.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der frühen Embryogenese von Säugetieren kommt es zu dramatischen epigenetischen Veränderungen. Kurz nach Befruchtung der Eizelle erfolgt die epigenetische Reprogrammierung früher Embryonen, die zur Entstehung eines totipotenten Entwicklungspotentials führt. Dabei kommt es über bisher unbekannte Mechanismen zu einer genomweiten Demethylierung des paternalen Genoms der Zygote.

In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der epigenetischen Reprogrammierung der DNA Methylierung in der frühen Embryogenese der Maus analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass neben dem paternalen Genom auch das maternale Genom, wenn auch im geringeren Maße, von dieser Reprogrammierung betroffen ist. Der wohl wichtigste Befund dieser Arbeit ist die Entdeckung, dass die aktive Demethylierung in der Zygote maßgeblich über die enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC erfolgt. Hier konnte die Dioxygenase Tet3 als verantwortliches Enzym identifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Eizellen von Säugern die Hydroxylierung von 5mC ein konservierter Mechanismus ist, der zur Reprogrammierung exogener Genome von Spermien und somatischer Zellkerne führt. Neben der massiven Hydroxylierung des 5mC konnten auch Indizien auf eine indirekte aktive Demethylierung des paternalen Genoms über konstitutive DNA Reparaturwege gefunden werden.

Diese Ergebnisse erfordern ein Umdenken des Begriffes „aktive DNA Demethylierung“ und eröffnen neue Aspekte der epigenetischen Reprogrammierung höherer Säugetiere.

## SUMMARY

In early mammalian embryos shortly after fertilization of the oocyte dramatic epigenetic changes occur. The epigenomes of early preimplantation embryos are substantially reprogrammed to ensure a totipotent developmental potential. Here, the paternal genome of the zygote undergoes genome-wide DNA demethylation by so far unknown mechanisms.

In this study the molecular mechanisms of the epigenetic reprogramming of DNA methylation in the early murine preimplantation development are analyzed. This analysis has shown that not only the paternal genome but also the maternal genome is affected by this reprogramming process to some extent. Most striking, it was discovered that the active DNA demethylation in the zygote is primarily accomplished by the enzymatic oxidation of 5mC to 5hmC. In this process the dioxygenase Tet3 could be identified as responsible enzyme. Studying mouse, rabbit and bovine zygotes and also cloned mouse 1-cell embryos derived by somatic nuclear transfer, it was shown that the conversion of 5mC to 5hmC is driven by maternal factors and appears to be an evolutionary conserved mechanism of the mammalian oocyte. In addition to the massive enzymatic oxidation of 5mC, experimental evidences also suggest the involvement of ubiquitous DNA repair pathways in active DNA demethylation.

Results of my thesis prompt the careful revision of the term “active DNA demethylation” and open up new facets to epigenetic reprogramming in mammalian development.

## REFERENZEN

- Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P. & Thompson, E. M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* **124**, 4615-4625 (1997).
- Albert, M. & Peters, A. H. Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 113-121 (2009).
- Amouroux, R., Campalans, A., Epe, B. & Radicella, J. P. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res* (2010).
- Aoki, E. & Schultz, R. M. DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. *Zygote* **7**, 165-172 (1999).
- Apostolou, E. & Hochedlinger, K. Stem cells: iPS cells under attack. *Nature* **474**, 165-166 (2011).
- Arney, K. L., Bao, S., Bannister, A. J., Kouzarides, T. & Surani, M. A. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote. *Int J Dev Biol* **46**, 317-320 (2002).
- Baart, E. B., van der Heijden, G. W., van der Hoeven, F. A., Bakker, R., Cooper, T. G. & de Boer, P. Reduced oocyte activation and first cleavage rate after ICSI with spermatozoa from a sterile mouse chromosome mutant. *Hum Reprod* **19**, 1140-1147 (2004).
- Balhorn, R., Brewer, L. & Corzett, M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev* **56**, 230-234 (2000).
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F. & Niehrs, C. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**, 671-675 (2007).
- Beaujean, N., Taylor, J. E., McGarry, M., Gardner, J. O., Wilmut, I., Loi, P., Ptak, G., Galli, C., Lazzari, G., Bird, A., Young, L. E. & Meehan, R. R. The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7636-7640 (2004).
- Beraldi, R., Pittoggi, C., Sciamanna, I., Mattei, E. & Spadafora, C. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* **73**, 279-287 (2006).
- Beranek, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**, 11-30 (1990).
- Berger, N. A., Kurohara, K. K., Petzold, S. J. & Sikorski, G. W. Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair --- implications for involvement of DNA polymerase alpha in both processes. *Biochem Biophys Res Commun* **89**, 218-225 (1979).
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L. & Lander, E. S. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326 (2006).
- Bestor, T. H. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* **74**, 9-12 (1988).
- Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402 (2000).
- Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397**, 579-583 (1999).
- Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y. & Blau, H. M. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**, 1042-1047 (2010).

- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21 (2002).
- Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213 (1986).
- Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H. R. & McLaughlin, K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* **16**, 1209-1219 (2002).
- Boorstein, R. J., Cummings, A., Jr., Marenstein, D. R., Chan, M. K., Ma, Y., Neubert, T. A., Brown, S. M. & Teebor, G. W. Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* **276**, 41991-41997 (2001).
- Borst, P. & Sabatini, R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annu Rev Microbiol* **62**, 235-251 (2008).
- Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P. O., Clark, A., Pradhan, S. & Jacobsen, S. E. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**, 1760-1764 (2007).
- Bouniol-Baly, C., Nguyen, E., Besombes, D. & Debey, P. Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation. *Exp Cell Res* **236**, 201-211 (1997).
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E. J., Roloff, T. C., Beisel, C., Schubeler, D., Stadler, M. B. & Peters, A. H. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 679-687 (2010).
- Campbell, K. H., Alberio, R., Choi, I., Fisher, P., Kelly, R. D., Lee, J. H. & Maalouf, W. Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Domest Anim* **40**, 256-268 (2005).
- Cannon, S. V., Cummings, A. & Teebor, G. W. 5-Hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **151**, 1173-1179 (1988).
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Jacobsen, S. E. & Fischer, R. L. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell* **110**, 33-42 (2002).
- Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R. & Schar, P. The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* **6**, 489-504 (2007).
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L. K., Bartolomei, M. S., Rambow, F., Bassi, M. R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A. J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L. & Bellacosa, A. Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair. *Cell* (2011).
- Das, A., Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Prasad, R., Wang, H., Boldogh, I., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., Tomkinson, A. E., Wilson, S. H., Mitra, S. & Hazra, T. K. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells. *DNA Repair (Amst)* (2006).
- David, S. S. & Williams, S. D. Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. *Chem Rev* **98**, 1221-1262 (1998).
- David-Cordonnier, M. H., Cunniffe, S. M., Hickson, I. D. & O'Neill, P. Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease. *Biochemistry* **41**, 634-642 (2002).
- Dawlaty, M. M., Ganz, K., Powell, B. E., Hu, Y. C., Markoulaki, S., Cheng, A. W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S. W., Page, D. C. & Jaenisch, R. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* **9**, 166-175 (2011).

- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. & Reik, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13734-13738 (2001).
- Derijck, A. A., van der Heijden, G. W., Giele, M., Philippens, M. E., van Bavel, C. C. & de Boer, P. gammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair (Amst)* **5**, 959-971 (2006).
- Doetsch, P. W. & Cunningham, R. P. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res* **236**, 173-201 (1990).
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. & Gehrke, C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* **10**, 2709-2721 (1982).
- Engel, N., Tront, J. S., Erinle, T., Nguyen, N., Latham, K. E., Sapienza, C., Hoffman, B. & Liebermann, D. A. Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice. *Epigenetics* **4**, 98-99 (2009).
- Farthing, C. R., Ficz, G., Ng, R. K., Chan, C. F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M. & Reik, W. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet* **4**, e1000116 (2008).
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. & Nussenzweig, A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**, 959-967 (2004).
- Ferreira, J. & Carmo-Fonseca, M. Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order. *J Cell Sci* **110 ( Pt 7)**, 889-897 (1997).
- Ficz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S. & Reik, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* (2011).
- Frauer, C., Hoffmann, T., Bultmann, S., Casa, V., Cardoso, M. C., Antes, I. & Leonhardt, H. Recognition of 5-Hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA Domain. *PLoS One* **6**, e21306 (2011).
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P. & Kouzarides, T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**, 4035-4040 (2003).
- Fulka, H., Mrazek, M., Tepla, O. & Fulka, J., Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* **128**, 703-708 (2004).
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Aladjem, M. I., Bonner, W. M. & Pommier, Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* **278**, 20303-20312 (2003).
- Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G. & Jones, P. A. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* **59**, 267-280 (2008).
- Gehring, M., Huh, J. H., Hsieh, T. F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J. J., Goldberg, R. B. & Fischer, R. L. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* **124**, 495-506 (2006).
- Gehring, M., Reik, W. & Henikoff, S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* **25**, 82-90 (2009).
- Gerlt, J. A. & Gassman, P. G. Understanding the rates of certain enzyme-catalyzed reactions: proton abstraction from carbon acids, acyl-transfer reactions, and displacement reactions of phosphodiester. *Biochemistry* **32**, 11943-11952 (1993).
- Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., Bruckl, T., Biel, M. & Carell, T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* **5**, e15367 (2010).

- Godon, C., Cordelieres, F. P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J. & Favau-  
don, V. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-  
strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* **36**, 4454-4464 (2008).
- Goll, M. G. & Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**,  
481-514 (2005).
- Gommers-Ampt, J. H., Teixeira, A. J., van de Werken, G., van Dijk, W. J. & Borst, P. The  
identification of hydroxymethyluracil in DNA of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*  
**21**, 2039-2043 (1993).
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T., David, L. & Zhu, J. K. ROS1, a  
repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosy-  
lase/lyase. *Cell* **111**, 803-814 (2002).
- Greenwood, C., Selth, L. A., Dirac-Svejstrup, A. B. & Svejstrup, J. Q. An iron-sulfur cluster  
domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *J Biol Chem* **284**, 141-  
149 (2009).
- Guan, L., van der Heijden, G. W., Bortvin, A. & Greenberg, M. M. Intracellular Detection of  
Cytosine Incorporation in Genomic DNA by Using 5-Ethynyl-2'-Deoxycytidine. *Chem-  
biochem* (2011).
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L. & Song, H. Hydroxylation of 5-Methylcytosine by  
TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. *Cell* (2011).
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J. & Surani, M.  
A. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* **117**, 15-23  
(2002).
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U. C., Cesari, F., Lee, C., Al-  
mouzni, G., Schneider, R. & Surani, M. A. Chromatin dynamics during epigenetic repro-  
gramming in the mouse germ line. *Nature* (2008).
- Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P. & Surani, M. A. Genome-wide  
reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*  
**329**, 78-82 (2010).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human dis-  
ease: an overview. *Methods Enzymol* **186**, 1-85 (1990).
- Halliwell, B. & Aruoma, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and  
measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* **281**, 9-19 (1991).
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T. & Cairns, B. R. Distinctive  
chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**, 473-  
478 (2009).
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J. & Schar, P. The versatile thymine DNA-glycosylase: a  
comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs. *Nu-  
cleic Acids Res* **31**, 2261-2271 (2003).
- Hayatsu, H. & Shiragami, M. Reaction of bisulfite with the 5-hydroxymethyl group in  
pyrimidines and in phage DNAs. *Biochemistry* **18**, 632-637 (1979).
- He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun,  
Y., Li, X., Dai, Q., Song, C. X., Zhang, K., He, C. & Xu, G. L. Tet-Mediated Formation  
of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* (2011).
- Hegde, M. L., Hazra, T. K. & Mitra, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand  
interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**, 27-47 (2008a).
- Hegde, M. L., Theriot, C. A., Das, A., Hegde, P. M., Guo, Z., Gary, R. K., Hazra, T. K., Shen,  
B. & Mitra, S. Physical and Functional Interaction between Human Oxidized Base-  
specific DNA Glycosylase NEIL1 and Flap Endonuclease 1. *J Biol Chem* **283**, 27028-  
27037 (2008b).
- Hellman, A. & Chess, A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Sci-  
ence* **315**, 1141-1143 (2007).

- Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., Lyko, F. & Wolf, E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* **71**, 217-223 (2004).
- Hildrestrand, G. A., Neurauter, C. G., Diep, D. B., Castellanos, C. G., Krauss, S., Bjoras, M. & Luna, L. Expression patterns of *Neil3* during embryonic brain development and neoplasia. *BMC Neurosci* **10**, 45 (2009).
- Holliday, R. & Pugh, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226-232 (1975).
- Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M. & Chaillet, J. R. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* **104**, 829-838 (2001).
- Howlett, S. K. & Reik, W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during pre-implantation development. *Development* **113**, 119-127 (1991).
- Huang, Y., Pastor, W. A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R. & Rao, A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* **5**, e8888 (2010).
- Huffman, J. L., Sundheim, O. & Tainer, J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* **577**, 55-76 (2005).
- Iqbal, K., Jin, S. G., Pfeifer, G. P. & Szabo, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. & Zhang, Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133 (2010).
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C. & Zhang, Y. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* (2011).
- Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X. & Jacobsen, S. E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**, 556-560 (2002).
- Jaenisch, R., Schnieke, A. & Harbers, K. Treatment of mice with 5-azacytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1451-1455 (1985).
- Jaenisch, R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *N Engl J Med* **351**, 2787-2791 (2004).
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080 (2001).
- Jin, S. G., Guo, C. & Pfeifer, G. P. GADD45A Does Not Promote DNA Demethylation. *PLoS Genet* **4**, e1000013 (2008).
- Jones, P. A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-1070 (2001).
- Jones, P. A. & Liang, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* **10**, 805-811 (2009).
- Julaton, V. T. & Reijo Pera, R. A. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet* **20**, 2238-2250 (2011).
- Kafri, T., Gao, X. & Razin, A. Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the pre-implantation mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10558-10562 (1993).
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E. & Sasaki, H. Essential role for de novo DNA methyltransferase *Dnmt3a* in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**, 900-903 (2004).
- Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Chung, A. S., Lee, K. K. & Han, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* **28**, 173-177 (2001).

- Kim, S. H., Kang, Y. K., Koo, D. B., Kang, M. J., Moon, S. J., Lee, K. K. & Han, Y. M. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 58-63 (2004).
- Klungland, A. & Lindahl, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* **16**, 3341-3348 (1997).
- Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S. G., Doetsch, P. W., Bolton, P. H., Wood, R. D. & Lindahl, T. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell* **3**, 33-42 (1999).
- Kornberg, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871 (1974).
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705 (2007).
- Kriaucionis, S. & Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929-930 (2009).
- Krokan, H., Wist, E. & Krokan, R. H. Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism. *Nucleic Acids Res* **9**, 4709-4719 (1981).
- Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8241-8246 (2001).
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J. & Reik, W. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* **35**, 88-93 (2003).
- Lepikhov, K. & Walter, J. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Dev Biol* **4**, 12 (2004).
- Lepikhov, K., Zakhartchenko, V., Hao, R., Yang, F., Wrenzycki, C., Niemann, H., Wolf, E. & Walter, J. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin* **1**, 8 (2008).
- Lepikhov, K., Wossidlo, M., Arand, J. & Walter, J. DNA methylation reprogramming and DNA repair in the mouse zygote. *Int J Dev Biol* **54**, 1565-1574 (2010).
- Levin, D. S., McKenna, A. E., Motycka, T. A., Matsumoto, Y. & Tomkinson, A. E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* **10**, 919-922 (2000).
- Levin, D. S., Vijayakumar, S., Liu, X., Bermudez, V. P., Hurwitz, J. & Tomkinson, A. E. A conserved interaction between the replicative clamp loader and DNA ligase in eukaryotes: implications for Okazaki fragment joining. *J Biol Chem* **279**, 55196-55201 (2004).
- Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926 (1992).
- Lindahl, T. & Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897-1905 (1999).
- Liutkeviciute, Z., Lukinavicius, G., Masevicius, V., Daujotyte, D. & Klimasauskas, S. Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat Chem Biol* **5**, 400-402 (2009).
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. & Helleday, T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33**, 3799-3811 (2005).
- Luthardt, F. W. & Donahue, R. P. Pronuclear DNA synthesis in mouse eggs. An autoradiographic study. *Exp Cell Res* **82**, 143-151 (1973).
- Madhusudan, S., Smart, F., Shrimpton, P., Parsons, J. L., Gardiner, L., Houlbrook, S., Talbot, D. C., Hammonds, T., Freemont, P. A., Sternberg, M. J., Dianov, G. L. & Hickson, I. D. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* **33**, 4711-4724 (2005).

- Maiti, A. & Drohat, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* (2011).
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**, 3563-3571 (1998).
- Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A. V., Colot, V., Schubert, I. & Tourmente, S. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2929-2939 (2003).
- Matsumoto, M., Yaginuma, K., Igarashi, A., Imura, M., Hasegawa, M., Iwabuchi, K., Date, T., Mori, T., Ishizaki, K., Yamashita, K., Inobe, M. & Matsunaga, T. Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J Cell Sci* **120**, 1104-1112 (2007).
- Matsumoto, Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 129-138 (2001).
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., Johnson, B. E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V. M., Rowitch, D. H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S. J., Haussler, D., Marra, M. A., Hirst, M., Wang, T. & Costello, J. F. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466**, 253-257 (2010).
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. & Haaf, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-502 (2000).
- McCullough, A. K., Sanchez, A., Dodson, M. L., Marapaka, P., Taylor, J. S. & Lloyd, R. S. The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites. *Biochemistry* **40**, 561-568 (2001).
- Metivier, R., Gallais, R., Tiffocche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F. & Salbert, G. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45-50 (2008).
- Migeon, B. R. Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. *Gen Med* **4**, 97-105 (2007).
- Mitra, S., Hazra, T. K., Roy, R., Ikeda, S., Biswas, T., Lock, J., Boldogh, I. & Izumi, T. Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. *Mol Cells* **7**, 305-312 (1997).
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M. & Schubeler, D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* **30**, 755-766 (2008).
- Monk, M., Boubelik, M. & Lehnert, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**, 371-382 (1987).
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W. & Petersen-Mahrt, S. K. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* **279**, 52353-52360 (2004).
- Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W. & Reik, W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R47-58 (2005).
- Morrison, J. R., Paszty, C., Stevens, M. E., Hughes, S. D., Forte, T., Scott, J. & Rubin, E. M. Apolipoprotein B RNA editing enzyme-deficient mice are viable despite alterations in lipoprotein metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7154-7159 (1996).

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
- Myster, S. H., Wang, F., Cavallo, R., Christian, W., Bhotika, S., Anderson, C. T. & Peifer, M. Genetic and bioinformatic analysis of 41C and the 2R heterochromatin of *Drosophila melanogaster*: a window on the heterochromatin-euchromatin junction. *Genetics* **166**, 807-822 (2004).
- Nagy, A. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003).
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., Tanaka, S., Shiota, K. & Nakano, T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 64-71 (2007).
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389 (1998).
- Ndlovu, M. N., Denis, H. & Fuks, F. Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends Biochem Sci* (2011).
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**, 58-61 (1999).
- Ng, R. K., Dean, W., Dawson, C., Lucifero, D., Madeja, Z., Reik, W. & Hemberger, M. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. *Nat Cell Biol* **10**, 1280-1290 (2008).
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J. M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S. L., Manos, P. D., Rossi, D. J., Yu, J., Hebrok, M., Hochedlinger, K., Costello, J. F., Song, J. S. & Rammalho-Santos, M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* **13**, 541-549 (2011).
- Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T. & Zhang, Y. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* **463**, 554-558 (2010).
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257 (1999).
- Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S. P., Allis, C. D., Cheng, X. & Bestor, T. H. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**, 714-717 (2007).
- Ooi, S. K. & Bestor, T. H. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**, 1145-1148 (2008).
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. & Walter, J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**, 475-478 (2000).
- Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E. M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., Tahiliani, M., Daley, G. Q., Liu, X. S., Ecker, J. R., Milos, P. M., Agarwal, S. & Rao, A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* **473**, 394-397 (2011).
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. & Bonner, W. M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**, 886-895 (2000).
- Piersen, C. E., Prasad, R., Wilson, S. H. & Lloyd, R. S. Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate excision reaction. *J Biol Chem* **271**, 17811-17815 (1996).

- Ponferrada-Marin, M. I., Roldan-Arjona, T. & Ariza, R. R. ROS1 5-methylcytosine DNA glycosylase is a slow-turnover catalyst that initiates DNA demethylation in a distributive fashion. *Nucleic Acids Res* (2009).
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. & Reik, W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **463**, 1101-1105 (2010).
- Pornthanakasem, W., Kongruttanachok, N., Phuangphairoj, C., Suyarnsestakorn, C., Sanghangthum, T., Oonsiri, S., Ponyeam, W., Thanasupawat, T., Matangkasombut, O. & Mutirangura, A. LINE-1 methylation status of endogenous DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* (2008).
- Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R. & Wilson, S. H. Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem* **273**, 15263-15270 (1998).
- Pratt, J. R., Parker, M. D., Affleck, L. J., Corps, C., Hostert, L., Michalak, E. & Lodge, J. P. Ischemic epigenetics and the transplanted kidney. *Transplant Proc* **38**, 3344-3346 (2006).
- Privat, E. & Sowers, L. C. Photochemical deamination and demethylation of 5-methylcytosine. *Chem Res Toxicol* **9**, 745-750 (1996).
- Probst, A. V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P. & Almouzni, G. A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* **19**, 625-638 (2010).
- Rai, K., Huggins, I. J., James, S. R., Karpf, A. R., Jones, D. A. & Cairns, B. R. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* **135**, 1201-1212 (2008).
- Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093 (2001a).
- Reik, W. & Walter, J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet* **27**, 255-256 (2001b).
- Reik, W. & Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**, 21-32 (2001c).
- Reik, W., Santos, F., Mitsuya, K., Morgan, H. & Dean, W. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1403-1409; discussion 1409 (2003).
- Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425-432 (2007).
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. & Durandy, A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565-575 (2000).
- Richmond, T. J. & Davey, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145-150 (2003).
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-251 (1977).
- Robertson, J., Robertson, A. B. & Klungland, A. The presence of 5-hydroxymethylcytosine at the gene promoter and not in the gene body negatively regulates gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 40-43 (2011).
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868 (1998).

- Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Paldi, A. & Viegas-Pequignot, E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* **12**, 2108-2113 (1998).
- Russo, V. E. A., Martienssen, R. A. & Riggs, A. D. Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Lab. Press*, pp 109–125 (1996).
- Ruzov, A., Tsenkina, Y., Serio, A., Dudnakova, T., Fletcher, J., Bai, Y., Chebotareva, T., Pells, S., Hannoun, Z., Sullivan, G., Chandran, S., Hay, D. C., Bradley, M., Wilmut, I. & De Sousa, P. Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* **21**, 1332-1342 (2011).
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39-85 (2004).
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. & Dean, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**, 172-182 (2002).
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W. & Dean, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* **13**, 1116-1121 (2003).
- Santos, F. & Dean, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* **127**, 643-651 (2004).
- Santos, F., Peters, A. H., Otte, A. P., Reik, W. & Dean, W. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* **280**, 225-236 (2005).
- Sarmiento, O. F., Digilio, L. C., Wang, Y., Perlin, J., Herr, J. C., Allis, C. D. & Coonrod, S. A. Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J Cell Sci* **117**, 4449-4459 (2004).
- Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B. E., Bergman, Y., Simon, I. & Cedar, H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* **39**, 232-236 (2007).
- Schmitz, K. M., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schafer, A., Grummt, I. & Mayer, C. TAF12 Recruits Gadd45a and the Nucleotide Excision Repair Complex to the Promoter of rRNA Genes Leading to Active DNA Demethylation. *Mol Cell* **33**, 344-353 (2009).
- Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H. & Gruss, P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *Embo J* **9**, 2185-2195 (1990).
- Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G. & Bonner, W. M. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**, 486-492 (2002).
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M. & Matsui, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* **278**, 440-458 (2005).
- Shen, J. C., Rideout, W. M., 3rd & Jones, P. A. High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* **71**, 1073-1080 (1992).
- Shi, W., Dirim, F., Wolf, E., Zakhartchenko, V. & Haaf, T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod* **71**, 340-347 (2004).
- Shimura, T., Inoue, M., Taga, M., Shiraishi, K., Uematsu, N., Takei, N., Yuan, Z. M., Shinohara, T. & Niwa, O. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol* **22**, 2220-2228 (2002).
- Smallwood, S. A., Tomizawa, S. I., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S. R. & Kelsey, G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* (2011).

- Sun, Q. Y. & Schatten, H. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Adv Exp Med Biol* **591**, 58-71 (2007).
- Surani, M. A., Hayashi, K. & Hajkova, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* **128**, 747-762 (2007).
- Suwinska, A., Czolowska, R., Ozdzinski, W. & Tarkowski, A. K. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol* **322**, 133-144 (2008).
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L. & Rao, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935 (2009).
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
- Tam, P. P., Zhou, S. X. & Tan, S. S. X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development* **120**, 2925-2932 (1994).
- Tamaru, H. & Selker, E. U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277-283 (2001).
- Tarkowski, A. An Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs. *Cytogenetics* **5**, 394-400 (1966).
- Torres-Padilla, M. E., Bannister, A. J., Hurd, P. J., Kouzarides, T. & Zernicka-Goetz, M. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and pre-implantation embryos. *Int J Dev Biol* **50**, 455-461 (2006).
- Trivers, R.L. Parent-offspring conflict. *Am. Zool.* **14**: 249-264 (1974).
- Valinluck, V. & Sowers, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* **67**, 946-950 (2007).
- van der Heijden, G. W., Dieker, J. W., Derijck, A. A., Muller, S., Berden, J. H., Braat, D. D., van der Vlag, J. & de Boer, P. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* **122**, 1008-1022 (2005).
- Vignon, X., Chesne, P., Le Bourhis, D., Flechon, J. E., Heyman, Y. & Renard, J. P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C R Acad Sci III* **321**, 735-745 (1998).
- Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-440 (2002).
- Wang, Y., Tang, X., Cheng, Z., Mueller, L., Giovannoni, J. & Tanksley, S. D. Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics* **172**, 2529-2540 (2006).
- Ward, I. M. & Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**, 47759-47762 (2001).
- Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A. E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S. H., Mitra, S. & Hazra, T. K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* **15**, 209-220 (2004).
- Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M. T., Johansen, J. V., Cloos, P. A., Rappsilber, J. & Helin, K. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**, 343-348 (2011).
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813 (1997).

- Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Scholer, H. & Walter, J. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *Embo J* **29**, 1877-1888 (2010).
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W. & Walter, J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* **2**, 241 (2011).
- Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Eve Sun, Y. & Zhang, Y. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* (2011a).
- Wu, S. C. & Zhang, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 607-620 (2010).
- Wu, S. M. & Hochedlinger, K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* **13**, 497-505 (2011b).
- Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A. J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K. & Shi, Y. G. Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol Cell* (2011).
- Yamagata, K. & Okada, Y. Understanding paternal genome demethylation through live-cell imaging and siRNA. *Cell Mol Life Sci* (2011).
- Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* **5**, 639-646 (2005).
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**, 335-340 (1997).
- Yoshida, N. & Perry, A. C. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc* **2**, 296-304 (2007).
- Yuan, B., Latek, R., Hossbach, M., Tuschl, T. & Lewitter, F. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res* **32**, W130-134 (2004).
- Yukawa, M., Oda, S., Mitani, H., Nagata, M. & Aoki, F. Deficiency in the response to DNA double-strand breaks in mouse early preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* (2007).
- Zeng, F., Baldwin, D. A. & Schultz, R. M. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* **272**, 483-496 (2004).
- Zhan, Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* **569**, 133-143 (2005).
- Zharkov, D. O., Shoham, G. & Grollman, A. P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* **2**, 839-862 (2003).
- Zhu, B., Zheng, Y., Hess, D., Angliker, H., Schwarz, S., Siegmann, M., Thiry, S. & Jost, J. P. 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5135-5139 (2000).
- Ziegler-Birling, C., Helmrich, A., Tora, L. & Torres-Padilla, M. E. Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *Int J Dev Biol* **53**, 1003-1011 (2009).
- Zingg, J. M., Shen, J. C., Yang, A. S., Rapoport, H. & Jones, P. A. Methylation inhibitors can increase the rate of cytosine deamination by (cytosine-5)-DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **24**, 3267-3275 (1996).

## ANHANG

**Tab. 8.1 | Quantifizierung des 5mC-Signals normalisiert gegen DNA-Antikörpersignal paternaler und maternaler Pronuklei der *in vitro* befruchteten Mauszygote**

#	PN1		PN2		frühes PN3		spätes PN3		PN4		PN5	
	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat
1	0,417	0,684	0,190	0,697	0,160	0,533	0,169	0,481	0,099	0,258	0,157	0,406
2	0,655	0,847	0,286	0,604	0,174	0,563	0,111	0,452	0,132	0,357	0,167	0,382
3	0,461	0,719	0,235	0,610	0,114	0,436	0,214	0,542	0,119	0,351	0,091	0,179
4			0,349	0,897	0,144	0,426			0,096	0,282	0,138	0,279
5			0,301	0,872	0,138	0,376			0,101	0,346	0,181	0,462
6			0,281	0,667	0,264	0,606			0,102	0,266	0,115	0,263
7					0,222	0,666			0,098	0,245	0,146	0,383
8					0,188	0,664			0,081	0,250	0,146	0,382
9					0,263	0,659			0,094	0,327	0,144	0,353

**Tab. 8.2 | Quantifizierung des 5hmC-Signals (polyklonaler Antikörper von Active Motif) normalisiert gegen DNA-Antikörpersignal paternaler und maternaler Pronuklei der *in vitro* befruchteten Mauszygote**

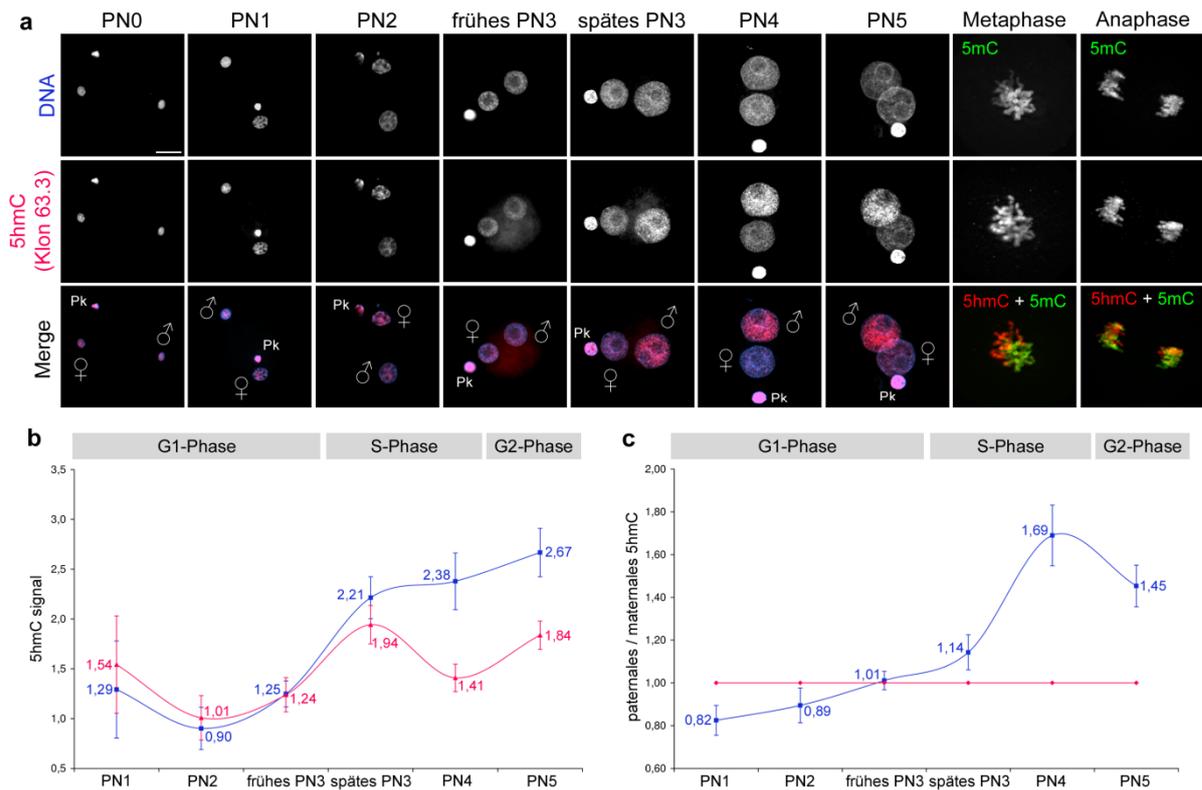
#	PN1		PN2		frühes PN3		spätes PN3		PN4		PN5	
	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat
1	0,750	0,637	0,331	0,370	0,541	0,445	2,761	1,418	3,285	0,726	3,241	1,563
2	0,632	0,718	0,296	0,419	0,710	0,415	4,331	2,377	3,075	1,122	4,047	1,714
3	0,354	0,737	0,305	0,315	0,528	0,418	2,983	1,885	2,905	0,884	3,961	1,849
4	1,066	0,788	0,302	0,301	0,642	0,366	5,990	1,988	2,217	0,715	4,259	1,873
5	0,794	1,649	0,419	0,538	0,565	0,410	3,358	1,765	2,579	0,938	2,567	0,836
6	0,354	0,415	0,308	0,402	1,327	0,791	1,933	0,531	3,194	1,281	3,118	1,060
7	0,610	0,777	0,657	0,841	1,667	0,956	1,675	0,406	3,934	1,401	3,420	1,473
8	0,516	0,688	0,594	0,586	0,995	0,682	1,528	0,515	3,648	1,144	3,899	1,396
9	1,137	1,238	0,383	0,684	0,648	0,520	2,202	0,699	2,064	0,776	4,008	2,041
10	0,407	0,414	0,524	0,827	1,217	0,576	1,808	0,625	2,843	0,861	3,151	1,313
11	0,278	0,286	0,354	0,737	1,282	0,783	2,290	0,721	2,184	0,547	2,368	1,277
12	0,357	0,469	0,346	0,766	0,930	0,703	2,912	0,792	2,452	0,825	2,949	1,660
13			0,319	0,394			2,605	0,957	1,992	0,751	2,944	1,236
14			0,390	0,436			2,099	0,810	2,301	0,907	3,352	1,410
15			0,351	0,432			1,962	1,104	2,319	0,867	3,117	1,551
16			0,417	0,424			2,254	0,658	2,591	1,008	2,166	1,167
17									2,439	0,793	2,110	0,793
18									2,678	1,059		

**Tab. 8.3 | Quantifizierung des 5mC-Signals der Pseudo-Pronuklei (PPN) von SCNT 1-Zell Embryonen der Maus**

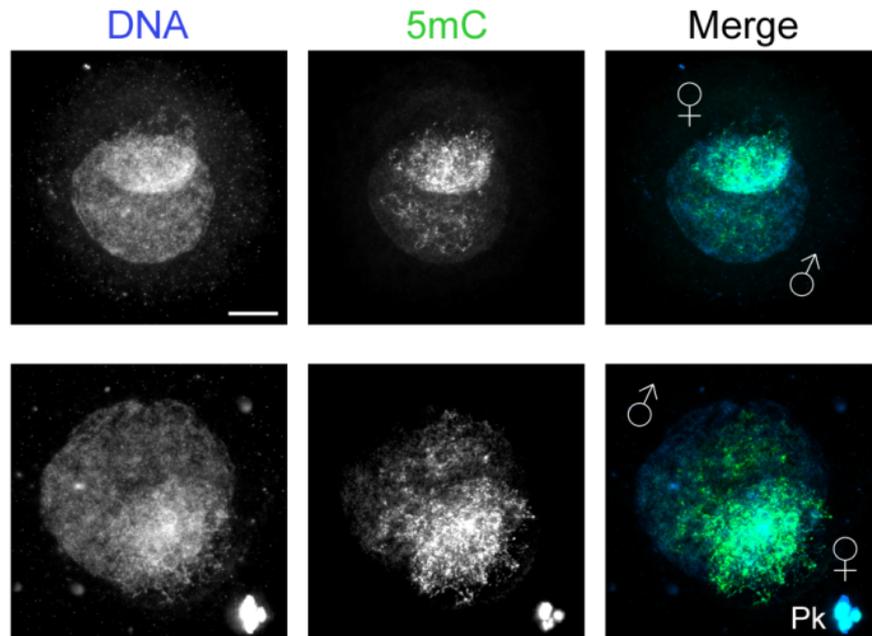
Klon #	2 hpa		4 hpa		6 hpa	
	1. PPN	2. PPN	1. PPN	2. PPN	1. PPN	2. PPN
1	0,627	0,719	0,267	0,365	0,265	0,223
2	0,585	0,699	0,381	0,201	0,280	0,299
3	0,647	0,874	0,383	0,378	0,252	0,218
4	0,987	0,735	0,240	0,465	0,278	0,281

**Tab. 8.4 | Quantifizierung der  $\gamma$ H2A.X-Foci von paternalen und maternalen Pronuklei von Mauszygoten in der G1-Phase**

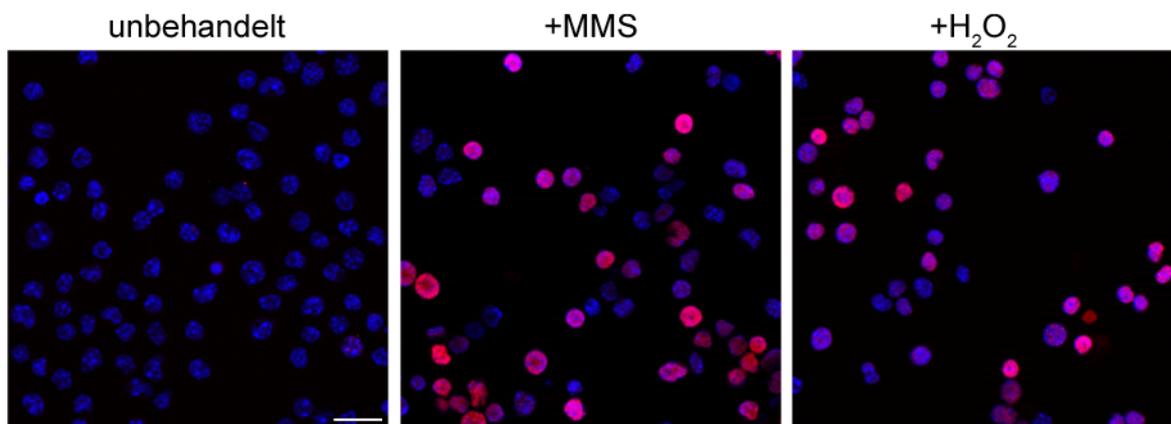
#	unbehandelt						Aphidicolin						Camptothecin					
	PN1		PN2		frühes PN3		PN1		PN2		frühes PN3		PN1		PN2		frühes PN3	
	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat
1	0	0	6	0	2	0	5	0	136	0	83	0	0	0	6	0	9	0
2	0	0	3	0	5	0	4	0	85	0	162	0	0	0	9	0	12	0
3	0	0	4	0	4	0	11	0	62	0	280	0	0	0	11	0	7	0
4	0	0	4	0	3	0	18	0	127	0	126	0	0	0	7	0	12	0
5	0	0	5	0	2	0	15	0	109	0	243	0	0	0	10	0	4	0
6	1	0	6	0	1	0	3	0	63	2	206	0	0	0	9	0	8	0
7	0	0	5	0	9	0	5	0	115	0	138	0	0	0	6	0	3	0
8	0	0	9	0	7	0	8	0	38	0	143	0	0	0	11	0	2	0
9	0	0	4	0	3	0	5	0	157	0	326	0	0	0	8	0	9	0
10	0	0	7	0	1	0	6	0	54	0	106	0	0	0	5	0	5	0
11	0	0	4	0	12	0	0	0	115	0	132	0	0	0	12	0	14	0
12	0	0	7	0	3	0	7	0	93	0	151	0	0	0	10	0	4	0
13	0	0	3	0	4	0	6	0	150	0	96	0	0	0	14	0	7	0
14	0	0	8	0	3	0	9	0	119	0	166	0	0	0	5	0	5	0
15	0	0	2	0	4	0	6	0	91	0	181	0	0	0	6	0	6	0
16	0	0	4	0	10	0	5	0	101	0	290	4	0	0	9	0	8	0
17	0	0	7	0	8	0	6	0	96	0	131	0	0	0	10	0	4	0
18	0	0	9	0	6	0	4	0	138	0	144	0	0	0	8	0	9	0
19	0	0	8	0	2	0	7	0	131	0	145	0	0	0	9	0	2	0
20	0	0	9	0	6	0	4	0	155	0	132	2	0	0	7	0	11	0
21	0	0	3	0	25	0			129	0	363	0			10	0	9	0
22			8	0	15	0			171	0	230	0					4	0
23			3	0	4	0			156	0							10	0
24			7	0	4	0			144	0								
25			5	0	8	0			98	0								
26					12	0			81	0								
27					10	0			257	0								
28					8	0			66	0								
29					12	0			139	0								
30					8	0			102	0								
31					9	1												
32					5	0												
33					10	0												
34					12	0												
35					15	0												
36					6	0												
37					7	0												
38					3	0												
39					12	0												
40					16	0												
41					9	0												
42					13	0												
43					14	0												



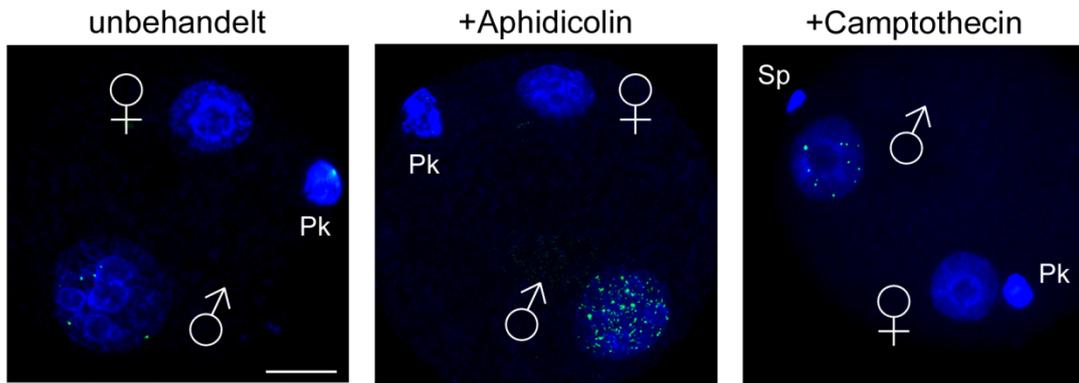
**Abb. 8.1 | 5hmC-IF-Analyse mit dem monoklonalen 5hmC-Antikörper (Klon 63.3).** (a) Gezeigt sind repräsentative pronukleäre Stadien von *in vitro* befruchteten Mauszygoten, die mit 5hmC- (rot, monoklonaler Mausantikörper von Prof. Dr. Wolf Reik / Prof. Dr. WolfAdrian Bird) und DNA-Antikörpern (blau) durch IF-Analyse untersucht wurden. (b) Quantifizierung des 5hmC-Signals normalisiert gegen DNA-Antikörpersignal (3 bis 9 Zygoten pro Stadium aus 2 bis 3 unabhängigen IVFs). (c) Vergleich von paternalem/maternalem 5hmC-Signal (maternal ist auf 1 gesetzt). Blaue Linie = paternal, rote Linie = maternal, ♂ = paternal und ♀ = maternal Pronukleus; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m, Pk = Polkörper, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen (Wossidlo *et al.*, 2011, Supplementary Information).



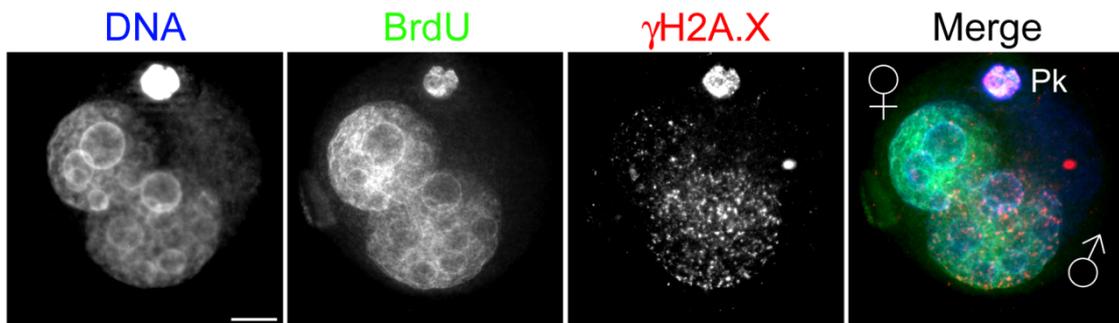
**Abb. 8.2 | 5mC-Signalverlust im paternalen Pronukleus von Kaninchenzygoten.** Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von Kaninchenzygoten im späten G2-Stadium, die mit 5mC- (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Prof. Dr. Dirk Schübeler) und DNA-Antikörpern (blau, polyklonaler Kaninchen-Antikörper von Immuno-Biological Laboratories) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt wurden. Die hier verwendeten Kaninchenzygoten wurden dabei durch Verpaarung superovulierter Häsinnen gewonnen. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20 µm; (Wossidlo *et al.*, 2011, Supplementary Information).



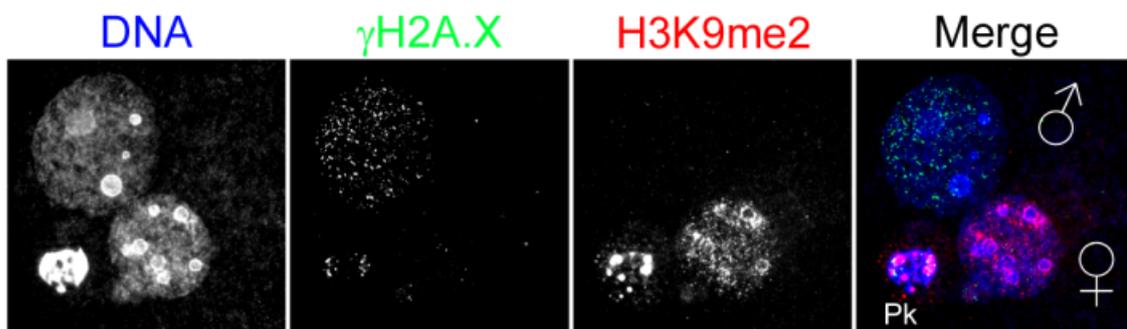
**Abb. 8.3 | Die Mutagene MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirken ein massives  $\gamma$ H2A.X-Signal in Kumulus-Zellen.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von Kumulus-Zellen der Maus, die vor der Fixierung für 1 h mit Methylmethansulfonat (MMS) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert und mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot, polyklonaler Kaninchen-Antikörper) analysiert wurden. Die Mutagene MMS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzieren eine starke  $\gamma$ H2A.X-Antwort. Maßstabsbalken = 20 µm.



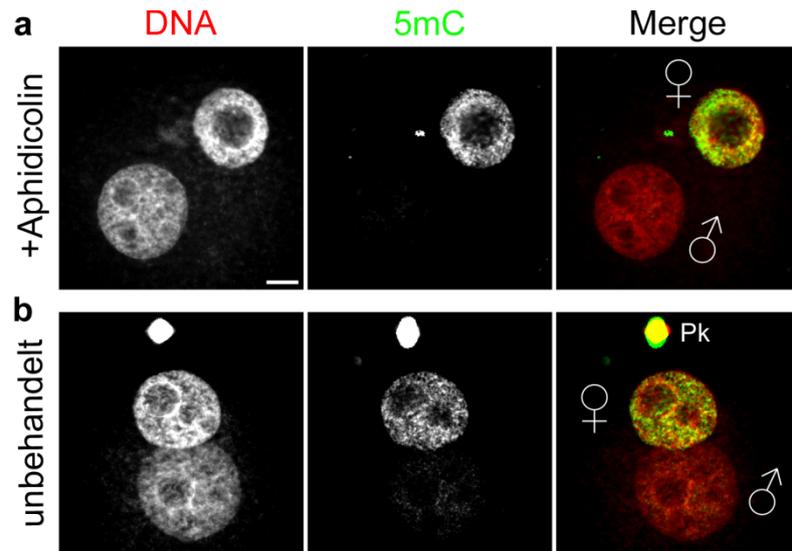
**Abb. 8.4 | Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aphidicolin führt zu einem verstärkten  $\gamma$ H2A.X-Signal im paternalen Pronukleus der Zygote in der G1-Phase.** Gezeigt sind vergrößerte Darstellungen von *in vitro* befruchteten Mauszygoten aus Abbildung 3.21, die 2 h vor der Fixierung im PN2-Stadium zusätzlich mit Aph und Cpt inkubiert wurden und mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (grün) untersucht wurden. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper, Sp = Spermium; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.



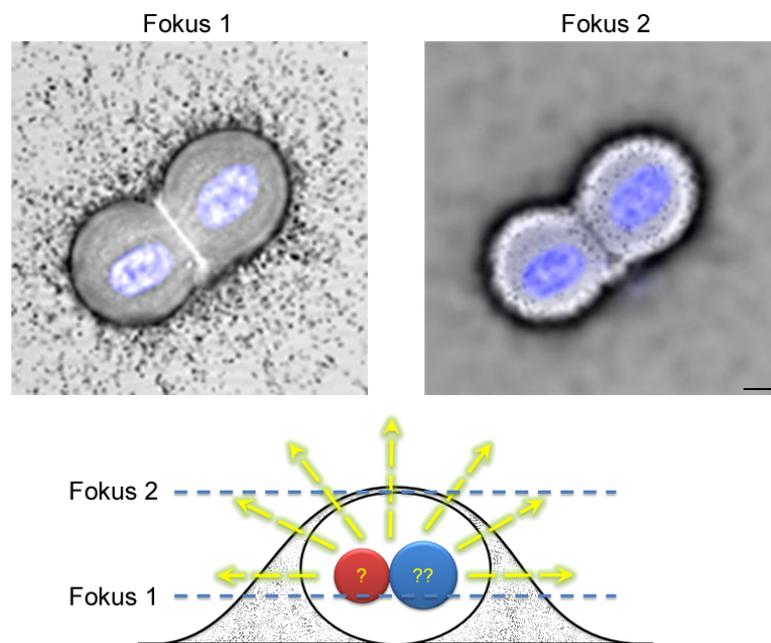
**Abb. 8.5 | Einbau von BrdU und asymmetrisches  $\gamma$ H2A.X-Signal während der S-Phase von Zygoten.** Gezeigt ist eine *in vitro* befruchtete Mauszygote, die 1 h vor der Fixierung im späten PN4-Stadium mit 5-Brom-Desoxyuridin (BrdU) inkubiert und anschließend mit BrdU- (grün) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (rot) untersucht wurde. Der Einbau von BrdU ist in beiden elterlichen Pronuklei gleichermaßen zu detektieren. Das  $\gamma$ H2A.X-Signal hingegen ist vorherrschend in paternalen Pronukleus zu finden. ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).



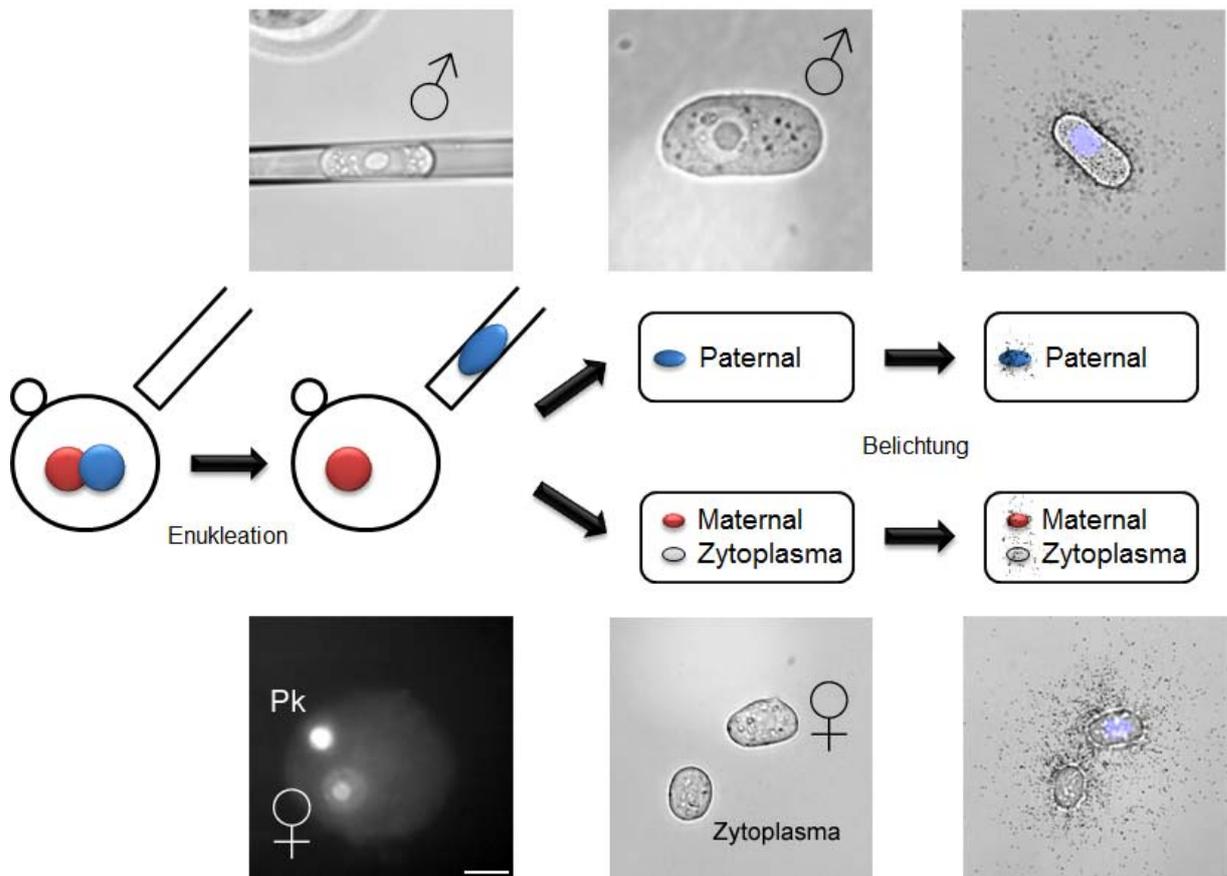
**Abb. 8.6 | Paternales  $\gamma$ H2A.X- und maternales H3K9me2-Signal einer späten PN3 Zygote.** *In vitro* befruchtete Mauszygoten im späten PN3-Stadium wurden mit H3K9me2- (rot) und  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern (grün) untersucht. Das H3K9me2-Signal kann ausschließlich im maternalen Pronukleus detektiert werden (Lepikhov *et al.*, 2004), wodurch das vorherrschende  $\gamma$ H2A.X-Signal in dem H3K9me2 negativen Pronukleus dem paternalen Genom zugeordnet werden kann.  $N > 20$ ; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus, Pk = Polkörper; Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).



**Abb. 8.7 | Aphidicolin hat keinen Einfluss auf den 5mC-Signalverlust im paternalen Pronukleus.** (a) *In vitro* befruchtete Zygoten der Maus wurden 2 h vor der Fixierung im frühen PN3-Stadium mit Aph inkubiert und anschließend mit 5mC-Antikörpern (grün, monoklonaler Maus-Antikörper von Eurogentec) untersucht. Unbehandelte Zygoten (b) zeigen ebenfalls den Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus der frühen PN3-Zygote.  $N > 20$  pro Gruppe; ♂ = paternaler und ♀ = maternaler Pronukleus; Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$  (Wossidlo *et al.*, 2010, Supplementary Information).



**Abb. 8.8 | Autoradiographie von Embryonen, die mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  inkubiert wurden.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen eines *in vitro* befruchteten 2-Zell Embryos, der mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  kultiviert und auf einem Objektträger fixiert und autoradiographisch analysiert wurde. Die zwei verschiedenen Fokuspositionen zeigen die Schwarzfärbung der Silberkörnchen des Fotofilms auf der gesamten Oberfläche des Embryos. Die auf Gelatine basierende, zähflüssige Fotoemulsion kann das Oolemma des Embryos nicht durchdringen und zeigt deshalb die nach außen streuende Strahlung auf der gesamten Oberfläche des Embryos. Diese Eigenschaft der Fotoemulsion verhindert eine genaue Zuordnung der Strahlungsquelle zu paternalen oder maternalen Pronuklei einer Zygote. Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 8.9 | Autoradiographie von Pronuklei und Zytoplasma von Embryonen, die mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  inkubiert wurden.** Im späten G1-Stadium wurden von *in vitro* befruchteten und mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  kultivierten Zygoten die paternalen und maternalen Pronuklei durch Mikromanipulation entnommen und getrennt voneinander autoradiographisch analysiert. Zur Negativkontrolle wurde eine Probe aus dem Zytoplasma entnommen und ebenfalls untersucht. Die Analyse zeigt, dass die Radioaktivität des  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  auch im Zytoplasma gefunden werden kann, welches eine Kontamination des Zytoplasmas oder eine Metabolisierung des  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  bedeuten könnte. Dadurch kann keine Aussage über den Einbau von Nukleotiden im paternalen Pronukleus in der späten G1-Phase getroffen werden. Maßstabsbalken = 20  $\mu\text{m}$ .

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	Cytidin 5'-alpha <sup>32</sup> P Triphosphat
5caC	5-Carboxyl-Cytosin
5fC	5-Formyl-Cytosin
5mC	5-Methyl-Cytosin
5hmC	5-Hydroxymethyl-Cytosin
5hmU	5-Hydroxymethyl-Uracil
A	Adenin
Abb	Abbildung
AP-Stelle	apurine/apyrimidine Stelle
Aph	Aphidicolin
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATMph	autophosphoryliertes, aktives ATM
ATR	ATM and Rad3-related kinase
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare (engl. base pair)
BrdC	5-Brom-Desoxycytidin
BrdU	5-Brom-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bspw	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
CMS	Cytosin 5-Methylensulfonat
Cpt	Camptothecin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDR	DNA damage response
dest	destilliert
DNA-PK	DNA abhängige Proteinkinase
Dnmt	DNA Methyltransferase
DMR	differentiell methylierte Region
Dnmt	DNA-Methyltransferasen
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EdC	5-Ethynyl-Desoxycytidin
EdU	5-Ethynyl-Desoxyuridin

## Abkürzungsverzeichnis

---

engl.	englisch
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
ESCs	Embryonale Stammzellen (embryonic stem cells)
ETn	early Retrotransposons (murines Retrotransposon)
FEN-1	Flap endonuclease 1
FITC-dCTP	Fluoreszein-Desoxycytidin
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
hCG	Humanes Chorion-Gonadotropin
HDACs	Histondeacetylasen
HMT	Histonmethyltransferasen
HP1	Heterochromatin Protein 1
hpa	hours <i>post</i> activation
hphCG	hours <i>post</i> hCG
hpICSI	hours <i>post</i> ICSI
hpf	hours <i>post</i> fertilization
HR	Homologe Rekombination
IAP	Intracisternal A Particle elements
ICM	Innere Zellmasse (von Blastozysten, aus dem engl.)
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IF	Immunfluoreszenz
IU	Internationale Enzymeinheit
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen (aus dem engl.)
IVF	<i>In vitro</i> Fertilisation
KD	Knockdown
KO	Knockout
L	Liter
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nonhomologous End Joining
Line1	long interspersed nuclear element 1
LP-BER	Long patch BER
LSH	Lymphoid specific helicase
MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4
M	Molar
mat	maternal
MBq	Mega-Becquerel
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
miRNAs	Mikro RNAs
min	Minute

## Abkürzungsverzeichnis

---

mM	Millimolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Microliter
mRNA	Messenger RNA
NPBs	nucleolar precursor bodies
pat	paternal
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pg	Pikogramm
PGCs	Primordiale Keimzellen (aus dem engl.)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinasen
Pk	Polkörper
PN	Pronukleus
PNK	Polynukleotid-Kinase
PPN	Pseudo-Pronukleus
PUA	Phospho $\alpha,\beta$ -unsaturated Aldehyde
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
RFC	Replication Factor C
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SCNT	somatic cell nuclear transfer
sec	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SN-BER	single nucleotide BER
T	Thymin
TDG	Thymine DNA Glycosylase
TE	Trophoektoderm
tRNA	Transfer-RNA
ÜN	über Nacht
XPA-XPG	xeroderma pigmentosum group A-G complementing protein
z.B.	zum Beispiel

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1   Enzymatische Katalyse von 5-Methyl-Cytosin durch DNA Methyltransferasen. ....	2
Abb. 1.2   Mechanismen der Etablierung, Aufrechterhaltung und Löschung der DNA Methylierung in Säugetieren .....	3
Abb. 1.3   Histonmodifikationen und Wechselwirkungen .....	6
Abb. 1.4   Verschiedene Methoden zur induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen ...	8
Abb. 1.5   Der Lebenszyklus von Säugetieren ist mit zwei Hauptphasen epigenetischer Reprogrammierung gekennzeichnet.....	10
Abb. 1.6   Lichtmikroskopische Aufnahme einer Eizelle und einer Zygote der Maus .....	14
Abb. 1.7   Dynamische Reprogrammierung epigenetischer Information im ersten Zellzyklus der Säugetierentwicklung .....	15
Abb. 1.8   Verlust von 5mC-Signal im paternalen Pronukleus der Mauszygote.....	16
Abb. 1.9   Dynamischer Verlust von 5mC-Antikörpersignal in der frühen Präimplantationsentwicklung der Maus .....	18
Abb. 1.10   Biochemie des 5-Hydroxymethyl-Cytosin .....	19
Abb. 1.11   Direkte und indirekte aktive DNA Demethylierung.....	21
Abb. 1.12   Mögliche Wege der direkten und indirekten aktiven DNA Demethylierung.....	25
Abb. 1.13   Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur (BER).....	26
Abb. 2.1   Präparation des <i>Vas deferenz</i> und der <i>Cauda epididymis</i> eines Mausbocks .....	37
Abb. 2.2   Präparation des Ovidukts eines Mausweibchens.....	38
Abb. 3.1   Verlust des 5mC-Antikörpersignals im paternalen Pronukleus der Zygote mit optimierten Denaturierungsbedingungen .....	50
Abb. 3.2   Quantifizierung des 5mC-Signals paternaler und maternaler Pronuklei der Mauszygote .....	52
Abb. 3.3   Beginn und Dauer der S-Phase von Mauszygoten werden in der Literatur kontrovers diskutiert.....	53
Abb. 3.4   Bestimmung der S-Phase von Mauszygoten durch „Pulse Labelling“ mit EdU.....	54
Abb. 3.5   Unterschiede in der dynamischen DNA Demethylierung der Zygote analysiert durch 5mC-Immunfluoreszenzen und der Bisulfit-Sequenzierung von Line1 Elementen .....	56
Abb. 3.6   Das Verhalten von 5-Hydroxymethyl-Cytosin in der 5mC-Immunfluoreszenz und Bisulfit-Sequenzierung.....	57
Abb. 3.7   Die sechste Base 5hmC kann bevorzugt im paternalen Genom von Mauszygoten detektiert werden.....	58
Abb. 3.8   Dynamisches Erscheinen von 5hmC-Signal in frühen Präimplantationsembryonen der Maus.....	60
Abb. 3.9   5hmC kann auch in Kaninchen- und Rinderzygoten detektiert werden.....	62
Abb. 3.10   Verlust von 5mC-Signal in geklonten 1-Zell Embryonen der Maus.....	64

Abb. 3.11   5mC- und 5hmC-Signal in geklonten 1-Zell Embryonen der Maus .....	65
Abb. 3.12   5mC und 5hmC im 2-Zell Embryo.....	66
Abb. 3.13   5hmC-Signal in Präimplantationsembryonen der Maus.....	67
Abb. 3.14   Das Erscheinen von 5hmC-Signal erfolgt replikationsunabhängig.....	68
Abb. 3.15   Starke Präsenz von Tet3 Transkripten in der Eizelle .....	69
Abb. 3.16   Schematischer Versuchsablauf der RNA-Interferenz von Tet Proteinen in der Zygote.....	70
Abb. 3.17   Der Tet KD in Eizellen beeinflusst das 5hmC- und 5mC-Signal von Zygoten ....	72
Abb. 3.18   Quantifizierung von 5hmC- und 5mC-Signalen paternaler und maternaler Pronuklei von Zygoten, die von mit „scrambled“ und Tet1-3 siRNA injizierten Eizellen abstammen.....	73
Abb. 3.19   Die native Histonvariante H2A.X ist während der Entwicklung der Mauszygote in beiden elterlichen Pronuklei gleichermaßen zu finden .....	75
Abb. 3.20   Die Induktion von DNA Schäden in der frühen Mauszygote führt zu massivem Auftreten von $\gamma$ H2A.X-Signal.....	77
Abb. 3.21   Dynamisches Erscheinen und parentale Asymmetrie von $\gamma$ H2A.X-Signalen in verschiedenen pronukleären Stadien der Mauszygote .....	79
Abb. 3.22   2-Zell Embryonen zeigen keinen Einfluss von Aph auf das $\gamma$ H2A.X-Signal in der G1-Phase .....	81
Abb. 3.23   Anzahl von $\gamma$ H2A.X-Foci in paternalen und maternalen Pronuklei der G1-Phase von Mauszygoten .....	82
Abb. 3.24   Dynamisches Erscheinen von $\gamma$ H2A.X-Signalen in geklonten 1-Zell Embryonen	83
Abb. 3.25   DNA Einzelstrangbrüche in der G1-Phase von Mauszygoten .....	85
Abb. 3.26   Die Induktion von DNA Schäden durch MMS erzeugt starke PARP-1 und $\gamma$ H2A.X-Signale .....	87
Abb. 3.27   Ko-Lokalisation von PARP-1 und $\gamma$ H2A.X-Signalen.....	87
Abb. 3.28   Autoradiographie von Zellkernen <i>in vitro</i> befruchteter Embryonen.....	91
Abb. 4.1   Dynamischer Verlust von 5mC-Signal und Gewinn an 5hmC-Signal in paternalen und maternalen Pronuklei.....	98
Abb. 4.2   Akkumulation von 5hmC im maternalen Pronukleus von PGC7-/- Zygoten .....	104
Abb. 4.3   Modell der indirekten aktiven DNA Demethylierung des paternalen Pronukleus in der Mauszygote .....	116
Abb. 4.4   Das Verhalten der fünften, sechsten, siebten und achten Base des Genoms in der Bisulfit-Analyse .....	117
Abb. 8.1   5hmC-IF-Analyse mit dem monoklonalen 5hmC-Antikörper (Klon 63.3).....	136
Abb. 8.2   5mC-Signalverlust im paternalen Pronukleus von Kaninchenzygoten .....	137
Abb. 8.3   Die Mutagene MMS und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bewirken ein massives $\gamma$ H2A.X-Signal in Kumulus-Zellen.....	137
Abb. 8.4   Die Inhibition von DNA Polymerasen durch Aphidicolin führt zu einem verstärkten $\gamma$ H2A.X-Signal im paternalen Pronukleus der Zygote in der G1-Phase.....	138

Abb. 8.5 | Einbau von BrdU und asymmetrisches  $\gamma$ H2A.X-Signal während der S-Phase von Zygoten..... 138

Abb. 8.6 | Paternales  $\gamma$ H2A.X- und maternales H3K9me2-Signal einer späten PN3 Zygote 138

Abb. 8.7 | Aphidicolin hat keinen Einfluss auf den 5mC-Signalverlust im paternalen Pronukleus..... 139

Abb. 8.8 | Autoradiographie von Embryonen, die mit [ $\alpha$ -32P]-dCTP inkubiert wurden..... 139

Abb. 8.9 | Autoradiographie von Pronuklei und Zytoplasma von Embryonen, die mit [ $\alpha$ -32P]-dCTP inkubiert wurden ..... 140

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1   Begriffserklärung der verschiedenen Stufen zellulärer Potenz .....	7
Tab. 2.1   Sequenzen der verwendeten Primer für die RT-PCR.....	35
Tab. 2.2   Sequenzen der verwendeten siRNAs .....	36
Tab. 8.1   Quantifizierung des 5mC-Signals normalisiert gegen DNA-Antikörpersignal paternaler und maternaler Pronuklei der <i>in vitro</i> befruchteten Mauszygote .....	134
Tab. 8.2   Quantifizierung des 5hmC-Signals (polyklonaler Antikörper von Active Motif) normalisiert gegen DNA-Antikörpersignal paternaler und maternaler Pronuklei der <i>in vitro</i> befruchteten Mauszygote .....	134
Tab. 8.3   Quantifizierung des 5mC-Signals der Pseudo-Pronuklei (PPN) von SCNT 1-Zell Embryonen der Maus .....	135
Tab. 8.4   Quantifizierung der $\gamma$ H2A.X-Foci von paternalen und maternalen Pronuklei von Mauszygoten in der G1-Phase.....	135

## CURRICULUM VITAE

### PERSÖNLICHE DATEN

Diplom-Biologe Mark Wossidlo · Seilerstraße 16 · 66111 Saarbrücken · Germany  
Telefon: +49 163 6665999  
E-mail: [mark.wossidlo@googlemail.com](mailto:mark.wossidlo@googlemail.com)

Department of Genetics/Epigenetics of Prof. Dr. Jörn Walter · University of Saarland · Uni Campus ·  
66123 Saarbrücken · Germany  
Telefon: +49 681 302-2443  
E-mail: [m.wossidlo@mx.uni-saarland.de](mailto:m.wossidlo@mx.uni-saarland.de)  
WWW: <http://epigenetik.uni-saarland.de/>

geboren am 16. März 1976 in Kusel, Deutschland  
Nationalität: deutsch

### STUDIUM UND PROMOTIONSSTUDIUM

- 02/2006 – 08/2011 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Genetik/Epigenetik von Prof. Dr. Jörn Walter mit der Untersuchung der epigenetischen Reprogrammierung der DNA Methylierung in der frühen Embryogenese der Maus
- 10/1998 – 07/2004 Hauptstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes mit dem Abschluss Diplom mit der finalen Note sehr gut  
Thema der Diplomarbeit: „Etablierung eines Testsystems zum Nachweis der RNA-Interferenz von natürlich vorkommenden miRNA´s in Säugerzellen“
- 10/1996 – 10/1998 Grundstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes

### WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

- 02/2006 – 08/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Genetik/Epigenetik von Prof. Dr. Jörn Walter
- 12/2005 – 01/2006 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Genetik/Epigenetik von Prof. Dr. Jörn Walter
- 01/2000 – 12/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT in der Kryobiologie von Prof. Dr. Heiko Zimmermann und Kernspintomographie von PD Dr. Frank Volke
- 11/1998 – 04/1999 Aushilfslehrer für Naturwissenschaften an der Missione Cattolica Italiana

### SCHULE UND WEHRDIENST

- 07/1995 – 08/1996 Grundwehrdienst in der Deutschen Marine  
1995 Abitur am Gymnasium Kusel

## PUBLIKATIONEN

**Wossidlo M**, Nakamura T, Lepikhov K, Marques C.J, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 2011. 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 2:241 doi: 10.1038/ncomms1240 (2011)

**Wossidlo M**, Arand J, Sebastiano V, Lepikhov K, Boiani M, Reinhardt R, Scholer H, Walter J. 2010. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *Embo J* 29: 1877-1888

Lepikhov K, **Wossidlo M**, Arand J, Walter J. 2010. DNA methylation reprogramming and DNA repair in the mouse zygote. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 1565-1574 (2010) doi: 10.1387/ijdb.103206kl

Arand J, Lepikhov K, **Wossidlo M**, Walter J. 2010 Active DNA demethylation - the enigma starts in the zygote. *Epigenomics: From Chromatin Biology to Therapeutics*. Book chapter

## VORTRÄGE (AUSWAHL)

Vortragsreise als eingeladener Gastredner mit dem Titel „DNA methylation reprogramming in mouse zygotes - 5hmC, a new epigenetic switch“, USA 2011

- Harvard University, Harvard Stem Cell Institute, Kevin Eggan, Boston
- Harvard Medical School, Stem Cell and Regenerative Biology, Konrad Hochedlinger, Boston
- Whitehead Institute for Biomedical Research, Rudolf Jaenisch, Boston
- Stanford School of Medicine, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Renee Reijo Pera, Stanford
- University of California, Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Miguel Ramalho Santos und Diana Laird, San Francisco
- University of California, Microbiology & Immunology, Michael McManus, San Francisco
- University of Hawai'i at Manoa, Institute for Biogenesis Research, Steven Ward, Honolulu

Eingeladener Gastredner am Marie Curie Institut, Chromatin Dynamics group, Geneviève Almouzni, Paris 2011: “DNA methylation reprogramming in mouse zygotes”

Eingeladener Gastredner an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), Epigenetik, Heinrich Leonhardt, München 2010: “Epigenetic reprogramming in mouse zygotes”

DFG Meeting SPP1356, Würzburg 2010: “Epigenetic reprogramming and DNA repair in the mouse zygote”

MPI Münster Workshop (AG Hans Schöler vom MPI Münster), Schloss Ringberg 2009: “Mechanisms of DNA demethylation in the mouse zygote”

Life Science Day, Saarbrücken 2009: “Epigenetic reprogramming and DNA repair in mouse zygotes”

DFG Meeting SPP1356, Würzburg 2009: “Epigenetic reprogramming and DNA repair in mouse zygotes”

MPI Münster Workshop (AG Hans Schöler vom MPI Münster), Schloss Ringberg 2007: “DNA-repair and associated chromatin-modifications in mouse zygotes: possible involvement in epigenomic reprogramming”

DFG Meeting SPP1129, Überherrn 2006: “Epigenetic reprogramming and repair in mouse zygotes”

Epigenomics Meeting, Berlin 2006: “DNA-repair and associated chromatin-modifications in murine preimplantation embryos”

## **POSTER PRÄSENTATIONEN**

EpiGeneSys Kick-Off Meeting, Paris 2010, "5-hydroxy-methylcytosine as an intermediate of active DNA demethylation in the mammalian zygote"

Chromatin and Epigenetics, Essen 2010: "Dynamic link of DNA demethylation, DNA repair and 5-hydroxy-methyl-cytosine in mouse zygotes"

Network of Excellence, Advances in Epigenetics, Sant Feliu de Guíxols 2010: "Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes"

Network of Excellence, Edinburgh 2009: "Epigenetic reprogramming and DNA repair in the mouse zygote"

59. Mosbacher Kolloquium, Epigenetics – Molecular Principles and Mechanisms, Mosbach 2008: "γ-H2A.X. in the mouse zygote – implications of DNA repair in epigenetic reprogramming"

EMBO Chromatin conference, Heidelberg 2007: "Dynamics of γ-H2A.X. in the mouse zygote"

## **EXTERNE WEITERBILDUNGEN**

Workshop DFG-Schwerpunktprogramm SPP 1356 „Somatic Cell Nuclear Transfer / Cloning“ von Dr. Michele Boiani, Juni 2009

Praktikum am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik zum Erlernen praktischer Techniken bei Mäusen (Narkose von Mäusen, Vasektomie bei Mäusen, Retransfer von Embryonen in pseudoschwangere Weibchen), Oktober 2008

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, September 2011

Mark Wossidlo