

**Asynchrone Replikation geprägter und nicht
geprägter Chromosomenregionen und
Expression relevanter Entwicklungsgene in
Präimplantationsembryonen der Maus**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Andreas May

geb. am 26.12.1978 in Trier

Mainz, 2009

Dekan: _____

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epigenetik	1
1.1.1	Epigenetische Mechanismen	1
1.2	Genomische Prägung	3
1.2.1	Regulation und Eigenschaften geprägter Gene	4
1.2.2	Evolution der Genomischen Prägung	7
1.2.3	Humane Imprintingkrankheiten.....	8
1.3	Epigenetische Reprogrammierung und genomische Prägung	9
1.4	Regulation der epigenetischen Reprogrammierung	12
1.5	Asynchrone Replikation und genomische Prägung	16
1.6	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	20
2.2	Mäusezucht	20
2.3	Embryopräparation	20
2.3.1	BrdU-Einbau zur Bestimmung zellulärer Proliferation	21
2.3.2	Blastomerenpräparation.....	21
2.4	Kultivierung und Präparation von Mausembryofibroblasten (MEFs)	22
2.4.1	Subkultivierung von Mausembryofibroblasten (MEFs).....	23
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.5	Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)	23
2.5.1	DNA-Isolierung	24
2.5.2	Sondenmarkierung mittels Nick-Translation.....	24
2.5.3	Hybridisierung der DNA-Sonden auf Interphasekerne und Metaphasen	25
2.5.4	Dokumentation	26
2.5.5	χ^2 -Unabhängigkeitstest	26
2.6	Multiplex Reverse Transkription (RT) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf AmpliGrid Chips	26

2.7	Quantitative Real-time RT-PCR (Q-PCR) mit QuantiTect SYBR Green® zur Expressionsanalyse.....	28
2.8	<i>In vitro</i> Transkription.....	29
2.9	<i>Whole Mount</i>-Immunfluoreszenzfärbung.....	31
2.10	Statistische Analysen	31
2.10.1	Satz von Bayes.....	31
2.10.2	Hauptkomponentenanalyse	32
2.10.3	Exakter Test nach Fisher.....	32
2.11	Material	32
2.11.1	Allgemeine Labormaterialien.....	32
2.11.2	BAC-Klone	32
2.11.3	Oligonukleotide.....	33
2.11.4	Antikörper	35
2.11.5	Software und Datenbanken	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen	37
3.1.1	Auswahl der BAC-Klone für die Analyse der Replikation mittels FISH.....	37
3.1.2	Validierung der FISH zur Replikationsanalyse von geprägten und nicht geprägten Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen	39
3.1.3	Replikationsverhalten geprägter Chromosomenregionen in Präimplantationsembryonen der Maus	42
3.1.4	Replikationsverhalten nicht geprägter Chromosomenregionen in Präimplantationsembryonen der Maus	44
3.2	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen und einzelnen Blastomeren der Maus mittels Multiplex RT-PCR.....	48
3.2.1	Assay-Design und Assay-Validierung.....	48
3.2.2	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen ...	51
3.2.3	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in einzelnen Blastomeren.....	52
3.2.4	Hauptkomponentenanalyse (PCA) zur Gruppierung der Expressionsmuster einzelner 16-Zell-Embryonen basierend auf Expressionsmuster der einzelnen Blastomeren.	55
3.2.5	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in einzelnen Blastomeren mittels Q-PCR.....	56
3.2.6	<i>Whole Mount</i> -Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der Genaktivität entwicklungsrelevanter Gene im späten Morulastadium.....	57

4	Diskussion	59
4.1	Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen	59
4.1.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung auf Interphasezellkernen.....	59
4.1.2	Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in Zygoten und Zweizellembryonen der Maus.....	60
4.1.3	Dynamische Regulation der asynchronen Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen.....	63
4.1.4	Speziesunterschiede in der frühen Präimplantationsphase	64
4.1.5	Relation zwischen der Replikation und dem Transkriptionsstatus eines Lokus.....	65
4.2	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen und einzelnen Blastomeren der Maus mittels Multiplex RT-PCR.....	67
4.2.1	Techniken zur Analyse der Genexpressionsprofile einzelner Zellen	67
4.2.2	Verlässlichkeit der Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus	69
4.2.3	Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus	70
4.2.4	Variation der Expression relevanter Entwicklungsgene zwischen Morula-Blastomeren der Maus	73
4.3	Ausblick	74
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis.....	77
7	Anhang	87
	Tabelle 7.1: Genexpression in einzelnen Blastomeren 12 verschiedener Morula- (16-Zell-) Embryonen.	87
	Tabelle 7.2: Expression der analysierten Entwicklungsgene in der Präimplantationsphase	89
7.2	Abkürzungsverzeichnis	91
7.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	92
7.4	Lebenslauf	93
7.5	Publikationen und Kongressteilnahmen.....	96
7.6	Danksagung	98
7.7	Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit.....	99

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Epigenetik ist im Prinzip das Studium der Gene während der Entwicklung und verknüpft Vererbung, Entwicklung und Evolution (Horsthemke, 2005). Der Begriff Epigenetik wurde erstmals von Conrad Hal Waddington verwendet (Waddington, 1942). Er beschrieb mit dem Begriff die Interaktionen von Genen mit ihrer Umwelt, die einen Phänotyp entstehen lassen, der durch den Epigenotyp vermittelt wird. Den Epigenotyp stellte er als ein Merkmal dar, das aus einer Verkettung von Prozessen besteht, die so zu einem Netzwerk verbunden sind, dass eine Störung in einem frühen Stadium weitgehende Abnormitäten in verschiedenen Organen und Geweben verursacht (Waddington, 1942). Diese Definition wurde mit dem Wissen über geprägte Gene erweitert. Demnach beschreibt die Epigenetik vererbbare Veränderungen der Erbinformation, die auf einer reversiblen (biochemischen) Modifikation der Erbinformation beruhen, aber keine konstante Veränderung der Erbinformation (DNA-Sequenz) darstellen (Wu und Morris, 2001). Die moderne, molekulare Epigenetik analysiert somit die Variation und Vererbung von Genexpressionszuständen, die im Wesentlichen durch DNA-Methylierung und die Histonmodifikationen reguliert werden. Durch diese Modifikationen wird die Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren zu deren Bindungsstellen auf der DNA und somit die Aktivierung oder Inaktivierung von Genen gesteuert (Horsthemke, 2005; Murrell *et al.*, 2005).

1.1.1 Epigenetische Mechanismen

Eine epigenetische Modifikation kann direkt auf der DNA-Ebene erfolgen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um die DNA-Methylierung, bei der vor allem Cytosinbasen betroffen sind. Die DNA-Methylierung spielt z.B. eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen Zellen, Bildung des Eu- und Heterochromatins, Regulation der zelltypspezifischen Genexpression und der genomischen Prägung (siehe Kapitel 1.2). Die Methylierung der DNA erfolgt i.d.R. an CpG-(*cytosine*

phosphorylated guanine“) Dinukleotiden. Die Übertragung der Methylgruppe wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert (siehe 1.4). Es wird postuliert, dass sich die DNA-Methylierung zum Schutz gegen Fremd-DNA wie z.B. transposable Elemente entwickelt hat (Yoder *et al.*, 1997). Durch die Methylierung würde die Fremd-DNA nach Integration in das Genom inaktiviert und somit das Genom des Wirtes geschützt. Methylierte DNA ist i.d.R. transkriptionell inaktiv, da die Methylgruppen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren verhindern (Tate und Bird, 1993; Watt und Molloy, 1988). Diese Inaktivierung kann durch die Rekrutierung von Proteinen mit einer Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) vermittelt werden (siehe 1.4; (Boyes und Bird, 1991)).

Epigenetische Modifikationen betreffen zum anderen auch DNA-bindende Proteine wie z.B. Histone. Histone können an bestimmten Aminosäuren modifiziert werden, indem diese acetyliert, methyliert, phosphoryliert oder ubiquitiniert werden. In Abbildung 1.1 sind die möglichen Histonmodifikationen an den Seitenketten der vier nukleosomalen Histone und an Linker-Histon H1 dargestellt. Hierbei vermittelt z.B. die Methylierung an dem Lysinrest 9 des Histons H3 eine Inaktivierung von Allelen, wohingegen eine Methylierung am Lysinrest 4 des Histons H3 mit einer Aktivierung der Genexpression einhergeht. Des Weiteren können auch Di- und Trimethylierungen z.B. am Lysinrest 9 von Histon H3 auftreten, was auch mit einer Inaktivierung des Chromatins assoziiert ist. Eine Acetylierung der Histone hingegen erhöht die transkriptionelle Aktivität des Chromatins (Morgan *et al.*, 2005; Strahl und Allis, 2000). Durch diese Modifikationen der Histonproteine kann die Chromatinarchitektur in Eu- und Heterochromatin verändert werden und somit die Transkription von Genen generell aktiviert (Euchromatin) oder reprimiert (Heterochromatin) werden. Hierbei wird der Zugang zu den entsprechenden Promotorsequenzen gefördert oder verhindert. Auch weist das Eu- und Heterochromatin Unterschiede in der chromosomalen Architektur, Replikation und transkriptionellen Aktivität auf (Li, 2002). Zudem spielen auch nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Genen oder auch von ganzen Chromosomen. Ein Beispiel ist das nicht für ein Protein kodierende RNA-Gen *XIST* (*inactive X specific transcript*) welches die X-Chromosominaktivierung vermittelt (Reik, 2007).

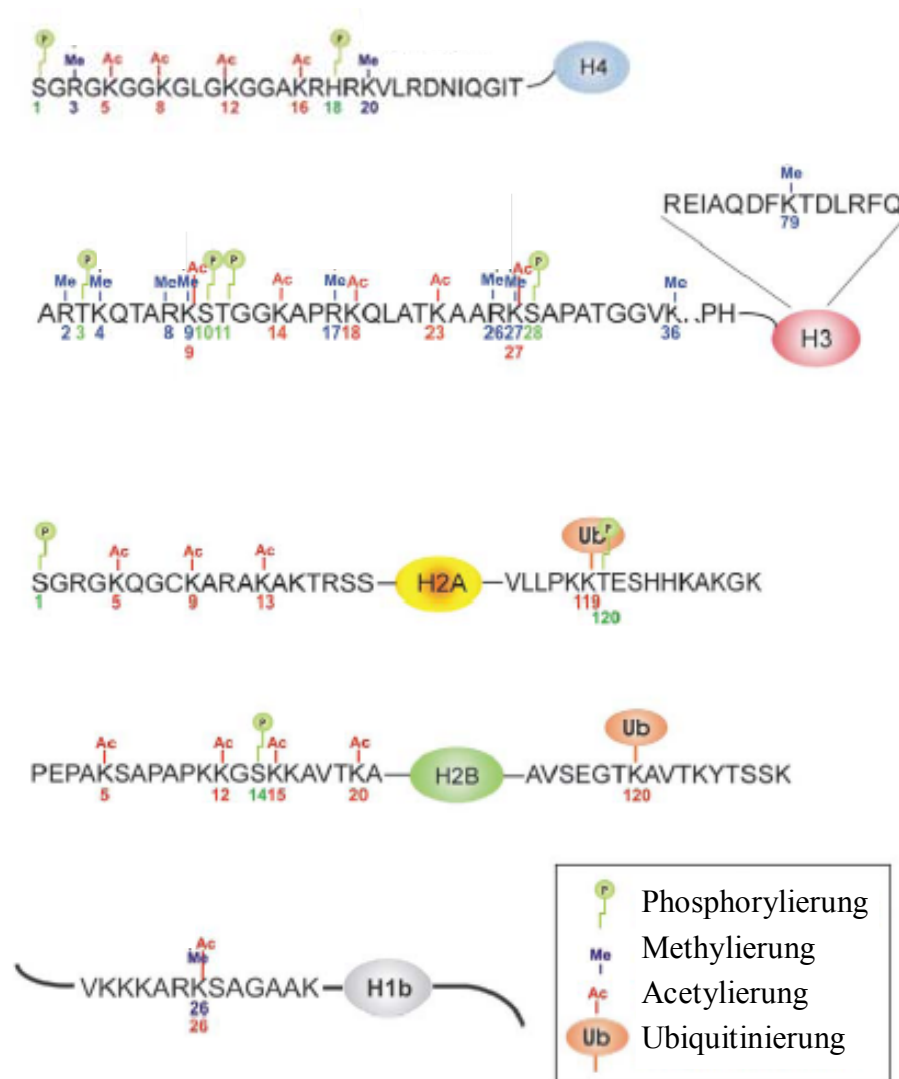


Abbildung 1.1: Modifikationen an den Seitenketten der vier nukleosomalen Histone H4, H3, H2A, H2B und Linker-Histon H1. Verändert nach (Margueron et al., 2005).

1.2 Genomische Prägung

Einen Sonderfall der epigenetischen Regulation stellt die genomische Prägung (auch genomisches Imprinting) dar. Hierbei handelt es sich um eine von der parental Herkunft abhängige, allelspezifische Modifikation, die zu einer monoallelischen oder differentiellen allelischen Expression der betroffenen Gene führt. Experimente mit uniparentalen Mausembryonen, die gyno- und androgenetischen Ursprungs waren, wurden Mitte der 80er Jahre durchgeführt und belegten, dass die parental Autosomen nicht

äquivalent und beide elterlichen Genome für eine normale Ontogenese essentiell sind (McGrath und Solter, 1984). Befruchtete Eizellen der Maus, deren Chromosomen vollständig maternalen Ursprungs sind, bilden keine Plazenta, während sich der Embryo zum Teratom entwickelt (Surani *et al.*, 1984; Surani *et al.*, 1986). Befruchtete Eizellen mit Chromosomen rein paternalen Ursprungs hingegen entwickeln keinen Embryoblasten, wohingegen sich der Trophoblast zur Blasenmole umbildet (McGrath und Solter, 1984). Die funktionellen Unterschiede zwischen dem paternalen und maternalen Genom sind der differentiellen Expression der parentalen Allele von geprägten Genen zuzuschreiben. Vermittelt wird die Prägung durch eine allelspezifische epigenetische Modifikation (siehe Kapitel 1.1.1), welche abhängig vom elterlichen Ursprung vorhanden ist und eines der beiden Allele transkriptionell inaktiviert (Reik und Walter, 2001). In den frühen 90er Jahren wurden die ersten geprägten Gene entdeckt. Auf *Mus musculus* Chromosom 17 (MMU17) wurde das ausschließlich maternal exprimierte Gen *Igf2r* (*insulin-like growth factor 2 receptor*) und auf MMU7 das paternal exprimierte Gen *Igf2* (*insulin-like growth factor 2*) sowie das maternal exprimierte Gen *H19* (*H19 fetal liver mRNA*) identifiziert (Barlow *et al.*, 1991; Bartolomei *et al.*, 1991; DeChiara *et al.*, 1991). Bis heute sind 101 geprägte Gene bei der Maus bekannt (http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass bis zu 200 geprägte Gene im Säugergenom existieren.

1.2.1 Regulation und Eigenschaften geprägter Gene

Geprägte Gene tendieren dazu, in chromosomalen Clustern vorzukommen. Dabei werden sie oft von gemeinsamen cis-regulatorischen Elementen gesteuert, welche als *imprinting center* (IC's) bekannt sind. Diese zeichnen sich durch differentiell methylierte Regionen (DMRs), spezielle Histonmodifikationen, Insulatorbindestellen und nicht kodierende RNA-Gene (ncRNAs) aus (Lewis und Reik, 2006).

Die differentielle Methylierung in DMRs wird durch CpG-Dinukleotide vermittelt. Diese sind im Genom der Maus unterrepräsentiert. Allerdings sind sie häufig in Promotorregionen akkumuliert. Methylierte CpG-Dinukleotide sind i.d.R. über das gesamte Genom verteilt, wohingegen nicht methylierte CpG-Dinukleotide in CpG-Inseln vorkommen. Als CpG-Inseln werden >200 bp große DNA Abschnitte bezeichnet, in denen CpG-Dinukleotide gehäuft auftreten (Gardiner-Garden und Frommer, 1987; Tykocinski und Max, 1984). Circa 1% des Säugergenoms besteht aus solchen CpG-Inseln. Die meisten

CpG-Inseln sind frei von methylierten Cytosinen, wohingegen CpG-Inseln in DMRs von geprägten Genen und X-chromosomalen Genen methyliert oder unmethyliert vorliegen können (Razin und Cedar, 1994).

Ein gut untersuchtes Cluster geprägter Gene befindet sich bei der Maus in dem distalen Bereich des Chromosoms 7 (MMU7dist). Die orthologe Region beim Menschen befindet sich auf HSA11p15.5. Die *H19*-Subdomäne dieses ca. 1 Megabasen (Mb) großen Locus ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Gezeigt ist die Regulation der reziproken Expression von *H19*, einer nicht kodierenden RNA und *Igf2*, welches einen Wachstumsfaktor kodiert. Zwischen den beiden Genen befindet sich ein IC, welches eine DMR enthält. ICs können als Chromatininsulatoren agieren. Hierbei spielt das CTCF Zinkfingerprotein (CCCTC bindender Faktor) am IC eine entscheidende Rolle. CTCF bindet am unmethylierten IC und inhibiert hierdurch die Transkription von *Igf2*, indem die Interaktion des stromabwärts liegenden Enhancers mit dem *Igf2*-Promoter verhindert wird (Bell und Felsenfeld, 2000). Diese Regulation des reziproken Imprintings wird auch als *enhancer competition*-Modell bezeichnet (Tilghman, 1999).

Weitere Regulationsmechanismen des Imprintings von Genen umfassen die erwähnten Histonmodifikationen (siehe Kapitel 1.1.1) wie aber auch die Expression von nicht kodierenden RNAs (ncRNAs). Am *Igf2r*-Lokus auf MMU17 z.B. wird die geprägte Expression der benachbarten Gene *Slc22a2* (*solute carrier family 22, member 2*) und *Slc22a3* (*solute carrier family 22, member 3*) in der Plazenta von Histonmodifikationen und dem nicht kodierenden RNA-Gen von *Air* (*antisense Igf2r RNA*) reguliert (Lewis und Reik, 2006).

Viele geprägte Gene spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und beim Wachstum des Embryos wie aber auch beim postnatalen Verhalten der Mutter und des Neugeborenen. Eine Auswahl geprägter Gene und deren Funktionen sind in Tabelle 1.1 B zusammengefasst. Knockout-Mäuse, denen das paternal exprimierte Gen *Peg3* (*paternally expressed 3*), *Dlk1* (*delta like 1 homolog (Drosophila)*) oder *Igf2* fehlt, weisen eine embryonale Wachstumsverzögerung auf. Dies weist darauf hin, dass paternal exprimierte Gene das Wachstum des Embryos i.d.R. fördern. Auch sind ein verändertes Fürsorgeverhalten und eine geringere Stillbereitschaft bei Mausweibchen ohne *Peg3*-Expression zu beobachten. Einen ähnlichen Phänotyp findet man auch bei einem Funktionsverlust des paternal exprimierten Gens *Mest* (*mesoderm specific transcript*) (Lefebvre *et al.*, 1998). Zudem weisen neugeborene Mäuse ohne *Peg3*-Expression eine geringere Bereitschaft zum Saugen auf. Ein Funktionsverlust einiger maternal exprimierter

Gene wie z.B. *Igf2r* führt hingegen zu embryonalem Überwuchs. Dies zeigt, dass maternal exprimierte Gene das Wachstum des Embryos hemmen. Eine direkte antagonistische Wirkung ist zudem für die Gene *Igf2* und *Igf2r* bekannt. *Igf2* fördert das Plazenta- und Embryowachstum (DeChiara *et al.*, 1991), wohingegen *Igf2r* dessen Wirkung inhibiert (Lau *et al.*, 1994). Einige geprägte Gene wie z.B. *Slc22a3* spielen überdies eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung (Zwart *et al.*, 2001). Ein weiteres wichtiges Merkmal von geprägten Genen ist deren asynchrone Replikation. Auf dieses Phänomen wird in Kapitel 1.5 noch näher eingegangen.

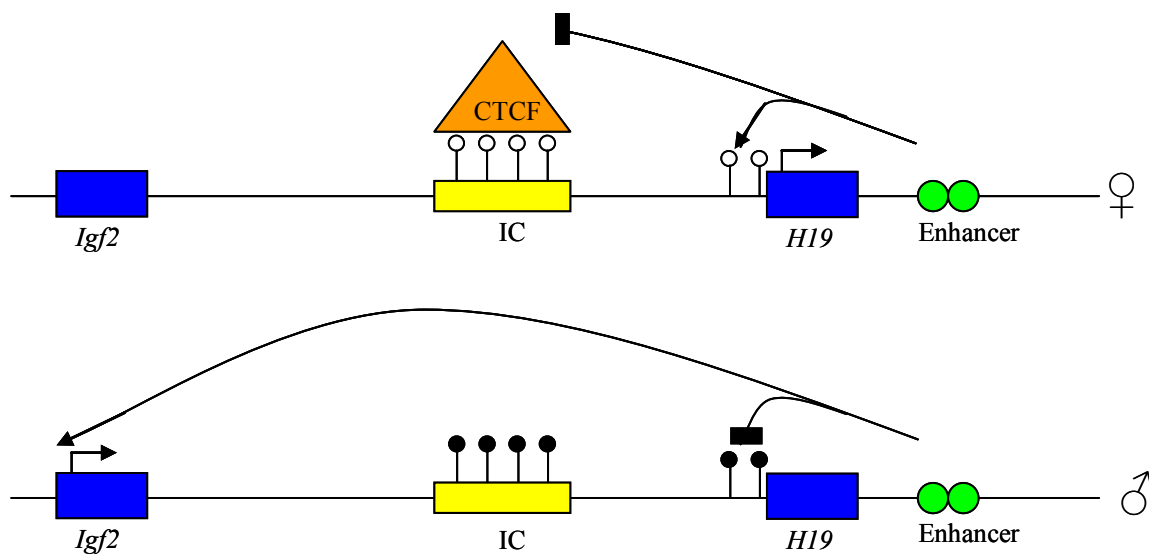


Abbildung 1.2: Regulation der monoallelischen Expression von *H19* und *Igf2* auf MMU7dist. Das *imprinting center* (IC) stromaufwärts von *H19* enthält eine differentiell methylierte Region (DMR) und beinhaltet eine Bindungsstelle für das Insulatorprotein CTCF. Auf dem maternalen Allel ist das IC nicht methyliert und CTCF kann binden. Hierdurch kann der Enhancer nicht mit dem Promoter von *Igf2* interagieren und *Igf2* wird nicht transkribiert. Auf dem paternalen Allel sind das IC wie auch der *H19* Promoter methyliert. Die Methylierung verhindert die Bindung von CTCF am IC und der Enhancer aktiviert die Transkription von *Igf2*, wohingegen die Methylierung des *H19* Promoters die Interaktion mit dem Enhancer inhibiert und *H19* nicht transkribiert wird.

1.2.2 Evolution der Genomischen Prägung

Die am weitesten verbreitete Theorie zur Evolution der genomischen Prägung ist die Genetische-Konflikt-Theorie. Die Genetische-Konflikt-Theorie geht von einer Konkurrenz der elterlichen Genome im Embryo aus, wobei diese um die Ressourcen der Mutter konkurrieren (Moore und Haig, 1991). Das Männchen ist aufgrund der vorherrschenden Polygamie bei Säugern daran interessiert, dass die Ressourcen der Mutter für die eigenen Nachkommen möglichst optimal ausgenutzt werden, wohingegen das Weibchen daran interessiert ist möglichst vielen verschiedenen Nachkommen ausreichend Ressourcen zur Verfügung zu stellen. Diese Interessenskonflikte, bezogen auf die Fitness der Nachkommen, führten zur Evolution neuartiger Genregulationsmechanismen. Hierbei fördert das paternale Genom die Expression von Wachstumsfaktoren, während das maternale Genom diese Faktoren reprimiert. Aus diesem Grund werden Gene für Wachstumsfaktoren wie *Igf2* väterlich exprimiert und antagonistisch wirkende Gene für Wachstumsrepressoren wie *Igf2r* mütterlich exprimiert. Die Genetische-Konflikt-Theorie basiert auf einem direkten Austausch von Nährstoffen zwischen Embryo und Muttertier. Die genomische Prägung würde man daher nur bei Plazentaliern, nicht aber z.B. bei Vögeln oder Fischen erwarten, bei denen eine physikalische Barriere durch die Kalkschale des Eis vorhanden ist bzw. eine Embryonalentwicklung außerhalb des Muttertiers stattfindet. Der Entstehungszeitpunkt des genomischen Imprintings wird evolutionär zwischen den Monotremen und den Marsupialiern angesiedelt. Die Genetische-Konflikt-Theorie bietet somit auch ein Erklärungsmodell dafür, warum die genomische Prägung bisher nur bei Säugern und außerhalb des Tierreichs nur bei bestimmten Pflanzenarten nachgewiesen werden konnte. Auch erklärt sie die antagonistische Wirkung geprägter Genpaare wie z.B. von *Igf2* und *Igf2r*. Die Theorie liefert zudem eine Basis für die in Kapitel 1.2 erwähnten Phänotypen von andro- und gynogenetischen Mausembryonen und den Einfluss von geprägten Genen auf postnatale Effekte wie z.B. die mütterliche Fürsorge gegenüber dem Nachwuchs (siehe Kapitel 1.2.1).

Im Tierreich wurden geprägte Gene bisher nur bei Marsupialiern und plazentalen Säugern beschrieben (Killian *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2005). Beim Huhn weisen die orthologen Bereiche zu den geprägten Genen der Säuger interessanterweise ebenfalls eine geclusterte Organisation und ein asynchrones Replikationsverhalten auf. Die asynchrone Replikation wird daher als ein Ausgangspunkt eines ancestralen Imprintingmechanismus

betrachtet, welcher in Säugern von einem stabileren, DNA-Methylierung involvierenden Mechanismus verdrängt wurde (Dünzinger *et al.*, 2005).

1.2.3 Humane Imprintingkrankheiten

Bei einer Störung der genomischen Prägung kann es beim Menschen zu sogenannten Imprintingkrankheiten kommen. Hierzu zählt unter anderem das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), bei dem die Gene des geprägten Locus auf HSA11p15 involviert sind. Die orthologe Region bei der Maus befindet sich auf MMU7dist. Das BWS ist ein heterogenes Syndrom, das sich durch eine Kombination der Hauptmerkmale Exomphalus, Makroglossie und Gigantismus und der Nebenmerkmale Hypoglykämie, faciale Abnormitäten und einem erhöhten Risiko embryonaler Tumore auszeichnet. In ca. 10 bis 15% der Fälle liegt eine paternale uniparentale Disomie (UPD) von HSA11p15 vor (Henry *et al.*, 1991). Weitere Ursachen sind auf fehlerhafter Methylierung beruhende Epimutationen im *imprinting center 1* in der Nähe des *H19*-Gens bzw. im *imprinting center 2* in der Nähe des *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 overlapping transcript 1 (non-protein coding)*)-Gens die zu einer biallelischen Expression der geprägten Gene führen können sowie Mutationen im Gen *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) (DeBaun *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 1999; Weksberg *et al.*, 1993).

Bei dem Prader-Willi Syndrom (PWS) und dem Angelman Syndrom (AS) handelt es sich um neurogenetische Erkrankungen, die durch eine Fehlregulation der geprägten Gene im Imprintingcluster auf dem humanen Chromosom 15 (HSA15q11-q13) verursacht werden. Das PWS ist durch Muskelhypotonie, Minderwuchs, Adipositas, Hypogonadismus sowie milde bis moderate mentale Retardierung (Holm *et al.*, 1993) gekennzeichnet. Die Mehrheit der Fälle (ca. 70%) basiert auf einer Deletion der Region HSA15q11-13 des paternalen Chromosoms. In der zweitgrößten Gruppe (ca. 29%) ist eine maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 15 zu beobachten. AS-Patienten weisen eine schwere mentale Retardierung, Ataxie, unmotiviert Lachanfalle, schwere sprachliche Beeinträchtigung sowie eine mentale Retardierung auf. In 70% der Fälle liegt eine maternale Deletion der Region 15q11-13 und in bis zu 3% der Fälle eine paternale UPD15 vor (Horsthemke und Buiting, 2006). Beide Syndrome können in seltenen Fällen auch durch mit fehlerhafter Methylierung assoziierten Epimutationen ausgelöst werden.

Weitere Erkrankungen, bei denen eine prädominant parentale Vererbung vermutet wird, sind komplexe Erkrankungen wie Autismus, atypisches Asthma, Psoriasis, Diabetes

Typ 1 und 2, Alzheimer und Schizophrenie (Morison *et al.*, 2005). Eine gestörte Expression einiger geprägter Gene kann auch zu Krebserkrankungen führen (Reik und Walter, 2001).

1.3 Epigenetische Reprogrammierung und genomische Prägung

Die DNA-Methylierungsmuster, welche während der Entwicklung erworben wurden, werden im adulten Organismus in somatischen Zellen stabil weitervererbt. Die Vererbung von somatischen DNA-Methylierungsmustern ist nur durch die Aktivität des Enzyms DNMT1 (*Dnmt1*; *DNA methyltransferase (cytosine-5) 1*) möglich (Goll und Bestor, 2005). In der Keimbahn werden in primordialen Keimzellen (PGCs) die CpG-Inseln von nicht geprägten sowie die DMRs geprägter Gene demethyliert (siehe auch Abb. 1.3 A). Die Entfernung der Methylierungsimprints findet in den PGCs der Maus von Tag 10,5 *post conceptionem* (dpc) bis 12,5 dpc statt (Hajkova *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Dadurch werden geprägte Gene zu diesem Zeitpunkt in PGCs biallelisch exprimiert (Szabo *et al.*, 2002). In der späteren Keimzellentwicklung wird durch *de novo* Methylierung ein neues genomweites Methylierungsmuster und auch das geschlechtsspezifische Imprintingmuster geprägter Gene etabliert. Dabei unterscheiden sich die Methylierungsmuster nicht nur an den geprägten Loci. Genomweit weisen reife Spermien einen höheren Methylierungsgrad auf als Oozyten (Sanford *et al.*, 1987).

Die Präimplantationphase ist durch tiefgreifende zelluläre und molekulare Ereignisse charakterisiert. Dabei verschmelzen zwei haploide Genome. Anschließend muss das neu entstandene embryonale Genom für eine somatische Genexpression aktiviert werden. Dies muss in korrekter Weise stattfinden, so dass Totipotenz und Pluripotenz wiederhergestellt werden. Beendet wird diese Phase durch die Bildung der Blastozyste und der Entstehung der ersten zwei Zelllinien, der inneren Zellmasse, die unter anderem den sich entwickelnden Embryo bildet, und des Trophoektoderms, aus dem sich die Plazenta entwickelt.

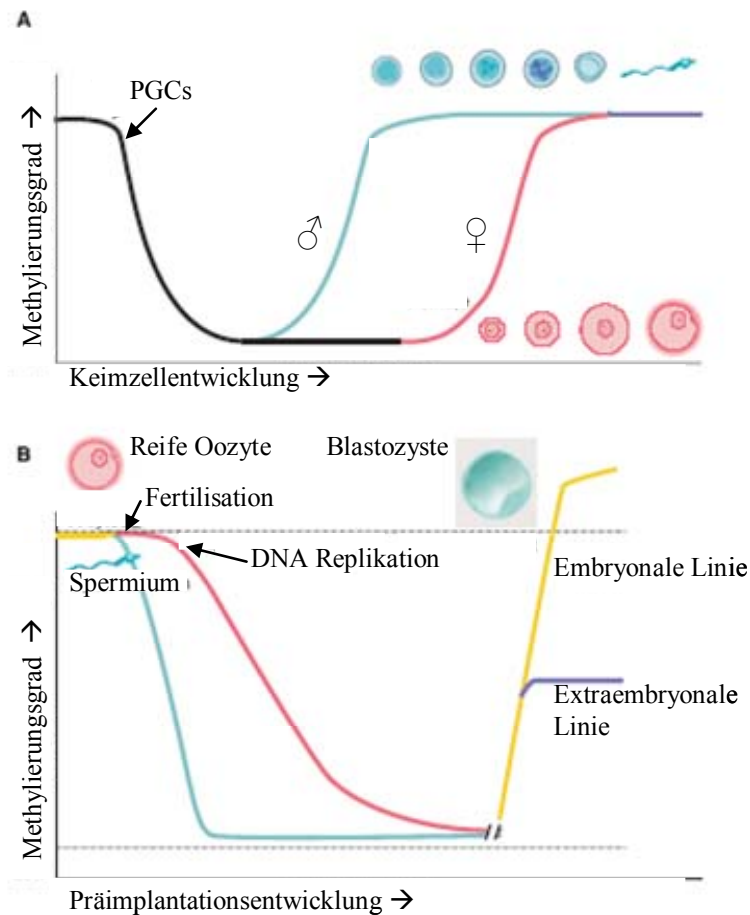


Abbildung 1.3: Methylierungsreprogrammierung in der Maus.

A: Methylierungsreprogrammierung in der Keimbahn. Vorläuferkeimzellen (PGCs) werden in der frühen Mausentwicklung demethyliert (schwarze Linie). Die Remethylierung beginnt in Prospermatogonien (blaue Linie) an Tag 16 dpc in männlichen Keimzellen und nach der Geburt in wachsenden Oozyten (rote Linie). **B:** Die Methylierungsreprogrammierung im Präimplantationsembryo. Das paternale Genom (blaue Linie) wird durch einen aktiven Mechanismus direkt nach der Befruchtung demethyliert. Das maternale Genom (rote Linie) wird durch einen passiven replikationsabhängigen Mechanismus demethyliert. Die Remethylierung der parental Genome findet zum Zeitpunkt der Implantation des Embryos statt. Das Ausmaß der Remethylierung bezogen auf den Methylierungsgrad differiert zwischen den embryonalen und extraembryonalen Zelllinien. Geprägte Gene (gestrichelte Linien) entgehen der genomweiten De- und Remethylierung (verändert nach (Reik *et al.*, 2001)), so dass ihr Methylierungsmuster erhalten bleibt.

Zur Wiederherstellung der Totipotenz embryonaler Zellen müssen die beiden funktionell nicht äquivalenten Keimbahngenome direkt nach der Befruchtung zu Beginn der Präimplantationsentwicklung reprogrammiert werden (Arney *et al.*, 2001; Haaf, 2006; Morgan *et al.*, 2005; Reik *et al.*, 2001). Durch die Fusion des Spermiums mit der Oozyte

wird die Oozyte aktiviert, welche dann das protaminverpackte Spermienchromatin in einen funktionellen paternalen Pronukleus mit einer normalen nukleosomalen Struktur reprogrammiert (Perreault, 1992). Dies geschieht wenige Stunden nach der Befruchtung. Dabei werden viele Sequenzen im paternalen Genom demethyliert (Dean *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2000a; Oswald *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). Dieser Prozess, bei dem es sich um eine aktive Demethylierung handeln muss, findet im paternalen Genom nach dem Austausch von Protaminen mit Histonen noch vor der ersten DNA-Replikation statt. Geprägte Gene werden über einen noch unbekanntem Mechanismus vor diesem genomweiten Reprogrammierungsprozess protektiert und halten die keimbahnspezifischen Methylierungs- und Expressionsmuster während der ganzen Entwicklung aufrecht. Auch der Mechanismus der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms ist bis heute nicht entschlüsselt, wobei sich die Hinweise verdichten, dass bei dem Mechanismus die DNA-Reparatur-Maschinerie involviert ist. Favorisiert werden hierbei *base-excision-* und *mismatch-repair-*Mechanismen (Gehring *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2002). Die aktive Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote ist in der Maus, dem Menschen und den meisten Säugerspezies beschrieben worden. Nicht nur bei der Demethylierung, sondern auch bei der Replikation der DNA unterscheiden sich die parental Genome direkt nach der Befruchtung. Bei der Maus wird die Replikation der DNA des paternalen Pronukleus zuerst initiiert und findet somit etwas früher als die Replikation der maternalen DNA statt (Aoki und Schultz, 1999; Bouniol-Baly *et al.*, 1997; Ferreira und Carmo-Fonseca, 1997). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass nachdem die Vorkernhüllen aufgelöst wurden und die beiden parental Genome verschmolzen sind, sie trotzdem mindestens bis zum Zweizell- bis Vierzellstadium im Zellkern räumlich separiert bleiben (Mayer *et al.*, 2000b; Merico *et al.*, 2007). Kurz nach der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms wird im Zweizellstadium das embryonale Genom aktiviert (Schultz, 1993). Das maternale Genom, welches in der Zygote demselben Zytoplasma ausgesetzt ist, bleibt aber von der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms verschont. Es wird graduell über eine passive, replikationsabhängige Demethylierung während der Präimplantationsentwicklung reprogrammiert. Diese Reprogrammierung ist bis zum Blastozystenstadium der Maus abgeschlossen (Santos *et al.*, 2002) und geht mit einem Ausschluss von Dnmt1o (oozytenspezifische Isoform der DNMT1) aus dem Zellkern von Präimplantationsembryonen der Maus einher (Howell *et al.*, 2001). Auch bei Reprogrammierung des maternalen Genoms entgehen die allelspezifisch methylierten Regionen geprägter Gene der

Demethylierung. Die generelle genomweite Demethylierung in der frühen Embryogenese wird auch mit der epigenetischen Reprogrammierung des inaktiven Spermien- und Oozytenchromatins zur Herstellung von Pluripotenz assoziiert, da hierbei auch die Demethylierung der Promotoren wichtiger Pluripotenzmarker wie z.B. *Pou5f1* (auch *Oct4*; *POU domain, class 5, transcription factor 1*) stattfindet und erst dadurch deren ordnungsgemäße Expression gewährleistet ist.

Die Etablierung der somatischen Methylierungsmuster differiert zwischen den Säugerspezies. In Rinderembryonen ist eine deutliche *de novo* Methylierung bereits im 8-16-Zellstadium zu beobachten, wohingegen in Mausembryonen die Remethylierung erst im Blastozystenstadium bei der Entstehung der ersten beiden Zelllinien beginnt. Diese stadien- und gewebespezifische Neumethylierung wird in der Präimplantationsphase wahrscheinlich durch die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B unter Beteiligung von DNMT3L katalysiert (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002). Beeinträchtigungen dieses hoch koordinierten Reprogrammierungsprozesses tragen womöglich zur hohen Rate von Entwicklungsausfällen bei Säugern bei (Haaf, 2006; Reik *et al.*, 2001). Die epigenetische Reprogrammierung in Präimplantationsembryonen der Maus ist in Abbildung 1.3 B dargestellt.

1.4 Regulation der epigenetischen Reprogrammierung

Die Reprogrammierung des Genoms während der Präimplantationsentwicklung muss von maternal wie auch von embryonal exprimierten Genen reguliert werden. Diese Gene müssen dabei die Regulation der DNA-Demethylierung und der DNA-Remethylierung, die Reprogrammierung des Spermienchromatins in ein funktionales paternales Genom sowie die Wiederherstellung der Pluripotenz kontrollieren. Auch in dieser frühen Phase der Embryonalentwicklung wird die Aktivität der involvierten Gene in deren regulatorischen Regionen über die DNA-Methylierung gesteuert. Relevante Faktoren für die Regulation der epigenetischen Reprogrammierung und der Steuerung der Genaktivität sind unter anderem die DNA-Methyltransferasen.

DNA-Cytosin-5-Methyltransferasen (DNMTs) sind Enzyme, die für die Etablierung und Aufrechterhaltung der genomischen Methylierungsmuster verantwortlich sind (Bestor, 2000). Die Inaktivierung von *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *Dnmt3b* resultiert in einer Hypomethylierung des Genoms und in embryonaler Letalität. Dies zeigt, dass diese Gene für die frühe Säugarentwicklung essentiell sind (Lei *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1992; Okano *et*

al., 1999). Die Inaktivierung von *Dnmt3l* führt zwar zu lebensfähigen Nachkommen, weibliche Nachkommen weisen jedoch eine fehlerhafte Methylierung der DMRs in Oozyten auf und männliche Nachkommen sind aufgrund einer defekten Spermatogenese steril (siehe Tabelle 1.1 A; (Arnaud *et al.*, 2006; Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002)). DNMT1 hat eine hohe Affinität für hemimethylierte DNA, welche transient während der DNA-Replikation entsteht, und ist hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster nach Zellteilungen. DNMT3A und DNMT3B werden Funktionen bei der *de novo* Methylierung zugeschrieben (Aoki *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Interessanterweise kodieren *Dnmt3a* (Chen *et al.*, 2002) wie auch *Dnmt3b* (Okano *et al.*, 1998) multiple Isoformen mit entwicklungs- und gewebespezifischen Expressionsmustern. Im Gegensatz zu den anderen DNA-Methyltransferasen fehlt DNMT3L die Transmethylierungsdomäne. Trotz der fehlenden Methyltransferaseaktivität scheint DNMT3L die *de novo* Methylierung durch eine direkte Interaktion mit den Enzymen DNMT3A und DNMT3B zu vermitteln (Suetake *et al.*, 2004).

Eine weitere Genfamilie, deren Genprodukte direkt mit methylierter DNA interagieren können, sind die 5-methyl-CpG-Bindeproteine (MBDs). Hierzu gehören MECP2, MBD1, MBD2, MBD3 sowie MBD4. Hierbei handelt es sich um eine Familie von Kernproteinen, welche mit ihrer 5-methyl-CpG Bindedomäne spezifisch methylierte DNA Sequenzen binden (Ballestar und Wolffe, 2001). Die Inaktivierung von *Mbd1* führt zu keinen Entwicklungsdefekten während der Embryogenese. In adulten Tieren ist jedoch eine verminderte Neurogenese zu beobachten (Zhao *et al.*, 2003). Auch *Mbd2*-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und fertil, weisen jedoch im weiblichen Geschlecht ein abnormales Verhalten auf (Hendrich *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den anderen MBDs fehlt MBD3 die 5-methyl-CpG-Bindedomäne. Ein Funktionsverlust von *Mbd3* ist embryonal letal (Hendrich *et al.*, 2001). *Mbd4*-Knockout-Mäuse zeigen keine Entwicklungsdefekte, jedoch eine erhöhte Rate an C-T-Transitionsmutationen (Wong *et al.*, 2002). Neben der 5-methyl-CpG-Bindedomäne können MBDs auch eine die Transkription unterdrückende Domäne (TRD) besitzen. MECP2, welches eine TRD besitzt, kann Repressoren und Chromatin-modifizierende Komplexe an methylierte DNA Sequenzen wie z.B. Promotoren rekrutieren und diese stilllegen (Jaenisch und Bird, 2003). Auch kann MECP2 nach Bindung an methylierte Cytosine über einen Histon-Deacetylase-Komplex eine Deacetylierung der N-terminalen Histonsseitenketten vermitteln. Dies führt zu einer dichteren Verpackung der DNA und somit zu einer Inaktivierung der betroffenen Gene (Bird und Wolffe, 1999; Cross *et al.*, 1997; Hendrich und Bird, 1998). Interessanterweise

wurde berichtet, dass MBD2 eine Demethylasefunktion besitzt (Bhattacharya *et al.*, 1999) und somit ein hoffnungsvoller Kandidat für die aktive DNA-Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote war. Dies konnte jedoch durch weitere Studien nicht bestätigt werden (Santos *et al.*, 2002; Wade *et al.*, 1999). Erwähnenswert ist auch, dass MBD4 als eine *mismatch* Glykosylase funktioniert (Christmann *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004) und somit bei der DNA-Reparatur beteiligt ist. Es wird vermutet, dass neben MBD4 auch GADD45A (*growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha*) für die aktive DNA-Demethylierung verantwortlich ist (Barreto *et al.*, 2007).

Der Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung ist bis heute noch nicht entschlüsselt. Möglicherweise wird die aktive Demethylierung nicht replizierender DNA über einen DNA-Reparaturmechanismus reguliert. Hierbei wird der Reparaturmechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER) favorisiert (siehe Kapitel 1.3). Bei der BER handelt es sich um einen hochkonservierten Mechanismus zur Reparatur beschädigter Basen in der DNA (Jost, 1993). Enzyme, die bei der BER unter anderem beteiligt sind, sind Typ 1-DNA Glykosylasen. Sie entfernen modifizierte, z.B. methylierte Basen und hinterlassen dabei eine Apurin/Apyrimidin (AP)-Stelle in der DNA, welche anschließend von der AP-Endonuklease APEX1 (REF1) gespalten wird (Evans *et al.*, 2000). Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA an der AP-Stelle wird anschließend von DNA-Polymerasen und Ligasen repariert. Ein Funktionsverlust von *Apex1*, *Polb*, *Lig1* oder *Lig3* ist immer embryonal letal (siehe Tabelle 1.1 A).

Obwohl die Faktoren der aktiven DNA-Demethylierung noch nicht entschlüsselt sind, ist klar, dass es sich hierbei um maternale zytoplasmatische Faktoren der Zygote handeln muss. Diese Reprogrammierungsmaschinerie in der Zygote ist auch in der Lage, einen somatischen Zellkern, welcher durch Kerntransfer in eine zuvor entkernte Oozyte transferiert wurde, so zu reprogrammieren (Shi *et al.*, 2003; Wilmut *et al.*, 2002), dass wieder der Status der Pluripotenz erreicht wird und ein neuer Organismus entstehen kann. Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz nach der epigenetischen Reprogrammierung spielt der Transkriptionsfaktor POU5F1 (auch OCT4) eine Schlüsselrolle. In befruchteten Eizellen wie auch in frühen Präimplantationsstadien der Maus ist maternale *Pou5f1*-mRNA enthalten. Die embryonale *Pou5f1*-Expression wird ab dem Vier- bis Achtzellstadium initiiert (Palmieri *et al.*, 1994). POU5F1 scheint in allen Blastomeren während der gesamten Präimplantationsentwicklung notwendig zu sein, um den Pluripotenzstatus aufrecht zu erhalten (Nichols *et al.*, 1998).

Tabelle 1.1: Phänotypen von Knockout-Mäusen

A: Auswahl von bei der epigenetischen Reprogrammierung relevanten Genen und die Phänotypen von deren Knockout-Mäusen. **B:** Auswahl geprägter Gene und die Phänotypen von deren Knockout-Mäusen.

A: Gensymbol	Genname		Phänotyp der Knockout-Maus	Referenzen
<i>H3.3</i>	H3 histone, family 3A		keine Knockout-Maus vorhanden	
<i>Pou5f1</i>	POU domain, class 5, transcription factor 1		Embryonen entwickeln sich bis zur Blastozyste; die ICM ist nicht pluripotent	(Nichols <i>et al.</i> , 1998)
<i>Dnmt1</i>	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1		Genomweite Demethylierung; Entwicklung nur bis 8,5 dpc	(Li <i>et al.</i> , 1992; Lei <i>et al.</i> , 1996)
<i>Dnmt3a</i>	DNA methyltransferase 3A		Gestörte Spermatogenese; letal nach 4 Wochen	(Okano <i>et al.</i> , 1999)
<i>Dnmt3b</i>	DNA methyltransferase 3B		milde Neuralleistendefekte; letal zw. 14,5 - 18,5 dpc	(Okano <i>et al.</i> , 1999)
<i>Dnmt3l</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like		fehlende maternale DMR Methylierung in Oozyten; Sterile Männchen aufgrund defekter Spermatogenese	(Bourc'his <i>et al.</i> , 2001; Hata <i>et al.</i> , 2002; Arnaud <i>et al.</i> , 2006)
<i>Mbd1</i>	methyl-CpG binding domain protein 1		keine Entwicklungsdefekte; verminderte Neurogenese in adulten Tieren	(Zhao <i>et al.</i> , 2003)
<i>Mbd2</i>	methyl-CpG binding domain protein 2		lebensfähig und fertil; abnormales Verhalten der Weibchen	(Hendrich <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mbd3</i>	methyl-CpG binding domain protein 3		letal nach 6,5 dpc	(Hendrich <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mbd4</i>	methyl-CpG binding domain protein 4		keine Entwicklungsdefekte; erhöhte Rate von C-T-Transitions-Mutationen	(Wong <i>et al.</i> , 2002)
<i>Apex1</i>	apurinic/aprimidinic endonuclease 1		letal nach 6,5 dpc	(Xanthoudakis <i>et al.</i> , 1996)
<i>Polb</i>	polymerase (DNA directed), beta		embryonal letal	(Gu <i>et al.</i> , 1994)
<i>Lig1</i>	ligase I, DNA, ATP-dependent		nicht essentiell für Zellfunktionen; aber fetal letal durch defekte Leber-Erythropoese	(Bentley <i>et al.</i> , 1996)
<i>Lig3</i>	ligase III, DNA, ATP-dependent		frühe embryonale Letalität	(Puebla-Osorio <i>et al.</i> , 2006)

B: Gensymbol	Genname	exprimiertes Allel	Phänotyp der Knockout-Maus	Referenzen
<i>Mest</i>	mesoderm specific transcript	paternal	Wachstumsverzögerung, mütterliches Verhalten	(Lefebvre <i>et al.</i> , 1998)
<i>Peg3</i>	paternally expressed 3	paternal	Wachstumsverzögerung, mütterliches Verhalten	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>Snrpn</i>	small nuclear ribonucleoprotein N	paternal	kein Effekt	(Yang <i>et al.</i> , 1998)
<i>H19</i>	H19 fetal liver mRNA	maternal	kein Effekt	(Jones <i>et al.</i> , 1998)
<i>Igf2</i>	insulin-like growth factor 2	paternal	Wachstumsverzögerung	(DeChiara <i>et al.</i> , 1991)
<i>Cdkn1c</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	maternal	reduzierte Überlebensrate,	(Yan <i>et al.</i> , 1997)
<i>Dlk1</i>	delta like 1 homolog (Drosophila)	paternal	Wachstumsverzögerung, Adipositas	(Moon <i>et al.</i> , 2002)
<i>Gtl2</i>	gene trap locus 2	maternal	Wachstumsverzögerung	(Schuster-Gossler <i>et al.</i> , 1996)
<i>Slc22a3</i>	solute carrier family 22, member3	maternal	lebensfähig und fertil, aber gestörte Aufnahme von Neurotransmittern	(Zwart <i>et al.</i> , 2001)
<i>Igf2r</i>	insulin-like growth factor 2 receptor	maternal	Überwuchs, letal	(Wang <i>et al.</i> , 1994)

1.5 Asynchrone Replikation und genomische Prägung

Die DNA wird während der S-Phase des Zellzyklus repliziert. Nicht alle Sequenzen in der DNA werden zum gleichen Zeitpunkt während der S-Phase repliziert (Hand, 1975). Das Säuger genom lässt sich in ein bis zwei Megabasen große Replikationseinheiten einteilen (Drouin *et al.*, 1990; Selig *et al.*, 1992). Genreiches und transkriptionell aktives Euchromatin enthält u.a. *housekeeping* Gene und ist nach Giemsa-Färbung in schwach gefärbten und früh replizierenden R-Banden zu finden, wohingegen die dunkel gefärbten und spät replizierenden G-Banden mit genarmem, transkriptionell eher inaktivem Heterochromatin korrelieren und Gewebe-spezifisch reprimierte Gene enthalten (Cremer und Cremer, 2001). Die Replikation startet von Ursprungssequenzen (ORIs – *origins of replication*) aus (Kitsberg *et al.*, 1993b). Es wird vermutet, dass diese ORIs reich an CpG-Dinukleotiden sind (Delgado *et al.*, 1998). Nach dem Start der Replikation kann diese von den ORIs bidirektional erfolgen. Hierbei korreliert eine frühe Replikation generell mit aktiven Genen, während eine späte Replikation auf heterochromatische Bereiche mit inaktiven Genen hindeutet (Goldman *et al.*, 1984; Holmquist, 1987; Kitsberg *et al.*, 1993a). Ein Beispiel hierfür ist die X-Chromosom-Inaktivierung im weiblichen Säuger genom. Das transkriptionell inaktive X-Chromosom wird im Vergleich zum transkriptionell aktiven X-Chromosom asynchron repliziert, wobei das inaktive X-Chromosom spät und das aktive X-Chromosom früh repliziert wird (Brown, 1966; Morishima *et al.*, 1962; Taylor, 1960).

Die DNA-Replikation ist räumlich wie auch zeitlich hoch organisiert und findet im Zellkern an Chromatinaggregaten, welche als Replikationsfozi bezeichnet werden, statt (Chakalova *et al.*, 2005). Jeder Replikationsfokus besteht aus einem Cluster mehrerer Replikons, die mit Replikationsfaktoren ausgestattet sind und beinhaltet circa 1 Mb DNA (Cremer und Cremer, 2001; Leonhardt *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1998).

Die Replikationsmuster distinkter Chromosomenregionen sind dynamisch und differieren deutlich zwischen verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien. Dies ist am Beispiel der β -Globingene gut zu verdeutlichen. Die β -Globingene befinden sich auf MMU7 in einem Cluster olfaktorischer Rezeptor (OR-)-Gene. Die gesamte Region wird in fast allen Zelltypen und Entwicklungsstadien spät repliziert, wohingegen der Locus in Erythroblasten früh repliziert wird, da hier auch die Expression der β -Globingene stattfindet. In dieser 1 Mb großen, früh replizierenden Replikationseinheit befinden sich auch einige der olfaktorischen Rezeptorgene (Cimbora *et al.*, 2000; Epner *et al.*, 1988).

Im Gegensatz zur synchronen Replikation ist die asynchrone Replikation eine Eigenschaft monoallelisch exprimierter Gene. Dazu gehören geprägte Gene aber auch Gene, bei denen die monoallelische Expression unabhängig von der elterlichen Herkunft der Allele stattfindet. Manche nicht geprägten Regionen wie z.B. X-chromosomale Gene in weiblichen Zellen (Takagi, 1974), B- und T-Zell-Rezeptor Loci (Mostoslavsky *et al.*, 2001) und OR-Gene (Chess *et al.*, 1994) werden in unterschiedlichen Zelltypen asynchron repliziert. Dabei ist die Entscheidung, welches der parental Allele eines nicht geprägten Gens inaktiviert wird, rein zufällig und wird postzygotisch während der Präimplantationsphase getroffen. Geprägte Gene liegen im Genom gewöhnlich in distinkten chromosomalen Domänen vor, und weisen eine asynchrone Replikation der beiden parental Kopien während der S-Phase auf. Die verschiedenen geprägten Gene werden jedoch in unterschiedlichen Zeitfenstern während der S-Phase repliziert. Wie bereits erwähnt, wird bei der X-Inaktivierung immer das inaktivierte X-Chromosom spät repliziert (Heard *et al.*, 1997). Bei den geprägten Genen wird jedoch von den beiden Allelen i.d.R. immer das paternale Allel früher repliziert (Kagotani *et al.*, 2002; Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1999). Dies geschieht unabhängig davon, ob das Allel paternal oder maternal geprägt vorliegt. Evolutionär betrachtet handelt es sich bei der asynchronen Replikation womöglich um einen strukturellen Imprint, über den es möglich ist, die paternale und maternale Identität zu unterscheiden (Kitsberg *et al.*, 1993a). Die asynchrone Replikation wird vor der Meiose gelöscht, um anschließend die parental Keimbahn-spezifischen Replikationsmuster in den Gameten neu zu setzen. Es wird angenommen, dass die elternspezifische asynchrone Replikation geprägter Gene bereits in der Zygote und frühen Embryonen präsent ist und fortan während der Ontogenese aufrecht erhalten wird, wohingegen nicht geprägte chromosomale Regionen direkt nach der ersten S-Phase synchron repliziert werden (Simon *et al.*, 1999). Der paternale Vorkern der Maus beginnt und beendet die S-Phase vor dem maternalen Vorkern (Bouniol-Baly *et al.*, 1997), wohingegen der umgekehrte Fall oder aber auch eine perfekt synchrone Replikation der parental Vorkerne in anderen Säugerspezies beobachtet wurde (Laurincik *et al.*, 1995; Naish *et al.*, 1987). Die elternspezifische asynchrone Replikation erscheint als eine funktionelle Komponente der genomischen Prägung. Allerdings handelt es sich dabei nicht um eine Grundvoraussetzung und auch nicht um eine Konsequenz der epigenetischen Modifikation, welche die elternspezifische Genmethylierung und Expression aufrechterhält (Cerrato *et al.*, 2003). Wie am *Igf2/H19*-Imprintingcluster der Maus gezeigt werden konnte, wird hier die geprägte Genexpression unabhängig von der asynchronen

Replikation durch die DNA-Methylierung bestimmt (Cerrato *et al.*, 2003; Gribnau *et al.*, 2003), so dass bisher keine klare funktionelle Verbindung zwischen der asynchronen Replikation und der genomischen Prägung beschrieben werden konnte. Es konnte jedoch vor kurzem gezeigt werden, dass CTCF nicht nur die Expression sondern auch das Replikationsmuster am Imprintingcluster auf MMU7dist reguliert (Bergstrom *et al.*, 2007).

Um die Replikationsmuster individueller Allele nicht synchron wachsender Zellen und geringer Zellpopulationen, wie z.B. die Blastomeren von Präimplantationsembryonen, zu analysieren; ist die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) die Methode der Wahl. Die FISH kann in Form von sogenannten Interphase-FISH-*Assays* zur Analyse von Interphasezellkernen in der Präimplantationsphase verwendet werden. Sie wird dabei zumeist in Kombination mit klassischen BrdU-Inkorporationsmethoden eingesetzt (Kitsberg *et al.*, 1993a; Selig *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1999). Zellkerne, in denen die zu untersuchende chromosomale Region auf beiden Allelen noch nicht repliziert wurde, liefern zwei einzelne fluoreszierende Hybridisierungssignale, wohingegen replizierte Regionen zwei Doppelsignale liefern (siehe Abb. 3.1 B und E). Ein Hybridisierungsmuster mit einem Einzelsignal und einem Doppelsignal korreliert mit Zellkernen, in denen die entsprechende Chromosomenregion asynchron repliziert wird (siehe Abb. 3.1 D). Auf den parental Chromosomen synchron replizierende Genorte weisen einen Anteil von ca. 10% asynchronen Hybridisierungsmuster auf (Selig *et al.*, 1992). Geprägte Regionen hingegen zeigen ein asynchrones Replikationsmuster von 20 – 40% (Gunaratne *et al.*, 1995; Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994; LaSalle und Lalande, 1995; Simon *et al.*, 1999).

1.6 Zielsetzung

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothese zu testen, dass die asynchrone Replikation der beiden elterlichen Genome kurz nach der Befruchtung kein spezifisches Kennzeichen geprägter Gene, sondern ein Kennzeichen der genomweiten epigenetischen Reprogrammierung ist und es sich hierbei um ein generelles genomweites Phänomen handelt, bei dem auch nicht geprägte Genombereiche involviert sind. Um diese Hypothese zu testen und um ein besseres Verständnis der Genomreprogrammierung nach der Befruchtung zu bekommen, sollte eine systematische Replikationsanalyse der asynchronen Replikation durchgeführt werden. Hierzu sollten repräsentative geprägte wie auch nicht geprägte chromosomale Regionen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf Interphasekernen von Präimplantationsembryonen analysiert werden. Zur Kontrolle der asynchronen Replikation sollten die untersuchten Regionen auch in einem Gewebe von Postimplantationsembryonen analysiert werden.

In einem zweiten Projekt sollte zum besseren Verständnis der Genomreprogrammierung während der Präimplantationsentwicklung die Expression von Schlüsselgenen (siehe Kapitel 1.4) in frühen Mausembryonen untersucht werden. Im Besonderen sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Expressionsmuster der zu untersuchenden Gene zwischen individuellen Blastomeren einzelner Morula-Embryonen differieren. Für diese Fragestellung sollte in Kooperation mit der Firma Advalytix AG (München) ein Multiplex-RT-PCR-Assay zur verlässlichen Expressionsanalyse von Einzelzellen etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Polymerase-Kettenreaktion, Gelelektrophorese, DNA-Sequenzierung, Klonierung, enzymatischer Verdau, Fällung von Nucleinsäuren sowie das Herstellen von Standardlösungen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt und werden methodisch nicht im Detail beschrieben.

2.2 Mäusezucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Untersuchungen am Mausmodell Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor ME, USA) verwendet. Die Zucht der Mäuse erfolgte in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter Koordination von Dr. Kurt Reifenberg. Sechs bis acht Wochen alte C57BL6/J-Weibchen wurden durch intraperitoneale Injektion von 7,5 IE eCG (Intervet, Unterschleissheim, Deutschland) und 44-48 h später durch Injektion von 7,5 IE hCG (Intervet) superovuliert. Superovulierte Mausweibchen wurden mit C57BL6/J-Männchen verpaart. Die Befruchtung fand 13 h (\pm 2 h) nach hCG Injektion statt. Der Tag nach der Empfängnis wurde als 0,5 *days post conceptionem* (dpc) definiert.

2.3 Embryopräparation

Einzell-, Zweizell-, Vierzell-, Achtzell- und Morula-Embryonen (16- bis 32-Zellen) wurden aus dem Ovidukt von superovulierten Mausweibchen jeweils 10-12, 33, 41, 53 und 60 h nach der Befruchtung mit einer 15 mm langen Hamilton-Mikrokanüle (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) herausgespült (Nagy et al., 2002). Die Embryonen wurden gründlich in M2-Medium (Sigma-Aldrich, Deutschland) gewaschen, um somatische Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Nur Embryonen „hoher Qualität“ (nach morphologischen Kriterien) dienten weiteren Analysen. Embryonen mit verzögerter Entwicklung oder Zeichen von Fragmentierung wurden verworfen. Für FISH-Experimente,

erfolgte ein Transfer der Embryonen in einen Tropfen mit 0,01 N HCl, 0,1% Tween 20 in H₂O auf einen POLY-PREP Objektträger (Sigma-Aldrich, Deutschland), um dort lysiert und fixiert zu werden (Simon *et al.*, 1999). Das Waschen der Objektträger erfolgte mit frischem PBS (*phosphate buffered saline*) für 3 min und die Dehydrierung in einer Ethanolreihe (70%, 85% und 100% EtOH) für jeweils 1 min. Nach Lufttrocknung wurden die Objektträger zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Für Multiplex-RT-PCR-Experimente wurden die entsprechenden Präimplantationsembryonen in einem Tropfen PBS ohne Magnesium und Kalzium gewaschen und in einem Volumen von circa 0,3 µl PBS auf einen AmpliGrid AG480F Glasobjektträger (Advalytix, München, Deutschland) transferiert.

2.3.1 BrdU-Einbau zur Bestimmung zellulärer Proliferation

Manche FISH-Experimente (siehe Kapitel 2.5) wurden mit einer 5-Bromodeoxyuridin (BrdU)-Markierung kombiniert. Damit ist es möglich, replizierende Zellen zu detektieren, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, da sie das Thymidinanalogon BrdU bei der DNA-Synthese inkorporieren. Zur Markierung wurden Präimplantationsembryonen vor der Fixierung auf einem POLY-PREP Objektträger (siehe Kapitel 2.3) bei 37°C für 1 h in M16-Medium (Sigma-Aldrich, Deutschland) mit 3×10^{-5} M BrdU inkubiert. Im Anschluss an die FISH wurden die Objektträger in PBS gewaschen, mit 1% BSA unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert und für 30 min bei 37°C mit einem anti-BrdU-Antikörper (Boehringer Mannheim), welcher 1/50 in 1% BSA verdünnt wurde, inkubiert. Nach dem Auswaschen wurden die Objektträger mit Cy3-konjugiertem Schaaf-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

2.3.2 Blastomerenpräparation

Zur Isolierung individueller Blastomere wurden Morula-Embryonen in PBS ohne Magnesium und Kalzium, welches 1% Polyvinylpyrrolidon (PVP; Sigma-Aldrich, Deutschland) enthält, gewaschen und anschließend in saurer *Tyrode's solution* (pH 2,3; Sigma-Aldrich, Deutschland) für 10 sec bei 37°C inkubiert. Nach beginnender Auflösung der Zona pellucida, wurden die Embryonen in einen frischen Tropfen PBS/PVP überführt um die restliche Zona pellucida durch behutsames Auf- und Abpipettieren mit einer Glasmikropipette (Durchmesser: 125 – 134 µm; BioMedical Instruments, Zöllnitz,

Deutschland) zu entfernen. Nach Entfernung der Zona pellucida erfolgte ein erneuter Waschschrift der Embryonen mit PBS/PVP und anschließend eine Inkubation für 5 min bei 37°C in einem neuen Tropfen PBS/PVP. Im nächsten Schritt wurden die Blastomeren durch Auf- und Abpipettieren mit einer flammenpolierten Glasmikropipette disaggregiert. Einzelne Blastomere wurden in einem 15 µl Tropfen PBS-Medium bei 37°C gesammelt (Bielanska et al., 2003) und in einem Volumen von circa 0,3 µl PBS auf einen AmpliGrid AG480F Glasobjektträger transferiert.

2.4 Kultivierung und Präparation von Mausembryofibroblasten (MEFs)

Mausembryofibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts* (MEFs)) wurden von 12,5 dpc alten Mausembryonen präpariert. Nach der Entfernung von Kopf, Extremitäten und Organen mit sterilem Präparierbesteck wurden die Embryonen mit dem Skalpell mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml Trypsin/EDTA (T/E) in PBS, 5 ml sterilen Glasperlen und einem Rührfisch transferiert. Anschließend wurden die zerkleinerten Embryonen bei 37°C für 30 min unter ständigem Rühren inkubiert. Es wurden in zwei weiteren Schritten jeweils weitere 10 ml T/E-Lösung hinzugegeben und erneut bei 37°C für 30 min unter ständigem Rühren inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit DMEM-Zellkulturmedium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) plus 10% fetalem Kälberserum (FKS) wurden die MEFs abzentrifugiert (5 min, 200 g, RT) und das Pellet resuspendiert. Abschließend wurden die MEFs in DMEM-Vollmedium (10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ bei wassergesättigter Atmosphäre im Zellkulturinkubator (Binder, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert (siehe Kapitel 2.4.1).

Für anschließende FISH-Experimente wurden die geernteten MEFs in hypotonischer Lösung (50 mM KCl) für 10 min bei 37°C suspendiert und mit eiskalter Methanol-Essigsäure-Lösung im Mischungsverhältnis 3:1 auf Glasobjektträgern fixiert. Zur Gewinnung von Metaphasen aus MEFs wurde kurz vor dem Ernten der entsprechenden Zellkultur zur Arretierung der Zellen in der Metaphase das Spindelgift Colcemid (0,1 µg/ml) hinzugegeben.

2.4.1 Subkultivierung von Mausembryofibroblasten (MEFs)

Nach Erreichen von 70 bis 80%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden dazu mit DPBS (Cambrex, East Rutherford NJ, USA) gewaschen, mit Trypsin/EDTA (GIBCO, Carlsbad CA, USA) von den Zellkulturflaschenböden abgelöst, im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in frischem DMEM-Vollmedium verdünnt und wieder ausplattiert.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Einfrieren wurde das Zellkulturmedium komplett abgenommen. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml PBS gewaschen und mit entsprechenden Mengen Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschenböden abgelöst. Nach fünfminütiger Zentrifugation (150 g, RT) wurde das Zellpellet in 1 ml *Cell Culture Freezing Medium* (GIBCO, Carlsbad CA, USA) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Im nächsten Schritt wurden die Kryoröhrchen in einen mit Isopropanol gefüllten passiven Kühlbehälter (*NalgeneTM Cryo 1°C Freezing-Container*) bei -80°C langsam eingefroren und nach ein bis zwei Tagen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Kryoröhrchen 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und in 5-facher Menge DMEM-Vollmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 150 g, RT) zur Entfernung von DMSO-Resten wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausplattiert.

2.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist eine Technik zur direkten Visualisierung von DNA-Sequenzen auf morphologisch konservierten, zytologischen Proben wie Metaphase-Chromosomen und Interphase-Zellkernen. Direkte FISH nutzt fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden. Die DNA-Sonde wie auch die zu untersuchende zytologische Probe müssen vorher denaturiert werden. Bei der Hybridisierungsreaktion binden Einzelstrangsequenzen der DNA-Sonde an komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenzen der zytologischen Probe.

2.5.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von großen DNA-Sonden (bis 250 kb) wie z. *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-DNA wurde mit dem PhasePrep™ BAC DNA Kit (Sigma-Aldrich, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. *E. coli* Kulturen (20 bis 40 ml) wurden durch Zentrifugation geerntet und mit einer modifizierten alkalischen Lyse mit SDS aufgeschlossen. Nach Präzipitation der Nukleinsäuren wurde restliche RNA mit RNase verdaut. Endotoxine und andere Unreinheiten wurden mit einer temperaturvermittelten Extraktion und Phasenseparation entfernt.

2.5.2 Sondenmarkierung mittels Nick-Translation

Zur nichtradioaktiven Markierung der DNA-Sonden wurden die in den BAC-Klonen enthaltenen chromosomalen Regionen nach dem Prinzip der Nick-Translation markiert. Bei der Nick-Translation werden durch den Einsatz von DNaseI in doppelsträngiger DNA Einzelstrangbrüche erzeugt, die durch die 5'-Exonuklease-Aktivität des Kornberg-Fragments der DNA-Polymerase I erweitert werden und anschließend durch die Polymeraseaktivität des Enzyms wieder mit Mononukleotiden aufgefüllt werden. Zur direkten Fluoreszenzmarkierung der entsprechenden DNA wurde Tetramethylrhodamin-5-dUTP oder Fluorescein-12-dUTP (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Da durch die DNaseI-Aktivität auch Doppelstrangbrüche entstehen, können Fragmentgemische mit einer durchschnittlichen Länge von 200 bis 500 bp erreicht werden. In den Experimenten wurde eine Inkubationszeit von 1 h bei 15°C mit einer Endkonzentration von 0,01 U DNase I in einem Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet. Es wurden für jede Markierungsreaktion 2 µg DNA verwendet. Der Reaktionsansatz einer Nick-Translationsreaktion ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Reaktionsansatz zur Nick-Translation

Reagenzien	Volumen
H ₂ O bidest.	29,5 - x µl
2 µg DNA	x µl
10x Nick-Translationsmischung	5 µl
dNTP-Mischung (10 mM je dNTP)	5 µl
0,1 M β-Mercaptoethanol	5 µl
1mM Tetramethylrhodamin-5-dUTP oder 1mM Fluorescein-12-dUTP	1 µl
DNaseI (1/3000 in H ₂ O verdünnt)	3 µl
DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase)	1,5 µl
	Σ = 50 µl

Die Reaktion wurde mit 50 µl Stopplösung (0,1% Bromphenol-Blau, 0,5% Dextran-Blau, 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)) beendet. Nach Aufreinigung der markierten Sonden über eine Sephadex G50 Säule, zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide, wurden diese mit 20 µg COT-1 DNA der Maus (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 50 µg DNA aus Heringsperma, 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen 100%igem Ethanol bei -80°C für 30 min präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol und Trocknung der markierten Sonden-DNA wurde diese in einer Hybridisierungsmischung (2x SSC (0,3 M NaCl/ 0,03 M Natriumcitrat (pH 7,0)), 30% Dextransulfat und 50% deionisiertes Formamid) resuspendiert.

2.5.3 Hybridisierung der DNA-Sonden auf Interphasekerne und Metaphasen

Präparate von Präimplantationsembryonen (siehe Kapitel 2.3) oder MEFs (siehe Kapitel 2.4) wurden mit 70% deionisiertem Formamid/30% 2x SSC (0,3 M NaCl/ 0,03 M Natriumcitrat (pH 7,0)) bei 73°C für 3 min denaturiert. Anschließend wurden die in Hybridisierungsmischung (4x SSC/20% Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Deutschland) gelösten Sonden bei 80°C für 5 bis 8 min denaturiert. Zur Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungsreaktionen repetitiver Sonden-DNA-Sequenzen wurden diese, mit Hilfe der zugegebenen COT-1 DNA der Maus, in dem anschließenden Prähybridisierungsschritt für 30 min bei 37°C hybridisiert. Dadurch standen nur DNA-Einzelstränge von *single copy*-Sequenzen für die anschließende Hybridisierungsreaktion auf der Proben-DNA zur

Verfügung. Die denaturierte und prähybridisierte Sonden-DNA wurde auf die Präparate aufgebracht und ÜN bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene DNA-Sonden von den Objektträgern mit 0,4x SSC-Lösung (60 mM NaCl/ 6 mM Natriumcitrat (pH 7,0)) bei 68°C für 2 min ausgewaschen. Nach einem erneuten Waschschrift mit 2x SSC-Lösung für 1 min bei Raumtemperatur und wurden die Proben in einer Ethanolreihe dehydriert. Abschließend wurden die Interphasekerne bzw. Metaphasechromosomen mit DAPI in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) im Mischungsverhältnis 1:1000 eingedeckelt, um ein Nachlassen der Fluoreszenzstrahlung zu verringern und die DNA der Chromosomen bzw. Zellkerne zu färben. Zur Kohybridisierung von zwei FISH-Proben wurden Standardprotokolle verwendet (Haaf, 2000)

2.5.4 Dokumentation

Bilder wurden mit einem Leica Epifluoreszenzmikroskop, welches mit einer Peltier gekühlten *charge-coupled device* Kamera (Leica, DC 350F) ausgestattet war, aufgenommen. Das Epifluoreszenzmikroskop wurde durch einen PC (*Personal Computer*) gesteuert. Die Bildverarbeitungssoftware Leica CW 4000 FISH wurde verwendet, um Graustufenbilder aufzunehmen und mit Farbbildern zu überlagern.

2.5.5 χ^2 -Unabhängigkeitstest

Der χ^2 -Unabhängigkeitstest mit vier Feldern wurde durchgeführt, um die Prozentwerte asynchron replizierender Zellkerne (für eine bestimmte Probe) zwischen differierenden Präimplantationsstadien zu vergleichen (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Ein *P*-Wert unter 5% wurde als signifikant definiert.

2.6 Multiplex Reverse Transkription (RT) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf AmpliGrid Chips

Um die Expression der Kandidatengene zu analysieren, musste die RNA in cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkription). Dazu wurden entweder ganze Embryonen (siehe Kapitel 2.3) oder individuelle Blastomere (siehe Kapitel 2.3.2) auf einen AmpliGrid AG480F Glasobjektträger transferiert. Dies ist ein Glasobjektträger mit einer Oberflächenstruktur zur spezifischen Positionierung eines einzelnen Mikroliters auf eine von 48 diskreten Reaktionsstellen (siehe Abb. 3.3). Die reverse Transkription wurde mit

einer RT-Primermixtur (siehe Tabelle 2.8) mit einer Endkonzentration von 0,3 μM pro Primer durchgeführt. Der Reaktionspuffer sowie die Polymerasen wurden dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entnommen. Die Q-Lösung wurde in 1-facher Konzentration verwendet. Eine Übersicht des Reaktionsansatzes und die Volumina der Reagenzien in einem Mikroliter gibt Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2: Reaktionsansatz für die Multiplex-RT-PCR

Reagenzien	Volumen/ μl	Mastermix
H ₂ O bidest.	0,444 μl	24,42 μl
5x Qiagen RT-Puffer	0,2 μl	11 μl
dNTPs (jeweils 10mM)	0,04 μl	2,2 μl
RT-Primermixtur	0,051 μl	2,805 μl
Enzymmix	0,04 μl	2,2 μl
Rnase inhibitor (40 U/ μl)	0,025 μl	1,375 μl
Q-Lösung	0,2 μl	11 μl
	$\Sigma = 1 \mu\text{l}$	$\Sigma = 55 \mu\text{l}$

Die reverse Transkription wurde in einem 1 μl Volumen auf dem AmpliGrid bei 60°C für 30 min auf einem vorgeheizten AmpliSpeed Slide Cycler (Advalytix, München, Deutschland) durchgeführt. Bei den anschließenden PCR-Reaktionen dienten $\frac{1}{4}$ des RT-Produktes (1 μl einer 1:4 Verdünnung der RT-Reaktion mit H₂O bidest.) als Matrize. Die Matrizen-cDNA wurde auf zwei verschiedenen Reaktionsstellen eines zweiten AmpliGrids komplett evaporiert. Die beiden PCR-Reaktionen wurden mit dem Qiagen Multiplex PCR Kit und PCR-Primermixtur 1 bzw. 2 (Tabelle 2.8) durchgeführt. Ein Mastermix mit allen Puffersubstanzen, *Taq*-Polymerase und entweder PCR-Primermix 1 oder 2 mit einer finalen Primerkonzentration von jeweils 0,3 μM wurde entsprechend der Herstellerangaben präpariert. Der typische Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Reaktionsansatz für die PCR-Reaktionen

Reagenzien	Volumen/ μl	Mastermix
H ₂ O bidest.	0,386 μl	21,23 μl
2x Qiagen Multiplex PCR Mix	0,5 μl	27,5 μl
PCR-Primermischung 1 oder 2	0,054 μl	2,97 μl
Q-Lösung	0,06 μl	3,3 μl
	$\Sigma = 1 \mu\text{l}$	$\Sigma = 55 \mu\text{l}$

Die Q-Lösung wurde in 0,3-facher Konzentration eingesetzt. Jeweils 1 μl von Mastermix 1 bzw. 2 wurde auf die zwei unterschiedlichen Reaktionsstellen mit der Matrizen-cDNA appliziert und mit 5 μl *Sealing Solution* (Advalytix, München Deutschland) überschichtet. Die PCR wurde auf einem Plattencycler mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 min, 40 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 60°C für 60 sec und 72°C für 60 sec und einem finalen zehninütigen Extensionsschritt bei 72°C durchgeführt.

Zur Analyse der RT-PCR-Produkte wurde eine Standard 8%ige Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) verwendet. Die Minigel-Elektrophorese (10 x 8 x 0,1 cm) wurde bei 120 V für 45 min durchgeführt. Die Gelbanden wurden für 5 min mit 1%iger Silbernitratlösung gefärbt und für 20 sec mit Wasser gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 5-10 min mit 0,1% alkalischer Formalinlösung (3 Tropfen NaOH in 50 ml H₂O und 150 μl 37%iger Formalinlösung). Die Geldokumentation erfolgte mit einem Standard-Digitalkamerasystem auf einem Weißlichttisch.

2.7 Quantitative Real-time RT-PCR (Q-PCR) mit QuantiTect SYBR Green® zur Expressionsanalyse

Zur Expressionsanalyse individueller Gene in Einzelzellen wurde die Quantitative Real-time RT-PCR (Q-PCR) verwendet. Die reverse Transkription wurde, wie in 2.6 beschrieben, mit den Primern Pou5f1_1cr, Dnmt3l_1fr und Lig3_1fr (siehe Tabelle 2.7) durchgeführt. Jeweils 1 μl des 1:4 verdünnten RT-Reaktionsproduktes wurde in eine Reaktionskammer einer Mikrotiterplatte, welches die entsprechenden Primerpaare Pou5f1_1cl+r, Dnmt3l_1fl+r oder Lig3_1fl+r mit einer Konzentration von 0,6 μM enthielt, pipettiert und evaporiert. Die Q-PCR wurde mit dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-

Time PCR Detektionssystem (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) und dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix beinhaltet 2,5 mM MgCl₂. In Tabelle 2.4 ist der Reaktionsansatz zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz für die Q-PCR

Reagenzien	Volumen/ Probe
H ₂ O bidest. (Rnase-frei)	12,5 µl
2x QuantiTect SYBR Green	
PCR Master Mix	12,5 µl
Primerpaar (je 0,6 µM)	in Mikrotiterplatte evaporiert
RT-Reaktionsprodukt	in Mikrotiterplatte evaporiert
	Σ = 25 µl

Die PCR wurde mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 min und 40 Amplifikationszyklen mit 94°C für 15 sec, 60°C für 30 sec und 72°C für 30 sec durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden quantifiziert, indem eine Schmelzkurve (60°C bis 95°C) generiert und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz detektiert wurde. Der C_t-Wert (C_t steht für *threshold cycle*), welcher der Zykluszahl entspricht, bei der das Fluoreszenzsignal eine gewählte Basislinie überschritten hat, wurde für jedes Transkript in jeder individuellen Zelle bestimmt. Die Basislinie wurde dabei so gewählt, dass sie die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schneidet. Somit entspricht ein kleinerer C_t-Wert einer höheren Expression. Der mittlere C_t-Wert von ca. 50 analysierten Zellen wurde zur relativen Quantifizierung der Genexpression verwendet.

2.8 *In vitro* Transkription

Zur Verifikation, dass die Primerpaare unseres Multiplex-Ansatzes eine vergleichbare Sensitivität aufweisen, wurden genspezifische Produkte von *Apex1*, *Lig1*, *Lig3* und *Mbd2* aus RNA-Verdünnungsreihen mit 1000, 100, 10, einer und keiner RNA-Kopie amplifiziert. Um die RNA-Verdünnungsreihen herzustellen, verwendeten wir die cDNA-Klone IRAVp968F08125D (*Apex1*), IRAVp968B1152D (*Lig1*), IMAGp998G1814414Q (*Lig3*) und IRAVp968H0390D (*Mbd2*) (ImaGenes, Berlin, Deutschland), von denen wir nach Sequenzverifikation, Linearisierung und Phenolextraktion die genspezifischen RNAs per *in vitro* Transkription (IVT) unter

Verwendung des SP6/T7 Transcription Kits (Roche, Basel, Schweiz) nach Angaben des Herstellers produzierten. In Tabelle 2.5 sind die Reagenzien und Volumina für eine IVT-Reaktion zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Reaktionsansatz der *in vitro* Transkription

Reagenzien	Volumen
1 µg DNA	x µl
dNTP-Mixtur (10 mM je dNTP)	12,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
H2O bidest. (Rnase-frei)	8 - x µl
SP6- oder T7-Polymerase	2 µl
	$\Sigma = 20 \mu\text{l}$

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 37°C einem DNaseI-Verdau unterzogen. Nach abschließender Aufreinigung der hergestellten RNAs mittels Phenolextraktion und Isopropanolfällung wurden die entsprechenden Proben mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) quantifiziert. Die Anzahl der Molekülzahl in dem IVT-Produkt wurde mit nachfolgender Formel errechnet und entsprechend verdünnt. Die reverse Transkription wurde wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt.

$$x = \frac{A_{260} \cdot V_F \cdot N_A}{n_A \cdot A_A + n_T \cdot A_T + n_G \cdot A_G + n_C \cdot A_C}$$

x	Molekülzahl pro l
A_{260}	UV-Lichtabsorption bei 260 nm
V_F	Verdünnungsfaktor
N_A	Avogadro-Konstante ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
n_A, n_T, n_G, n_C	Anzahl der jeweiligen Nukleotide des RNA-Fragments
A_A, A_T, A_G, A_C	Absorptionskoeffizient der jeweiligen Nukleotide

2.9 Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung

Zur Immunfluoreszenzfärbung von Mausembryonen im späten Morulastadium wurde die Zona pellucida mit saurer *Tyrode's* Lösung (pH 2,3; Sigma-Aldrich, Deutschland) entfernt. Die Embryonen wurden für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindestellen der Antikörper bei 4°C über Nacht in Blockierungslösung (1% BSA, 0,1% Triton X-100 und 1,5% Ziegen- oder Eselserum). Nach dem Blockierungsschritt wurden die Embryonen mit dem in Blockierungslösung nach den Angaben des Herstellers verdünnten Primärantikörper, gegen DNMT3A, MBD3, APEX1 oder POLB bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen mehrmals in PBS gewaschen und für 1 h mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Embryonen wieder auf Objektträger übertragen und mit einem kleinen Tropfen Vectashield Mounting Medium, welches 0,1% DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) enthielt, eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte wie in 2.5.4 beschrieben.

2.10 Statistische Analysen

2.10.1 Satz von Bayes

Wir verwendeten das Bayes'sche Theorem um zu testen, ob eines der untersuchten Gene (z.B. Gen X) eine differentielle Expression in den verschiedenen Blastomeren einer Morula zeigt. Die Anzahl der Zellen, in denen das Gen X exprimiert ist, folgt einer Binominalverteilung $B(n,p)$, wobei n die Anzahl der Zellen ist, die in Betracht gezogen werden, und p die Wahrscheinlichkeit exprimiert zu sein, darstellt. Wenn das Gen X zwischen den untersuchten Zellen nicht differentiell exprimiert ist, liegt der Fall $p=0$ oder $p=1$ vor. Für einen angenommenen Messfehler von 20% falsch positiven bzw. 20% falsch negativen Ergebnissen akzeptierten wir einen Wert von $p<0,2$ oder $p>0,8$ als nicht differentiell exprimiert. In einem hypothesenfreien Testverfahren benutzen wir einen uninformativen (gleichverteilten) Prior für p , $p_{\text{Prior}} \sim \text{uniform}[0,1]$. Nach Auszählung der Zahl n_1 der Zellen, welche ein Gen X exprimieren, und der Zahl n_0 der Zellen, welche X nicht exprimieren, errechnet sich der Posterior für die Verteilung von p als eine Betaverteilung $p_{\text{Posterior}} \sim \text{Beta}(n_0, n_1)$.

Das Verhältnis $p(\text{pPosterior} \in [0.2,0.8]) / p(\text{pPosterior} \notin [0.2,0.8])$ betrachten wir als ein Maß für differentielle Expression. Je größer dieses Verhältnis ist, desto stärker ist die Evidenz für differentielle Expression.

2.10.2 Hauptkomponentenanalyse

Um zu untersuchen, ob die Expressionsmuster der einzelnen Zellen individueller Embryonen bestimmten Gruppen, z.B. Embryonen, welche die meisten Gene exprimieren vs. Embryonen, die nur wenige Gene exprimieren, zuzuordnen sind, führten wir eine Hauptkomponentenanalyse durch. Dazu wurde für jede Morula und jedes untersuchte Gen bzw. jede Isoform die relative Anzahl der Zellen eines gegebenen Embryos berechnet, die die entsprechende RNA exprimieren. Somit wurde jede Morula für die untersuchten Gene bzw. Isoformen durch einen 15-dimensionalen Vektor repräsentiert. Die Morula 8 wurde aus der Analyse komplett ausgeschlossen, da nur eine einzelne Zelle des gesamten Embryos zur Verfügung stand (siehe Tabelle 7.1). Die verbleibenden 11 Datenpunkte wurden mit einem k-Mittelwert-Algorithmus mit zwei Clusterzentren berechnet, was zu einer klaren Separation in zwei Gruppen führte (siehe Kapitel 3.2.4 und Abb. 3.6).

2.10.3 Exakter Test nach Fisher

Der Fisher Exakt-Test wurde verwendet, um die Menge der Genprodukte in Morula-Embryonen und individuellen Morula-Blastomeren zu vergleichen (siehe Kapitel 3.2.3). Ein *P*-Wert von unter 5% wurde als signifikant definiert.

2.11 Material

2.11.1 Allgemeine Labormaterialien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden für alle Experimente handelsübliche Enzyme, Chemikalien und sonstige Reagenzien im analytischen Maßstab sowie handelsübliches Material und Standardlaborgeräte verwendet.

2.11.2 BAC-Klone

Maus-BAC-Klone für vier geprägte und fünf nicht geprägte Chromosomenregionen wurden vom *Children's Hospital Oakland Research Institute* (<http://bacpac.chori.org>) erworben (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Verwendete Maus-BAC-Klone.

Bei den ersten vier BAC-Klonen handelt es sich um Klone aus geprägten Chromosomenregionen. Die letzten fünf BAC-Klone entsprechen nicht geprägten Chromosomenregionen.

BAC	Gene	Lokalisation
RP23-429C4	<i>Zim1</i> , <i>Peg3</i>	7A1
CT7-397F16	<i>Snrpn</i>	7B4
RP23-402J22	<i>Igf2r</i> , <i>Slc22a1</i>	17A1
RP23-117C15	<i>Dlk1</i> , <i>Gtl2</i> , <i>Rtl1</i>	12F1
RP24-260K21	<i>Emp1</i> , <i>Pbp2</i>	6G1
RP23-301K19	<i>Hbb-b1</i> , <i>Hbb-b2</i> , <i>Hbb-y</i> und 7 OR-Gene	7F2
RP23-178P20	<i>Opa1</i>	16B2
RP23-460N10	genfrei	7A1
RP24-269E24	genfrei	16C2

2.11.3 Oligonukleotide

Für die Multiplex-RT-PCR wurden die in Tabelle 2.7 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Das Design der Primer für die Multiplex-RT-PCR erfolgte mit Hilfe der Primer3-Software (<http://primer3.sourceforge.net/>). Die Primer für die verschiedenen Gene mussten sehr ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen ($60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Die anderen Parameter für die Oligonukleotide wurden entsprechend der Standardeinstellungen der Primer3-Software übernommen. Ein iterativer Prozess wurde verwendet, um jedes Gen bezüglich seiner Multiplex-Kompatibilität zu untersuchen, indem die *Mispriming*-Parameter der Primer3-Software verwendet wurden. Eine finale Überprüfung des RT-Primermixes erfolgte experimentell. Die resultierenden PCR-Produkte überspannen mindestens ein Intron, um Produkte unterscheiden zu können, die von RNA bzw. von genomischer DNA abstammen. Die Größe der RNA-Produkte reichte von 100 bp bis 300 bp. Die RT-PCR wurde in zwei Primermixturen aufgeteilt (siehe Tabelle 2.8), so dass die generierten PCR-Produkte im selben Mix in ihrer Länge um mindestens 5% differierten und per Gelelektrophorese unterscheidbar waren. Das Primerpaar von *Dnmt1* amplifiziert

sowohl die somatische als auch die für Oozyten spezifische Isoform. Um unterschiedliche Regionen von *Dnmt3a* und *Dnmt3b* zu amplifizieren, wurden zwei bzw. drei Primerpaare verwendet. Die Kombination der PCR-Produkte einer bestimmten Zelle erlaubte es, zwei *Dnmt3a*- und vier *Dnmt3b* Isoformen zu unterscheiden.

Tabelle 2.7: Primerpaare für die Multiplex-RT-PCR.

Primername	Sequenz 5'-3'	Primername	Sequenz 5'-3'
<i>Dnmt3a</i> 1er ^a	5' -ATACTCAGGCTCATCGTCGG-3'	<i>Dnmt3a</i> 1el ^a	5' -CCCTACTACATCAGCAAACGG-3'
<i>Dnmt3a</i> 2gr ^a	5' -CAGCAGTTGTTGTTCCACACA-3'	<i>Dnmt3a</i> 2gl ^a	5' -CAATGTACCCTGGAGCA-3'
<i>Dnmt3b</i> 1br ^b	5' -GCTATTTGTCTTGAGGCGCT-3'	<i>Dnmt3b</i> 1bl ^b	5' -AACTTAGAACCCAGGAGACGC-3'
<i>Dnmt3b</i> 2br ^b	5' -TGACTACAGGAAAAGCTGGTT-3'	<i>Dnmt3b</i> 2bl ^b	5' -TGGCTTCAAAGAAATGATAAGCTC-3'
<i>Dnmt3b</i> 3pr ^b	5' -AGAATGGACGGTTGTCGC-3'	<i>Dnmt3b</i> 3pl ^b	5' -GTGATTGGTGGAAAGCCCAT-3'
<i>Dnmt1</i> 1gr	5' -GGTACTTCAGGTTAGGGTCGTCTA-3'	<i>Dnmt1</i> 1gl	5' -AAAGCAAAGTGTGATCCCG-3'
<i>Dnmt3l</i> 1fr	5' -AAAGGCTCAGTACCCGCAC-3'	<i>Dnmt3l</i> 1fl	5' -CCTGCCCTTCTCAGGA-3'
<i>Pou5fl</i> 1cr	5' -GACTCCACCTCACACGGTTC-3'	<i>Pou5fl</i> 1cl	5' -CAGACCACCATCTGTCTCGCT-3'
<i>Lig1</i> 1cr	5' -AGTTCGACGCTTTGGGAAT-3'	<i>Lig1</i> 1cl	5' -TCAAGTGGTGCCCGAGAG-3'
<i>Lig3</i> 1fr	5' -CACCTCTGCTCATTGTGAA-3'	<i>Lig3</i> 1fl	5' -ACTCGGGTGCAAAACACG-3'
<i>Mbd2</i> 1er	5' -GCCTCATCTCCACTGTCCA-3'	<i>Mbd2</i> 1el	5' -AGGTAGCAATGACGAGACCC-3'
<i>Mbd1</i> 1dr	5' -TCTGTTTCGCGGTTGAAGG-3'	<i>Mbd1</i> 1dl	5' -TGGTGTCAAAGGCAGAGACT-3'
<i>Mbd4</i> 1dr	5' -GAGGAGGGTCCATTTCTTG-3'	<i>Mbd4</i> 1dl	5' -AGACAGCATCCCAGGAC-3'
<i>Mbd3</i> 1dr	5' -GGTGTGTAGAGCACTCGCAA-3'	<i>Mbd3</i> 1dl	5' -TGCAGAAGAAGTGGTCAGGA-3'
<i>Apex1</i> 1br	5' -GCTCTTGACGTTTCAGCCG-3'	<i>Apex1</i> 1bl	5' -ATCAGAAAACCTCACCAGTG-3'
<i>Polb</i> 1br	5' -TTTCTTAGCTTCCGCTCCG-3'	<i>Polb</i> 1bl	5' -CAGCGATCCACAAGTACAAT-3'
<i>H3f3a</i> r	5' -GGCCTCACTTGCTCCTGCAA-3'	<i>H3f3a</i> l	5' -GCAAGAGTGCGCCCTCTACTG-3'

^a Die Primerpaare *Dnmt3a* 1er+1 und *Dnmt3a* 2gr+1 amplifizieren verschiedene Regionen des *Dnmt3a* Gens. Die folgenden Kombinationen der PCR-Produkte werden von *Dnmt3a* Isoform 1 und 2 amplifiziert (gemäß NCBI Gendatenbank):

Isoform	PCR-Produkte	Expressionsstatus	amplifizierte PCR-Produkte
<i>Dnmt3a</i> Isoform 1	somatische Zellen	in geringen Mengen ubiquitär exprimiert	1e + 2g
<i>Dnmt3a</i> Isoform 2	pluripotente Zellen	in ES-Zellen der Maus	2g

^b Die Primerpaare *Dnmt3b* 1br+1, *Dnmt3b* 2br+1 und *Dnmt3b* 3pr+1 amplifizieren verschiedene Regionen des *Dnmt3b* Gens. Die folgenden Kombinationen der PCR-Produkte werden von *Dnmt3b* Isoform 1-4 amplifiziert (gemäß NCBI Gendatenbank):

Isoform	PCR-Produkte	Struktur/Funktion	amplifizierte PCR-Produkte
<i>Dnmt3b</i> Isoform 1	pluripotente Zellen	enthält Transmethylierungsdomäne	1b + 2b + 3p
<i>Dnmt3b</i> Isoform 2	somatische Zellen	enthält Transmethylierungsdomäne	2b + 3p
<i>Dnmt3b</i> Isoform 3	somatische Zellen	ohne Transmethylierungsdomäne	3p
<i>Dnmt3b</i> Isoform 4	pluripotente Zellen	ohne Transmethylierungsdomäne	1b + 3p

Tabelle 2.8: Primermixturen für die reverse Transkription und PCR-Reaktionen

RT-Primermischung	PCR-Primermischung 1	Produktgröße	PCR-Primermischung 2	Produktgröße
<i>Dnmt3a</i> 1er	<i>Dnmt3a</i> 1el+r	270 Bp	<i>Lig1</i> 1cl+r	241 Bp
<i>Dnmt3a</i> 2gr	<i>Dnmt3a</i> 2gl+r	165 Bp	<i>Lig3</i> 1fl+r	116 Bp
<i>Dnmt3b</i> 1br	<i>Dnmt3b</i> 1bl+r	102 Bp	<i>Mbd2</i> 1el+r	291 Bp
<i>Dnmt3b</i> 2br	<i>Dnmt3b</i> 2bl+r	138 Bp	<i>Mbd1</i> 1dl+r	77 Bp
<i>Dnmt3b</i> 3pr	<i>Dnmt3b</i> 3pl+r	145 Bp	<i>Mbd4</i> 1dl+r	122 Bp
<i>Dnmt1</i> 1gr	<i>Dnmt1</i> 1gl+r	84 Bp	<i>Mbd3</i> 1dl+r	109 Bp
<i>Dnmt3l</i> 1fr	<i>Dnmt3l</i> 1fl+r	152 Bp	<i>Apex1</i> 1bl+r	183 Bp
<i>Pou5f1</i> 1cr	<i>Pou5f1</i> 1cl+r	193 Bp	<i>Polb</i> 1bl+r	93 Bp
<i>Lig1</i> 1cr	<i>H3f3a</i> l+r	213 Bp	<i>H3f3a</i> l+r	213 Bp
<i>Lig3</i> 1fr				
<i>Mbd2</i> 1er				
<i>Mbd1</i> 1dr				
<i>Mbd4</i> 1dr				
<i>Mbd3</i> 1dr				
<i>Apex1</i> 1br				
<i>Polb</i> 1br				
<i>H3f3a</i> r				

2.11.4 Antikörper

Für *Whole Mount*-Immunfluoreszenzfärbungen wurden folgende Antikörper verwendet: Der monoklonale Maus-Antikörper (IMG-268) gegen den C-Terminus (Aminosäuren 705-908) des Mausproteins DNMT3A wurde von Imgenex (San Diego CA, USA) erworben, der monoklonale Maus-Antikörper (NB100-116) gegen das humane APEX1 von Novus Biologicals (Littleton CO, USA), der monoklonale Maus-Antikörper (MS-669-P0) gegen das humane POLB von NeoMarkers (Fremont CA, USA) und der polyklonale Antikörper (sc-9402) aus der Ziege gegen den C-Terminus des humanen Proteins MBD3 von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA, USA). Texas Red-markierter Ziege anti-Maus IgG (sc-2781) und FITC-markierter Esel anti-Ziege IgG (sc-2024) Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology bezogen.

2.11.5 Software und Datenbanken

Zur Identifizierung geeigneter Maus-BAC-Klone wurden die Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), des *Wellcome Trust Sanger Institute* (<http://www.ensembl.org/>) und des *UCSC Genome*

Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) verwendet. Das Design der Primer für die Multiplex-RT-PCR wurde mit Hilfe der Primer3-Software (<http://primer3.sourceforge.net/>) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen

Zur Analyse der asynchronen Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen wurde die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) verwendet, weil diese Methode gegenüber anderen zur Verfügung stehenden Methoden mehrere Vorteile, besonders bei der Analyse geringer Zellzahlen, bietet (siehe Kapitel 4.1.1). Die Auswahlkriterien adäquater BAC-Klone zur Replikationsanalyse mittels FISH werden in Kapitel 3.1.1 beschrieben. In Kapitel 3.1.2 werden die Ergebnisse zur Validierung der FISH-Methode für die Replikationsanalyse dargestellt. Die Ergebnisse der Replikationsstudie geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen während der Präimplantationsentwicklung der Maus sind in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 zusammengefasst.

3.1.1 Auswahl der BAC-Klone für die Analyse der Replikation mittels FISH

Zur systematischen Analyse der asynchronen Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen auf Interphasezellkernen von Embryonen verschiedener Präimplantationsstadien wurden vier BAC-Klone mit geprägten Genen (*Snrpn*, *Zim1-Peg3*, *Dlk1-Gtl2* und *Igf2r*) und fünf BAC-Klone mit nicht geprägten Chromosomenregionen ausgewählt. Bei der Auswahl der entsprechenden BAC-Klone ging es hauptsächlich darum, dass eine gute Hybridisierung gewährleistet war und die FISH-Signale somit einfach und eindeutig zu detektieren waren. Dies war besonders wichtig, da die geringe Anzahl an Embryonen pro Mauspräparation und die geringe Anzahl auswertbarer Zellkerne pro Embryo die einzelnen FISH-Experimente stark limitierten. Zum anderen wurden für die geprägten Gene Loci ausgesucht, die in der Maus und im Menschen gut charakterisiert sind. Zwei der vier ausgewählten BAC-Klone aus geprägten Chromosomenregionen wurden so ausgewählt, dass ein direkter Vergleich mit einer Studie aus dem Jahr 1999 möglich war, in der ebenfalls das Replikationsverhalten dieser Regionen in Präimplantationsembryonen analysiert wurde (Simon *et al.*, 1999). Zwei der

geprägten sowie zwei der nicht geprägten Regionen befinden sich auf *Mus musculus* Chromosom 7 (MMU7), auf dem sich die syntänen Regionen zu den am besten untersuchten Imprintingclustern des Menschen befinden. Die anderen Regionen befinden sich auf verschiedenen Chromosomen. Die ausgewählten BAC-Klone und die untersuchten Gene sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Alle BAC-Klone wurden auf ihre korrekte Lokalisation im Genom verifiziert, indem sie auf Metaphasechromosomen hybridisiert wurden. Als repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 3.1A die Hybridisierung des BACs RP23-429C4 (rot), welcher die geprägten Gene *Zim1* (*zinc finger, imprinted 1*) und *Peg3* (*paternally expressed 3*) enthält und auf MMU7A1 hybridisiert (siehe Abb. 3.1A, rote Probe), sowie des BACs CT7-397F16 (siehe Abb. 3.1A, grüne Probe), welcher das geprägte Gen *Snrpn* (*small nuclear ribonucleoprotein N*) enthält und auf MMU7B4 hybridisiert, dargestellt. Der BAC RP23-402J22, welcher das geprägte Gen *Igf2r* (*insulin-like growth factor 2 receptor*) und *Slc22a1* (*solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1*) enthält, hybridisiert auf MMU17A1, während der BAC RP23-117C15 die geprägten Gene *Dlk1* (*delta like 1 homolog (Drosophila)*), *Gtl2* (*gene trap locus 2*; auch bekannt als *Meg3*) und *Rtl1* (*retrotransposon-like gene 1*) enthält und auf Chromosom MMU12F1 hybridisiert. Zudem wurden folgende BACs mit nicht geprägten Genen bzw. genfreien Regionen ausgewählt: BAC RP24-260K21 mit den Genen *Emp1* (*epithelial membrane protein 1*) und *Pbp2* (*phosphatidylethanolamine binding protein 2*; lokalisiert auf MMU6G1), BAC RP23-301K19 mit den Genen *Hbb-b1* (*hemoglobin, beta adult major chain*), *Hbb-b2* (*hemoglobin, beta adult major chain*), *Hbb-y* (*hemoglobin Y, beta-like embryonic chain*) sowie sieben olfaktorischen Rezeptorgenen (lokalisiert auf MMU7F2), BAC RP23-178P20 mit dem Gen *Opal* (*optic atrophy 1 homolog*) (lokalisiert auf MMU16B2), BAC RP23-460N10 mit einer genfreien Region (lokalisiert auf MMU7A1, 1 Mb von einem *imprinting center* entfernt) und BAC RP24-269E24 mit einer genfreien Region (lokalisiert auf MMU16C2). Neben der Qualität für eine gute Auswertbarkeit der FISH-Signale im Fluoreszenzmikroskop wurde zur Charakterisierung der ausgewählten BAC-Klone die Hybridisierungseffizienz auf Metaphasechromosomen berücksichtigt und zur Validierung der FISH-Experimente auf Interphasezellkernen eingesetzt. Die ausgewählten BACs produzierten diskrete FISH-Signale auf beiden homologen Chromosomen in mindestens 98-99% der hybridisierten Zellkerne und zeigten keine Kreuzhybridisierung zu anderen Chromosomenregionen. Höchstens 1-2% der Zellkerne zeigten keine Signale nach der FISH und weniger als 0,5%

zeigten nur ein chromosomales Signal, was vermutlich suboptimale Hybridisierungsbedingungen widerspiegelt.

3.1.2 Validierung der FISH zur Replikationsanalyse von geprägten und nicht geprägten Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen

Bei der Auswertung von mittels FISH analysierten Zellkernen weisen Zielsequenzen, die noch nicht repliziert wurden, zwei Einzelsignale (SS; (*single-single*) Signalmuster) für jedes Allel auf (siehe Abb. 3.1B), wohingegen komplett replizierte Zielsequenzen, die die S-Phase komplett durchlaufen haben, zwei Doppelsignale aufweisen (siehe Abb. 3.1E; DD; (*double-double*) Signalmuster). Ein hemizygoten Hybridisierungsmuster mit einem Einzel- und einem Doppelsignal (SD; (*single-double*) Signalmuster) im gleichen Zellkern repräsentiert eine asynchrone Replikation der beiden parental Allele. Dabei hat das Allel mit dem Doppelsignal die S-Phase schon durchlaufen und liegt repliziert vor, während das Allel mit dem Einzelsignal noch im unreplizierten Zustand vorliegt (siehe Abb. 3.1D). Bei der Auswertung in dieser Studie wurden nur klar erkennbare Hybridisierungssignale analysiert. Eine unabhängige Auswertung eines zweiten Experimentators fand im Rahmen dieser Studie nicht statt. Bei der Auswertung durch den Experimentator wurden die Probenamen vor der Auswertung entweder nicht auf die Objektträger geschrieben oder von einer zweiten Person kodiert. Der Experimentator konnte somit das Ergebnis nicht durch Vorwissen über die auszuwertenden Proben beeinflussen, weil die Probenamen erst nach der Auswertung zugeordnet wurden. Dies schließt systematische Fehler bei der Interpretation der FISH-Ergebnisse aus.

Um die Zuverlässigkeit der FISH-Experimente auf Interphasezellkernen zu testen, wurden der BAC RP23-301K19 (enthält den nicht geprägten β -Globin-Lokus) und der BAC RP23-178P20 (enthält das nicht geprägte Gen *Opal*) auf Zellkerne von Morula-Embryonen hybridisiert, welche zuvor mit BrdU inkubiert wurden (siehe Abb. 3.1C; Kapitel 2.3.1). Achtzig bis 88% der Zellen von unterschiedlichen Morula-Embryopräparationen waren BrdU-positiv, was mit replizierenden Zellen korreliert, die sich in der S-Phase befinden. Es wurden über 100 BrdU-positive Zellkerne für jeden BAC ausgewertet und 24-25% hemizygoten Hybridisierungsmuster (SD-Muster; asynchrone Replikation) für den β -Globin-Lokus und *Opal* nachgewiesen. Bei der Auswertung des gleichen Experiments mit nicht markierten Interphasezellkernen, d.h. ohne BrdU-

Inkubationschritt, zeigten 25% (β -Globin-Lokus) bzw. 22% (*Opal*) aller ausgewerteten Interphasezellkerne (>100 Zellkerne wurden ausgewertet) eine asynchrone Replikation. Alle weiteren Experimente wurden ohne BrdU-Markierung durchgeführt, da dies eine simultane Hybridisierung von verschiedenen BAC-Klonen ermöglichte. Der Vorteil, dass pro Embryopräparation mehr Proben ausgewertet werden konnten, kompensiert den Nachteil, dass auch Zellen aus der G1- bzw. G2-Phase, in denen sich unreplizierte bzw. komplett replizierte Loci befinden, in die Auswertung mit eingeflossen sind. Dabei musste insbesondere berücksichtigt werden, dass während der Embryopräparation (siehe Kapitel 2.3) und der für die FISH auf Interphasezellkerne notwendigen mehrfachen Waschschriffe (siehe Kapitel 2.5.3) Embryonen bzw. Zellkerne verloren gehen können. Des Weiteren war es aufgrund der ähnlichen Ergebnisse bei der Auswertung von BrdU-markierten und nicht mit BrdU markierten Zellkernen sowie aufgrund der hohen Anteile, von bis zu 88% mit BrdU markierten Zellkernen (siehe BrdU-Markierungsexperimente oben) vertretbar, alle weiteren Experimente ohne BrdU-Markierung durchzuführen. Üblicherweise wird angenommen, dass ein Locus asynchron repliziert, wenn 25-40% der Zellkerne ein SD-Signalmuster aufweisen (Kagotani *et al.*, 2002; Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1999). Da nicht ausschließlich Zellkerne, die sich in der S-Phase befinden, ausgewertet wurden und somit der Prozentsatz asynchron replizierender Zellen etwas niedriger sein sollte, wurde der Grenzwert für einen asynchron replizierenden Locus bei 25% SD-Signalmustern festgelegt. Dies steht im Einklang mit unseren Labor-Erfahrungen aus einer früheren Studie (Dünzinger *et al.*, 2005) sowie mit meinem Pilotexperiment mit BrdU-markierten Zellkernen.

Für alle folgenden Experimente wurden zur Analyse des Replikationsverhaltens geprägter und nicht geprägter Loci während der Präimplantationsentwicklung und zur Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen den untersuchten Präimplantationsstadien die ausgewählten BAC-Klone auf circa 50 Zellkerne von Einzell- und Zweizell-Embryonen, auf 100 bis 150 Zellkerne von Vierzell-, Achtzell- und Morula-Embryonen und auf über 200 Zellkerne von MEFs hybridisiert.

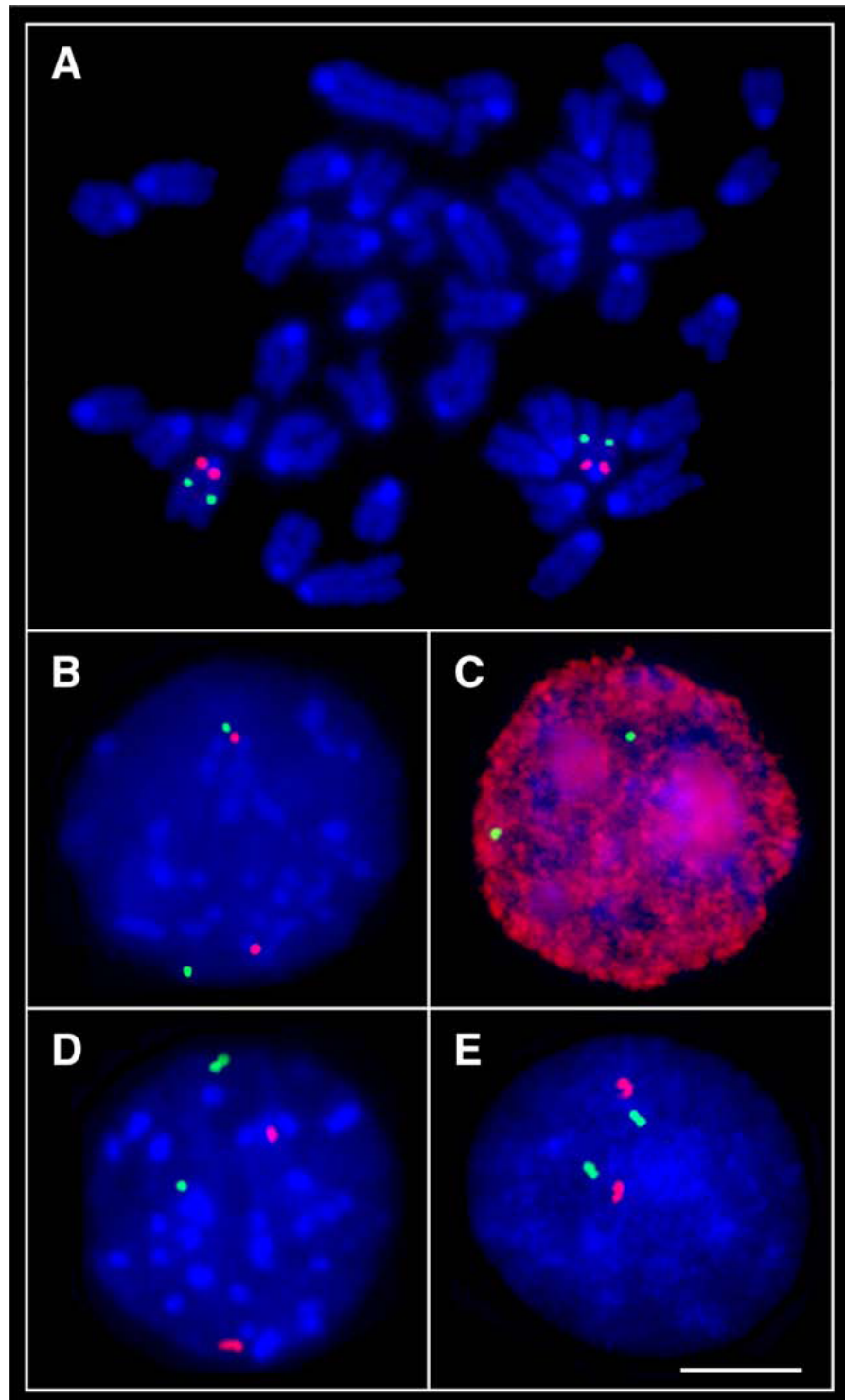


Abbildung 3.1: Repräsentative Beispiele von FISH-Signalen auf Interphase- und Metaphasezellkernen.

Alle Präparationen wurden mit Fluorescein-12-dUTP (grün) oder Tetramethylrhodamin-5-dUTP (rot) markierten Proben hybridisiert und anschließend mit DAPI (blau) gegengefärbt. **A:** FISH des BACs RP23-429C4 (*Zim1-Peg3*), hier rot markiert, auf Mauschromosom 7A1 und des BACs CT7-397F16 (*Snrpn*), hier grün markiert, auf Mauschromosom 7B4. **B:** Blastomerenzellkern mit zwei nicht replizierten Allelen (zwei Einzelsignale; SS). BAC RP23-429C4 (*Zim1-Peg3*) ist rot markiert und BAC CT7-397F16 (*Snrpn*) ist

grün markiert. **C:** Hybridisierung des grün markierten BACs RP23-178P20 (*Opa1*) auf einen mit BrdU markierten Blastomerenkern, hier rot markiertes Sekundärantikörpersignal (Cy3-konjugierter Sekundärantikörper). **D:** Blastomerenkern mit einem asynchronen Replikationsmuster (ein Einzel- und ein Doppelsignal; SD). Grün markiert ist hier der BAC RP23-117C15 (*Dlk1-Gtl2*) und rot markiert der BAC RP23-402J22 (*Igf2r*). **E:** Blastomerenkern mit zwei replizierten Allelen (zwei Doppelsignale; DD) jeweils für den grün markierten BAC RP24-269E24 (genfrei) und dem rot markierten BAC RP23-178P20 (*Opa1*). Der Maßstab entspricht 10 μm .

3.1.3 Replikationsverhalten geprägter Chromosomenregionen in Präimplantationsembryonen der Maus

Zur Analyse des Replikationsverhaltens geprägter Chromosomenregionen wurden die BACs CT7-397F16, RP23-429C4, RP23-117C15 sowie RP23-402J22 (siehe Tabelle 2.6) auf Präimplantationsembryonen sowie MEFs hybridisiert. Hierbei zeigte der BAC CT7-397F16 (*Snrpn*, Chromosom 7B4) bei über 30% der Zellkerne ein hemizygotes Hybridisierungsmuster in fast allen Präimplantationsstadien. Zu beobachten war dies in Einzell-, Vierzell-, Achtzell-, und Morula-Embryonen sowie in MEFs (siehe Abb. 3.2A). Von den analysierten Zweizell-Embryonen zeigten nur 24% der analysierten Zellkerne ein hemizygotes Hybridisierungsmuster. Jedoch unterschied sich die Rate asynchron replizierender Zellkerne nicht signifikant ($P > 0,25$) von der in Zygoten und Vierzell-Embryonen, so dass die im Zweizellstadium beobachtete niedrigere asynchrone Replikationsrate von *Snrpn* mit einer statistischen Schwankung erklärbar wäre. Die asynchrone Replikation von *Snrpn* ist aber direkt nach der Befruchtung nachweisbar und wird während der gesamten Präimplantationsphase sowie auch in MEFs aufrechterhalten.

Eine ähnliche Verteilung der asynchronen Replikation war bei *Zim1* und *Peg3* zu beobachten. Der entsprechende BAC RP23-429C4 (Chromosom 7A1) produzierte ein asynchrones Hybridisierungsmuster in über 26% der analysierten Zellkerne von MEFs und allen Präimplantationsstadien mit Ausnahme von Achtzell-Embryonen. In Achtzell-Embryonen waren 22% asynchron replizierende Zellkerne und somit ein synchrones Replikationsmuster zu beobachten (siehe Abb. 3.2B). Aufgrund der niedrigen asynchronen Replikationsrate von 22% in Achtzell-Embryonen wurde die Hybridisierung des BACs RP23-429C4 wiederholt. Dabei wurden 111 weitere Zellkerne von Achtzell-Embryonen ausgewertet. Bei diesem Experiment wiesen 24% der analysierten Zellkerne ein hemizygotes Hybridisierungsmuster auf, was auch knapp unter unserer gewählten Grenze für eine asynchrone Replikation liegt. Der Vergleich der asynchronen Replikationsraten

von Achtzell- und Vierzell-Embryonen zeigt keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,25$), wohingegen der Vergleich von Achtzell-Embryonen und Morula-Embryonen einen signifikanten Unterschied ergibt ($P < 0,03$).

Der BAC RP23-117C15 (*Dlk1* und *Gtl2*, Chromosom 12F1) zeigte in Mauseygoten eine asynchrone Replikation in 32% der ausgewerteten Zellkerne. Zweizell-Embryonen wiesen in 29% der Zellkerne, Vierzell-Embryonen in 22% der Zellkerne, Achtzell-Embryonen in 25% der Zellkerne und MEFs in 30% der Zellkerne eine asynchrone Replikation der chromosomalen Region auf (siehe Abb. 3.2C). Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den Daten für die BACs CT7-397F16 (*Snrpn*) und RP23-429C4 (*Zim1*, *Peg3*) überein. Die asynchrone Replikationsrate von 12% in Morula-Embryonen ist hingegen nicht konsistent mit den Daten in den anderen Präimplantationsstadien und MEFs sowie mit den Daten für die BACs CT7-397F16 (*Snrpn*) und RP23-429C4 (*Zim1*, *Peg3*). Der χ^2 -Unabhängigkeitstest zeigt, dass der Unterschied von 12% asynchron replizierenden Zellen in Morula-Embryonen verglichen mit 25% in Achtzell-Embryonen signifikant ist. Der P -Wert beträgt hierbei weniger als 0,003. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Replikation des *Dlk1/Gtl2*-Lokus während der Präimplantationsentwicklung graduell von einem asynchronen (in Zygoten und Zweizell-Embryonen) zu einem synchronen Muster (in Morula-Embryonen) übergeht. Da diese niedrige asynchrone Replikationsrate untypisch für geprägte Gene ist, wurde die Hybridisierung des BACs RP23-117C15 auf Zellkerne von Morula-Embryonen wiederholt (siehe nächster Abschnitt).

Der BAC RP23-402J22 (*Igf2r* und *Slc22a1*, Chromosom 17A1) zeigte ein ähnliches Replikationsverhalten wie der BAC RP23-117C15. So wiesen Zygoten in 31% der Fälle, Zweizell-Embryonen in 35% der Fälle, Vierzell-Embryonen in 29% der Fälle, Achtzell-Embryonen in 29% und MEFs in 27% ein asynchrones Replikationsmuster auf. Nur in Morula-Embryonen wurde wiederum eine deutlich niedrigere asynchrone Replikationsrate von 20% beobachtet (Abb. 3.2D). Obwohl die geringere asynchrone Replikationsrate in Morula-Embryonen im Vergleich zu anderen Präimplantationsstadien für *Igf2r* nicht signifikant war ($P = 0,08$), wurde ein Wiederholungsexperiment durchgeführt, um eine statistische Schwankung zu bestätigen oder ausschließen zu können. Bei diesem Wiederholungsexperiment wurde auch der BAC RP23-117C15 (*Dlk1/Gtl2*-Lokus) nochmals hybridisiert. Die erneute Auswertung von über 100 Zellkernen aus neuen Morula-Präparationen ergab für den BAC RP23-117C15 (*Dlk1-Gtl2*) eine SD-Rate von 16% und für den BAC RP23-402J22 (*Igf2r*) eine SD-Rate von 23%. Zusammenfassend

zeigen diese Daten, dass der *Dlk1/Gtl2*-Lokus und sehr wahrscheinlich auch *Igf2r* in Morula-Embryonen synchron repliziert werden.

3.1.4 Replikationsverhalten nicht geprägter Chromosomenregionen in Präimplantationsembryonen der Maus

Zur Analyse des Replikationsverhaltens nicht geprägter Chromosomenregionen wurden die BACs RP23-178P20, RP24-260K21, RP23-301K19, RP24-269E24 und RP23-460N10 (siehe Tabelle 2.6) auf Präimplantationsembryonen sowie MEFs hybridisiert. Dabei zeigte der BAC RP23-178P20 (*Opal*, Chromosom 16B2) während der Präimplantationsentwicklung dramatische Änderungen der asynchronen Replikationsrate. In Ein- und Zweizell-Embryonen war eine SD-Rate von 45% bzw. 54% zu beobachten. Ab dem Vierzellstadium bis zum Morulastadium ging die SD-Rate sehr stark auf Werte zwischen 18 und 22% zurück (siehe Abb. 3.2E). Dieser abrupte Übergang von asynchroner zu synchroner Replikation zwischen dem Zweizell- und Vierzellstadium war mit einem *P*-Wert von unter 0,001 hoch signifikant. MEFs wiesen für diesen BAC 24% asynchron replizierende Zellen auf, was mit einem synchronen Replikationsmuster korreliert. Ähnliche Resultate wurden für den BAC RP24-260K21 (*Emp1* und *Pbp1*, Chromosom 6G1) erhalten. In Zygoten und Zweizell-Embryonen wurde eine SD-Rate von 25% bzw. 36% nachgewiesen. Vierzell-, Achtzell-, und Morula-Embryonen zeigten in 18%, 24% bzw. 24% der Zellkerne eine asynchrone Replikation von *Emp1* und *Pbp1*. Auch bei der Hybridisierung des BACs RP24-260K21 war somit ein deutlicher Übergang von einem asynchronen zu einem synchronen Replikationsmuster zwischen dem Zweizell- und Vierzell-Embryostadium detektierbar (siehe Abb. 3.2F).

Auf dem BAC RP23-301K19, welcher auf Chromosom 7F2 hybridisiert und den β -Globin-Lokus enthält (*Hbb-b1*, *Hbb-b2* und *Hbb-y*), befinden sich auch 7 OR-Gene. Über 50% des BACs werden von diesen OR-Genen repräsentiert. Auch bei diesem BAC war ebenso wie bei den BACs RP23-178P20 und RP24-260K21 ein klarer Übergang von asynchroner Replikation zu synchroner Replikation zu beobachten. In Einzell- und Zweizell-Embryonen wurde eine SD-Rate von 35% bzw. 36% nachgewiesen, während in Vierzell- und Achtzell-Embryonen nur noch eine SD-Rate von 16% bzw. 22% detektierbar war (siehe Abb. 3.2G). Die festgestellte erhöhte asynchrone Replikationsrate in Morula-Embryonen von 25% sowie in MEFs von 29% kann durch die in der späten

Präimplantationsphase stattfindende klonale Etablierung der allelspezifischen Replikation der OR-Gene erklärt werden (Chess *et al.*, 1994).

Hybridisierungsexperimente des genfreien BACs RP24-269E24 auf Mauschromosom 16C2 zeigten in Einzell- und Zweizell-Embryonen eine asynchrone Replikation des Lokus in 34 bzw. 37% der ausgewerteten Zellkerne (siehe Abb. 3.2H). Im Gegensatz zu den nicht geprägten genhaltigen Regionen war hier kein klarer Übergang von der asynchronen zur synchronen Replikation zwischen dem Zweizell- und Vierzellstadium zu beobachten. Stattdessen wurde eine graduelle Abnahme des Prozentsatzes hemizygoter Replikationsmuster in den Zellkernen von Vierzell- (32%), Achtzell- (27%) und Morula-Embryonen (26%) beobachtet. MEFs zeigten eine synchrone Replikationsrate von 24%. Um herauszufinden, ob diese graduelle Transition von der asynchronen zu synchronen Replikation eine inhärente Eigenschaft nicht kodierender Sequenzen oder Chromosomenregionen ist, wurde ein weiterer genfreier BAC auf Zellkerne von Zweizell- und Vierzell-Embryonen hybridisiert. Die Hybridisierung des BACs RP23-460N10 (Chromosom 7A1) zeigte in Zweizellern ein SD-Muster in 46% der analysierten Zellkerne, wohingegen in Vierzellern eine SD-Rate von 21% zu beobachten war (siehe Abb. 3.2I). Demnach zeigte die genfreie, nicht kodierende Region des BACs RP23-460N10 ähnlich wie die nicht geprägten genhaltigen Regionen von BAC RP23-178P20, RP24-260K21 und RP23-301K19 einen recht abrupten Übergang, zwischen dem Zweizell- und Vierzellstadium, von einem asynchronen zu einem synchronen Replikationsverhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass genfreie wie auch genhaltige nicht geprägte Chromosomenregionen in Einzell- und Zweizell-Embryonen asynchron repliziert werden. Im Vierzellstadium wird dieses asynchrone Replikationsmuster in genhaltigen nicht geprägten Regionen durch ein synchrones Replikationsmuster ersetzt, das dann in der weiteren Entwicklung erhalten bleibt. Auch bei genfreien chromosomalen Regionen ist ein Übergang von der asynchronen Replikation zur synchronen Replikation zwischen dem Zweizell- und Vierzellstadium zu beobachten. Jedoch weisen hier einzelne Regionen auch eine graduelle Transition von der asynchronen zur synchronen Replikation auf, wie bei der Hybridisierung des BACs RP24-269E24 zu beobachten war.

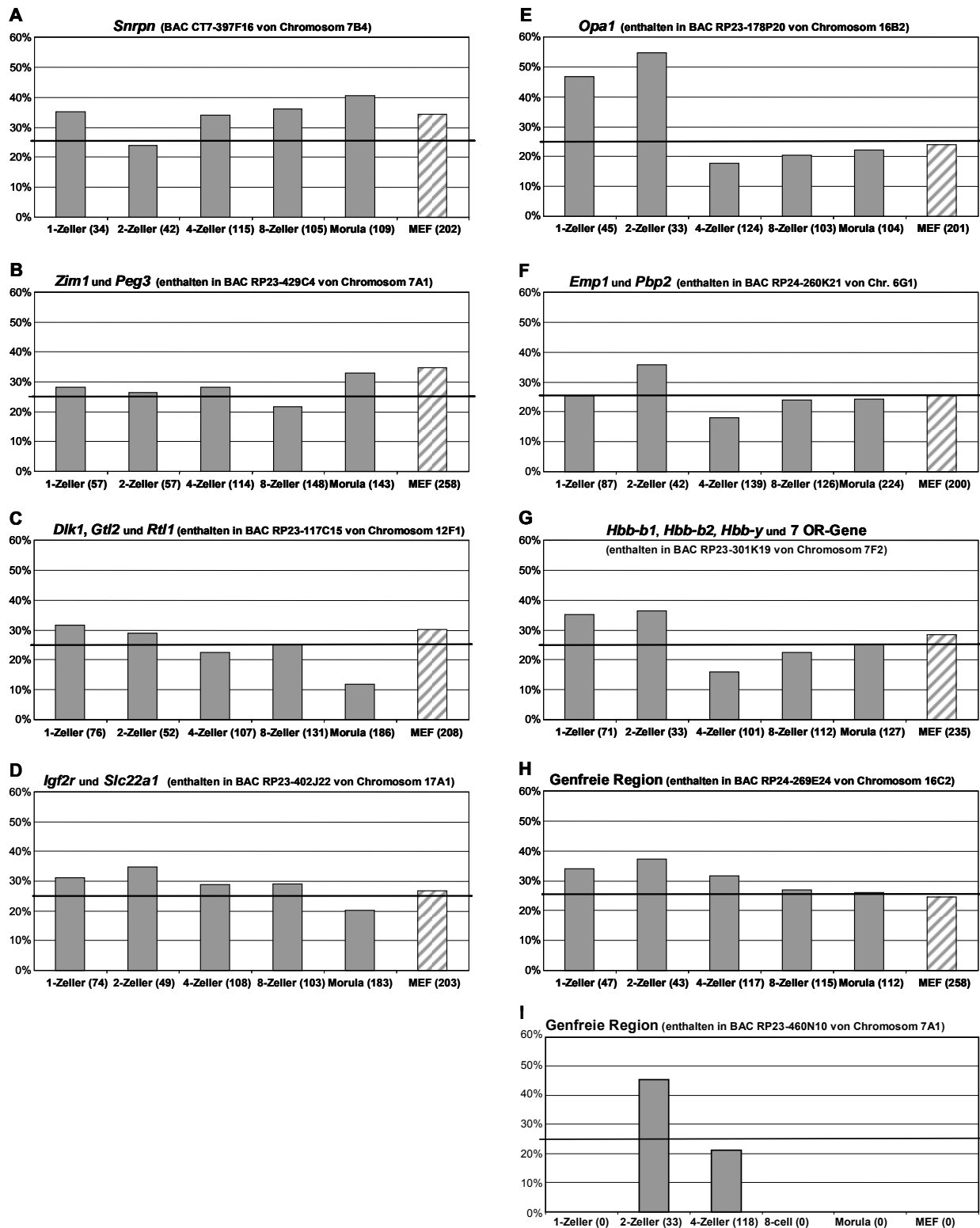


Abbildung 3.2: Prozentwerte asynchron replizierter Zellkerne. Die Histogramme für jede gezeigte BAC Probe zeigen die Prozentwerte asynchron replizierter Zellkerne in Einzell-, Zweizell-, Vierzell-, Achtzell-, und Morula-Embryonen der Maus (graue Balken) sowie in MEFs (schraffierte Balken). Die Anzahl der analysierten Zellkerne für einen bestimmten BAC und ein bestimmtes Entwicklungsstadium/Zelltyp sind in Klammern angegeben. Die querverlaufende schwarze Linie in jedem Histogramm repräsentiert den Grenzwert zwischen asynchroner Replikation (>25% der Zellkerne mit SD-Signalen) und synchroner

Replikation (<25% Zellkerne mit SD-Signalen). Auf der linken Seite sind die Histogramme der geprägten Gene dargestellt. **A:** *Snrpn*, enthalten in BAC CT7-397F16. **B:** *Zim1* und *Peg3*, enthalten in BAC RP23-429C4. **C:** *Dlk1*, *Gtl2* und *Rtl1*, enthalten in BAC RP117C15. **D:** *Igf2r* und *Slc22a1*, enthalten in RP23-402J22. Auf der rechten Seite sind die Histogramme der nicht geprägten Gene dargestellt. **E:** *Opa1*, enthalten in BAC RP23-178P20. **F:** *Emp1* und *Pbp2*, enthalten in BAC RP24-260K21. **G:** *Hbb-b1*, *Hbb-b2*, *Hbb-y* und 7 OR Gene, enthalten in BAC RP23-301K19. **H:** Der genfreie BAC RP24-269E24 und **I:** Der genfreie BAC RP23-460N10.

3.2 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen und einzelnen Blastomeren der Maus mittels Multiplex RT-PCR

Zur Expressionsstudie von Entwicklungsgenen in Präimplantationsembryonen und einzelnen Blastomeren sollte zunächst in Kooperation mit der Firma Advalytix AG (München, Deutschland) ein entsprechender Ansatz etabliert werden. Dabei wurde ein Multiplex-RT-PCR-Ansatz zur Detektion relevanter Entwicklungsgene mit DNA- und Chromatin-modifizierenden Eigenschaften entwickelt (siehe Kapitel 3.2.1). Die jeweiligen Experimente mit ganzen Embryonen oder einzelnen Blastomeren wurden auf einem AmpliGrid AG480F-Glasobjektträger durchgeführt. Die Abbildung 3.3 gibt einen Überblick über die Einzelzellanalyse mit Hilfe der AmpliGrid-Technologie.

3.2.1 Assay-Design und Assay-Validierung

Für die Etablierung des Multiplex-RT-PCR-Primermixes (siehe Tabelle 2.8) zur Detektion der Gene *Dnmt1*, *Dnmt3a* (Isoformen 1 und 2), *Dnmt3b* (Isoformen 1 bis 4), *Dnmt3l*, *Mbd1*, *Mbd2*, *Mbd3*, *Mbd4*, *Apex1*, *Polb*, *Lig1*, *Lig3* und *Pou5f1* war es wichtig, ein adäquates Referenzgen zu finden. Das Referenzgen sollte in jeder einzelnen Blastomere einzelner Präimplantationsembryonen verlässlich detektiert werden. Hierfür wurde die Expression von allgemein üblichen Referenzgenen wie *Gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *H2a* (*H2A histone family*), *H3f3a* (*H3 histone, family 3A*) und *Rn18s* (*18S RNA*) in Einzell-, Zweizell-, Vierzell- und 16-Zell-Embryonen der Maus getestet. Dabei stellte sich heraus, dass das Referenzgen *H3f3a* am verlässlichsten und stabilsten exprimiert wurde. Bei den entsprechenden RT-PCR-Experimenten produzierte *H3f3a* Gelbanden vergleichbarer Intensität in allen analysierten Embryonen. *H3f3a* ist eine Histonvariante, die das Histon H3 ersetzen kann und Chromatin epigenetisch markiert. H3F3A weist eine asymmetrische Verteilung zwischen dem paternalen und maternalen Vorkern in der Mauszygote auf. Außerdem wird es in allen Zellkernen während der Präimplantationsentwicklung bis zum Blastozystenstadium exprimiert (Torres-Padilla *et al.*, 2006). Die Histonvariante *H3f3a* wird zellzyklusunabhängig ubiquitär exprimiert und wurde schon in verschiedenen Studien als interne Kontrolle für RT-PCR-Experimente in unterschiedlichen Geweben verwendet (Futscher *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1993). Somit wurde für alle zukünftigen Experimente als Referenzgen das Gen *H3f3a* eingesetzt.

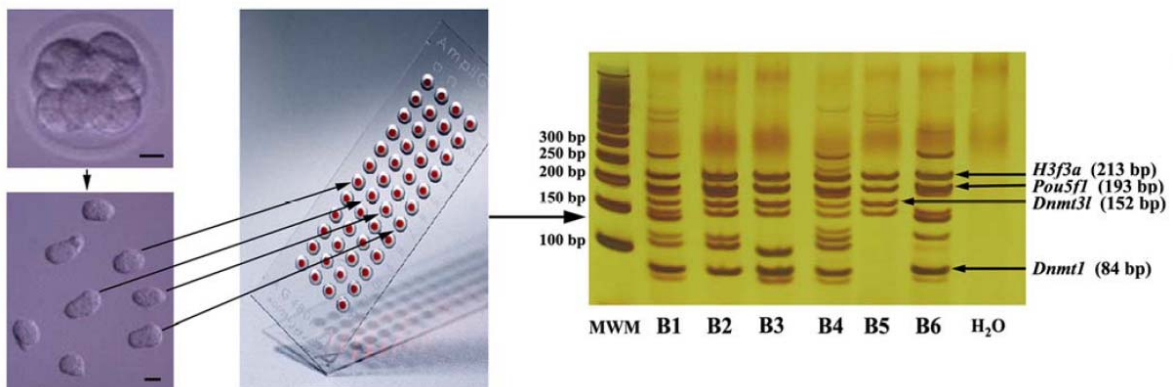


Abbildung 3.3: Überblick der Einzelzell-Expressionsanalyse mit Hilfe der AmpliGrid-Technologie. Zur Expressionsanalyse von Blastomeren wurden die vereinzelt Zellen nach Disaggregation aus einem Morula-Embryo auf jeweils eine 1 μ l-Reaktionsstelle eines AmpliGrid-Glasobjektträgers transferiert. Auf dieser Reaktionsstelle wurde eine Multiplex-RT-PCR durchgeführt. Die daraus resultierenden PCR-Produkte der individuellen Blastomeren (B1-B6) wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Produktgrößen wurden mit einem Molekulargewichtsmarker (MWM) ermittelt. Die entsprechende Wasserkontrolle der Multiplex-RT-PCR ist in der letzten Gelspur aufgetragen (H₂O). RT-PCR-Produkte von *H3f3a* (213 Bp) und *Pou5f1* (193 bp) wurden z.B. in jeder Blastomere detektiert. RT-PCR-Produkte von *Dnmt1* (84 Bp) und *Dnmt3l* (152 bp) wurden hier nur in einem Teil der analysierten Blastomeren detektiert. Der Maßstab in den links dargestellten Fotos von einem Morula-Embryo (oben) bzw. individuellen Blastomeren (unten) entspricht 10 μ m.

Vor den eigentlichen RT-PCR-Experimenten wurde das Multiplex-Primersset in zehn unabhängigen RT-PCR-Reaktionen validiert. Hierbei wurde eine Gesamt-RNA-Menge von 200 pg aus Tag 11,5 *post conceptionem* (dpc) alten C57BL6/J Mausembryonen verwendet. 200 pg Gesamt-RNA entsprechen annähernd der RNA-Menge, die sich in einer Mauszygote befindet. Die RNA-Menge in einer Mauszygote wird auf circa 350-550 pg RNA geschätzt (Nagy *et al.*, 2002). Bei einer Gesamt-RNA-Menge von 200 pg generierten 13 (*Dnmt3a* 1e, *Dnmt3a* 2g, *Dnmt3b* 2b, *Dnmt1*, *Pou5f1*, *H3f3a*, *Apex1*, *Polb*, *Lig1*, *Lig3*, *Mbd2*, *Mbd3* und *Mbd1*) der 17 getesteten Primerpaare in 9 bis 10 der 10 Wiederholungsexperimente das entsprechende PCR-Produkt. Bei Verwendung der Primerpaare für *Dnmt3b* 3p und *Mbd4* konnte in 5 bzw. 8 der 10 Experimente ein PCR-Produkt und bei Verwendung der Primerpaare für *Dnmt3b* 1b und für *Dnmt3l* in 2 bis 5 der 10 Wiederholungsexperimente das entsprechende PCR-Produkt generiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die mRNAs einiger Gene bzw. Isoformen, welche präferentiell in pluripotenten Stammzellen exprimiert werden, in 11,5 dpc alten Embryonen nur sehr

schwach exprimiert werden. Um ausschließen zu können, dass die verminderte Detektion einiger Genprodukte bzw. Isoformen in unserem Multiplex RT-PCR Ansatz mit fehlender Sensitivität für die Detektion von geringen mRNA Mengen zusammenhängt, wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Hierbei wurde die Amplifikation eines 308 bp Fragmentes der pAW109 Kontroll-RNA aus dem *GeneAmp RNA PCR control kit* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) in einer Verdünnungsreihe mit 1000, 100, 10, einer und keiner RNA-Kopie(n) analysiert. Dabei wurde das entsprechende Fragment bei einer Verdünnung mit 1000 und 100 RNA-Kopien in 100% der Experimente detektiert. Bei einer Verdünnung mit 10 RNA-Kopien wurde das 308 bp Fragment in 89% der Experimente und bei einer Verdünnung mit einer RNA-Kopie in 17% der Experimente nachgewiesen (siehe Tabelle 3.1). War keine RNA-Kopie vorhanden, so konnte das Fragment auch nicht amplifiziert werden. Um zusätzlich zu zeigen, dass die Primerpaare des Multiplex-RT-PCR-Ansatzes die gleiche Sensitivität bei der Detektion von wenigen RNA-Kopien besitzen, wurden mittels in vitro-Transkription aus cDNA-Klonen RNAs von vier analysierten Gene generiert (*Apex1*, *Lig1*, *Lig3* und *Mbd2*). Auch hier wurden verschiedene Anzahlen an Wiederholungsexperimenten mit 1000, 100, 10, einer und keiner RNA-Kopie(n) durchgeführt. Ein genspezifisches Produkt wurde in allen Experimenten mit 1000 bzw. 100 RNA-Kopien detektiert. Bei den Experimenten mit 10 RNA-Kopien war ein Nachweis von genspezifischen Produkten in 68 bis 89% (Durchschnitt: $78,6\% \pm 7,3\%$) der Fälle möglich, wohingegen dies in Experimenten mit einer RNA-Kopie in nur 4 bis 24% (Durchschnitt: $14,2\% \pm 6,9\%$) der Experimente der Fall war (siehe Tabelle 3.1). Die entsprechenden Wasserkontrollen waren immer negativ. Dabei ist zu beachten, dass bei einer RNA-Verdünnung auf durchschnittlich eine RNA-Kopie in annähernd 30% der Reaktionen kein RNA-Molekül vorhanden ist. In weiteren 30% der Reaktionen können zwei oder mehr RNA-Moleküle enthalten sein. Bei einer Verdünnung auf 1-2 RNA-Kopien ergibt sich daraus eine Detektionswahrscheinlichkeit von 20%. Sind 10 RNA-Kopien vorhanden, so ergibt sich eine Detektion in circa 80% der Fälle. Sind 100 oder mehr RNA-Kopien vorhanden, werden diese in 100% der entsprechenden Experimente detektiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis zu 10 RNA-Kopien verlässlich nachgewiesen werden können.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Experimente zur Validierung der Primersensitivität mittels per *in vitro*-Transkription hergestellten RNAs.

Gen	Prozentwerte der RT-PCR-Experimente mit entsprechendem Genprodukt							
	1 RNA-Kopie		10 RNA-Kopien		100 RNA-Kopien		1000 RNA-Kopien	
pAW109	19%	(9/52)	89%	(16/18)	100%	(8/8)	100%	(8/8)
<i>Apex1</i>	24%	(10/42)	68%	(17/25)	100%	(16/16)	100%	(14/14)
<i>Lig1</i>	11%	(5/45)	73%	(8/11)	100%	(8/8)	100%	(6/6)
<i>Lig3</i>	4%	(1/24)	82%	(14/17)	100%	(6/6)	100%	(6/6)
<i>Mbd2</i>	13%	(5/39)	81%	(13/16)	100%	(8/8)	100%	(6/6)

Für die anschließende Expressionsanalyse wurde die reverse Transkription mit allen Primern des RT-Primermixes (siehe Tabelle 2.8) durchgeführt. Um die Auswertung der folgenden PCR anhand von Minigelen zu erleichtern und um die entsprechenden Gelbanden visuell gut voneinander unterscheiden zu können, wurde die PCR in zwei verschiedene Reaktionen aufgeteilt. In jeder Reaktion wurden das Referenzgen *H3f3a* sowie 8 weitere Gene bzw. Isoformen amplifiziert. In der Tabelle 2.8 sind auch die in den beiden PCR-Reaktionen enthaltenen Primer aufgelistet. Jeweils ein Fünftel bis ein Viertel des Produktes der reversen Transkription war als Startmaterial für die nachfolgenden Multiplex-PCR-Reaktionen ausreichend, so dass nur die Hälfte des Produktes für die beiden Multiplex-PCR-Reaktionen verwendet wurde.

3.2.2 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantations-embryonen

Es wurde die Expression der Gene aus Primermixtur 1 und 2 (siehe Tabelle 2.8) in mindestens 20 individuellen Embryonen von Einzell-, Zweizell-, Vierzell- und Morula-Embryonen analysiert. Das Referenzgen *H3f3a*, das Pluripotenzgen *Pou5f1*, die DNA-Methyltransferase *Dnmt1*, das 5-methyl-CpG Bindeprotein *Mbd3*, und die BER-Gene *Apex1*, *Polb* und *Lig3* waren in allen auswertbaren Embryonen vom Zygotenstadium bis zum Morulastadium exprimiert (siehe Abb. 3.4). *Mbd1*- und *Mbd4*-Genprodukte waren in allen Zygoten detektierbar; jedoch nahm der Prozentsatz der Embryonen mit detektierbarer *Mbd1*- und *Mbd4*-Expression stetig vom Zweizell- bis zum Morulastadium ab. Das Gen *Mbd2* war in den untersuchten Präimplantationsstadien und –embryonen überwiegend nicht zu detektieren. Die Isoformen der DNA-Methyltransferase *Dnmt3a* wurden in 30 bis

60% der Embryonen vom Zygotenstadium bis zum Morulastadium exprimiert. Von der *de novo* Methyltransferase *Dnmt3b* wurde nur die Isoform 4 exprimiert. Dieser Isoform fehlt die katalytische Domäne. In der Präimplantationsentwicklung war hier eine Expression in 30 bis 80% der Embryonen zu beobachten. Die Isoform 1, welche eine Transmethylierungsdomäne enthält und in ES-Zellen vorhanden ist, und die somatischen Isoformen 2 und 3, welche eine bzw. keine Transmethylierungsdomäne besitzen, wurden postzygotisch nicht exprimiert. Maternale *Dnmt3b*-Transkripte wurden in 10% der Zygoten detektiert.

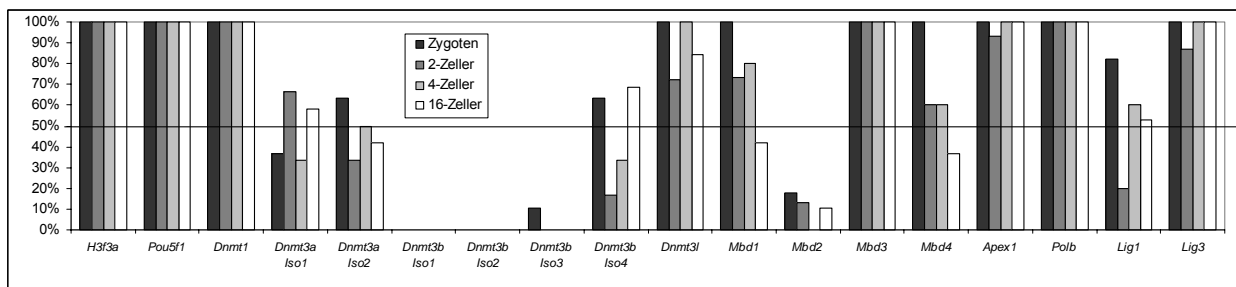


Abbildung 3.4: Genexpression relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus. Zygoten, 2-Zell-, 4-Zell- und 16-Zell-Embryonen der Maus sind durch unterschiedliche Graustufen markiert. Die Histogramme entsprechen den Prozentwerten der Embryonen, die das entsprechende Gen oder die entsprechende Isoform exprimieren. Hierbei wurden mindestens 20 Embryonen analysiert.

3.2.3 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in einzelnen Blastomeren

Für eine aussagekräftige Einzelzellanalyse wurden Expressionsprofile von 118 einzelnen Blastomeren aus 12 unterschiedlichen Morula-Embryonen bestimmt. 17 Zellen (also 14%) wiesen kein RT-PCR-Produkt auf und wurden somit von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese Zellen tatsächlich keines der 17 getesteten Gene bzw. Isoformen exprimieren, ist das Fehlen aller Transkripte eher auf technische Artefakte wie z.B. das Verlieren der Zelle während der Präparation oder einen Pipettierfehler in den nachfolgenden experimentellen Schritten zurückzuführen.

Es ist denkbar, dass die durchschnittlichen Expressionsmuster aller analysierten Blastomeren aus Morula-Embryonen (siehe Abb. 3.5 A), welche auf der Analyse von 101 einzelnen Zellen basieren, dem gemittelten Expressionsmuster ganzer Morula-Embryonen

entsprechen (siehe Abb. 3.4, weiße Balken). Die mRNAs von *H3f3a* und *Pou5f1* wurden in allen analysierten Blastomeren aus den jeweiligen Morula-Embryonen detektiert. Die Expression von *H3f3a* und *Pou5f1* korreliert somit mit den Ergebnissen die aus ganzen Embryonen gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.2.2). Vergleicht man jedoch die Expression der Gene *Dnmt1*, *Mbd3*, *Apex1*, *Polb* und *Lig3* zwischen Blastomeren und ganzen Embryonen, so sind statistisch signifikante Unterschiede festzustellen. Die entsprechenden *P*-Werte wurden mit dem exakten Fisher-Test ermittelt. Die mRNAs von *Dnmt1* ($P=0,004$), *Mbd3* ($P<0,001$), *Apex1* ($P=0,007$), *Polb* ($P=0,013$) und *Lig3* ($P=0,001$) wurden in allen 16-Zell-Embryonen aber in nur 60-80% der Blastomeren detektiert. *Dnmt3l* ($P<0,001$) wurde in annähernd 80% der Embryonen und in 40% der Blastomeren detektiert. Die Prozentwerte von *Dnmt3l*-exprimierenden Zellen bewegten sich in einem Rahmen von 0% bis 75% in den jeweils analysierten Embryonen (siehe Tabelle 7.1). Es gibt eine große Diskrepanz zwischen den Expressionswerten ganzer 16-Zell-Embryonen und den gemittelten Expressionswerten der einzelnen analysierten Blastomeren eines 16-Zell-Embryos. Dies kann man damit begründen, dass die Expression eines bestimmten Gens in nur ein bis zwei Zellen eines einzelnen Embryos ausreicht, um ein RNA-abhängiges Genprodukt dieses Embryos in einer Analyse des gesamten Embryos zu generieren. In diesem Fall wird die Expression als 100%, d.h. in dem entsprechenden Embryo als exprimiert, gewertet. Bei der Analyse der einzelnen Blastomeren wird in diesem Fall jedoch nach Mittelung der Expressionswerte der einzelnen Blastomeren des 16-Zell-Embryos eine Expression von 6 bis 13% detektiert. Somit ist ein Vergleich der gemittelten Expressionswerte einzelner Blastomeren aus 16-Zell-Embryonen mit den gemittelten Expressionswerten ganzer 16-Zell-Embryonen nur bedingt möglich.

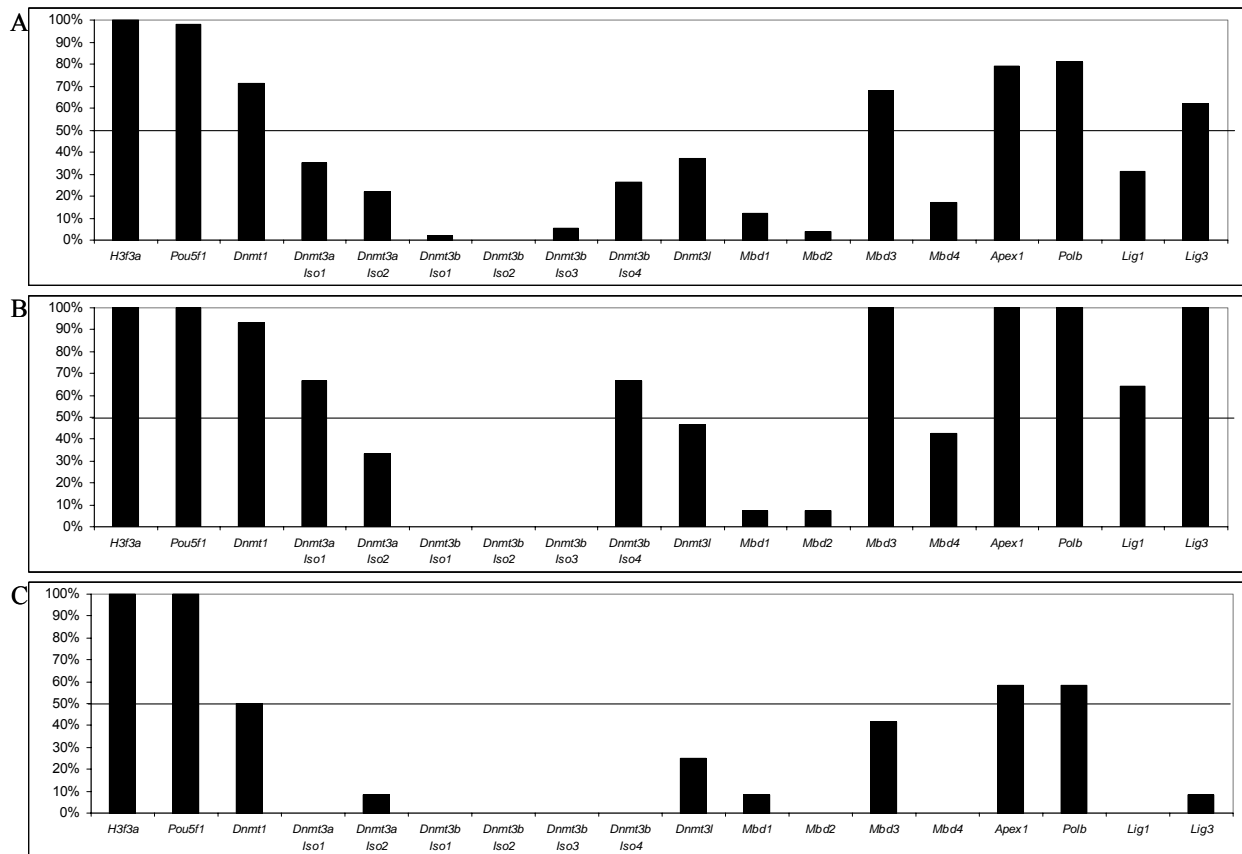


Abbildung 3.5: Genexpression relevanter Entwicklungsgene in Blastomeren von 16-Zell-Embryonen der Maus. Die schwarzen Balken entsprechen den Prozentwerten der Blastomeren, die das entsprechende Gen oder die entsprechende Isoform exprimieren. **A:** Durchschnittliche Prozentwerte aller 101 analysierten Blastomeren aus 12 unterschiedlichen Embryonen. **B:** Prozentwerte der exprimierenden Zellen des Embryos m5, von dem 14 Blastomeren analysierbar waren. In diesem Embryo konnten in den meisten Zellen entwicklungsrelevante Gene detektiert werden. **C:** Prozentwerte der exprimierenden Zellen des Embryos m10, von dem 12 Blastomeren analysierbar waren. In diesem Embryo konnten in den wenigsten Zellen entwicklungsrelevante Gene detektiert werden.

Unsere Resultate aus der Analyse einzelner Blastomeren eines 16-Zell-Embryos zeigen klar, dass die Expression von DNA- und Chromatin-modifizierenden Genen zwischen Zellen des gleichen Präimplantationsstadiums variieren kann. Um dies statistisch abzusichern, wurde das Bayes'sche Theorem verwendet (siehe Kapitel 2.10.1). Dabei wurde die Annahme einer differentiellen Expression von *Dnmt3b* Isoform 4 (Verhältniswert von $9,16E-09$), *Dnmt3l* ($4,16E-05$), *Lig3* ($4,17E-05$), *Dnmt3a* Isoform 1 (0.0001), *Lig1* (0.0011) und *Mbd3* (0.0022) in der Population der analysierten Morula-Blastomeren bestätigt (siehe Tabelle 7.1). Für *Dnmt3a* Isoform 1 ist es 10.000 mal wahrscheinlicher, dass p zwischen $[0,2,0,8]$ liegt als umgekehrt. Es ist eher nicht anzunehmen, dass *Dnmt1* (0.045), *Dnmt3a* Isoform 2 (0.279) und *Apex1* (0.924)

differentiell exprimiert werden. Überhaupt kein Hinweis für eine differentielle Expression wurde für die Gene *Mbd1* (25), *Mbd2* (390727), *Mbd4* (2.1) und *Polb* (3.2) gefunden. Dies ist natürlich auch bei den Isoformen 1 bis 3 von *Dnmt3b* der Fall, welche so gut wie nie in Blastomeren detektiert wurden, sowie bei *Pou5f1* und *H3f3a*, welche in allen Blastomeren exprimiert wurden.

3.2.4 Hauptkomponentenanalyse (PCA) zur Gruppierung der Expressionsmuster einzelner 16-Zell-Embryonen basierend auf Expressionsmuster der einzelnen Blastomeren.

Es konnten zwei unterschiedliche Typen von 16-Zell-Embryonen basierend auf dem Expressionsprofil der jeweils analysierten Blastomeren unterschieden werden. Bei der Hauptkomponentenanalyse wurde die Morula 8 aus der Analyse komplett ausgeschlossen, da nur eine einzelne Zelle des Embryos zur Verfügung stand (siehe Tabelle 7.1). Der Embryo aus Abbildung 3.5B (Morula m5 aus Abb. 3.6) exprimiert die Gene *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* Isoform 4, *Mbd3* und die BER-Gene in der Mehrzahl oder allen seiner einzelnen Zellen. Der Embryo aus Abbildung 3.5C (Morula m10 aus Abb. 3.6) zeigte hingegen nur wenige Zellen, die DNA- und Chromatin-modifizierende Gene exprimieren. Nur eine der 12 analysierten Zellen dieses Embryos wies detektierbare mRNA-Mengen der *de novo* Methyltransferase *Dnmt3a* Isoform 2 auf. Die Hauptkomponentenanalyse der Einzelzell-Expressionsprofile von 11 verschiedenen Morula-Embryonen ergab eine klare Separation der 16-Zell-Embryonen. Dabei konnten zwei Gruppen von Embryonen unterschieden werden: zum einen Embryonen, die die relevanten Entwicklungsgene bzw. Reprogrammierungsgene in den meisten Zellen exprimieren (Morula-Embryonen m1-m6) und zum anderen Embryonen, die die entsprechenden Gene nicht oder sehr selten exprimieren (Morula-Embryonen m7, m9-m12; siehe auch Abb. 3.6).

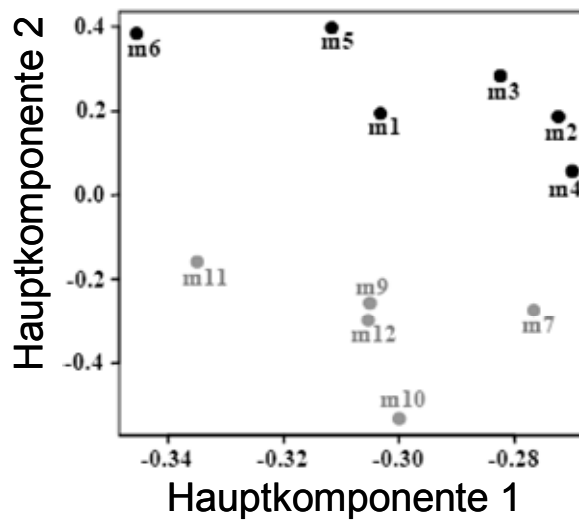


Abbildung 3.6: Grafische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse. Jeder Vektor basiert auf dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen der 15 verschiedenen mRNAs, die in die Hauptkomponentenanalyse aufgenommen wurden. Zu sehen sind zwei klar getrennte Cluster von Morula-Embryonen. Ein Cluster (hier durch schwarze Punkte gekennzeichnet) wird durch die Morulae m1-m6 repräsentiert. In diesen Embryonen werden relevante Reprogrammierungsgene in den meisten Blastomeren exprimiert. Das zweite Cluster (hier durch graue Punkte gekennzeichnet) wird durch die Morulae m7 und m9-m12 repräsentiert. In diesen Embryonen werden die analysierten Reprogrammierungsgene in den meisten Blastomeren nicht exprimiert.

3.2.5 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in einzelnen Blastomeren mittels Q-PCR.

Die Sensitivität unseres Multiplex-Ansatzes auf AmpliGrid-Objektträgern wurde mit der Sensitivität der quantitativen real-time RT PCR (Q-PCR) verglichen. Die Q-PCR wird als die sensitivste Technik zur mRNA-Detektion und -Quantifikation betrachtet, die momentan zur Verfügung steht. Für die entsprechenden Experimente wurden die drei Gene *Pou5f1*, *Dnmt3l* und *Lig3* ausgewählt. Ein Ausschluss von genomischen Produkten geschah genauso wie in unserem Multiplex-RT-PCR-Ansatz über die Wahl von entsprechenden Intron-überspannenden Primern. Des Weiteren wurde über eine Schmelztemperaturbestimmung kontrolliert, ob neben dem für das cDNA-PCR-Produkt spezifischen *peak* ein weiterer für das genomische PCR-Produkt spezifischer *peak* vorliegt. Dies war in keinem der Q-PCR-Experimente der Fall. Für die Expressionsanalyse wurde die Expression jedes Gens mittels Q-PCR in jeweils >50 Blastomeren untersucht. Für *Pou5f1* zeigten 52 von 54 analysierten Zellen (96% der Zellen) ein Amplifikationsprodukt.

Der durchschnittliche C_t -Wert betrug $33,8 \pm 2,17$ und die Schmelztemperatur (T_m) betrug $82,9^\circ\text{C} \pm 0,26$. Für das Gen *Dnmt3l* wiesen 4 der 54 analysierten Blastomeren, also 7%, ein Amplifikat auf. Der C_t -Wert betrug $36,3 \pm 0,63$, wobei ein Trennen der DNA-Stränge bei $T_m = 83,4^\circ\text{C} \pm 0,29$ gemessen wurde. *Lig3*-Produkte waren in 8 der 53 analysierten Blastomeren detektierbar, was 15% der analysierten Zellen entspricht. Hier wurden ein C_t -Wert von $36,8 \pm 1,75$ und eine Schmelztemperatur von $81,0^\circ\text{C} \pm 0,2$ gemessen. Verglichen mit *Pou5f1* weist der höhere C_t -Wert für *Dnmt3l* und *Lig3* auf eine niedrigere Zahl an Ausgangsmolekülen bzw. Transkripten in der Q-PCR-Reaktion hin.

3.2.6 Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der Genaktivität entwicklungsrelevanter Gene im späten Morulastadium

Um zu überprüfen, ob die mRNA-Expression eines spezifischen Gens in Blastomeren von 16-Zell-Embryonen mit der Genaktivität in späteren Präimplantationsstadien korreliert, wurden *whole Mount*-Immunfluoreszenzfärbungen für die entsprechenden Proteine durchgeführt. Dazu wurden 40 bis 60-Zell-Embryonen verwendet. In allen Kontrollexperimenten, in welchen der Erstantikörper (gegen DNMT3A, MBD3, APEX1 oder POLB) weggelassen wurde, zeigten alle Morula-Blastomeren ein Fehlen der Immunfluoreszenzfärbung. Ein monoklonaler Antikörper gegen beide DNMT3A-Isoformen der Maus produzierte eine punktierte nukleäre Färbung, wobei heterochromatische Chromozentren ausgelassen wurden. Hierbei wurden 110 von 168 Zellen, also 65,5% der analysierten Blastomeren aus späten Morula-Embryonen spezifisch gefärbt (siehe Abb. 3.7A). Die Prozentwerte der DNMT3A-positiven Zellkerne in den fünf analysierten Embryonen waren 47%, 62%, 70%, 92% und 95%. Bei Immunfluoreszenzfärbungen mit dem polyklonalen Antikörper gegen das humane MBD3 wurden alle 106 Kerne von drei verschiedenen Embryonen gefärbt. Nur die Intensität der Immunfluoreszenzfärbung variierte zwischen den einzelnen analysierten Embryonen. Zu beobachten war auch, dass das durch DAPI intensiver gefärbte Heterochromatin im Vergleich zum Euchromatin eine stärkere Immunfluoreszenzfärbung aufwies (siehe Abb. 3.7B). Die Immunfluoreszenzfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper gegen die humane Variante von APEX1 färbten das Zytoplasma und die Zellkerne homogen (Daten nicht gezeigt). Hierbei waren in 5 analysierten Embryonen 99 der 106 Blastomeren, also 93%, positiv. Zwei Morula-Embryonen wiesen in 79% bzw. 89% der Fälle APEX1-positive Blastomeren auf. Die restlichen drei Embryonen waren in 100% der Blastomeren

APEX1-positiv. Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen das humane POLB-Protein ergab eine homogene Kernfärbung und eine schwache Färbung im Zytoplasma. In 5 analysierten Embryonen zeigten 106 von 109 Blastomeren, also 97%, eine positive Immunfluoreszenzfärbung.

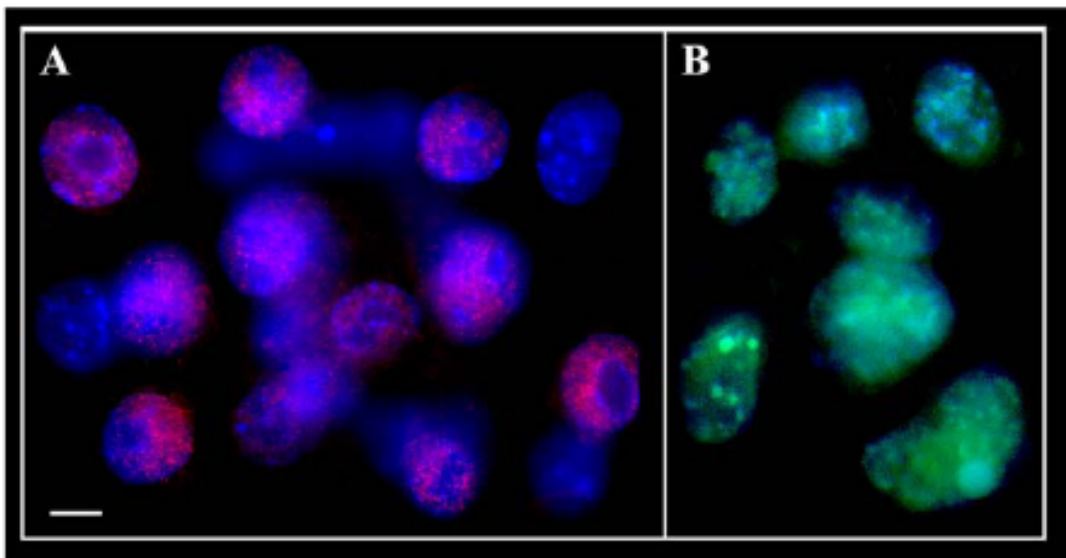


Abbildung 3.7: Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung von Präimplantationsembryonen des späten Morulastadiums. A: Teil eines Embryos, in dem das DNMT3A-Protein (Texas-Red, rot) nachgewiesen wurde. In den meisten, aber nicht allen Zellkernen ist eine punktierte Kernfärbung erkennbar **B:** Teil eines Embryos, in dem das MBD3-Protein (FITC, grün) nachgewiesen wurde. Hier ist eine starke Bindung des Antikörpers in heterochromatischen Bereichen zu beobachten. Die Gegenfärbung der Zellkerne in A und B wurde mit DAPI durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in frühen Mausembryonen

Bislang gibt es nur eine Studie, die die Replikationsmuster verschiedener geprägter und nicht geprägter Loci in Präimplantationsembryonen (Einzell- sowie Acht- bis 16-Zell-Embryonen) der Maus untersucht hat (Simon *et al.*, 1999). Um ein genaueres Bild der Replikationsmuster in der frühen Mausentwicklung, insbesondere in Verbindung mit den stattfindenden epigenetischen Reprogrammierungsereignissen (siehe Kapitel 1.3) zu erhalten, wurden in der vorliegenden Studie die Replikationsmuster von vier geprägten und fünf nicht geprägten Chromosomenregionen in einer großen Anzahl (siehe auch Abb. 3.2) von Zygoten und Blastomeren aus Zweizell-, Vierzell-, Achtzell-, Morula-Embryonen sowie Mausembryofibroblasten (MEFs) analysiert. Als Ergebnis dieser Studie konnte zum ersten Mal überhaupt gezeigt werden, dass geprägte wie auch nicht geprägte Gene in der Maus direkt nach der Befruchtung asynchron replizieren.

4.1.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf Interphasezellkernen

Um das Replikationsverhalten geprägter Gene in frühen Mausembryonen analysieren zu können, ist die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) die Methode der Wahl. Replikationsstudien, die auf anderen zur Verfügung stehenden Methoden wie z.B. der Zellzyklus-Fraktionierung aufbauen, können fehlerhaft sein, da der Zeitpunkt während der S-Phase, an dem die Replikation an einem bestimmten Locus initiiert wird, sehr stark von Zelle zu Zelle variieren kann. Aufgrund dieser starken Variation kommt es zu einer erheblichen Überlappung des Replikationsmusters des zu untersuchenden Locus in den einzelnen S-Phase-Fractionen, die mittels Durchflusszytometrie gewonnen wurden (Simon *et al.*, 1999). Dies erklärt möglicherweise auch, warum mittels Durchflusszytometrie nach Separation der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, die asynchrone Replikation an verschiedenen Stellen des *Igf2-H19*-Lokus in somatischen Zellen nicht detektiert werden konnte (Kawame *et al.*, 1995). Dieser entscheidende Nachteil tritt bei der Analyse des Replikationsverhaltens mittels FISH nicht auf, da hier in jeder einzelnen Zelle ein klares

Replikationsmuster für den Experimentator direkt sichtbar und somit eindeutig auswertbar ist. Nichtsdestotrotz gibt es verschiedene Quellen für eine fehlerhafte Auswertung der Hybridisierungssignale bei der Replikationsanalyse mittels FISH. Eine Fehlinterpretation der Hybridisierungssignale kann dadurch bedingt sein, dass eine Separierung der Schwesterchromatiden nicht stattgefunden hat und somit früh replizierte DNA bis spät in die S-Phase hinein als ein Einzelsignal erscheint. Dadurch wird fälschlicherweise ein Locus als nicht repliziert ausgewertet. Eine fehlerhafte Auswertung ist auch möglich, wenn durch den Denaturierungsprozess die beiden komplementären DNA-Stränge der DNA-Doppelhelix in einer Chromatide von einander getrennt werden. Dies täuscht eine schon stattgefunden Replikation des entsprechenden Locus vor. Obwohl es möglich ist, dass solche Auswertungsfehler, die statistisch verteilt alle hybridisierten Proben gleich stark betreffen, feine Unterschiede im Replikationsverhalten der untersuchten Proben verwischen, können sie nicht systematische und drastische Unterschiede zwischen geprägten und nicht geprägten Regionen vortäuschen. Auch aufgrund der geringen Zahl von Präimplantationsembryonen und auswertbaren Zellkernen in den einzelnen Embryonen ist die FISH zur Analyse des Replikationsverhaltens sehr gut geeignet. Des Weiteren belegen verschiedene Studien, dass die FISH auf Interphasezellkernen besonders geeignet ist, um die Replikationszeitpunkte individueller genomischer Loci in nicht synchronisierten Zellpopulationen zu studieren (Kagotani *et al.*, 2002; Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994; Selig *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1999).

4.1.2 Asynchrone Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen in Zygoten und Zweizellembryonen der Maus

Bei der Betrachtung der Replikationsmuster geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen (siehe Abb. 3.2) fällt auf, dass in Zygoten wie auch in Zweizellembryonen alle untersuchten Regionen asynchron repliziert wurden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die asynchrone Replikation in diesen frühen Präimplantationsstadien direkt nach der Befruchtung ein generelles genomweites Phänomen darstellt und nicht auf geprägte Chromosomenregionen begrenzt ist. Erst im Vierzellstadium wiesen vier von fünf nicht geprägten Genregionen ein synchrones Replikationsmuster auf, wohingegen drei von vier geprägten Loci weiterhin asynchron repliziert wurden.

Die Beobachtung der asynchronen Replikation nicht geprägter Chromosomenregionen in Zygoten widerspricht der Studie von Simon *et al.* (Simon *et al.*,

1999), die zeigte, dass nicht geprägte Chromosomenregionen in Zygoten synchron replizieren. Diese Diskrepanz zu den in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten ist möglicherweise damit zu erklären, dass Simon *et al.* und die vorliegende Studie unterschiedliche Zeitfenster zur Analyse der Replikationsmuster während der ersten S-Phase verwendeten. Die DNA wird in der Zygote circa 21 bis 29 Stunden nach der Injektion von hCG repliziert (Bouniol-Baly *et al.*, 1997). In der Studie von Simon *et al.* (Simon *et al.*, 1999) wurden die Zygoten 20 bis 24 Stunden nach der Hormoninjektion in der frühen S-Phase präpariert und anschließend eine weitere Stunde in BrdU-haltigem Kulturmedium inkubiert. Für die hier beschriebenen Experimente wurden hingegen Zygoten 22 bis 26 Stunden nach der Hormoninjektion präpariert, was mit der Mitte der ersten S-Phase korreliert. Zur Diskrepanz trägt zudem möglicherweise noch die Tatsache bei, dass Simon *et al.* *in vitro* kultivierte Acht- bis 16-Zell-Embryonen analysierten. In der vorliegenden Studie wurden hingegen Blastomeren von *ex vivo* Zweizell-, Vierzell-, Achtzell- und Morula-Embryonen sowie MEFs von 12,5 dpc alten Mausembryonen analysiert. Die Zygoten und Embryonen wurden nicht kultiviert, da die Embryokulturbedingungen die Methylierungsmuster und Expressionsmuster geprägter Gene verändern können (Doherty *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 2001) und daher möglicherweise auch die Replikationsmuster beeinflussen. Überdies verwendeten Simon *et al.* (Simon *et al.*, 1999) als FISH-Proben Plasmid-, Phagen-, Cosmid-, P1-, BAC- und YAC-Klone, wohingegen bei den Experimenten der vorliegenden Studie ausschließlich auf BAC-Klone zurückgegriffen wurde, die im Interphase-FISH-*Assay* sehr klare Signale lieferten. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Auswertung der Signale des Interphase-FISH-*Assays* sehr stark von den verwendeten Hybridisierungsproben sowie von der subjektiven Interpretation der Hybridisierungssignale durch den Experimentator abhängig ist. Mit Ausnahme des β -Globin-Lokus wurden in beiden Studien unterschiedliche nicht geprägte Chromosomenregionen analysiert. Das Replikationsverhalten einer nicht geprägten Chromosomenregion ist möglicherweise auch von dem Sequenzkontext abhängig, in dem sich die Region befindet. Als Beispiel hierfür kann auch das Replikationsverhalten der in der vorliegenden Studie verwendeten genfreien nicht geprägten Chromosomenregionen dienen. Hierbei zeigte der genfreie BAC RP24-269E24 im Vergleich zu dem genfreien BAC RP23-460N10 eine eher graduelle Transition von einer asynchronen zu einer synchronen Replikation nach der Befruchtung.

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten in Zygoten stimmen hingegen sehr gut mit Daten aus mehreren Studien überein, in denen durch Fluoreszenzmarkierung

von replizierender DNA gezeigt wurde, dass in der Mauszygote jeder Pronukleus seinem eigenen Replikationsmuster folgt (Aoki und Schultz, 1999; Bouniol-Baly *et al.*, 1997; Ferreira und Carmo-Fonseca, 1997). In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass in der Mauszygote das paternale Genom vor dem maternalen Genom in die S-Phase eintritt und diese auch vor dem maternalen Genom beendet. Demnach ist nicht nur für geprägte Chromosomenregionen sondern auch für nicht geprägte Chromosomenregionen in Zygoten von einer asynchronen Replikation auszugehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen deutlich, dass geprägte, nicht geprägte sowie genfreie Chromosomenregionen in Zygoten und Zweizell-Embryonen asynchron repliziert werden. Diese Daten unterstützen neben den Daten aus den oben genannten Studien die Ansicht, dass die asynchrone Replikation in diesem frühen Entwicklungsstadium Unterschiede in der Chromatinorganisation und/oder in der Funktion zwischen den beiden parental Genomen während der frühen Embryogenese widerspiegelt. Auch scheint es, dass die asynchrone Replikation zumindest in diesem frühen Entwicklungsstadium der Maus nicht notwendigerweise mit geprägten Chromosomenregionen verknüpft ist. Die beiden parental Genomanteile weisen in Einzell- und Zweizell-Embryonen der Maus drastische Methylierungsunterschiede auf (Mayer *et al.*, 2000a; Santos *et al.*, 2002). Des Weiteren ist eine räumliche Separation der beiden parental Genome in diesen beiden Präimplantationsstadien der Maus beobachtet worden (Mayer *et al.*, 2000b; Merico *et al.*, 2007). Man kann daher postulieren, dass die asynchrone Replikation eine weitere Komponente dieser auffälligen funktionellen Asymmetrie zwischen den beiden parental Genomen ist, die bis zum Zweizellstadium aufrechterhalten wird und anschließend graduell (siehe Kapitel 4.1.3) verschwindet. Die abrupte Transition der asynchronen Replikation zur synchronen Replikation nicht geprägter Chromosomenregionen suggeriert einen aktiven Prozess und überschneidet sich mit der transkriptionellen Aktivierung des embryonalen Genoms (Latham *et al.*, 1991; Schultz, 1993; Worrada *et al.*, 1994) im Zweizell-Embryo der Maus. Eine Transition zur synchronen Replikation nicht geprägter Chromosomenregionen ab dem Zweizellstadium würde, im Hinblick auf die biallelische Expression von *Housekeeping*-Genen nach der Aktivierung des embryonalen Genoms, Sinn machen.

4.1.3 Dynamische Regulation der asynchronen Replikation geprägter und nicht geprägter Chromosomenregionen

Die untersuchten nicht geprägten wie auch die untersuchten geprägten Chromosomenregionen wiesen in Zygoten und Zweizell-Embryonen eine asynchrone Replikation auf. Nicht geprägte Chromosomenregionen zeigten in diesen beiden Stadien sogar eine höhere asynchrone Replikationsrate als geprägte Chromosomenregionen. Eine synchrone Replikation mit unter 25% asynchron replizierenden Zellkernen war für nicht geprägte Chromosomenregionen erst nach dem Zweizell-Embryostadium zu beobachten und wurde von diesem Zeitpunkt an aufrechterhalten. Eine für nicht geprägte Chromosomenregionen unerwartet hohe asynchrone Replikationsrate von über 25% wurde hingegen mit dem für den β -Globin-Lokus spezifischen BAC in Morula-Embryonen und MEFs nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1.4 und Abb. 3.2G). Da dieser BAC nicht nur den β -Globin-Lokus enthält, sondern über 50% der Insert-DNA OR-Gene kodieren, kann die erhöhte asynchrone Replikationsrate möglicherweise durch die klonale Etablierung der allespezifischen Replikation der OR-Gene, welche in der späten Präimplantationsphase stattfindet, erklärt werden (Chess *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den nicht geprägten Chromosomenregionen wurde die asynchrone Replikation aller untersuchten geprägten Chromosomenregionen direkt nach der Befruchtung etabliert und während der gesamten Präimplantationsentwicklung aufrechterhalten (siehe Abb. 3.2A, B, C und D). Eine asynchrone Replikation von *Snrpn* wurde auch schon in einer früheren Studie in Zygoten und Acht- bis 16-Zell-Embryonen sowie auch in MEFs beobachtet (Simon *et al.*, 1999). Einige geprägte Chromosomenregionen zeigten jedoch eine dynamische Regulation der asynchronen Replikation, die durch das Vorliegen von synchronen Replikationsmustern in einzelnen Präimplantationsstadien gekennzeichnet war. Teilweise ist das synchrone Replikationsmuster, wie es z.B. bei *Snrpn* im Zweizellstadium zu beobachten war, mit statistischen Schwankungen zu erklären, da hier der Unterschied der asynchronen Replikationsrate zu anderen Präimplantationsstadien nicht signifikant war (siehe Kapitel 3.1.3). Für einige geprägte Gene wurde jedoch auch eine signifikante Relaxation der asynchronen Replikation in bestimmten Präimplantationsstadien nachgewiesen. So wurde für den *Dkl1/Gtl2*-Lokus auf Mauschromosom 12F1 ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Replikationsmuster zwischen Morula- und Achtzell-Embryonen festgestellt. Dieser signifikante Unterschied deutet darauf hin, dass das Vorliegen von synchronen Replikationsmustern in Morula-Embryonen einen funktionellen Hintergrund hat. Der

Igf2r-Lokus auf Mauschromosom 17A1 zeigte ähnlich wie der *Dlk1/Gtl2*-Lokus ebenfalls eine scheinbar synchrone Replikation in Morula-Embryonen. Die Wiederholungsexperimente auf Morula-Blastomeren (siehe Kapitel 3.1.3 unten) ergaben für den *Dlk1/Gtl2*-Lokus und *Igf2r*-Lokus erneut ein synchrones Replikationsmuster. Auch wenn für *Igf2r* der Unterschied der asynchronen Replikation im Vergleich zu den anderen Präimplantationsstadien nicht signifikant war, kann auch hier aufgrund des synchronen Replikationsmusters im Wiederholungsexperiment ein funktioneller Hintergrund für die Relaxation der asynchronen Replikation in Morula-Embryonen vermutet werden. *Zim1* und *Peg3* zeigten hingegen in Achtzell-Embryonen ein synchrones Replikationsmuster, das sich auch im Wiederholungsexperiment bestätigte. Somit scheint für die chromosomale Region von *Zim1* und *Peg3*, welche von dem BAC RP23-429C4 abgedeckt wird, das asynchrone Replikationsmuster in Achtzellern relaxiert zu sein. Dabei war der Unterschied im Replikationsverhalten im Vergleich zu Morula-Embryonen signifikant, aber im Vergleich zu Vierzell-Embryonen nicht signifikant, so dass hier weitere Hybridisierungsexperimente nötig sind, um eine klare Aussage treffen zu können. Neben einem funktionellen Hintergrund für die Relaxation der asynchronen Replikation in Blastomeren von Morula-Embryonen könnte eine weitere Erklärung sein, dass die 100 bis 200 kb große Sequenz des BAC-Inserts benachbarte Replikons enthält, die gelegentlich ihr Replikationsmuster während der Präimplantationsentwicklung koordinieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter BAC eine Replikationsgrenze (oder benachbarte ORI – *origin of replication*) überspannt, ist jedoch sehr gering. Die Veränderungen im Replikationsmuster über bekannte Replikationsgrenzen hinweg sind gewöhnlich moderat (Selig *et al.*, 1992).

4.1.4 Speziesunterschiede in der frühen Präimplantationsphase

Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der asynchronen Replikation des paternalen und maternalen Genoms im frühen Säugerembryo um ein Relikt der Radiation der Säuger handelt. Die Genomreplikation in den Embryonen von *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* ist durch eine schnelle Zellteilung charakterisiert und unterliegt keiner fixierten zeitlichen und/oder räumlichen Ordnung (Blumenthal *et al.*, 1974; Callan, 1974). Im Vergleich hierzu ist die DNA-Synthese im frühen Säugerembryo zeitlich und räumlich hoch koordiniert. Es sind aber signifikante Unterschiede in der Genomreplikation sowie der genomweiten epigenetischen Reprogrammierung zwischen

einzelnen Säugerspezies zu beobachten. In der Mauszygote wird der paternale Pronukleus etwas früher als der maternale Pronukleus repliziert (Aoki und Schultz, 1999; Bouniol-Baly *et al.*, 1997; Ferreira und Carmo-Fonseca, 1997). Andere Säugerspezies zeigen bei der asynchronen Replikation eine umgekehrte Reihenfolge oder sogar eine perfekte synchrone Replikation der beiden parentalen Pronuklei (Laurincik *et al.*, 1995; Naish *et al.*, 1987). Die transkriptionelle Genomaktivierung im frühen Säugerembryo findet bei der Maus im Zweizell-, beim Schwein im Vierzell-, beim Menschen im Vierzell- bis Achtzell-Embryostadium sowie beim Kaninchen und Rind im Achtzell- bis 16-Zell-Embryostadium statt (Kanka, 2003; Manes, 1973; Memili und First, 2000; Schultz, 1993). Vergleicht man die Demethylierung des Genoms kurz nach der Befruchtung zwischen verschiedenen Säugerspezies (siehe Kapitel 1.3 und Abb. 1.3B), zeigt sich, dass das Oozytenzytoplasma der Maus die größte Demethylierungsaktivität aufweist. Eine mittlere Demethylierungsaktivität ist in Rindern und beim Menschen zu beobachten, während beim Schaaf und Kaninchen im Vergleich zu den anderen genannten Säugerspezies die Demethylierungsaktivität des Oozytenzytoplasmas am geringsten ist (Beaujean *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2000a; Shi *et al.*, 2004). Des Weiteren variiert auch der Zeitpunkt der Etablierung der somatischen Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Säugerspezies. In Rinderembryonen ist eine deutliche *de novo* Methylierung bereits im Acht- bis 16-Zellstadium zu beobachten, wohingegen in Mausembryonen die Remethylierung und somit die Etablierung der somatischen Methylierungsmuster erst im Blastozystenstadium bei der Etablierung der ersten zwei Zelllinien beginnt (Dean und Ferguson-Smith, 2001).

4.1.5 Relation zwischen der Replikation und dem Transkriptionsstatus eines Lokus

Obwohl es keine strikte Korrelation zwischen den Replikationszeitpunkten und der Transkription eines Lokus gibt, wird die asynchrone Replikation generell als ein Mechanismus betrachtet, der eine allelische Inaktivierung bzw. allelische Aktivierung reflektiert (Cerrato *et al.*, 2003; Chess *et al.*, 1994; Kagotani *et al.*, 2002; Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994; Mostoslavsky *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 1999; Takagi, 1974). Es wird angenommen, dass Gene und Chromosomenregionen, welche in der ersten Hälfte der S-Phase repliziert werden, ein höheres Transkriptionspotential besitzen, wohingegen Sequenzen, welche in der zweiten Hälfte der S-Phase repliziert werden, konstitutiv oder

epigenetisch reprimiert sind (Gilbert, 2002; Hatton *et al.*, 1988). *Snrpn* wird schon ab dem Vierzell-Embryostadium und fortan während der gesamten Ontogenese in allen Geweben und Zelltypen monoallelisch exprimiert (Kitsberg *et al.*, 1993a; Szabo und Mann, 1995), was mit dem früh etablierten asynchronen Replikationsmuster korreliert. Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Replikationsdaten, können somit als ein Beispiel für die Etablierung der relevanten epigenetischen Signale für die monoallelische Expression zum Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung dienen. Diese Signale werden auch während der genomweiten De- und Remethylierungsereignisse aufrechterhalten. Über die Expression von *Zim1* und *Peg3* in frühen Embryonen sind keine Daten vorhanden (Quelle: Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>). In späteren Stadien ist für *Zim1* und *Peg3* eine strikte monoallelische Expression zu beobachten (Kim *et al.*, 1999). *Dlk1* und *Gtl2* werden nicht in detektierbaren Mengen während der Präimplantationsentwicklung exprimiert. Eine detektierbare Expression von *Dlk1* und *Gtl2* ist erst in 9,5 dpc bzw. 8,5 dpc alten Embryonen zu beobachten. Hierbei finden sich Hinweise auf eine biallelische Expression in bestimmten Geweben (da Rocha *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2000). *Igf2r* wird während der Präimplantationsentwicklung zuerst biallelisch exprimiert und zeigt in späteren Entwicklungsstadien eine monoallelische Expression (Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994). Die Tatsache, dass *Igf2r* während der Präimplantationsentwicklung biallelisch exprimiert wird, unterstützt die Beobachtung, dass die epigenetische Etablierung der asynchronen Replikation unabhängig vom Expressionsstatus eines geprägten Gens ist (Kitsberg *et al.*, 1993a; Knoll *et al.*, 1994). Es werden somit weitere epigenetische Ereignisse in späteren Entwicklungsstadien benötigt, um die monoallelische Expression zu etablieren (Szabo und Mann, 1995). Demnach scheint der Replikationszeitpunkt eher mit dem Transkriptionspotential als mit der Transkriptionsaktivität zu korrelieren. Dynamische Veränderungen der Replikationsmuster (siehe Kapitel 4.1.3) erleichtern möglicherweise Änderungen in der Genexpression während der Differenzierung und Entwicklung (Aladjem, 2007; Lucas und Feng, 2003). Die in der vorliegenden Studie beobachteten leichten bis gravierenden Änderungen der asynchronen Replikation mancher geprägter Gene während der Präimplantationsentwicklung spiegeln möglicherweise funktionelle Änderungen wider, welche die Transkription und/oder Chromatinorganisation involvieren. Die Assoziation zwischen später Replikation und transkriptionell inaktivem Chromatin scheint in Eukaryoten konserviert zu sein. Dies kann als ein guter Indikator für eine funktionelle Signifikanz der entsprechenden Replikationszeitpunkte während der S-Phase betrachtet

werden. Die dynamische Regulation der Replikationszeitpunkte während der Entwicklung wird wahrscheinlich durch epigenetische Mechanismen gesteuert. Der kausale Zusammenhang zwischen den Replikationszeitpunkten und anderen Prozessen im Zellkern wie z.B. der Transkription und dem Umbau des Chromatins muss jedoch noch vollständig geklärt werden. Änderungen der Replikationszeitpunkte auf dem Niveau individueller Gene, Chromosomenregionen oder gar ganzer Genome sind möglicherweise der Grund und/oder die Konsequenz der räumlichen und/oder zeitlichen Konflikte zwischen der Replikation, Transkription und Chromatinstruktur (Aladjem, 2007; Lucas und Feng, 2003).

4.2 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen und einzelnen Blastomeren der Maus mittels Multiplex RT-PCR

Die Blastomeren im Präimplantationsembryo müssen die Pluripotenz während der ersten Furchungsteilungen des Embryos wiederherstellen. Da molekulare Ereignisse wie z.B. die Aktivierung eines bestimmten Gens möglicherweise große Unterschiede zwischen einzelnen Zellen aufweisen, sind zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen des Reprogrammierungsprozesses nach der Befruchtung Expressionsanalysen auf dem Niveau einzelner Zellen bzw. Blastomeren nötig.

4.2.1 Techniken zur Analyse der Genexpressionsprofile einzelner Zellen

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Analyse von einzelnen embryonalen Zellen mittels RT-PCR (Q-PCR) schwierig ist (Hartshorn *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2005; Krüssel *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Wrenzycki *et al.*, 2001). Die Analyse von Oozyten und Zygoten, in denen sich eine noch relativ große Menge an maternaler mRNA befindet, bildet hierbei eine Ausnahme. Überdies kann mit dem Q-PCR-Ansatz nur eine limitierte Anzahl von Genen in einzelnen Zellen in einem vernünftigen Zeitrahmen analysiert werden. Andererseits wurden verschiedene Protokolle zur genomweiten Expressionsanalyse von Einzelzellen publiziert. Diese Studien, die u.a. Oligonukleotid-Microarrays zur genomweiten Expressionsanalyse verwendeten, gehen davon aus, dass die exponentielle Amplifikation oder die viele Zyklen umfassende lineare cDNA-Amplifikation einzelner Zellen die relativen Expressionsverhältnisse individueller Transkripte nicht verändern (Hartmann und Klein, 2006; Iscove *et al.*, 2002; Kurimoto *et al.*, 2006). Globale RT-PCR-Ansätze können mehrere Mikrogramm cDNA von einzelnen

Zellen oder Embryonen liefern. Damit ist es möglich, eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Genen zu analysieren. Obwohl mehrere Studien unter Einsatz dieses globalen RT-PCR-Ansatzes eine biologische Variation zwischen individuellen Embryonen beobachteten, wurden trotz ausreichenden cDNA-Mengen nur für wenige Gene quantitative Expressiondaten erhoben (Metcalf *et al.*, 2003; Metcalf *et al.*, 2004). Eine weitere Amplifikationstechnik, die sogenannte *Multiple displacement amplification* (MDA), funktioniert unter Verwendung der phi29-DNA-Polymerase. Hierbei handelt es sich um eine isothermale Amplifikationstechnik, die nicht auf der PCR-Methode basiert. Mit dieser Methode ist eine verlässliche und effiziente Amplifikation eines gesamten Genoms möglich (Panelli *et al.*, 2006). Sie wurde zur Amplifikation der Genome einzelner Spermien (Jiang *et al.*, 2005) sowie einzelner Blastomeren (Renwick *et al.*, 2006) verwendet. Mit einigen Modifikationen kann die MDA-Technik auch zur repräsentativen Amplifikation von cDNA verwendet werden (Wang *et al.*, 2004). Auch wenn eine repräsentative Amplifikation von cDNA aus Einzelzellen möglich ist und eine entsprechende Sensitivität durch Verwendung verschiedenster Amplifikationstechniken erreicht wird, bleiben Microarray-Analysen relativ kosten- und zeitaufwändig. Aus diesen Gründen sind sie nicht für eine schnelle Analyse einer großen Anzahl von Einzelzellen geeignet.

Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten AmpliGrid-Technologie ist eine Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms nicht nötig. Die reverse Transkription läuft in einem Reaktionsvolumen von einem Mikroliter ab. Anschließend werden Multiplex-RT-PCR-Reaktionen mit einer cDNA-Verdünnung durchgeführt (siehe Kapitel 2.6 und Abb. 3.3). Das Produkt der reversen Transkription, welches von einer einzelnen Zelle generiert wurde, reicht aus, um circa 40 verschiedene Gene bzw. Transkripte in 4-5 Multiplex-RT-PCR-Reaktionen qualitativ zu analysieren. Der zeitaufwändigste Schritt ist die Entwicklung sowie die Testung der Oligonukleotidprimer für die Multiplex-RT-PCR-Reaktion. Sind die Oligonukleotidprimer hierfür etabliert, ist eine schnelle Analyse von Einzelzellen im Hochdurchsatz bei Verwendung von Standardlabormaterialien gewährleistet.

4.2.2 Verlässlichkeit der Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus

Obwohl der in dieser Studie etablierte experimentelle Ansatz nur qualitative Daten produziert, kann er aussagekräftige Expressionsprofile einzelner Präimplantationsembryonen und einzelner Morula-Blastomeren liefern. Verschiedene Primerpaare des Multiplex-RT-PCR-Ansatzes, welche die gleiche Sensitivität in RNA-Verdünnungsreihen aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3.1), zeigten unterschiedliche Ergebnisse zwischen einzelnen Blastomeren oder Embryonen (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3). Zum Beispiel wurde *Mbd2* in 10%, *Lig1* in ungefähr 50% sowie *Lig3* und *Apex1* in 100% der analysierten 16-Zell-Embryonen detektiert. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die beobachtete Expressionsvariabilität zwischen einzelnen Blastomeren oder ganzen Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums der Realität entspricht.

In den Kontrollexperimenten zeigten alle untersuchten Gene bei Vorhandensein von 100 Transkripten ein detektierbares Genprodukt. Dies war in circa 80% der Experimente der Fall, wenn 10 Transkripte als Ausgangsmaterial vorlagen (siehe 3.2.1 und Tabelle 3.1). Daraus lässt sich schließen, dass bei Vorhandensein einer mRNA-Bande auf dem Polyacrylamidgel die analysierte Zelle bzw. der analysierte Embryo mindestens 10 RNA-Kopien enthält. Fehlt die entsprechende mRNA-Bande, so wurde das untersuchte Gen entweder gar nicht oder nur in sehr geringem Maße, also in Form von weniger als 10 RNA-Kopien, transkribiert. Natürlich wird das Vorhandensein oder Fehlen eines Genproduktes in einer bestimmten Zelle oder einem bestimmten Embryo auch durch technische Limitierungen beeinflusst. Experimentelle Schwankungen und stochastische Prozesse der Genexpression können die Ergebnisse ebenfalls stören. Die hier gewonnenen Ergebnisse werden durch vorherige Studien in verschiedenen Spezies (Hartmann und Klein, 2006; Hartshorn *et al.*, 2005; Iscove *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2005; Krüssel *et al.*, 1998; Kurimoto *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Metcalfe *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007; Wrenzycki *et al.*, 2001) unterstützt. Die in den Experimenten beobachtete Heterogenität in der Expression der Gene *Dnmt3a* Isoform 1, *Dnmt3b* Isoform 4, *Dnmt3l*, *Mbd3*, *Lig1* und *Lig3* (siehe Kapitel 3.2.3 und 4.2.4) zwischen einzelnen Blastomeren oder auch ganzen Embryonen ist aber nicht einfach durch methodische Artefakte, sondern durch biologische Prozesse bedingt.

Vergleicht man die Expressionsdaten, die mittels Q-PCR aus einzelnen Blastomeren gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.2.5) mit den Daten aus dem Multiplex-RT-PCR-Ansatz (siehe Kapitel 3.2.3), so exprimierten 96% (Q-PCR) bzw. 100% (Multiplex-RT-PCR) der Blastomeren *Pou5f1*, 15% bzw. 63% *Lig3* und 7% bzw. 37% *Dnmt3l*. Somit konnte auch mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten qualitativen Multiplex-Ansatz auf Einzelzellen eine mindestens so hohe Sensitivität erreicht werden wie mit Hilfe der Q-PCR. Jedoch konnten nur mit dem Multiplex-RT-PCR-Ansatz viele relevante Reprogrammierungsgene gleichzeitig analysiert werden.

Viele Studien, in denen die Daten aus *gepoolten* Proben gewonnen wurden, sind möglicherweise fehlerhaft, da in einem Pool mehrerer Embryonen drastische Veränderungen in der Genexpression einzelner Zellen oder einzelner Embryonen überdeckt werden können. Die in dieser Studie etablierte Technik hingegen kann diese Nachteile umgehen, weil für ausgewählte Gene die relative Expression (siehe Kapitel 3.2.5) sowie die Variabilität der Expression zwischen Zellen und/oder Embryonen bestimmt werden kann.

4.2.3 Expressionsanalyse relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von 17 für die frühe Embryonalentwicklung wichtigen Genen bzw. Isoformen in individuellen Maus-Präimplantationsembryonen vom Zygoten- bis zum Morulastadium (siehe Kapitel 3.2.2) sowie in einzelnen Blastomeren aus Morula-Embryonen (siehe Kapitel 3.2.3) analysiert.

RNA-abhängige Produkte der Histonvariante *H3f3a* und des Transkriptionsfaktors *Pou5f1* konnten in allen analysierten Präimplantationsembryonen sowie in allen Morula-Blastomeren detektiert werden. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Expression des Referenzgens *H3f3a* stimmt mit einer weiteren Studie überein, in der das korrespondierende Protein mittels Immunfluoreszenz in Zellkernen von Embryonen verschiedener Präimplantationsstadien detektiert wurde (Torres-Padilla *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass der Pluripotenzmarker *Pou5f1* in allen Morula-Blastomeren konsistent exprimiert wurde, zeigt, dass die Pluripotenz in der Präimplantationsentwicklung sehr uniform reaktiviert wird. In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die embryonale *Pou5f1*-mRNA-Expression im Vierzell- bis Achtzell-Embryostadium beginnt und mit einer Lokalisierung des Proteins im Zellkern einhergeht, was auf dessen

biologische Relevanz schließen lässt (Liu *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 1994; Yeom *et al.*, 1991).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit früheren Studien überein, in denen *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* und *Dnmt3l* in allen Präimplantationsstadien exprimiert waren (Doherty *et al.*, 2002; Huntriss *et al.*, 2004; Ratnam *et al.*, 2002; Vassena *et al.*, 2005). Die beobachteten Expressionsmuster (siehe Kapitel 3.2.2 und Abb. 3.4) lassen vermuten, dass *Dnmt1* und *Dnmt3a* die enzymatische Aktivität für die DNA-Methylierung während der Präimplantationsentwicklung der Maus kodieren. Es wurde berichtet, dass die Isoform 1 von *Dnmt3a* in dieser frühen Phase der Entwicklung in geringen Mengen mehr oder weniger ubiquitär exprimiert wird, wohingegen die kürzere Isoform 2 präferentiell in embryonalen Stammzellen und in Geweben exprimiert wird, die einer *de novo* Methylierung unterliegen (Chen *et al.*, 2002). Die gewonnenen Expressionsdaten lassen vermuten, dass die enzymatische Aktivität von *Dnmt1* und *Dnmt3a* durch die Koexpression der *Dnmt3b*-Isoform 4 und *Dnmt3l* stimuliert wird. Es wurde berichtet, dass die DNMT3B-Isoform 4, welcher die Transmethylierungsdomäne fehlt, in pluripotenten Zellen exprimiert wird, was mit den hier vorgestellten Ergebnissen korreliert (Chen *et al.*, 2002; Weisenberger *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ist es jedoch wichtig, zu betonen, dass die Expression der einzelnen mRNAs nicht notwendigerweise mit einer funktionellen Aktivität korreliert. Dies wird sehr deutlich am Beispiel von DNMT1, welches während der gesamten Präimplantationsentwicklung exprimiert, dabei jedoch im Zytoplasma festgehalten wird. Dies führt dazu, dass die Methyltransferaseaktivität im Zellkern nicht vorhanden ist. Eine Lokalisation von DNMT1 im Zellkern ist nur im Achtzell-Embryostadium aber nicht in anderen Präimplantationsstadien beobachtet worden (Cardoso und Leonhardt, 1999; Ratnam *et al.*, 2002).

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten unterstützen auch die Annahme, dass die 5-methyl-CpG-Bindeproteine (MBDs) biologisch relevante Funktionen während der frühen Entwicklung des Mausembryos besitzen. *Mbd3* konnte in allen analysierten Präimplantationsembryonen detektiert werden. Studien mit Knockout-Mäusen zeigten, dass *Mbd3* essentiell für die normale Ontogenese der Maus ist (Hendrich *et al.*, 2001). Dieser Befund wird auch durch die hier vorgestellten Daten unterstützt, die mit *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbungen gewonnen wurden. Ein Nachweis von MBD3 war in allen der 106 analysierten Zellkerne aus drei verschiedenen Embryonen des späten Morulastadiums möglich (siehe Kapitel 3.2.6). Im Gegensatz hierzu konnte die Expression von *Mbd2* in Vierzell-Embryonen gar nicht detektiert werden. Zudem war *Mbd2* auch in

der Mehrzahl der analysierten Zygoten, Zweizell-Embryonen und 16-Zell-Embryonen nicht nachweisbar (siehe Abb. 3.4). Dazu passt die Beobachtung, dass *Mbd2*^{-/-} Mäuse lebensfähig sind (Hendrich *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2003). Die hier vorgestellten Befunde wie auch die von Hendrich *et al.* unterstützen somit die Annahme, dass es sich bei *Mbd2* nicht um eine in Zygoten aktive Demethylase handelt ((Santos *et al.*, 2002); siehe auch Kapitel 1.4). Diesen Befunden stehen jedoch Ergebnisse einer aktuellen Studie gegenüber, in der MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 in der Zygote, Zweizell-Embryonen, Achtzell-Embryonen sowie in Blastozysten detektiert werden konnten (Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2007). Bei der vorliegenden Expressionsanalyse war auch zu beobachten, dass *Mbd1* und *Mbd4* von der Zygote bis zum 16-Zell-Embryostadium in immer weniger Embryonen detektiert werden konnten. Eine plausible Erklärung hierfür ist, dass in Zygoten *Mbd1*- und *Mbd4*-mRNAs gespeichert sind, diese mit jeder Furchungsteilung nach und nach abgebaut werden und eine embryonale *Mbd1*- bzw. *Mbd4*-Transkription nicht stattfindet. Die Beobachtung, dass *Apex1*, *Polb* und *Lig3* in allen Präimplantationsstadien exprimiert werden, unterstützt die These, dass der Mechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER) für die Embryonalentwicklung notwendig ist. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass homozygote Knockout-Mäuse, denen die hier analysierten BER-Gene fehlen (siehe Kapitel 1.4 und Tabelle 1.1 A), während der Embryonalentwicklung sterben (Gu *et al.*, 1994; Puebla-Osorio *et al.*, 2006; Xanthoudakis *et al.*, 1996). Die entsprechenden Gene müssen wahrscheinlich auch relativ uniform in allen Blastomeren exprimiert werden, wie die gewonnenen durchschnittlichen Expressionsdaten in einzelnen Morula-Blastomeren sowie die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen später Morula-Embryonen (40- bis 60-Zell-Embryonen) zeigen. *Apex1* konnte hier in 79% aller analysierten Blastomeren detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse waren bei der Detektion von *Polb* zu beobachten; hier zeigten 81% der analysierten Blastomeren das entsprechende mRNA-Produkt. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für APEX1 und POLB in späten Morula-Embryonen waren insgesamt 93% (99 von 106 Blastomeren) der analysierten Blastomeren für APEX1 97% (106 von 109 Blastomeren) für das POLB-Protein positiv.

Die Expressionsdaten der analysierten Gene bzw. Isoformen, die in anderen Studien gewonnen wurden, sind auch in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

4.2.4 Variation der Expression relevanter Entwicklungsgene zwischen Morula-Blastomeren der Maus

Im Gegensatz zu *H3f3a* und *Pou5f1* variierte die mRNA-Expression der DNA- und Chromatin-modifizierenden Gene beträchtlich zwischen einzelnen Zellen des gleichen Morula-Embryos und sogar noch stärker zwischen Zellpopulationen verschiedener Morula-Embryonen (siehe Kapitel 3.2.3 letzter Abschnitt und Tabelle 7.1). Plausible Erklärungen für diese Variabilität zwischen einzelnen Zellen eines Embryos bzw. Zellpopulationen verschiedener Embryonen können sein, dass sich die analysierten Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus befunden haben, dass sie verschiedene zelluläre Funktionen ausführen und/oder sich in verschiedenen Stadien der epigenetischen Reprogrammierung (siehe Kapitel 1.3) befanden. Dabei muss beachtet werden, dass zu dem Zeitpunkt, an dem das embryonale Genom während der Präimplantationsphase reprogrammiert wird (siehe Abb. 1.3B), sich jeder Zellkern möglicherweise nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und einem gewissen Umfang in seiner Reaktivierung der Genexpression befindet.

Trotz einer gewissen Stochastik bei der Genexpression in individuellen Zellen (Levsky und Singer, 2003; Raj *et al.*, 2006) und deutlichen experimentellen Schwankungen in den Einzelzellanalysen ist es erwähnenswert, dass mit den in der vorliegenden Studie gewonnenen Expressionsprofilen einzelner Blastomeren (siehe Tabelle 7.1 und Abb. 3.5) leicht zwischen Morula-Embryonen, die *Mbd3*, DNMT- und BER-Gene in den meisten ihrer Blastomeren exprimieren, und Morula-Embryonen, in denen diese Gene in den meisten Zellen nicht aktiviert zu sein scheinen, unterschieden werden kann (siehe Kapitel 3.2.4). Hierbei kann spekuliert werden, dass die Embryonen, die einen höheren Prozentsatz von Blastomeren aufweisen, in denen die relevanten Entwicklungsgene exprimiert werden, ein höheres Entwicklungspotential besitzen als solche Embryonen, die die entsprechenden Gene in nur wenigen Blastomeren exprimieren. Diese beobachtete Separation von einzelnen Morula-Embryonen (siehe Abb. 3.6) unterstützt die Annahme, dass die analysierten Embryonen in zwei distinkte Gruppen eingeteilt werden können. Nichtsdestotrotz müssten weitere Experimente mit größeren Populationen von Blastomeren und Embryonen durchgeführt werden, um hierüber eine klare Aussage treffen zu können. Dabei müsste auch überprüft werden, ob nicht evtl. auch ein Kontinuum an Expressionsprofilen zwischen verschiedenen Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums vorherrscht, wie z.B. die Immunfluoreszenzfärbungen von DNMT3A in fünf verschiedenen Embryonen vermuten lassen (siehe Kapitel 3.2.6).

4.3 Ausblick

Es sind weitere Studien notwendig, um die entwicklungs- und gewebespezifischen Faktoren besser zu verstehen, die das temporäre Replikationsmuster bestimmter Chromosomenregionen spezifizieren. Zudem sind weitere Studien erforderlich, um die funktionelle Signifikanz von Veränderungen im Replikationsmuster zu bestimmen. Um zu klären, warum nicht geprägte Chromosomenregionen der Maus ab dem Zweizellstadium synchron repliziert werden und ob hier tatsächlich eine Verbindung zur Genomaktivierung im Zweizell-Embryo besteht, wären Replikationsstudien mit nicht geprägten Chromosomenregionen in anderen Säugerspezies von Interesse, bei denen die Genomaktivierung im Acht- bis 16-Zell-Embryostadium stattfindet (z.B. Kaninchen und Rind).

Aufgrund eines zunehmenden Bedarfs an Expressionsanalysen auf der Einzelzellebene wie z.B. von einzelnen mikromanipulierten Zellen und Zellen, die mittels Durchflusszytometrie oder per *Laser Capture Microdissection* aus größeren Zellpopulationen oder Geweben gewonnen wurden, wird die verlässliche Analyse von Einzellzellen in Verbindung mit einem Multiplex-RT-PCR-Ansatz an Bedeutung gewinnen. Hierbei können vielfältige Einsatzgebiete in Forschung und Diagnostik erschlossen werden. So wird zum Beispiel die Totipotenz in den Zellen des frühen Embryos kurz nach der Befruchtung wiederhergestellt. Nach wenigen Zellteilungen werden diese totipotenten Zellen auf bestimmte Zelllinien festgelegt. Ähnliche Prozesse treten möglicherweise während der *in vitro* Differenzierung von pluripotenten Stammzellen auf. Zur Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Ereignisse bedarf es einer systematischen Studie der Genexpressionsprofile einzelner Zellen. Des Weiteren gibt es noch kein klares Bild darüber, welche Gene in Embryonen mit einem hohen bzw. niedrigen Entwicklungspotential konsistent exprimiert bzw. fehlerhaft exprimiert werden. Um Markergene finden zu können, die das Entwicklungspotential eines Embryos widerspiegeln, ist es notwendig, Expressionsprofile einzelner Zellen von *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen sowie klonierten Embryonen zu vergleichen. Techniken wie *In vitro* Maturation, Superovulation, Kryopreservation, *In vitro* Befruchtung, Intrazytoplasmatische Spermieninjektion sowie Embryokultur und Kerntransfer finden alle zu Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung statt, in denen das Epigenom reprogrammiert wird. Dabei interferieren sie mit essentiellen Schritten der Gametogenese und frühen Embryogenese. Obwohl assistierte Reproduktionstechniken bei

Tieren und beim Menschen eine breite Anwendung finden, sind die Kenntnisse über die Effekte der Techniken auf die Genexpression in einzelnen Embryonen noch recht lückenhaft. Um die Behandlung der humanen Infertilität, sowie die *in vitro* Produktion von Tieren zu verbessern, ist ein umfangreicheres Wissen über die Variabilität der Genexpression zwischen einzelnen Zellen früher Embryonen notwendig. Hierbei ist die Analyse von Expressionsprofilen individueller Embryonen bzw. einzelner Blastomeren ein wertvolles Forschungsinstrument. Bei Verwendung von assistierten Reproduktionstechniken könnten sich, mit zunehmend mehr Wissen über die Expressionsprofile relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus, auch die Expressionsanalyse von ein bis zwei biopsierten Blastomeren, zur Beurteilung der Embryoqualität, als nützlich erweisen.

5 Zusammenfassung

Zum besseren Verständnis der epigenetischen Reprogrammierung nach der Befruchtung, wurde in der vorliegenden Studie unter Verwendung eines Interphase-FISH-Assays, eine systematische Analyse des Replikationsverhaltens geprägter (*Snrpn*, *Zim1-Peg3*, *Dlk1-Gtl2* und *Igf2r*) und nicht geprägter (*Emp1-Pbp2*, *Hbb-b1-Hbb-y*, *Opa1* und zwei genfreie Regionen) Chromosomenregionen in Präimplantationsembryonen der Maus durchgeführt. Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass geprägte wie auch nicht geprägte Chromosomenregionen direkt nach der Befruchtung asynchron replizieren. Synchron replizierten vier der fünf nicht geprägten Chromosomenregionen erst nach dem Zweizell-Embryostadium. Eine asynchrone Replikation geprägter Regionen wurde während der gesamten Präimplantationsentwicklung und in differenzierten Zellen beobachtet. Einige geprägte Genregionen zeigten eine Relaxation der asynchronen Replikation. Ob eine dynamische Regulation der asynchronen Replikation biologisch relevant ist, müssen zukünftige Studien klären. In einem weiteren Projekt konnte mit Hilfe eines Multiplex-RT-PCR-Ansatzes die sensitive Detektion von bis zu 10 Transkripten in einzelnen Zellen etabliert werden. Anschließend wurden Expressionsmuster von 17 für die epigenetische Reprogrammierung relevanten Entwicklungsgenen und Transkripten in Präimplantationsembryonen sowie in einzelnen Morula-Blastomeren analysiert. Der Transkriptionsfaktor *Pou5f1* konnte in allen Präimplantationsembryonen sowie in allen Morula-Blastomeren detektiert werden, was darauf hinweist, dass die Pluripotenz in allen Blastomeren uniform reaktiviert wird. Die mRNA-Expression verschiedener DNA-Cytosin-5-Methyltransferasen, 5-methyl-CpG-Bindeproteine sowie von Enzymen der Basenexzisionsreparatur variierte stark zwischen individuellen Zellen des gleichen Embryos und noch stärker zwischen Zellen verschiedener Embryonen. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass die Expression relevanter Entwicklungsgene zwischen individuellen Blastomeren differiert. Des Weiteren wurden Gruppen von Embryonen beobachtet, in denen die meisten der relevanten Entwicklungsgene exprimiert bzw. nicht exprimiert waren.

6 Literaturverzeichnis

- Aladjem, M.I. 2007. Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat Rev Genet.* 8:588-600.
- Aoki, A., I. Suetake, J. Miyagawa, T. Fujio, T. Chijiwa, H. Sasaki, and S. Tajima. 2001. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 29:3506-12.
- Aoki, E., and R.M. Schultz. 1999. DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. *Zygote.* 7:165-72.
- Arnaud, P., K. Hata, M. Kaneda, E. Li, H. Sasaki, R. Feil, and G. Kelsey. 2006. Stochastic imprinting in the progeny of Dnmt3L^{-/-} females. *Hum Mol Genet.* 15:589-98.
- Arney, K.L., S. Erhardt, R.A. Drewell, and M.A. Surani. 2001. Epigenetic reprogramming of the genome--from the germ line to the embryo and back again. *Int J Dev Biol.* 45:533-40.
- Ballestar, E., and A.P. Wolffe. 2001. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem.* 268:1-6.
- Barlow, D.P., R. Stoger, B.G. Herrmann, K. Saito, and N. Schweifer. 1991. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature.* 349:84-7.
- Barreto, G., A. Schafer, J. Marhold, D. Stach, S.K. Swaminathan, V. Handa, G. Doderlein, N. Maltry, W. Wu, F. Lyko, and C. Niehrs. 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature.* 445:671-5.
- Bartolomei, M.S., S. Zemel, and S.M. Tilghman. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature.* 351:153-5.
- Beaujean, N., G. Hartshorne, J. Cavilla, J. Taylor, J. Gardner, I. Wilmut, R. Meehan, and L. Young. 2004. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol.* 14:R266-7.
- Bell, A.C., and G. Felsenfeld. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature.* 405:482-5.
- Bergstrom, R., J. Whitehead, S. Kurukuti, and R. Ohlsson. 2007. CTCF regulates asynchronous replication of the imprinted H19/Igf2 domain. *Cell Cycle.* 6:450-4.
- Bestor, T.H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 9:2395-402.
- Bhattacharya, S.K., S. Ramchandani, N. Cervoni, and M. Szyf. 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature.* 397:579-83.
- Bielanska, M., S.L. Tan, and A. Ao. 2003. Chromosomal information derived from single blastomeres isolated from cleavage-stage embryos and cultured in vitro. *Fertil Steril.* 79:1304-11.
- Bird, A.P., and A.P. Wolffe. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 99:451-4.
- Blumenthal, A.B., H.J. Kriegstein, and D.S. Hogness. 1974. The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 38:205-23.
- Bouniol-Baly, C., E. Nguyen, D. Besombes, and P. Debey. 1997. Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation. *Exp Cell Res.* 236:201-11.
- Bourc'his, D., G.L. Xu, C.S. Lin, B. Bollman, and T.H. Bestor. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science.* 294:2536-9.

- Boyes, J., and A. Bird. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*. 64:1123-34.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science*. 151:417-25.
- Callan, H.G. 1974. DNA replication in the chromosomes of eukaryotes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 38:195-203.
- Cardoso, M.C., and H. Leonhardt. 1999. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol*. 147:25-32.
- Cerrato, F., W. Dean, K. Davies, K. Kagotani, K. Mitsuya, K. Okumura, A. Riccio, and W. Reik. 2003. Paternal imprints can be established on the maternal Igf2-H19 locus without altering replication timing of DNA. *Hum Mol Genet*. 12:3123-32.
- Chakalova, L., E. Debrand, J.A. Mitchell, C.S. Osborne, and P. Fraser. 2005. Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet*. 6:669-77.
- Chen, T., Y. Ueda, J.E. Dodge, Z. Wang, and E. Li. 2003. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*. 23:5594-605.
- Chen, T., Y. Ueda, S. Xie, and E. Li. 2002. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem*. 277:38746-54.
- Chess, A., I. Simon, H. Cedar, and R. Axel. 1994. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*. 78:823-34.
- Christmann, M., M.T. Tomicic, W.P. Roos, and B. Kaina. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 193:3-34.
- Cimbora, D.M., D. Schubeler, A. Reik, J. Hamilton, C. Francastel, E.M. Epner, and M. Groudine. 2000. Long-distance control of origin choice and replication timing in the human beta-globin locus are independent of the locus control region. *Mol Cell Biol*. 20:5581-91.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2:292-301.
- Cross, S.H., R.R. Meehan, X. Nan, and A. Bird. 1997. A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet*. 16:256-9.
- da Rocha, S.T., M. Tevendale, E. Knowles, S. Takada, M. Watkins, and A.C. Ferguson-Smith. 2007. Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control. *Dev Biol*. 306:810-23.
- Dean, W., and A. Ferguson-Smith. 2001. Genomic imprinting: mother maintains methylation marks. *Curr Biol*. 11:R527-30.
- Dean, W., F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf, and W. Reik. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13734-8.
- DeBaun, M.R., E.L. Niemitz, and A.P. Feinberg. 2003. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet*. 72:156-60.
- DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 64:849-59.
- Delgado, S., M. Gomez, A. Bird, and F. Antequera. 1998. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J*. 17:2426-35.
- Doherty, A.S., M.S. Bartolomei, and R.M. Schultz. 2002. Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development. *Dev Biol*. 242:255-66.

- Doherty, A.S., M.R. Mann, K.D. Tremblay, M.S. Bartolomei, and R.M. Schultz. 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.* 62:1526-35.
- Drouin, R., N. Lemieux, and C.L. Richer. 1990. Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma.* 99:273-80.
- Dünzinger, U., I. Nanda, M. Schmid, T. Haaf, and U. Zechner. 2005. Chicken orthologues of mammalian imprinted genes are clustered on macrochromosomes and replicate asynchronously. *Trends Genet.* 21:488-92.
- Epner, E., W.C. Forrester, and M. Groudine. 1988. Asynchronous DNA replication within the human beta-globin gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8081-5.
- Evans, A.R., M. Limp-Foster, and M.R. Kelley. 2000. Going APE over ref-1. *Mutat Res.* 461:83-108.
- Ferreira, J., and M. Carmo-Fonseca. 1997. Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order. *J Cell Sci.* 110 (Pt 7):889-97.
- Futscher, B.W., L.L. Blake, J.H. Gerlach, T.M. Grogan, and W.S. Dalton. 1993. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *mdr1* mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. *Anal Biochem.* 213:414-21.
- Gardiner-Garden, M., and M. Frommer. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 196:261-82.
- Gehring, M., J.H. Huh, T.F. Hsieh, J. Penterman, Y. Choi, J.J. Harada, R.B. Goldberg, and R.L. Fischer. 2006. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell.* 124:495-506.
- Gilbert, D.M. 2002. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol.* 14:377-83.
- Goldman, M.A., G.P. Holmquist, M.C. Gray, L.A. Caston, and A. Nag. 1984. Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science.* 224:686-92.
- Goll, M.G., and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 74:481-514.
- Gribnau, J., K. Hochedlinger, K. Hata, E. Li, and R. Jaenisch. 2003. Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization. *Genes Dev.* 17:759-73.
- Gu, H., J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science.* 265:103-6.
- Gunaratne, P.H., M. Nakao, D.H. Ledbetter, J.S. Sutcliffe, and A.C. Chinault. 1995. Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region. *Genes Dev.* 9:808-20.
- Haaf, T. 2000. Fluorescence in situ hybridization. *Encyclopedia of Analytical chemistry.*
- Haaf, T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 310:13-22.
- Hajkova, P., S. Erhardt, N. Lane, T. Haaf, O. El-Maarri, W. Reik, J. Walter, and M.A. Surani. 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev.* 117:15-23.
- Hand, R. 1975. Regulation of DNA replication on subchromosomal units of mammalian cells. *J Cell Biol.* 64:89-97.
- Hartmann, C.H., and C.A. Klein. 2006. Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* 34:e143.

- Hartshorn, C., A. Anshelevich, and L.J. Wangh. 2005. Rapid, single-tube method for quantitative preparation and analysis of RNA and DNA in samples as small as one cell. *BMC Biotechnol.* 5:2.
- Hata, K., M. Okano, H. Lei, and E. Li. 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development.* 129:1983-93.
- Hatton, K.S., V. Dhar, E.H. Brown, M.A. Iqbal, S. Stuart, V.T. Didamo, and C.L. Schildkraut. 1988. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 8:2149-58.
- Heard, E., P. Clerc, and P. Avner. 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet.* 31:571-610.
- Hendrich, B., and A. Bird. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 18:6538-47.
- Hendrich, B., J. Guy, B. Ramsahoye, V.A. Wilson, and A. Bird. 2001. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev.* 15:710-23.
- Henry, I., C. Bonaiti-Pellie, V. Chehensse, C. Beldjord, C. Schwartz, G. Utermann, and C. Junien. 1991. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature.* 351:665-7.
- Holm, V.A., S.B. Cassidy, M.G. Butler, J.M. Hanchett, L.R. Greenswag, B.Y. Whitman, and F. Greenberg. 1993. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics.* 91:398-402.
- Holmquist, G.P. 1987. Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression. *Am J Hum Genet.* 40:151-73.
- Horsthemke, B. 2005. Was ist Epigenetik. *Medizinische Genetik.* 17:251-253.
- Horsthemke, B., and K. Buiting. 2006. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res.* 113:292-9.
- Howell, C.Y., T.H. Bestor, F. Ding, K.E. Latham, C. Mertineit, J.M. Trasler, and J.R. Chaillet. 2001. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell.* 104:829-38.
- Huntriss, J., M. Hinkins, B. Oliver, S.E. Harris, J.C. Beazley, A.J. Rutherford, R.G. Gosden, S.E. Lanzendorf, and H.M. Picton. 2004. Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 67:323-36.
- Iscove, N.N., M. Barbara, M. Gu, M. Gibson, C. Modi, and N. Winegarden. 2002. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol.* 20:940-3.
- Jaenisch, R., and A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33 Suppl:245-54.
- Jeong, Y.J., H.W. Choi, H.S. Shin, X.S. Cui, N.H. Kim, G.L. Gerton, and J.H. Jun. 2005. Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 71:284-9.
- Jiang, Z., X. Zhang, R. Deka, and L. Jin. 2005. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res.* 33:e91.
- Jost, J.P. 1993. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4684-8.

- Kagotani, K., S. Takebayashi, A. Kohda, H. Taguchi, M. Paulsen, J. Walter, W. Reik, and K. Okumura. 2002. Replication timing properties within the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66:1046-51.
- Kanka, J. 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology.* 59:3-19.
- Kantor, B., K. Makedonski, R. Shemer, and A. Razin. 2003. Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr Patterns.* 3:697-702.
- Kawame, H., S.M. Gartler, and R.S. Hansen. 1995. Allele-specific replication timing in imprinted domains: absence of asynchrony at several loci. *Hum Mol Genet.* 4:2287-93.
- Kelley, M.R., J.K. Jurgens, J. Tentler, N.V. Emanuele, S.E. Blutt, and M.A. Emanuele. 1993. Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique is comparative, quantitative, and rapid: uses in alcohol research involving low abundance mRNA species such as hypothalamic LHRH and GRF. *Alcohol.* 10:185-9.
- Khosla, S., W. Dean, D. Brown, W. Reik, and R. Feil. 2001. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod.* 64:918-26.
- Killian, J.K., J.C. Byrd, J.V. Jirtle, B.L. Munday, M.K. Stoskopf, R.G. MacDonald, and R.L. Jirtle. 2000. M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Mol Cell.* 5:707-16.
- Kim, J., X. Lu, and L. Stubbs. 1999. Zim1, a maternally expressed mouse Kruppel-type zinc-finger gene located in proximal chromosome 7. *Hum Mol Genet.* 8:847-54.
- Kitsberg, D., S. Selig, M. Brandeis, I. Simon, I. Keshet, D.J. Driscoll, R.D. Nicholls, and H. Cedar. 1993a. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature.* 364:459-63.
- Kitsberg, D., S. Selig, I. Keshet, and H. Cedar. 1993b. Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature.* 366:588-90.
- Knoll, J.H., S.D. Cheng, and M. Lalande. 1994. Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet.* 6:41-6.
- Kobayashi, S., H. Wagatsuma, R. Ono, H. Ichikawa, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Aisaka, N. Miyoshi, T. Kohda, A. Ogura, M. Ohki, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2000. Mouse Peg9/Dlk1 and human PEG9/DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse Meg3/Gtl2 and human MEG3. *Genes Cells.* 5:1029-37.
- Krüssel, J.S., C. Simon, M.C. Rubio, A.R. Pape, Y. Wen, H.Y. Huang, P. Bielfeld, and M.L. Polan. 1998. Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 13:2206-11.
- Kurimoto, K., Y. Yabuta, Y. Ohinata, Y. Ono, K.D. Uno, R.G. Yamada, H.R. Ueda, and M. Saitou. 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34:e42.
- Lam, W.W., I. Hatada, S. Ohishi, T. Mukai, J.A. Joyce, T.R. Cole, D. Donnai, W. Reik, P.N. Schofield, and E.R. Maher. 1999. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet.* 36:518-23.
- LaSalle, J.M., and M. Lalande. 1995. Domain organization of allele-specific replication within the GABRB3 gene cluster requires a biparental 15q11-13 contribution. *Nat Genet.* 9:386-94.

- Latham, K.E., J.I. Garrels, C. Chang, and D. Solter. 1991. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development*. 112:921-32.
- Lau, M.M., C.E. Stewart, Z. Liu, H. Bhatt, P. Rotwein, and C.L. Stewart. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev*. 8:2953-63.
- Laurincik, J., P. Hyttel, and V. Kopečný. 1995. DNA synthesis and pronucleus development in pig zygotes obtained in vivo: an autoradiographic and ultrastructural study. *Mol Reprod Dev*. 40:325-32.
- Lee, J., K. Inoue, R. Ono, N. Ogonuki, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura, and F. Ishino. 2002. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*. 129:1807-17.
- Lefebvre, L., S. Viville, S.C. Barton, F. Ishino, E.B. Keverne, and M.A. Surani. 1998. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet*. 20:163-9.
- Lei, H., S.P. Oh, M. Okano, R. Juttermann, K.A. Goss, R. Jaenisch, and E. Li. 1996. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*. 122:3195-205.
- Leonhardt, H., H.P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporberr, T. Cremer, D. Zink, and M.C. Cardoso. 2000. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol*. 149:271-80.
- Levsky, J.M., and R.H. Singer. 2003. Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol*. 13:4-6.
- Lewis, A., and W. Reik. 2006. How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res*. 113:81-9.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 3:662-73.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 69:915-26.
- Li, S.S., Y.H. Liu, C.N. Tseng, and S. Singh. 2006. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 340:48-53.
- Liu, L., E. Czerwicz, and D.L. Keefe. 2004. Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr Patterns*. 4:433-41.
- Lucas, I., and W. Feng. 2003. The essence of replication timing: determinants and significance. *Cell Cycle*. 2:560-3.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol*. 143:1415-25.
- Manes, C. 1973. The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Dev Biol*. 32:453-9.
- Margueron, R., P. Trojer, and D. Reinberg. 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 15:163-76.
- Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, and T. Haaf. 2000a. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 403:501-2.
- Mayer, W., A. Smith, R. Fundele, and T. Haaf. 2000b. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol*. 148:629-34.
- McGrath, J., and D. Solter. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*. 37:179-83.

- Memili, E., and N.L. First. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*. 8:87-96.
- Merico, V., J. Barbieri, M. Zuccotti, B. Joffe, T. Cremer, C.A. Redi, I. Solovei, and S. Garagna. 2007. Epigenomic differentiation in mouse preimplantation nuclei of biparental, parthenote and cloned embryos. *Chromosome Res.* 15:341-60.
- Metcalfe, A.D., D.J. Bloor, B.A. Lieberman, S.J. Kimber, and D.R. Brison. 2003. Amplification of representative cDNA pools from single human oocytes and pronucleate embryos. *Mol Reprod Dev.* 65:1-8.
- Metcalfe, A.D., H.R. Hunter, D.J. Bloor, B.A. Lieberman, H.M. Picton, H.J. Leese, S.J. Kimber, and D.R. Brison. 2004. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Mol Reprod Dev.* 68:35-50.
- Moore, T., and D. Haig. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* 7:45-9.
- Moralez, I., A. Phelps, B. Riley, M. Raines, E. Wirrig, B. Snarr, J.P. Jin, M. Van Den Hoff, S. Hoffman, and A. Wessels. 2006. Muscularizing tissues in the endocardial cushions of the avian heart are characterized by the expression of h1-calponin. *Dev Dyn.* 235:1648-58.
- Morgan, H.D., W. Dean, H.A. Coker, W. Reik, and S.K. Petersen-Mahrt. 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 279:52353-60.
- Morgan, H.D., F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1:R47-58.
- Morishima, A., M.M. Grumbach, and J.H. Taylor. 1962. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 48:756-63.
- Morison, I.M., J.P. Ramsay, and H.G. Spencer. 2005. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet.* 21:457-65.
- Mostoslavsky, R., N. Singh, T. Tenzen, M. Goldmit, C. Gabay, S. Elizur, P. Qi, B.E. Reubinoff, A. Chess, H. Cedar, and Y. Bergman. 2001. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature.* 414:221-5.
- Murrell, A., V.K. Rakyan, and S. Beck. 2005. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1:R3-R10.
- Nagy, A., M. Gertsenstein, K. Vintersten, and R. Behringer. 2002. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory press.*
- Naish, S.J., S.D. Perreault, A.L. Foehner, and B.R. Zirkin. 1987. DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol Reprod.* 36:245-53.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 95:379-91.
- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99:247-57.
- Okano, M., S. Xie, and E. Li. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 19:219-20.

- Oswald, J., S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, and J. Walter. 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol.* 10:475-8.
- Palmieri, S.L., W. Peter, H. Hess, and H.R. Scholer. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.* 166:259-67.
- Panelli, S., G. Damiani, L. Espen, G. Micheli, and V. Sgaramella. 2006. Towards the analysis of the genomes of single cells: further characterisation of the multiple displacement amplification. *Gene.* 372:1-7.
- Perreault, S.D. 1992. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutat Res.* 296:43-55.
- Puebla-Osorio, N., D.B. Lacey, F.W. Alt, and C. Zhu. 2006. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Mol Cell Biol.* 26:3935-41.
- Raj, A., C.S. Peskin, D. Tranchina, D.Y. Vargas, and S. Tyagi. 2006. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol.* 4:e309.
- Ratnam, S., C. Mertineit, F. Ding, C.Y. Howell, H.J. Clarke, T.H. Bestor, J.R. Chaillet, and J.M. Trasler. 2002. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol.* 245:304-14.
- Razin, A., and H. Cedar. 1994. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell.* 77:473-6.
- Reik, W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 447:425-32.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293:1089-93.
- Reik, W., and J. Walter. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2:21-32.
- Renwick, P.J., J. Trussler, E. Ostad-Saffari, H. Fassihi, C. Black, P. Braude, C.M. Ogilvie, and S. Abbs. 2006. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping--a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online.* 13:110-9.
- Ruddock-D'Cruz, N.T., J. Xue, K.J. Wilson, C. Heffernan, S. Prashadkumar, M.A. Cooney, L.G. Sanchez-Partida, A.J. French, and M.K. Holland. 2007. Dynamic changes in the localization of five members of the methyl binding domain (MBD) gene family during murine and bovine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev.*
- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory press.*
- Sancar, A., L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73:39-85.
- Sanford, J.P., H.J. Clark, V.M. Chapman, and J. Rossant. 1987. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev.* 1:1039-46.
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik, and W. Dean. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 241:172-82.
- Schultz, R.M. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays.* 15:531-8.
- Selig, S., K. Okumura, D.C. Ward, and H. Cedar. 1992. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. *Embo J.* 11:1217-25.

- Shi, W., F. Dirim, E. Wolf, V. Zakhartchenko, and T. Haaf. 2004. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 71:340-7.
- Shi, W., V. Zakhartchenko, and E. Wolf. 2003. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation.* 71:91-113.
- Simon, I., T. Tenzen, B.E. Reubinoff, D. Hillman, J.R. McCarrey, and H. Cedar. 1999. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature.* 401:929-32.
- Smith, C., D. Berg, S. Beaumont, N.T. Standley, D.N. Wells, and P.L. Pfeffer. 2007. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction.* 133:231-42.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41-5.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, and S. Tajima. 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem.* 279:27816-23.
- Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature.* 308:548-50.
- Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris. 1986. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell.* 45:127-36.
- Suzuki, S., M.B. Renfree, A.J. Pask, G. Shaw, S. Kobayashi, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2005. Genomic imprinting of IGF2, p57(KIP2) and PEG1/MEST in a marsupial, the tammar wallaby. *Mech Dev.* 122:213-22.
- Szabo, P.E., K. Hubner, H. Scholer, and J.R. Mann. 2002. Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells. *Mech Dev.* 115:157-60.
- Szabo, P.E., and J.R. Mann. 1995. Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: implications for imprinting mechanisms. *Genes Dev.* 9:3097-108.
- Takagi, N. 1974. Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos. *Exp Cell Res.* 86:127-35.
- Tate, P.H., and A.P. Bird. 1993. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 3:226-31.
- Taylor, J.H. 1960. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. *J Biophys Biochem Cytol.* 7:455-64.
- Tilghman, S.M. 1999. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell.* 96:185-93.
- Torres-Padilla, M.E., A.J. Bannister, P.J. Hurd, T. Kouzarides, and M. Zernicka-Goetz. 2006. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol.* 50:455-61.
- Tykocinski, M.L., and E.E. Max. 1984. CG dinucleotide clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes. *Nucleic Acids Res.* 12:4385-96.
- Vassena, R., R. Dee Schramm, and K.E. Latham. 2005. Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 72:430-6.
- Waddington, C. 1942. The epigenotype. *Endeavour.* 1:18-20.
- Wade, P.A., A. Geggion, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A.P. Wolffe. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet.* 23:62-6.

- Wang, G., E. Maher, C. Brennan, L. Chin, C. Leo, M. Kaur, P. Zhu, M. Rook, J.L. Wolfe, and G.M. Makrigiorgos. 2004. DNA amplification method tolerant to sample degradation. *Genome Res.* 14:2357-66.
- Watt, F., and P.L. Molloy. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2:1136-43.
- Weisenberger, D.J., M. Velicescu, J.C. Cheng, F.A. Gonzales, G. Liang, and P.A. Jones. 2004. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol Cancer Res.* 2:62-72.
- Weksberg, R., D.R. Shen, Y.L. Fei, Q.L. Song, and J. Squire. 1993. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 5:143-50.
- Wilmut, I., N. Beaujean, P.A. de Sousa, A. Dinnyes, T.J. King, L.A. Paterson, D.N. Wells, and L.E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 419:583-6.
- Wong, E., K. Yang, M. Kuraguchi, U. Werling, E. Avdievich, K. Fan, M. Fazzari, B. Jin, A.M. Brown, M. Lipkin, and W. Edelman. 2002. Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14937-42.
- Worrad, D.M., P.T. Ram, and R.M. Schultz. 1994. Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development.* 120:2347-57.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskinetepe, A. Martins, Jr., S. Sirisathien, B. Brackett, and H. Niemann. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 16:893-901.
- Wu, C., and J.R. Morris. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 293:1103-5.
- Xanthoudakis, S., R.J. Smeyne, J.D. Wallace, and T. Curran. 1996. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8919-23.
- Yeom, Y.I., H.S. Ha, R. Balling, H.R. Scholer, and K. Artzt. 1991. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev.* 35:171-9.
- Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13:335-40.
- Zhao, X., T. Ueba, B.R. Christie, B. Barkho, M.J. McConnell, K. Nakashima, E.S. Lein, B.D. Eadie, A.R. Willhoite, A.R. Muotri, R.G. Summers, J. Chun, K.F. Lee, and F.H. Gage. 2003. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6777-82.
- Zwart, R., S. Verhaagh, M. Buitelaar, C. Popp-Snijders, and D.P. Barlow. 2001. Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 21:4188-96.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Genexpression in einzelnen Blastomeren 12 verschiedener Morula- (16-Zell-)Embryonen.

Morula- Nummer	Blastomere- Nummer	H3f3a	Pou5f1	Dnmt1	Dnmt3a Isoform 1	Dnmt3a Isoform 2	Dnmt3b Isoform 1	Dnmt3b Isoform 2	Dnmt3b Isoform 3	Dnmt3b Isoform 4	Dnmt3l	Mbd1	Mbd2	Mbd3	Mbd4	Apex1	Polb	Lig1	Lig3
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
1	4	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
1	6	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
1	7	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
1	9	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
1	10	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
1	11	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1	12	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
2	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
2	3	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
2	4	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
3	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
3	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
3	3	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
3	4	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
3	5	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
3	6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
3	7	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
3	8	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
3	9	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
3	10	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
3	11	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
3	12	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
4	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4	3	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
5	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
5	3	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
5	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
5	5	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
5	6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
5	7	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
5	8	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
5	9	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
5	10	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
5	11	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
5	12	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
5	13	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
5	14	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
5	15	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
6	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
6	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
6	4	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1

Morula- Nummer	Blastomere- Nummer	Dnmt3a Dnmt3b Dnmt3l Mbd1 Mbd2 Mbd3 Mbd4 Apex1 Polb Lig1 Lig3																			
		H3f3a	Pou5f1	Dnmt1	Dnmt3a Isoform 1	Dnmt3a Isoform 2	Dnmt3b Isoform 1	Dnmt3b Isoform 2	Dnmt3b Isoform 3	Dnmt3b Isoform 4	Dnmt3l	Mbd1	Mbd2	Mbd3	Mbd4	Apex1	Polb	Lig1	Lig3		
7	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1		
7	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
7	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
7	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
7	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
7	9	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
7	10	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
7	11	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
8	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
9	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
9	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
9	5	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
9	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
9	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
9	8	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
9	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	10	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
10	4	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
10	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
10	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
10	9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
10	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
10	11	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
10	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
11	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
11	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
11	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
11	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
11	6	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
11	7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
11	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	9	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
11	12	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
11	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
11	14	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
12	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
12	6	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
12	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
12	8	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
12	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
12	10	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
12	11	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
12	12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tabelle 7.2: Expression der analysierten Entwicklungsgene in der Präimplantationsphase

Gen	Zygote (0,5 dpc)	2-Zell-Embryo (1,0 dpc)	4-Zell-Embryo (2,0 dpc)	8-Zell-Embryo (2,5 dpc)	Morula (3,0 dpc)	Blastozyste (4,0 dpc)	Referenzen
<i>H3βa</i>	IF (Zellkern)	IF (Zellkern)	IF (Zellkern)	keine Daten	keine Daten	IF (Zellkern)	(1)
<i>Pou5f1</i>	RT-PCR RNA <i>in situ</i> IF	RT-PCR keine Daten IF	RT-PCR RNA <i>in situ</i> IF	RT-PCR RNA <i>in situ</i> IF (Zellkern)	RT-PCR RNA <i>in situ</i> IF (Zellkern)	RT-PCR RNA <i>in situ</i> IF (Zellkern) (ICM)	(2-5)
<i>Dnmt1</i>	IF (DNMT1O) (Zytoplasma) RT-PCR (<i>Dnmt1o</i>)	IF (DNMT1O) (Zytoplasma) RT-PCR (<i>Dnmt1s</i>)	IF (DNMT1O) (Zytoplasma) RT-PCR (<i>Dnmt1s</i>)	IF (DNMT1O) (Zellkern) RT-PCR (<i>Dnmt1s</i>)	IF (DNMT1O) (Zytoplasma) RT-PCR (<i>Dnmt1s</i>)	IF (DNMT1O) (Zellkern) RT-PCR (<i>Dnmt1s</i>)	(6,7)
<i>Dnmt3a</i>	RT-PCR (hoch) RT-PCR (50%)	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (hoch) keine Daten	RT-PCR (hoch) RT-PCR (0%)	(8) (9)
<i>Dnmt3b</i>	RT-PCR (gering)	RT-PCR (gering)	RT-PCR (gering)	RT-PCR (gering)	RT-PCR (gering)	RT-PCR (hoch)	(8)
<i>Dnmt3l</i>	RT-PCR (gering) RT-PCR (100%)	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (gering) keine Daten	RT-PCR (hoch) keine Daten	RT-PCR (hoch) RT-PCR (100%)	(8) (9)
<i>Mbd1</i>	IF (Zytoplasma und Zellkern)	IF (im Zellkern stärker)	keine Daten	IF (Zytoplasma und Zellkern)	keine Daten	IF (im Zytoplasma stärker)	(10)
<i>Mbd2</i>	IF (Zytoplasma und Zellkern)	IF (Zytoplasma und Zellkern)	keine Daten	IF (Zytoplasma und Zellkern)	keine Daten	IF (im Zytoplasma stärker)	(10)
<i>Mbd3</i>	IF (Zytoplasma und Zellkern)	IF (Zytoplasma und Zellkern)	keine Daten	IF (Zytoplasma und Zellkern)	keine Daten	IF (im Zytoplasma stärker)	(10)
<i>Mbd4</i>	IF (Zytoplasma)	IF (im Zellkern stärker)	keine Daten	IF (im Zellkern stärker)	keine Daten	IF (im Zellkern stärker)	(10)

IF = Immunfluoreszenzdetektion des Proteins im Zytoplasma bzw. Zellkern.
Dnmt1o, *Dnmt1s* = oozytenspezifische bzw. somatische Isoform von *Dnmt1*.
 RT-PCR (50%) = 50% der getesteten Embryonen zeigen das entsprechende RT-PCR-Produkt.

7.1.1 Referenzen zu Tabelle 7.2:

- (1) (Torres-Padilla *et al.*, 2006)
- (2) (Quelle: Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>)
- (3) (Yeom *et al.*, 1991)
- (4) (Palmieri *et al.*, 1994)
- (5) (Liu *et al.*, 2004)
- (6) (Ratnam *et al.*, 2002)
- (7) (Doherty *et al.*, 2002)
- (8) (Vassena *et al.*, 2005)
- (9) (Huntriss *et al.*, 2004)
- (10) (Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2007)

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	<i>complementary DNA</i>
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dpc	<i>days post conceptionem</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eCG	equines Choriongonadotropin
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
hCG	humanes Choriongonadotropin
ICM	Innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
i.d.R.	in der Regel
IE	Internationale Einheit
kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel
vs.	versus
♀	weiblich
♂	männlich

7.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1.1:	Modifikationen an den Seitenketten der vier Kernhistone H4, H3, H2A, H2B und Histon H1	3
Abb. 1.2:	Regulation der monoallelischen Expression von <i>H19</i> und <i>Igf2</i> auf MMU7dist	6
Abb. 1.3:	Methylierungsreprogrammierung in der Maus	10
Abb. 3.1:	Repräsentative Beispiele von FISH-Signalen auf Interphase- und Metaphasezellkernen	41
Abb. 3.2:	Prozentwerte asynchron replizierter Zellkerne	46
Abb. 3.3:	Überblick der Einzelzell-Expressionsanalyse mit Hilfe der AmpliGrid-Technologie	49
Abb. 3.4:	Genexpression relevanter Entwicklungsgene in Präimplantationsembryonen der Maus	52
Abb. 3.5:	Genexpression relevanter Entwicklungsgene in Blastomeren von 16-Zell-Embryonen der Maus	54
Abb. 3.6:	Grafische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse	56
Abb. 3.7:	Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung von Präimplantationsembryonen des späten Morulastadiums	58

Tabellen:

Tab. 1.1:	Phänotypen von Knockout-Mäusen	15
Tab. 2.1:	Reaktionsansatz zur Nick-Translation	25
Tab. 2.2:	Reaktionsansatz für die Multiplex-RT-PCR	27
Tab. 2.3:	Reaktionsansatz für die PCR-Reaktionen	28
Tab. 2.4:	Reaktionsansatz für die Q-PCR	29
Tab. 2.5:	Reaktionsansatz der <i>in vitro</i> Transkription	30
Tab. 2.6:	Verwendete Maus-BAC-Klone	33
Tab. 2.7:	Primerpaare für die Multiplex-RT-PCR	34
Tab. 2.8:	Primermixturen für die reverse Transkription und PCR-Reaktionen	35
Tab. 3.1:	Ergebnisse der Experimente zur Validierung der Primersensitivität mittels per <i>in vitro</i> -Transkription hergestellten RNAs	51

7.4 Lebenslauf

|

7.5 Publikationen und Kongressteilnahmen

Publikationen:

May, A., Kirchner, H. Müller, P. Hartmann, N. El Hajj, A. Tresch, U. Zechner, W. Mann, and T. Haaf. 2009. Multiplex rt-PCR expression analysis of developmentally important genes in individual mouse preimplantation embryos and blastomeres. *Biol Reprod.* 80:194-202.

May, A., K. Reifenberg, U. Zechner, and T. Haaf. 2008. Asynchronous replication dynamics of imprinted and non-imprinted chromosome regions in early mouse embryos. *Exp Cell Res.* 314:2788-95.

Spangenberg, C., E.U. Lausch, T.M. Trost, D. Prawitt, **A. May**, R. Keppler, S.A. Fees, D. Reutzel, C. Bell, S. Schmitt, I.B. Schiffer, A. Weber, W. Brenner, M. Hermes, U. Sahin, O. Tureci, H. Koelbl, J.G. Hengstler, and B.U. Zabel. 2006. ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res.* 66:3715-25.

Vorträge und Posterpräsentationen (Auswahl):

May, A., D. Weise, K. Reifenberg, T. Haaf, and U. Zechner. 2008. The impact of ovarian stimulation on the cellular epigenome in preimplantation mouse embryos. 59. Mosbacher Kolloquium 2008 "Epigenetics" (Posterpräsentation).

May, A., R. Kirchner, H. Müller, W. Mann, U. Zechner, and T. Haaf. 2007 Multiplex rt-PCR of DNA modification and pluripotency genes in single blastomeres of mouse preimplantation embryos. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (Posterpräsentation).

May, A., R. Kirchner, H. Müller, W. Mann, U. Zechner, and T. Haaf. 2006. Multiplex rt-PCR of DNA modification genes in single blastomeres of mouse preimplantation embryos. 3rd Münster Conference on Single Cell Analysis (Vortrag).

May, A., U. Zechner, B. Großmann, and T. Haaf. 2006. Replication timing and spatio-temporal organization of imprinted and non-imprinted chromosome regions during mouse preimplantation development. 2006. 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (Vortrag).

Spangenberg, C., T.M. Trost, E.U. Lausch, S.A. Fees, D. Reutzel, **A. May**, S. Schmitt, I.B. Schiffer, J.G. Hengstler, D. Prawitt, B.U. Zabel. 2005. Inducible oncogenic ERBB2-signaling identifies premature senescence as a primary tumor-protective response in mammary carcinogenesis. ESHG European Human Genetic Conference, Prag 7-10 Mai (Vortrag C20)

7.6 Danksagung

7.7 Veröffentlichungen der Ergebnisse dieser Arbeit

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen:

May, A., Kirchner, H. Müller, P. Hartmann, N. El Hajj, A. Tresch, U. Zechner, W. Mann, and T. Haaf. 2009. Multiplex rt-PCR expression analysis of developmentally important genes in individual mouse preimplantation embryos and blastomeres. *Biol Reprod.* 80:194-202.

May, A., K. Reifenberg, U. Zechner, and T. Haaf. 2008. Asynchronous replication dynamics of imprinted and non-imprinted chromosome regions in early mouse embryos. *Exp Cell Res.* 314:2788-95.

Vorträge und Posterpräsentationen:

May, A., R. Kirchner, H. Müller, W. Mann, U. Zechner, and T. Haaf. 2007 Multiplex rt-PCR of DNA modification and pluripotency genes in single blastomeres of mouse preimplantation embryos. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (Posterpräsentation).

May, A., R. Kirchner, H. Müller, W. Mann, U. Zechner, and T. Haaf. 2006. Multiplex rt-PCR of DNA modification genes in single blastomeres of mouse preimplantation embryos. 3rd Münster Conference on Single Cell Analysis (Vortrag).

May, A., U. Zechner, B. Großmann, and T. Haaf. 2006. Replication timing and spatio-temporal organization of imprinted and non-imprinted chromosome regions during mouse preimplantation development. 2006. 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (Vortrag).

Die Publikationen befinden sich am Ende des Anhangs.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Asynchronous replication dynamics of imprinted and non-imprinted chromosome regions in early mouse embryos

Andreas May^a, Kurt Reifenberg^b, Ulrich Zechner^a, Thomas Haaf^{a,*}

^aInstitute for Human Genetics, Johannes Gutenberg University Mainz, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany

^bCentral Laboratory Animal Facility, Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 7 February 2008

Revised version received

13 July 2008

Accepted 14 July 2008

Available online 22 July 2008

Keywords:

Asynchronous replication
Embryonic genome activation
Genome reprogramming
Imprinting
Interphase FISH
Preimplantation embryo

ABSTRACT

We have used interphase FISH to analyze the replication behavior of four imprinted chromosome regions (*Snrpn*, *Zim1-Peg3*, *Dlk1-Gtl2*, and *Igf2r*) and five non-imprinted regions in mouse one-cell to morula-stage embryos and embryonic fibroblasts. In general, imprinted chromosome regions showed the expected asynchronous pattern of replication throughout all analyzed stages of preimplantation development and in differentiated cells. The *Dlk1-Gtl2* locus which is not expressed and *Igf2r* which is biallelically expressed in early embryos showed a relaxation of replication asynchrony at the morula stage. Asynchronous replication in zygotes and two-cell embryos was not specific to imprinted regions. Three non-imprinted loci (*Emp1-Pbp2-Dynt11*, *Hbb-b1-Hbb-b2-Hbb-y*, and *Opa1*) as well as one gene-free region on chromosome 7A1 switched from asynchronous replication in one- and two-cell embryos to synchronous replication in 4-cell embryos and later stages. Another gene-free region on chromosome 16C2 showed a more gradual transition from asynchronous to synchronous replication from two-cell to morula-stage embryos. We propose that replication asynchrony contributes to the striking asymmetry between the two parental genomes, which are epigenetically reprogrammed after fertilization into a diploid somatic genome. The switching of non-imprinted genes from asynchronous to synchronous replication may be associated with embryonic genome activation and restoration of transcriptional potential for somatic development.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Genomic imprinting is an epigenetic modification of a subset of genes leading to preferential activity of one parental allele. Parent-specific epigenetic marks are established in the paternal and maternal germ line, respectively, and then stably maintained after fertilization [1–3]. Imprinted genes are usually clustered in distinct chromosomal domains, which show asynchronous replication of the two parental copies during S phase. It is always the paternal allele that replicates earlier, regardless of whether a gene is paternally or maternally inactivated. Replication asynchrony may

provide a structural imprint for paternal versus maternal allele identity [4–6]. Replication asynchrony is erased before meiosis and male versus female germ-line specific replication timing marks are established in the gametes. It has been reported that the parent-specific replication asynchrony of imprinted genes is already present in the zygote and early embryos, whereas non-imprinted chromosome regions replicate synchronously from the first S phase after fertilization on [7]. Some non-imprinted regions, i.e. X-chromosomal genes in female cells [8], B- and T-cell receptor loci [9], and olfactory receptor (OR) genes [10] may replicate asynchronously in different cell types of the body. The choice of

* Corresponding author. Fax: +49 6131 175690.

E-mail address: haaf@humgen.klinik.uni-mainz.de (T. Haaf).

which parental allele of a non-imprinted gene is inactivated is random and established postzygotically around the time of preimplantation.

Parent-specific replication asynchrony appears to be a functional component of genomic imprints. However, it is neither a prerequisite nor a consequence of the epigenetic modifications that establish and/or maintain parent-specific gene methylation and expression [11]. Vertebrate orthologs of mammalian imprinted genes exhibit a clustered organization in asynchronously replicating domains, but no parent-specific activity. Replication asynchrony is thought to form the basis of an ancestral imprinting mechanism which was superseded by a more stable epigenetic mechanism involving differential DNA methylation in mammals [12,13].

The two functionally non-equivalent germ-line genomes must be reprogrammed after fertilization to restore totipotency in embryonal cells [1–3,14]. Imprinted genes are protected by an unknown mechanism from this genome-wide reprogramming process and maintain their germ-line specific methylation and activity patterns throughout development. Sperm–egg fusion activates the oocyte which then remodels the protamine-packaged sperm chromatin into a functional male pronucleus with normal nucleosomal structure [15]. The paternal pronucleus is actively and drastically demethylated within a few hours after fertilization [16,17]. It also replicates slightly earlier than the female pronucleus [18–20]. Even after pronuclear envelope breakdown the paternal and maternal genomes remain spatially separated at least up to the 2–4-cell stage [21,22]. The maternal genome, although exposed to the same cytoplasm, is resistant to active demethylation and gradually demethylated during preimplantation development using a passive replication-dependent mechanism. Activation of the mouse embryonic genome already occurs at the two-cell stage [23–25], when the maternal genome is still fully methylated. Epigenetic genome reprogramming in the early embryo appears to be vulnerable to environmental stress. Disturbances in these highly coordinated molecular and cellular events during preimplantation development may contribute to the high rate of embryo loss and developmental defects in mammals [14,26,27]. Normal fertilization, assisted reproduction, and even embryo cloning are all susceptible to similar dysregulation of epigenetic components. Only the frequency and severity of abnormal phenotypes increase after interfering with or bypassing essential steps of gametogenesis and early embryogenesis.

Evidently, there is a striking genome asymmetry in early mouse embryos. Temporal separation of replication timing of the two parental genomes after fertilization may be associated with genome-wide epigenetic reprogramming and not be a specific hallmark of imprinted genes. To test this hypothesis, we performed a systematic asynchronous replication analysis of representative imprinted and non-imprinted chromosome regions in one-cell to morula-stage mouse embryos.

Materials and methods

Mouse embryo and fibroblast preparation

Six to 8-week old C57BL6/J female mice were superovulated by intraperitoneal injection of 7.5 IU eCG (Intervet) and 44–48 h later by injection of 7.5 IU hCG (Intervet). Superovulated female mice

were mated with C57BL6/J male mice. Fertilization occurred 13 h ± 2 h after hCG injection. One-cell, two-cell, 4-cell, 8-cell, and morula (16–32 cell) embryos were flushed from the oviducts at 10–12, 33–36, 41, 53 and 60 h after fertilization [28]. Only “high quality” embryos (by morphological criteria) were used for further analysis. Embryos with developmental delay (i.e. 2–4-cell embryos in an 8-cell embryo preparation) or signs of fragmentation were discarded. The embryos were thoroughly washed in several drops of fresh M2 medium (Sigma) in order to remove cell debris. Then they were fixed and lysed onto a POLY-PREP slide (Sigma) by putting them into a drop of 0.01 N HCl, 0.1% Tween 20 in H₂O [7]. These slides were washed in fresh PBS for 3 min and dehydrated in an ethanol series for 1 min each. After air-drying they were stored until further processing up to several weeks at 4 °C.

Mouse embryonic fibroblast cultures were established from 12.5 d.p.c. embryos and cultured in Dulbecco's modified essential medium with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Cell pellets were suspended in a hypotonic solution consisting of 50 mM KCl for 10 min and then fixed with 3:1 mixture of methanol–acetic acid.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) with region-specific probes

Bacterial artificial chromosome (BAC) clones for FISH analysis of four imprinted and five non-imprinted chromosome regions were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org>). The selected imprinted loci are well characterized in mice and humans. Two of the imprinted and two of the non-imprinted regions lie on mouse chromosome 7, the others are distributed on different chromosomes. The most important criterion of probe selection was the quality of the FISH signals. The selected BACs produced discrete FISH signals on both homologous chromosomes in at least 98–99% of hybridized nuclei and did not cross-hybridize to other chromosome regions. At most 1–2% of nuclei completely lacked hybridization signals and less than 0.5% displayed only one chromosomal signal, presumably reflecting suboptimal hybridization conditions.

BAC DNA was prepared with the PhasePrep BAC DNA Kit (Sigma) and directly labeled with either rhodamine-5-dUTP or fluorescein-12-dUTP (Roche) by nick translation. Standard protocols were followed for two-color FISH [29]. For some experiments, FISH was combined with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling of replicating DNA. Embryos were incubated at 37 °C for 1 h in M2 culture medium with 3 × 10⁻⁵ M BrdU before fixing them on a slide. Following FISH with fluorescein-labeled DNA probe, the slides were washed in PBS, blocked with 1% BSA, and incubated for 30 min at 37 °C with anti-BrdU antibody (Boehringer Mannheim) diluted 1/50 with 1% BSA. After washing the slides were incubated with Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (Dianova). Images were taken with a Leica epifluorescence microscope equipped with a peltier cooled charge-coupled device camera (Leica DC 350F), which was controlled by a personal computer. Leica CW 4000 FISH imaging software was used to capture gray-scale images and to superimpose the source images into a color image.

Statistical analysis

The χ^2 test with *Fourfold table* was used to compare the percentages of asynchronously replicating nuclei (for a given

probe) between different preimplantation stages. A *p*-value of less than 5% was considered significant.

Results

The interphase dot assay

FISH on interphase nuclei allows one to study replication timing of individual loci in unsynchronized cell populations [4–7,30]. BAC clones were selected for four imprinted (*Snrpn*, *Zim1-Peg3*, *Dlk1-Gtl2*, and *Igf2r*) and five non-imprinted chromosome regions. BAC RP23-429C4 (*Zim1-Peg3*) hybridized to chromosome 7A1 (Fig. 1A, red probe), CT7-397F16 (*Snrpn*) to chromosome 7B4 (Fig. 1A, green probe), RP23-402J22 (*Igf2r*) to chromosome 17A1, RP23-117C15 (*Dlk1-Gtl2*) to chromosome 12F1, RP24-260K21 (*Emp1-Pbp2-Dynlt1*) to chromosome 6G1, RP23-301K19 (*Hbb-b1*, *Hbb-b2*, *Hbb-y*, and 7 OR genes) to chromosome 7F2, and RP23-178P20 (*Opa1*) to chromosome 16B2. The gene-free BACs RP23-460N10 and RP24-269E24 hybridized to chromosomes 7A1, closely located (within 1 Mb) to an imprinting cluster, and to chromosome 16C2.

To compare the replication behavior of imprinted and non-imprinted loci during mouse preimplantation development, the BAC clones were hybridized to approximately 50 nuclei each from one- and two-cell stages, 100–150 nuclei each from 4-cell, 8-cell, and morula stages, and >200 fibroblast nuclei. Nuclei in which the targeted chromosome regions had not yet replicated revealed two single hybridization dots (one for each chromatid) (Fig. 1B), whereas fully replicated nuclei displayed two double hybridization dots (two pairs of sister chromatids) (Fig. 1E). A hemizygous hybridization pattern with one singlet and one doublet in the same nucleus represented asynchronous replication of the two parental alleles (Fig. 1D).

Only nuclei with clearly visible hybridization signals were scored by the same experimenter, who did not know which probe had been hybridized. This largely excludes a systematic bias in interpretation of the FISH results. Nevertheless there remain several sources of scoring errors, i.e. if early-replicated sister chromatids do not separate until very late S phase or if during the harsh denaturation process the two complementary DNA strands of a single chromatid (DNA double helix) become physically separated. Although it is well possible that such scoring errors which apply equally to all hybridized probes can blur subtle differences in the replication behavior, they cannot fake a systematic and dramatic difference between imprinted and non-imprinted regions, if such difference in the replication behaviour does not exist in the first place. The main advantage of interphase FISH compared to other assays for replication timing analysis is that it can be done at the single cell level and with very limited numbers of cells. Studies using cell cycle fractionation techniques may be flawed because the time point during S phase at which replication is initiated at a given locus can vary to some extent from cell to cell and, consequently, there is a considerable overlap between flow-sorted S phase fractions [7]. This may explain why separation of S phase cells by flow cytometry failed to detect replication asynchrony at several sites within the *Igf2-H19* locus in somatic cell types [31].

To calibrate our interphase FISH dot assay and test its reliability, we hybridized BAC RP23-301K19 from the non-imprinted β -globin locus and RP23-178P20 containing the non-imprinted *Opa1* gene

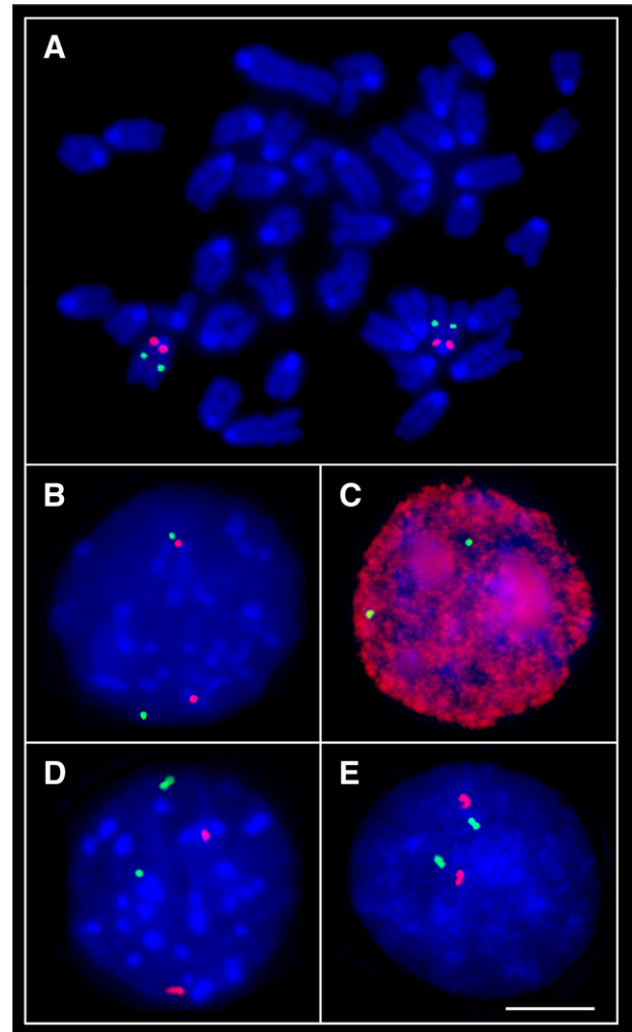


Fig. 1 – Representative examples of interphase and metaphase FISH signals. Preparations were hybridized with fluorescein-(green) and/or rhodamine-labeled (red) probes and counterstained with DAPI (blue). (A) FISH mapping of the red BAC RP23-429C4 (*Zim1-Peg3*) to mouse chromosome 7A1 and the green BAC CT7-397F16 (*Snrpn*) to chromosome 7B4. (B) Blastomere nucleus with two unreplicated alleles (single dots) each for the red BAC RP23-429C4 (*Zim1-Peg3*) and the green BAC CT7-397F16 (*Snrpn*). (C) Hybridization of the green BAC RP23-178P20 (*Opa1*) to a BrdU-labeled (red antibody signal) blastomere nucleus. (D) Blastomere nucleus showing asynchronous replication (SD pattern) with one unreplicated allele (singlet) and one replicated allele (doublet) each for the green BAC RP23-117C15 (*Dlk1-Gtl2*) and the red BAC RP23-402J22 (*Igf2r*). (E) Blastomere nucleus with two replicated alleles (doublets) each for the green BAC RP24-269E24 and the red BAC RP23-178P20 (*Opa1*). Scale bar = 10 μ m.

to cells from morula-stage embryos that had been incubated with BrdU (Fig. 1C). Eighty to 88% of the cells from different morula preparations were BrdU positive, indicative of replicating cells. We scored >100 BrdU-positive nuclei for each BAC and found 24–25% hemizygous singlet–doublet (SD) hybridization patterns for both the β -globin locus and *Opa1*. When we performed the same

analysis on embryos that had not been labeled with BrdU, 25% and 22% of all interphase nuclei showed asynchronous replication, respectively. All further experiments were performed without BrdU labeling, because this allowed us to score two probes simultaneously. The advantage of analyzing more blastomeres per probe compensates for the fact that without BrdU labeling we cannot exclude that some of the nuclei with hemizygous hybridization patterns are not in S phase. Usually, asynchronous replication is assumed, when 25%–40% of nuclei show an SD hybridization pattern [4–7]. Because we did not only score S phase nuclei but all interphase nuclei, we considered 25% SD nuclei as a good indicator for asynchronous replication. This is consistent with our experience from a previous study [12] and our pilot experiment.

Replication behavior of imprinted chromosome regions in mouse preimplantation embryos

BAC CT7-397F16 containing the *Snrpn* gene on chromosome 7B4 produced hemizygous hybridization patterns in >30% of nuclei from mouse one-cell, 4-cell, 8-cell, and morula-stage embryos as well as in mouse embryonic fibroblasts (MEF) (Fig. 2A). Two-cell embryos displayed only 24% SD nuclei. However, the SD rate in two-cell embryos did not differ significantly ($p>0.25$) from that in other preimplantation stages. We conclude that asynchronous replication of *Snrpn* is already present in the zygote and then maintained throughout preimplantation development and in MEF. The same was true for *Zim1* and *Peg3*. BAC RP23-429C4 from chromosome 7A1 produced >26% SD nuclei in all preimplantation stages except 8-cell embryos as well as in fibroblasts (Fig. 2B). Because the 22% SD nuclei in 8-cell embryos were below our threshold for asynchronous replication, we repeated this experiment on 111 nuclei from a different 8-cell embryo preparation and found 24% SD patterns. This indicates that asynchronous replication of *Zim1* and *Peg3* may be relaxed in 8-cell embryos, however the difference between 8-cell and other analyzed embryonic stages is not significant ($p>0.25$).

BAC RP23-117C15 containing *Dlk1* and *Gtl2* (chromosome 12F1) replicated asynchronously in one-cell embryos (32% SD nuclei), two-cell embryos (29% SD), and MEF (30% SD) (Fig. 2C). However, the 12% SD nuclei in morula-stage embryos were clearly inconsistent with asynchronous replication and significantly lower ($p<0.003$) than in the other analyzed preimplantation stages. The 22% SD nuclei in 4-cell and 25% in 8-cell embryos indicate a gradual change from asynchronous replication timing in one- and two-cell embryos to synchronous replication in morulae. Similar to *Dlk1-Gtl2*, *Igf2r* contained in BAC RP23-402J22 (chromosome 17A1) replicated asynchronously in one-cell (31% SD nuclei), two-cell (35%), 4-cell (29%), 8-cell embryos (29%), and MEF (27%), but not in morula-stage embryos (20% SD nuclei) (Fig. 2D). Although the decreased percentage of SD nuclei in morula-stage embryos was not statistically significant ($p=0.08$), it looked conspicuous. We therefore repeated the hybridization of BACs RP23-117C15 (*Dlk1-Gtl2*) and RP23-402J22 (*Igf2r*) on >100 nuclei from different morula preparations and found 16% and 23% SD nuclei, respectively. Collectively, these results suggest that *Dlk1-Gtl2* and most likely *Igf2r* replicate synchronously in morula-stage embryos. The replication behavior of specific imprinted genes at specific developmental stages may be more dynamic than previously thought.

Replication behavior of non-imprinted chromosome regions

BAC RP23178P20 which contains the non-imprinted *Opa1* gene (chromosome 16B2) revealed a dramatic change in replication asynchrony during preimplantation development. One- and two-cell embryos displayed 45% respectively 54% nuclei with SD patterns, compared to only 18–22% in 4-cell to morula-stage embryos (Fig. 2E). This abrupt switch from asynchronous to synchronous replication between the two-cell and 4-cell stage was highly significant ($p<0.001$). Synchronous replication was also observed in MEF with 24% SD nuclei. Similar results were obtained with BAC RP24-260K21 containing the non-imprinted *Emp1*, *Pbp1*, and *Dynlt1* genes. Twenty five percent respectively 36% SD nuclei were observed in one- and two-cell embryos; 18% in 4-cell, 24% in 8-cell, and 24% in morula-stage embryos (Fig. 2F).

BAC RP23-301K19 from chromosome 7F2 contains the β -globin locus (*Hbb-b1*, *Hbb-b2*, and *Hbb-y*) as well as 7 OR genes which represent more than 50% of the BAC sequence. There was a clear switch from asynchronous replication in one-cell (35% SD nuclei) and two-cell embryos (36%) to synchronous replication in 4-cell (16%) and 8-cell embryos (22%) (Fig. 2G). The increased percentages of SD nuclei in morula-stage embryos (25%) and MEF (29%) can be explained by clonal establishment of allele-specific replication timing of OR genes in late preimplantation embryos [10].

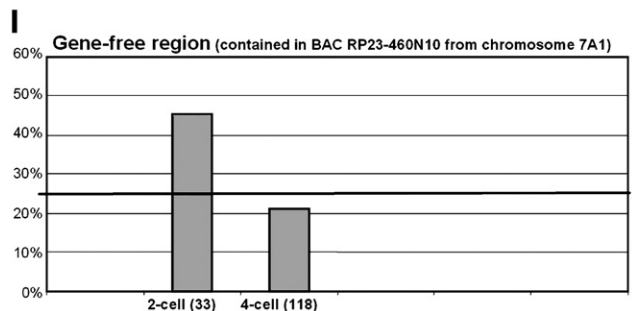
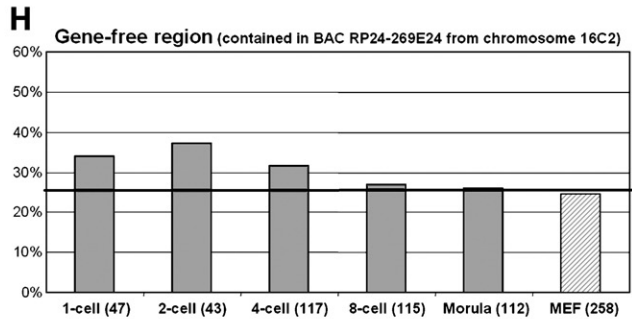
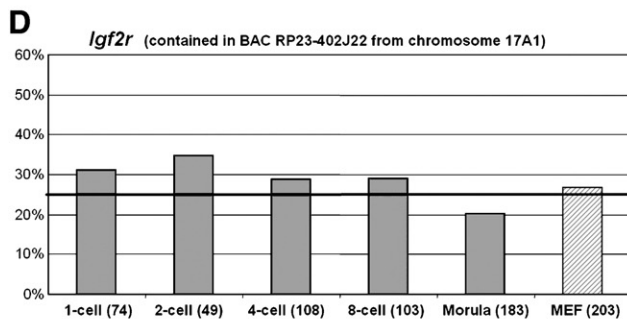
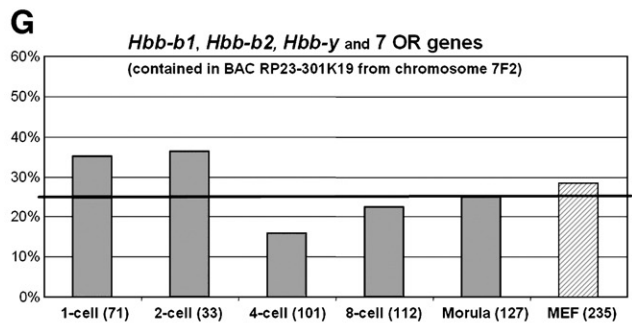
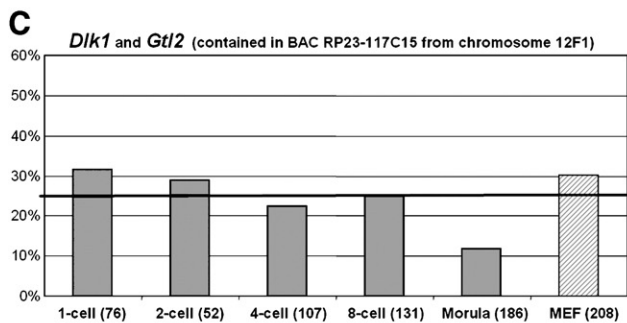
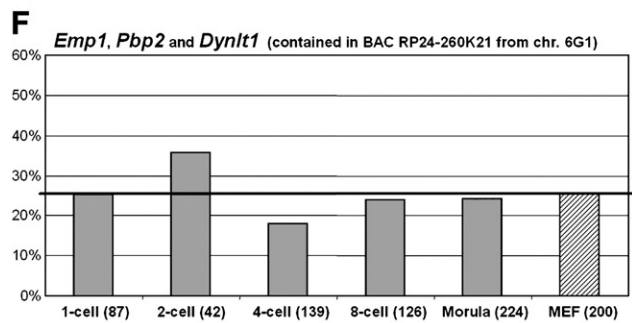
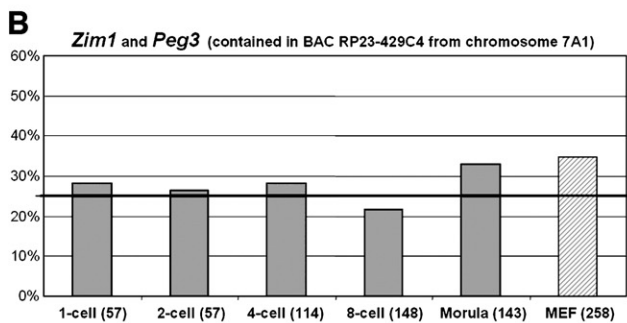
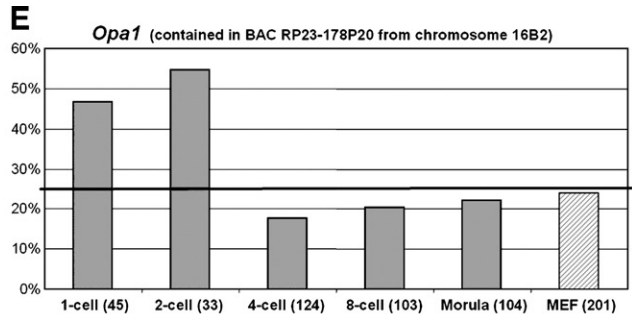
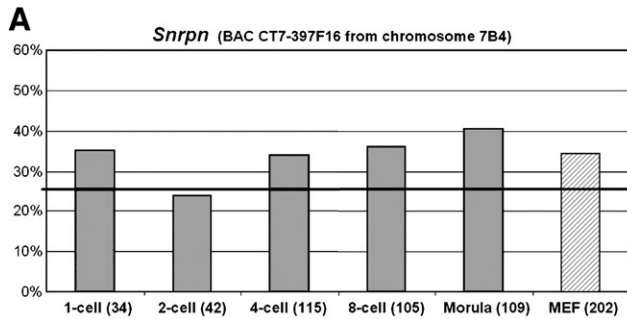
The gene-free BAC RP24-269E24 replicated asynchronously in one-cell (34% SD nuclei) and two-cell embryos (37% SD nuclei) (Fig. 2H). However, in contrast to the non-imprinted gene-containing regions there was no clear switch from asynchronous to synchronous replication between the two- and 4-cell stage. Instead we observed a rather gradual decrease in the percentage of SD nuclei from 4-cell (32%) to 8-cell (27%) and morula-stage embryos (26%). MEF showed 24% SD nuclei. To find out whether this gradual transition from asynchronous to synchronous replication is an inherent property of non-coding sequences, we hybridized another gene-free BAC RP23-460N10 to two- and 4-cell stages. We observed 46% SD patterns in two-cell embryos and 21% in 4-cell embryos (Fig. 2I). Thus, similar to non-imprinted gene-containing regions, the non-coding sequences in BAC RP23-460N10 switched their replication behaviour rather abruptly from the two- to the 4-cell stage.

Discussion

Our study shows for the first time that both imprinted and non-imprinted genes replicate asynchronously immediately after fertilization. In fact, the percentages of SD nuclei in zygotes and two-cell embryos were even higher for non-imprinted than for imprinted regions. Synchronous replication of non-imprinted chromosome regions was only established after the two-cell stage, whereas asynchronous replication of imprinted chromosome regions was maintained during preimplantation development. Interestingly, some imprinted genes showed a relaxation of replication asynchrony at particular developmental stages. For example, the *Dlk1* and *Gtl2* locus on chromosome 12F1 and the *Igf2r* locus on chromosome 17A1 seemed to replicate synchronously in morula-stage embryos. One possible explanation for this relaxed replication asynchrony in morula blastomeres may be that the 100–200 kb BAC sequence contains neighboring replicons that occasionally coordinate their replication timing pattern during

preimplantation development. However, the likelihood that a particular BAC spans a replication time border may be rather low and the changes in replication timing across known borders are usually moderate [30].

Although there is no strict correlation between replication timing and transcription, asynchronous replication is generally considered to reflect allelic (in)activation events [4–11]. Replication timing appears to be related to transcriptional potential rather than



to transcriptional activity. Dynamic changes of replication patterns may facilitate changes of gene expression during differentiation and development [32,33]. It is tempting to speculate that the observed subtle and dramatic changes in replication asynchrony of some imprinted genes during preimplantation development may precede or dictate functional changes involving transcription and/or chromatin organization. *Snrpn* is already activated around the four-cell stage and monoallelically expressed throughout all later stages of development and in all tissues/cell types [4,34]. There is no information on *Zim1* and *Peg3* expression in early embryos (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>), however later embryo stages show strict monoallelic expression [35]. *Dlk1* and *Gtl2* are not expressed at detectable levels during preimplantation development. Expression was first seen in 9.5 and 8.5 d.p.c. embryos, respectively, with some evidence for biallelic expression in particular tissues [36,37]. *Igf2r* is first biallelically expressed during preimplantation development and shows monoallelic expression at later stages of development [4,5].

Our observation that non-imprinted chromosome regions also replicate asynchronously up to the two-cell stage is not consistent with Simon et al. [7]. One possible explanation may be that replication asynchrony was analyzed in different time windows of the first S phase which lasts from approximately 21 h to 29 h after hCG injection [18]. Simon et al. [7] prepared zygotes about 20–24 h after hormone injection in early S phase and then incubated them for one more hour in BrdU-containing medium. They also looked at in vitro cultured 8–16-cell embryos. We flushed zygotes ($n=420$) from the oviducts at 22 h to 26 h post hCG, which corresponds to mid S phase, and analyzed blastomeres from ex vivo two-cell ($n=318$), 4-cell ($n=824$), 8-cell ($n=705$), and morula-stage embryos ($n=1,061$). Because embryo culture conditions can alter the methylation and expression patterns of imprinted genes [38,39], we did not culture the zygotes/embryos prior to FISH analysis. Another explanation may be that Simon et al. [7] used different types of FISH probes (plasmid, phage, cosmid, P1, BAC, and YAC clones), whereas we relied entirely on BACs producing very distinct FISH signals. The scoring results of the interphase FISH dot assay are highly dependent on the probes used and on the subjective interpretation of the hybridization signals by the experimenter. With the exception of the β -globin locus different non-imprinted chromosome regions were analyzed in both studies. The replication behavior of non-imprinted chromosome regions may depend on the sequence context. For example, one analyzed gene-free region switched more gradually from asynchronous to synchronous replication after fertilization.

Our results are consistent with several studies [18–20] using fluorescent labeling of replicating DNA to demonstrate that in the mouse zygote each pronucleus follows its own replication timing and that the paternal genome enters and ends first S phase before

the maternal genome. It has been noted previously that transcriptional activity does not play a critical role in establishing a fixed temporal replication order in the early embryonic cell nucleus. Our data indicating that imprinted, non-imprinted, and even gene-free regions replicate asynchronously in mouse one- and two-cell embryos support the view that replication asynchrony reflects differences in chromatin organization and/or function between the two parental genomes during early development not necessarily related to imprinted transcriptional units per se. Mouse one- and two-cell embryos display dramatic methylation differences [16,17] and spatial separation of the two parental genomes [21,22]. We propose that asynchronous replication represents another component of this striking functional asymmetry between the paternal and maternal genomes which is maintained up to the two-cell stage and then gradually disappears. Abrupt transition of non-imprinted chromosome regions from asynchronous to synchronous replication occurs within successive stages, suggesting an active process. It coincides with major embryonic genome activation [23–25]. In general, genes and chromosome regions which replicate in the first half of S phase are thought to have transcriptional potential, whereas sequences which replicate in the second half of S phase are constitutively or epigenetically heritably repressed [40,41]. The association between late replication and silent chromatin appears to be conserved among eucaryotes, which can be considered a good indicator for functional significance. The replication timing dynamics during development and differentiation is likely to be regulated by epigenetic mechanisms. However, the causal relationships between replication timing and other nuclear processes such as transcription and chromatin assembly remain to be elucidated. Changes of replication timing at the level of individual genes, chromosome regions, or even entire genomes may be cause and/or consequence of spatial and/or temporal conflicts between replication, transcription and chromatin structure [32,33].

On the other hand, we cannot exclude the possibility that asynchronous replication of the paternal and maternal genomes in the early mammalian embryo is an innocent bystander, an evolutionary relic from mammalian radiation. Genome replication in the fast-dividing *Drosophila* and *Xenopus* embryos does not follow a fixed temporal and/or spatial order [42,43]. DNA synthesis in early mammalian embryos is spatio-temporally highly coordinated, but there are significant differences in genome replication and genome-wide epigenetic reprogramming between species. In the mouse one-cell embryo, the male pronucleus replicates slightly earlier than the female pronucleus [18–20]. Other mammalian species show replication asynchrony in the opposite direction or perfect synchrony of both pronuclei [44,45]. Embryonic genome activation occurs in mice at the two-cell, in pigs at the 4-cell, in humans at the 4–8 cell, and in rabbits and cattle at the 8–16-cell

Fig. 2 – Percentages of asynchronously replicating nuclei. The histograms for each indicated BAC probe show the percentages of SD nuclei in mouse one-cell, two-cell, 4-cell, 8-cell, and morula-stage embryos (gray bars) as well as in MEF (hatched bars). The total number of nuclei analyzed for a given BAC and developmental stage/cell type is indicated in parentheses. The black transverse line in each graph represents the threshold between asynchronous replication (>25% nuclei with SD patterns) and synchronous replication (<25% SD nuclei). The right panel shows the histograms for the imprinted genes *Snrpn*, contained in BAC CT7-397F16 (A), *Zim1* and *Peg3*, contained in BAC RP23-429C4 (B), *Dlk1* and *Gtl2*, contained in BAC RP23-117C15 (C), and *Igf2r*, contained in BAC RP23-402J22 (D). The left panel shows the histograms for the non-imprinted genes *Opa1*, contained in BAC RP23-178P20 (E), *Emp1*, *Pbp2*, and *Dynlt1*, contained in BAC RP24-260K21 (F), *Hbb-b1*, *Hbb-b2*, *Hbb-y*, and 7 OR genes, contained in BAC RP23-301K19 (G), and the gene-free BACs RP24-269E24 (H) and RP23-460N10 (I).

stage [24,46–48]. The demethylating activity of the egg cytoplasm is the highest in mouse, medium in bovine and human, and low in sheep and rabbit [16,26,49,50]. The timing of establishment of somatic methylation patterns also differs between species. In bovine embryos considerable de novo methylation already occurs at the 8–16-cell stage, whereas in mouse embryos remethylation begins only in the blastocyst with the derivation of two different cell types. Clearly, further studies are needed to better understand the developmental and tissue-specific factors that specify the temporal replication program and the functional significance of changes in the DNA replication patterns.

Acknowledgments

We thank Dr. Bärbel Grossmann, Dr. Kostia Lepikhov, and Dr. Yoel Shufaro for their initial help with the embryo preparations. This work was supported by research grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HA 1374/9-1) and the Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation (Project 848).

REFERENCES

- [1] K.L. Arney, S. Erhardt, R.A. Drewell, M.A. Surani, Epigenetic reprogramming of the genome – from the germ line to the embryo and back again, *Int. J. Dev. Biol.* 45 (2001) 533–540.
- [2] W. Reik, W. Dean, J. Walter, Epigenetic reprogramming in mammalian development, *Science* 293 (2001) 1089–1093.
- [3] H.D. Morgan, F. Santos, K. Green, W. Dean, W. Reik, Epigenetic reprogramming in mammals, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 47–58.
- [4] D. Kitsberg, S. Selig, M. Brandeis, I. Simon, I. Keshet, D.J. Driscoll, R.D. Nicholls, H. Cedar, Allele-specific replication timing of imprinted gene regions, *Nature* 364 (1993) 459–463.
- [5] J.H. Knoll, S.D. Cheng, M. Lalonde, Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader–Willi syndrome imprinted chromosomal region, *Nat. Genet.* 6 (1994) 41–46.
- [6] K. Kagotani, S. Takebayashi, A. Kohda, H. Taguchi, M. Paulsen, J. Walter, W. Reik, K. Okumura, Replication timing properties within the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 1046–1051.
- [7] I. Simon, T. Tenzen, B.E. Reubinoff, D. Hillman, J.R. McCarrey, H. Cedar, Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development, *Nature* 401 (1999) 929–932.
- [8] N. Takagi, Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos, *Exp. Cell Res.* 86 (1974) 127–135.
- [9] R. Mostoslavsky, N. Singh, T. Tenzen, M. Goldmit, C. Gabay, S. Elizur, P. Qi, B.E. Reubinoff, A. Chess, H. Cedar, Y. Bergman, Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system, *Nature* 414 (2001) 221–225.
- [10] A. Chess, I. Simon, H. Cedar, R. Axel, Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression, *Cell* 78 (1994) 823–834.
- [11] F. Cerrato, W. Dean, K. Davies, K. Kagotani, K. Mitsuya, K. Okumura, A. Riccio, W. Reik, Paternal imprints can be established on the maternal Igf2-H19 locus without altering replication timing of DNA, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 3123–3132.
- [12] U. Dünzinger, I. Nanda, M. Schmid, T. Haaf, U. Zechner, Chicken orthologues of mammalian imprinted genes are clustered on macrochromosomes and replicate asynchronously, *Trends Genet.* 21 (2005) 488–492.
- [13] U. Dünzinger, T. Haaf, U. Zechner, Conserved synteny of mammalian imprinted genes in chicken, frog, and fish genomes, *Cytogenet. Genome Res.* 117 (2007) 78–85.
- [14] T. Haaf, Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 310 (2006) 13–22.
- [15] S.D. Perreault, Chromatin remodeling in mammalian zygotes, *Mutat. Res.* 296 (1992) 43–55.
- [16] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, Demethylation of the zygotic paternal genome, *Nature* 403 (2000) 501–502.
- [17] F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean, Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo, *Dev. Biol.* 241 (2002) 172–182.
- [18] C. Bouniol-Baly, E. Nguyen, D. Besombes, P. Debey, Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation, *Exp. Cell Res.* 236 (1997) 201–211.
- [19] J. Ferreira, M. Carmo-Fonseca, Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order, *J. Cell. Sci.* 110 (1997) 889–897.
- [20] E. Aoki, R.M. Schultz, DNA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation, *Zygote* 7 (1999) 165–172.
- [21] W. Mayer, A. Smith, R. Fundele, T. Haaf, Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 629–634.
- [22] V. Merico, J. Barbieri, M. Zuccotti, B. Joffe, T. Cremer, C.A. Redi, I. Solovei, S. Garagna, Epigenomic differentiation in mouse pre-implantation nuclei of biparental, parthenote and cloned embryos, *Chrom. Res.* 15 (2007) 341–360.
- [23] K.E. Latham, J.I. Garrels, C. Chanq, D. Solter, Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages, *Development* 112 (1991) 921–932.
- [24] R.M. Schultz, Regulation of zygotic gene activation in the mouse, *BioEssays* 15 (1993) 531–538.
- [25] D.M. Worrall, P.T. Ram, R.M. Schultz, Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP, *Development* 120 (1994) 2347–2357.
- [26] W. Dean, F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf, W. Reik, Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 13734–13738.
- [27] W. Shi, T. Haaf, Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure, *Mol. Reprod. Dev.* 63 (2002) 329–334.
- [28] A. Nagy, M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer, *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2002, pp. 194–200.
- [29] T. Haaf, Fluorescence in situ hybridization, *Encyclopedia of Analytical Chemistry, Nucleic Acids Structure and Mapping*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Chichester, 2000, pp. 4984–5006.
- [30] S. Selig, K. Okumura, D.C. Ward, H. Cedar, Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization, *Embo J.* 11 (1992) 1217–1225.
- [31] H. Kawame, S.M. Gartler, R.S. Hansen, Allele-specific replication timing in imprinted domains: absence of asynchrony at several loci, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 2287–2293.
- [32] I. Lucas, W. Feng, The essence of replication timing: determinants and significance, *Cell Cycle* 2 (2003) 560–653.
- [33] M.I. Aladjem, Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 588–600.
- [34] P.E. Szabo, J.R. Mann, Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: implications for imprinting mechanisms, *Genes Dev.* 9 (1995) 3097–3108.
- [35] J. Kim, X. Lu, L. Stubbs, Zim1, a maternally expressed mouse Kruppel-type zinc-finger gene located in proximal chromosome 7, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 847–854.
- [36] S.T. da Rocha, M. Tevendale, E. Knowles, S. Takada, M. Watkins, A.C. Ferguson-Smith, Restricted co-expression of Dlk1 and the

- reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control, *Dev. Biol.* 306 (2007) 810–823.
- [37] S. Kobayashi, H. Wagatsuma, R. Ono, H. Ichikawa, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Aisaka, N. Miyoshi, T. Kohda, A. Ogura, M. Ohki, T. Kaneko-Ishino, F. Ishino, Mouse Peg9/Dlk1 and human PEG9/DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse Meg3/Gtl2 and human MEG3, *Genes Cells* 5 (2000) 1029–1037.
- [38] A.S. Doherty, M.R. Mann, K.D. Tremblay, M.S. Bartolomei, R.M. Schultz, Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo, *Biol. Reprod.* 62 (2000) 1526–1535.
- [39] S. Koshla, W. Dean, D. Brown, W. Reik, R. Feil, Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes, *Biol. Reprod.* 64 (2001) 918–926.
- [40] K.S. Hatton, V. Dhar, T.A. Gahn, E.H. Brown, A. Iqbal, S. Stuart, V.T. Didamo, C.L. Schildkraut, Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 2149–2158.
- [41] D.M. Gilbert, Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 377–383.
- [42] H.G. Callan, DNA replication in the chromosomes of eukaryotes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38 (1973) 195–203.
- [43] A.B. Blumenthal, H.J. Kriegstein, D.S. Hogness, The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38 (1973) 205–223.
- [44] S.J. Naish, S.D. Perreault, A.L. Foehner, B.R. Zirkin, DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control, *Biol. Reprod.* 36 (1987) 245–253.
- [45] J. Laurincik, P. Hyttel, V. Kopecny, DNA synthesis and pronucleus development in pig zygotes obtained in vivo: an autoradiographic and ultrastructural study, *Mol. Reprod. Dev.* 40 (1995) 325–332.
- [46] C. Manes, The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit, *Dev. Biol.* 32 (1973) 453–459.
- [47] E. Memili, N.L. First, Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species, *Zygote* 8 (2000) 87–96.
- [48] J. Kanka, Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo, *Theriogenology* 59 (2003) 3–19.
- [49] N. Beaujean, G. Hartshorne, J. Cavilla, J. Taylor, J. Gardner, I. Wilmut, R. Meehan, L. Young, Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics, *Curr. Biol.* 14 (2004) 266–267.
- [50] W. Shi, F. Dirim, E. Wolf, V. Zakhartchenko, T. Haaf, Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 340–347.

HIGHLIGHTS

Volume 314, Number 15, September 10, 2008

- Adenylyl cyclase-associated protein-1/CAP1 as a biological target substrate of gelatinase B/MMP-9.** By Bénédicte Cauwe, Erik Martens, Philippe E. Van den Steen, Paul Proost, Ilse Van Aelst, Daniel Blockmans, and Ghislain Opdenakker. 2739

Matrix metalloproteinases (MMPs) are notoriously known for their tissue remodeling functions as well as for their regulatory “processing” of cytokines, protein hormones, chemokines and numerous cell membrane-bound molecules. Above and beyond these extracellular substrates, the article by Cauwe *et al.* now shows that gelatinase B/MMP-9 exerts a novel role of MMPs by the degradation of intracellular proteins during cytolysis. This was illustrated by the identification of the cytoskeletal protein “adenylyl cyclase-associated protein-1” as a novel MMP-9 substrate *in vitro*, and *in vivo* in patients with systemic autoimmune diseases. These findings suggest that intracellular substrates may be proteolyzed into “remnant neo-epitopes,” in this way initiating or exacerbating systemic autoimmunity. Alternatively, degradation of abundant cytoskeletal proteins may be critical to avoid (actin) toxicity after extensive cell death.

- Dystonin/Bpag1 is a necessary endoplasmic reticulum/nuclear envelope protein in sensory neurons.** By Kevin G. Young and Rashmi Kothary . . . 2750

Neurological disorders are highly heterogeneous in etiology, though defects in protein folding, transport and degradation reflect a common theme in the mechanisms underlying their pathogenesis. Loss of dystonin protein function results in the murine sensory neuropathy, *dystonia musculorum (dt)*. Dystonin isoforms are large modular proteins of the plakin family. In this study, evidence is presented that a dystonin isoform known to be well-expressed in sensory neurons and affected in multiple *dt* alleles plays a role in organizing endoplasmic reticulum structure. This, along with phenotypic features of the mutant neurons, suggests that dystonin is required for normal functioning of the protein production machinery of neurons.

- Asynchronous replication dynamics of imprinted and non-imprinted chromosome regions in early mouse embryos.** By Andreas May, Kurt Reifenberg, Ulrich Zechner, and Thomas Haaf. 2788

Asynchronous replication is generally thought to reflect allelic (in)activation events. Parent-specific replication asynchrony of imprinted genes, which is already present in the zygote and then maintained throughout further development, appears to be a functional component of genomic imprints. Current models suggest that non-imprinted chromosome regions replicate synchronously from the first S phase on. Here the authors report that both imprinted and non-imprinted genes and even gene-free regions replicate asynchronously after fertilization. Abrupt transition of non-imprinted chromosome regions from asynchronous to synchronous replication occurs between the two- and four-cell stage. This implies an active epigenetic process, which coincides with embryonic genome activation. We propose that asynchronous replication is part of the striking functional asymmetry between the paternal and maternal genomes after fertilization not necessarily related to imprinted domains. The observed dynamics may be cause and/or consequence of spatial and/or temporal conflicts between replication, transcriptional potential, and functional chromatin organization during preimplantation development.

- Chromatin context dominates estrogen regulation of pS2 gene expression.** By Akua K. Oduro, Michael K. Fritsch, and Fern E. Murdoch. . . 2796

Most estrogen receptor positive breast cancers will eventually display resistance to anti-estrogen therapy. This study examined the role of chromatin in loss of estrogen regulation of the pS2 gene. The pS2 promoter was stably inserted into a recombinant site and compared to the native site in the same cell. Transcription from the native site was dependent upon estrogen and both sites showed estrogen induced recruitment of receptor to promoter. The recombinant site was characterized by highly elevated levels of activating histone modifications compared to the native site and high, constitutive transcription. These findings demonstrate that a permissive chromatin environment can override enhancer activity and may be a mechanism for a gene to escape normal hormone regulation.

Multiplex RT-PCR Expression Analysis of Developmentally Important Genes in Individual Mouse Preimplantation Embryos and Blastomeres¹

Andreas May,³ Roland Kirchner,⁴ Helena Müller,⁴ Petra Hartmann,⁴ Nady El Hajj,³ Achim Tresch,⁵ Ulrich Zechner,³ Wolfgang Mann,⁴ and Thomas Haaf^{2,3}

Institute for Human Genetics,³ Johannes Gutenberg University Mainz, 55101 Mainz, Germany
Advantix AG,⁴ 81377 Munich, Germany

Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics,⁵ Johannes Gutenberg University Mainz, 55101 Mainz, Germany

ABSTRACT

We have developed a microfluidic chip-based qualitative assay for sensitive (10 RNA copies) detection of multiple transcripts in single cells. We determined the expression patterns of 17 developmentally important genes and isoforms in individual mouse preimplantation embryos from superovulated matings and blastomeres. The ubiquitously expressed histone variant *H3f3a* and the transcription factor *Pou5f1* generated mRNA-derived products in all analyzed (1-cell, 2-cell, 4-cell, and morula stage) embryos and in all analyzed blastomeres from 16-cell embryos, indicating a uniform reactivation of pluripotency gene expression during mouse preimplantation development. In contrast, mRNA expression of different methyltransferases for DNA methylation, methylcytosine-binding proteins for chromatin modification, and base excision repair enzymes, which may provide a mechanism for active demethylation, varied considerably between individual cells from the same embryo and even more dramatically between cells from different embryos. We conclude that at a given point in time the transcriptome encoding the reprogramming machinery and, by extrapolation, genome reprogramming differs between blastomeres. By studying the cell-to-cell variability in gene expression, we can distinguish the following two classes: mouse 16-cell embryos in which most cells express the reprogramming machinery and embryos in which most cells do not contain detectable mRNA levels of DNA and chromatin modification genes. Immunolocalization of DNMT3A, MBD3, APEX1, and LIG3 in most or all nuclei of 40–60-cell embryos is a good indicator of functional activity of genes that are activated by the 16-cell stage.

blastomere, developmental biology, DNA methyltransferase, early development, embryo, gene regulation, genome reprogramming, in vitro fertilization, methyl-CpG-binding domain protein, multiplex RT-PCR, preimplantation development, single-cell analysis

INTRODUCTION

Preimplantation development is characterized by dramatic cellular and molecular events, including fusion of the two haploid genomes, activation of the embryonic genome, restoration of pluripotency, and blastocyst formation. In mouse,

human, and most other mammalian species, the paternal zygotic genome is actively demethylated within a few hours after fertilization, whereas the maternal genome is passively demethylated by a replication-dependent mechanism after the two-cell embryo stage [1, 2]. These genome-wide demethylation waves may have a role in epigenetic reprogramming of the genetically inactive sperm and egg chromatin for somatic development. The timing of establishment of somatic methylation patterns differs between species. In bovine embryos, considerable de novo methylation already occurs at the 8- to 16-cell stage, whereas in mouse embryos remethylation begins only in the blastocyst with the derivation of two different cell types. Disturbances of this highly coordinated reprogramming process may contribute to the high rate of developmental failure in mammals [3, 4].

Genome reprogramming during preimplantation development must be regulated by maternal and/or embryonic expression of genes controlling DNA demethylation and remethylation, chromatin modification, and pluripotency. DNA cytosine-5-methyltransferases (DNMTs) are the enzymes that are responsible for establishment and maintenance of genomic methylation patterns [5]. Inactivation of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3b* caused hypomethylation of the genome and embryonic lethality, indicating that these genes are essential for early mammalian development [6, 7]. DNMT1 has a high affinity for hemimethylated sites that are generated transiently during DNA replication and is largely responsible for maintaining methylation patterns throughout cell divisions. DNMT3A and DNMT3B are thought to function in de novo methylation [8, 9]. *Dnmt3a* [10] and *Dnmt3b* [11] encode multiple isoforms with developmental-stage and tissue-specific expression patterns. DNMT3L lacks the motifs for transmethylation processes but stimulates de novo methylation through direct interactions with DNMT3A and DNMT3B [12]. Considering the developmental dynamics of genomic DNA methylation and the small number of DNMT genes in the mammalian genome, it is plausible to assume that multiple gene variants and interactions increase the complexity of DNA methylation mechanisms.

MECP2, MBD1, MBD2, MBD3, and MBD4 comprise a family of nuclear proteins that are endowed with a 5-methyl-CpG-binding domain (MBD); with the exception of MBD3, all bind specifically to methylated DNA sequences [13]. They recruit repressor and chromatin-remodeling complexes to methylated DNA (i.e., promoters), causing gene silencing [14]. MBD2 has been reported to function as a demethylase [15], but this could not be confirmed [16, 17]. Instead, active demethylation of nonreplicating DNA may be achieved by base excision repair (BER), an evolutionarily highly conserved mechanism for the repair of damaged DNA bases [18]. Type 1 DNA glycosylases remove modified (i.e., methylated) bases and leave an apurinic/aprimidinic (AP) site, which is then

¹Supported by research grant HA 1374/9-1 from the German Research Foundation.

²Correspondence: FAX: 49 6131 175690;
e-mail: haaf@humgen.klinik.uni-mainz.de

Received: 31 July 2007.

First decision: 29 August 2007.

Accepted: 2 September 2008.

© 2009 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

CHART 1. Primer pairs for multiplex RT PCR.

<i>Dnmt3a</i> 1er ^a	ATACTCAGGCTCATCGTCGG	<i>Dnmt3a</i> 1e1 ^a	CCCTACTACATCAGCAAACGG
<i>Dnmt3a</i> 2gr ^a	CAGCAGTTGTGTGCCACA	<i>Dnmt3a</i> 2g1 ^a	CAATGTCACCTGGAGCA
<i>Dnmt3b</i> 1br ^b	GCTATTTGTCTTGAGGCGCT	<i>Dnmt3b</i> 1b1 ^b	AACTTAGAACCCAGGAGACGC
<i>Dnmt3b</i> 2br ^b	TGACTACAGGAAAAGCTGGTT	<i>Dnmt3b</i> 2b1 ^b	TGGCTTCAAAGAATGATAAGCTC
<i>Dnmt3b</i> 3pr ^b	AGAATGGACGGTTGTCCG	<i>Dnmt3b</i> 3p1 ^b	GTGATTGGTGGAAAGCCCAT
<i>Dnmt1</i> 1gr	GGTACTTCAGGTTAGGGTCGTCTA	<i>Dnmt1</i> 1g1	AAAGCAAAAGTGTGATCCCG
<i>Dnmt3l</i> 1fr	AAAGGCTCAGTACCCGCAC	<i>Dnmt3l</i> 1f1	CCTGCCCTTCTCACGGA
<i>Pou5f1</i> 1cr	GACTCCACCTCACACGGTTC	<i>Pou5f1</i> 1c1	CAGACCACCATCTGTCCGCT
<i>Lig1</i> 1cr	AGTTCGACGCTTTGGGAAT	<i>Lig1</i> 1c1	TCAAGTGGTGCCCGAGAG
<i>Lig3</i> 1fr	CACCTCTGCTCATTGTGAA	<i>Lig3</i> 1f1	ACTCGGGTGCAAAACACG
<i>Mbd2</i> 1er	GCCTCATCTCCACTGTCCA	<i>Mbd2</i> 1e1	AGGTAGCAATGACGAGACCC
<i>Mbd1</i> 1dr	TCTGTTCGCGGTTGAAGG	<i>Mbd1</i> 1d1	TGGTGTCAAAGGCAGAGACT
<i>Mbd4</i> 1dr	GAGGAGGGTCCATTTCCTTG	<i>Mbd4</i> 1d1	AGACAGCATCCCACGGAC
<i>Mbd3</i> 1dr	GGTGTGTAGAGCACTCGCAA	<i>Mbd3</i> 1d1	TGCAGAAGAACTGGTCAGGA
<i>Apex1</i> 1br	GCTCTGTCAGTTCAGCCG	<i>Apex1</i> 1b1	ATCAGAAAACCTCACCCAGTG
<i>Polb</i> 1br	TTTCTTAGCTTCCGCTCCG	<i>Polb</i> 1b1	CAGGCGATCCACAAGTACAAT
<i>H3f3a</i> r	GGCCTCACTTGCCCTCTGCAA	<i>H3f3a</i> l	GCAAGAGTGCGCCCTCTACTG

^aPrimer pairs *Dnmt3a* 1er+1 and *Dnmt3a* 2gr+1 are targeted to different regions of the *Dnmt3a* gene. The following combinations of PCR products are amplified from *Dnmt3a* isoforms 1 and 2 (according to NCBI gene entries):

Isoform	PCR products	Expression
<i>Dnmt3a</i> isoform 1 1e+2g	somatic cells (ubiquitously expressed at low levels)	
<i>Dnmt3a</i> isoform 2 2g	pluripotent cells (mouse ES cells)	

^bPrimer pairs *Dnmt3b* 1br+1, *Dnmt3b* 2br+1, and *Dnmt3b* 3pr+1 are targeted to different regions of the *Dnmt3b* gene. The following combinations of PCR products are amplified from *Dnmt3b* isoforms 1-4 (according to NCBI gene entries):

Isoform	PCR products	Expression, structure/function
<i>Dnmt3b</i> isoform 1 1b+2b+3p	pluripotent cells, with transmethylation domain	
<i>Dnmt3b</i> isoform 2 2b+3p	somatic cells, with transmethylation domain	
<i>Dnmt3b</i> isoform 3 3p	somatic cells, without transmethylation domain	
<i>Dnmt3b</i> isoform 4 1b+3p	pluripotent cells, without transmethylation domain	

cleaved by the AP endonuclease APEX1 (REF1) [19]. The DNA backbone at the AP site is subsequently repaired by DNA polymerase(s) and ligase(s). It is noteworthy that MBD4 also functions as a mismatch glycosylase [20, 21].

Maternal cytoplasmic factors control active demethylation in the fertilized egg and can even reprogram a somatic cell nucleus that has been transferred into an oocyte [22, 23]. The mouse embryonic genome is already activated at the two-cell stage [24]. One key factor for the control of early embryonic development is the transcription factor POU5F1 (OCT4). The fertilized mouse oocyte and early cleavage stages contain residual maternal *Pou5f1* mRNA. Embryonic *Pou5f1* expression is initiated at the 4- to 8-cell stage [25]. *Pou5f1* seems to be required in blastomeres throughout all preimplantation stages to maintain pluripotency [26]. The histone variant H3F3A can replace histone H3 and, thus, epigenetically mark chromatin. It shows an asymmetric distribution between male and female pronucleus in the mouse zygote and is present in the nuclei of all preimplantation stages up to the blastocyst [27].

It becomes increasingly clear that average expression data from apparently homogenous cell populations provide an incomplete picture [28, 29]. To better understand epigenetic genome reprogramming during preimplantation development, we have studied the expression of the aforementioned key genes in early mouse embryos and, in particular, the extent to which the expression patterns differ among individual blastomeres.

MATERIALS AND METHODS

Embryo and Blastomere Preparation

Mouse experiments were approved by the committee for animal experimentation at Mainz University School of Medicine and were performed in accordance

with the European Union normative for care and use of experimental animals. Six- to eight-wk-old female C57BL6/J mice were superovulated by intraperitoneal injection of 7.5 IU of eCG (Intervet, Unterschleißheim, Germany) and 44–48 h later by injection of 7.5 IU of hCG (Intervet) and were mated with C57BL6/J males. Embryos of 1-cell, 2-cell, 4-cell, and 16-cell stages were flushed from the oviducts at 10–12 h, 33 h, 41 h, and 60 h after fertilization, respectively [30]. Only “high quality” embryos (by morphological criteria) were used for further analysis. Embryos with developmental delay or signs of fragmentation were discarded. For the isolation of individual blastomeres, 16-cell embryos were washed in calcium- and magnesium-free PBS containing 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) and then incubated in acid Tyrode solution (pH 2.3; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for about 10 sec at 37°C. When thinning of the zona pellucida was observed, the embryos were transferred into a drop of fresh PBS-PVP, and the residual zona was removed by gentle pipetting with a glass micropipette. Zona-free embryos were flushed with PBS-PVP and then incubated in a new drop of PBS-PVP for 5 min at 37°C. Disaggregation of blastomeres was achieved by up-and-down pipetting with a flame-polished glass micropipette. Blastomeres were collected in a 15- μ l drop of PBS medium at 37°C [31].

Primer Design

The Primer3 program (<http://primer3.sourceforge.net/>) [32] was used for designing the oligonucleotide primers (Chart 1) for multiplex RT-PCR. Primers of different genes must have similar melting temperature (T_m) (mean \pm SD, 60°C \pm 1°C); the other physical parameters of the oligonucleotides were according to the standard settings of Primer3. An iterative process was used to check the primers gene by gene for multiplex compatibility using the mispriming parameters of Primer3. A final examination was performed by experimental verification. The resulting gene products ranged across at least one intron to distinguish RNA-derived products from those derived from genomic DNA. The size range of the RNA-derived products was between 100 and 300 bp. The gene products generated with the same primer mixture differed at least 5% in length from each other to distinguish them by gel electrophoresis. The primer pair for *Dnmt1* amplifies both the somatic and oocyte-specific isoforms. Two primer pairs were designed to amplify different regions from *Dnmt3a*, and three primer pairs were designed for *Dnmt3b*. The combination of PCR products of a particular cell allowed us to distinguish two *Dnmt3a* and four *Dnmt3b* isoforms.

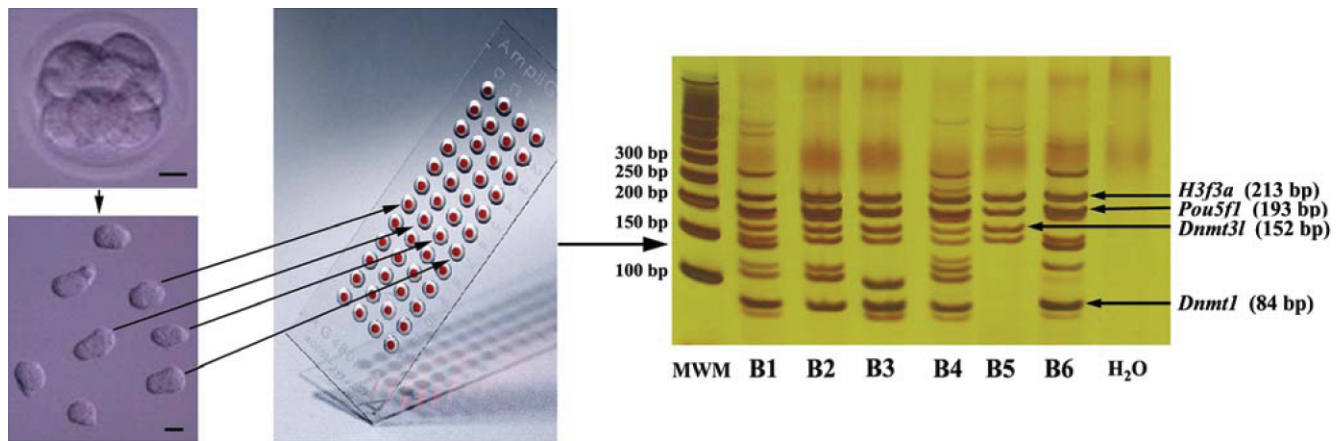


FIG. 1. Overview of single-cell expression analysis with AmpliGrid technology. Individual blastomeres of a disaggregated mouse embryo are placed onto discrete reaction sites of the AmpliGrid for multiplex RT-PCR. The PCR products from individual blastomeres (B1–B6) are then resolved by gel electrophoresis. The first lane on the gel contains molecular weight markers (MWM) and the last lane a water control. *H3f3a* (213 bp) and *Pou5f1* (193 bp) gene products are detected in each cell, whereas *Dnmt1* (84 bp) and *Dnmt3l* (152 bp) bands are only present in a subset of cells. Bar = 10 μ m.

RT-PCR on AmpliGrid Chips

Individual preimplantation embryos or individual blastomeres were transferred in approximately 0.3 μ l of PBS each onto an AmpliGrid AG480F slide (Advalytix, Munich, Germany). This is a glass chip with a surface structure for the specific positioning of 1 μ l on each of 48 discrete reaction sites (Fig. 1). The RT was performed with RT primer mixture (Table 1) at a final primer concentration of 0.3 μ M each using buffer and polymerases of the OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). The Q solution was used at 1-fold concentration. The RT reaction was performed in a 1- μ l volume on the AmpliGrid at 60°C for 30 min on a preheated slide cyclor. The subsequent PCRs were performed using one fourth of the RT product (1 μ l of a 1:4 dilution of the RT mix in water) as template. Template cDNA was evaporated to dryness on two different reaction sites of a second AmpliGrid. The two PCRs were performed with the Qiagen multiplex PCR kit and primer mixture one or two. A master mix with all buffer substances, Taq polymerase, and PCR primer mixture one or two at a final primer concentration of 0.3 μ M each was prepared according to the manual accompanying the kit. The Q solution was used at 0.3-fold concentration. One microliter each of master mix 1 and master mix 2 was applied to the two different reaction sites with the template and covered with 5 μ l of sealing solution. The PCR was performed on a slide cyclor with an initial denaturation step of 95°C for 10 min and 40 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 60 sec, and 72°C for 60 sec, and a final 10-min extension step at 72°C.

To demonstrate the sensitivity of our assay, we amplified a 308-bp fragment from an RNA dilution series with 1000, 100, 10, one, and no copies of pAW109 RNA using the GeneAmp RNA PCR control kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and primers DM151 and DM152. In addition, we amplified gene-specific 183-bp (*Apex1*), 241-bp (*Lig1*), 116-bp (*Lig3*), and 291-bp (*Mbd2*) fragments from RNA dilution series of *Apex1*, *Lig1*, *Lig3*, and

Mbd2 using primer pairs *Apex1* 1bl+r, *Lig1* 1cl+r, *Lig3* 1fl+r, and *Mbd2* 1el+r, respectively (Chart 1). RNAs were produced by in vitro transcription (IVT) of cDNA clones IRAVp968F08125D (*Apex1*), IRAVp968B1152D (*Lig1*), IMAGp998G1814414Q (*Lig3*), and IRAVp968H0390D (*Mbd2*) (ImaGenes, Berlin, Germany) using the SP6/T7 transcription kit (Roche, Basel, Switzerland). RNA concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE). After calculation of the molecular weight of the in vitro-produced RNA molecule, the number of RNA copies in the IVT reaction was calculated. The RT-PCR was performed on the AmpliGrid as already described.

Standard 8% PAGE in Tris-borate-EDTA buffer was used for product analysis. The minigel (10 \times 8 \times 0.1 cm) electrophoresis was run at 120 V for 45 min. The bands on the gel were stained for 5 min with 1% silver nitrate solution, washed for 20 sec with water, and developed for 5–10 min with 0.1% alcaleic formalin solution (dissolve 3 drops of NaOH in 50 ml of H₂O and add 150 μ l of 37% formalin solution). Gel documentation was performed using a standard digital camera system on a white-light dish.

Quantitative Real-Time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR (Q PCR) was used for expression analyses of individual genes in single cells. The RT of individual blastomeres was performed with primers *Pou5f1* 1cr, *Dnmt3l* 1fr, and *Lig3* 1fr. One microliter each of the 1:4 diluted RT reaction product was then added to wells of a microtiter plate containing primer pairs *Pou5f1* 1cl+r, *Dnmt3l* 1fl+r, or *Lig3* 1fl+r (Chart 1) at a concentration of 0.6 μ M. The QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) does not allow multiplex reactions. Therefore, with the same starting material (one fourth of the RT product per PCR) only four genes can be analyzed in a single cell by Q PCR using the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR detection system. The QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix contains 2.5 mM MgCl₂. The PCR was performed with one denaturation cycle at 95°C for 15 min and 40 amplification cycles at 94°C for 15 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec. The PCR products were quantified by generating a melting curve (60°C–95°C) with continuous fluorescence measurement. The cycle number at which a fluorescent signal rises above background (C_t value) was determined for each transcript in each individual cell. The mean C_t value of approximately 50 analyzed individual cells was used for relative quantification of gene expression.

Whole-Mount Immunofluorescence Staining

Mouse monoclonal antibody (IMG-268) against the C-terminus (amino acids 705–908) of mouse DNMT3A was purchased from Imgenex (San Diego, CA), mouse monoclonal antibody (NB100–116) against human APEX1 from Novus Biologicals (Littleton, CO), mouse monoclonal antibody (MS-669-P0) against human POLB from NeoMarkers (Fremont, CA), and goat polyclonal antibodies (sc-9402) against the C-terminus of human MBD3 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Texas red-labeled goat anti-mouse IgG (sc-2781) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled donkey anti-goat IgG (sc-2024) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

For immunofluorescence staining of late morula-stage embryos, the zona pellucida was removed with acidic Tyrode solution. The embryos were fixed

TABLE 1. Primer mixtures for RT and PCR reactions.

RT primer mix	PCR primer mixture 1	PCR primer mixture 2
<i>Dnmt3a</i> 1er	<i>Dnmt3a</i> 1el+r 270 bp	<i>Lig1</i> 1cl+r 241 bp
<i>Dnmt3a</i> 2gr	<i>Dnmt3a</i> 2gl+r 165 bp	<i>Lig3</i> 1fl+r 116 bp
<i>Dnmt3b</i> 1br	<i>Dnmt3b</i> 1bl+r 102 bp	<i>Mbd2</i> 1el+r 291 bp
<i>Dnmt3b</i> 2br	<i>Dnmt3b</i> 2bl+r 138 bp	<i>Mbd1</i> 1dl+r 77 bp
<i>Dnmt3b</i> 3pr	<i>Dnmt3b</i> 3pl+r 145 bp	<i>Mbd4</i> 1dl+r 122 bp
<i>Dnmt1</i> 1gr	<i>Dnmt1</i> 1gl+r 84 bp	<i>Mbd3</i> 1dl+r 109 bp
<i>Dnmt3l</i> 1fr	<i>Dnmt3l</i> 1fl+r 152 bp	<i>Apex1</i> 1bl+r 183 bp
<i>Pou5f1</i> 1cr	<i>Pou5f1</i> 1cl+r 193 bp	<i>Polb</i> 1bl+r 93 bp
<i>Lig1</i> 1cr	<i>H3f3a</i> 1+r 213 bp	<i>H3f3a</i> 1+r 213 bp
<i>Lig3</i> 1fr		
<i>Mbd2</i> 1er		
<i>Mbd1</i> 1dr		
<i>Mbd4</i> 1dr		
<i>Mbd3</i> 1dr		
<i>Apex1</i> 1br		
<i>Polb</i> 1br		
<i>H3f3a</i> r		

TABLE 2. Primer sensitivity data.

Gene	Percentage of RT-PCR trials with positive output			
	1 RNA copy	10 copies	100 copies	1000 copies
pAW109	19% (9/52)	89% (16/18)	100% (8/8)	100% (8/8)
<i>Apex1</i>	24% (10/42)	68% (17/25)	100% (16/16)	100% (14/14)
<i>Lig1</i>	11% (5/45)	73% (8/11)	100% (8/8)	100% (6/6)
<i>Lig3</i>	4% (1/24)	82% (14/17)	100% (6/6)	100% (6/6)
<i>Mbd2</i>	13% (5/39)	81% (13/16)	100% (8/8)	100% (6/6)

for 15 min with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature. They were then blocked overnight at 4°C in 1% BSA, 0.1% Triton X-100, and 1.5% goat or donkey serum. After blocking, the embryos were incubated with primary antibody (diluted in blocking solution according to the recommendations of the supplier) against DNMT3A, MBD3, APEX1, or POLB at room temperature for 2 h. The embryos were then washed several times with PBS and incubated for 1 h with fluorescent-labeled secondary antibodies. After three further washes with PBS, the embryos were placed on slides and mounted with a small drop of Vectashield mounting medium containing 0.1% 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Tris-like) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Images were taken using a Leica (Wetzlar, Germany) epifluorescence microscope with a Peltier-cooled charge-coupled device camera (Leica DC 350F) controlled by a personal computer. The grey-scaled source images were captured separately, pseudocolored, and merged using Leica CW 4000 fluorescence in situ hybridization imaging software. In all control experiments in which the first antibody (against DNMT3A, MBD3, APEX1, or POLB) was omitted, morula-stage blastomeres always displayed absence of immunofluorescence staining.

Statistical Analysis

Fisher exact test was used to compare the abundances of gene products within morula-stage embryos and individual morula blastomeres. $P < 0.05$ was considered significant.

We used a Bayesian approach to test whether there are genes showing differential expression across the cells of a morula. Using gene x as an example, the number of cells in which x is present follows a binomial distribution $\text{Bayesian}(n, P)$, where n represents the number of all cells under consideration; and P , the probability of being expressed. If x is not differentially expressed across cells, then $P = 0.0$ or $P = 1.0$. Assuming a measurement error of 20% false positives or 20% false negatives, we accept $P < 0.2$ and $P > 0.8$ as nondifferentially expressed. Because we have no prior information about the true P value, we start with a flat prior for P , $P_{\text{prior}} \sim \text{uniform}(0,1)$. Counting the n_0 absences and the n_1 and the presences of x ($n_0 + n_1 = n$) the posterior for P becomes a beta distribution with shape parameters n_0 and n_1 , $P_{\text{post}} \sim \text{beta}(n_0, n_1)$. We report the ratio $P(P_{\text{post}} \neq [0.2, 0.8])$ to $P(P_{\text{post}} \in [0.2, 0.8])$ as a measure for differential expression. The smaller the ratio is, the stronger the support for differential expression.

We also explored if the single-cell expression patterns of individual embryos fall into distinct groups. For each morula and each RNA, the relative abundance of cells from a given embryo expressing the respective RNA was calculated. Therefore, each morula is represented by a 15-dimensional (there were 15 RNA populations tested) real-valued vector. We performed a principal components analysis to obtain improved visualization. Morula eight was a complete dropout and was excluded from further analysis. This was because only one expressing cell was obtained from this embryo (Supplemental Table 1 and all other supplemental data are available at www.biolreprod.org). A 2-means clustering algorithm was run on the remaining 11 data points, resulting in a clear separation.

RESULTS

Assay Design and Validation

We have developed a multiplex RT-PCR assay for DNA and chromatin modification genes that has the sensitivity required for single-cell analysis. It uses a commercially available microfluidic chip with discrete reaction sites for RT and subsequent multiplex PCRs (Fig. 1). The multiplex primer set (Chart 1) allows the simultaneous analysis of the DNA methyltransferases *Dnmt1*, *Dnmt3a* (isoforms 1 and 2), *Dnmt3b* (isoforms 1–4), and *Dnmt3l*; the methylcytosine

(mC)-binding proteins *Mbd1*, *Mbd2*, *Mbd3*, and *Mbd4*; the BER genes *Apex1*, *Polb*, *Lig1*, and *Lig3*; and the pluripotency gene *Pou5f1*. Critical to the application of blastomere and single-embryo analysis is the selection of an appropriate reference gene. Therefore, we tested the expression of several commonly used reference genes, including *Gapdh*, *Hist3h2a*, *H3f3a*, and *Rn18s* (18S RNA) in mouse 1-cell, 2-cell, 4-cell, and 16-cell embryos and found *H3f3a* to be the most stable gene (data not shown). The RT-PCR on AmpliGrid chips produced *H3f3a* bands of comparable intensity in essentially all examined individual embryos. The histone variant *H3f3a* is an ubiquitously and cell-cycle independently expressed gene that has been used as internal control for RT-PCR experiments in different tissues [33, 34]. For multiplex analysis, the RT reaction was performed with the entire RT primer mix (Table 1). To facilitate the resolution of gene products on minigels, the PCR was performed in two different reactions, each amplifying products of the reference gene *H3f3a* and eight study genes/isoforms. One fourth to one fifth of the RT product generated in the first reaction was sufficient as starting material for subsequent multiplex PCR. Therefore, AmpliGrid technology allows one to analyze the expression of approximately 40 different gene products in a single cell or embryo.

Before single-embryo analysis, the multiplex primer set was validated with 10 independent RT-PCRs using 200 pg each of total RNA from C57BL6/J mouse embryos at 11.5 days postcoitum. For comparison, a mouse zygote is estimated to contain 350–550 pg of total RNA [30]. Thirteen of 17 tested primer pairs generated gene products in nine or 10 of 10 trials. The primer pairs for *Mbd4* and *Dnmt3b* 3p gave products in five to eight trials, and those for *Dnmt3b* 1b and *Dnmt3l* gave products in two to five trials (data not shown). It is not unexpected that the mRNA levels of some genes/isoforms that are preferentially expressed in pluripotent cells are very low in embryos at 11.5 days postcoitum. To test the sensitivity of our assay, we first amplified a 308-bp fragment from pAW109 RNA, a commercially available control RNA. For interpretation of the AmpliGrid results, it is critical that different primer pairs in our customized multiplex have the same limit of sensitivity. Therefore, we generated RNAs of four of our study genes by IVT of *Apex1*, *Lig1*, *Lig3*, and *Mbd2* cDNA clones. Different numbers of RT-PCRs were performed with 1000, 100, 10, one, and no RNA molecules. A gene-specific product was detected in all trials with 1000 or 100 RNA copies, in 68%–89% (mean \pm SD, 78.6% \pm 7.3%) of trials with 10 copies, and in 4%–24% (mean \pm SD, 14.2% \pm 6.9%) of trials with one copy (Table 2). The water controls were always negative. When working with limiting dilution (on average, one copy per reaction), approximately 30% of the reactions may not contain an RNA molecule, whereas another 30% may contain two or more RNA molecules. Therefore, the detection rate with one or two RNA copies is around 20%, with 10 copies is around 80%, and with 100 or more copies is 100%. To simplify matters, we conclude that as few as 10 transcripts can be reliably detected using AmpliGrid technology.

Expression Analysis of Individual Embryos

We have studied expression of our gene set in at least 20 individual embryos each of 1-cell, 2-cell, 4-cell, and 16-cell stages. The reference gene *H3f3a*, the pluripotency gene *Pou5f1*, the DNA methyltransferase *Dnmt1*, the mC-binding protein *Mbd3*, and the BER genes *Apex1*, *Polb*, and *Lig3* were expressed in essentially all embryos from zygote to morula stage, indicating embryonic activation of gene expression during preimplantation development (Fig. 2). *Mbd1* and *Mbd4*

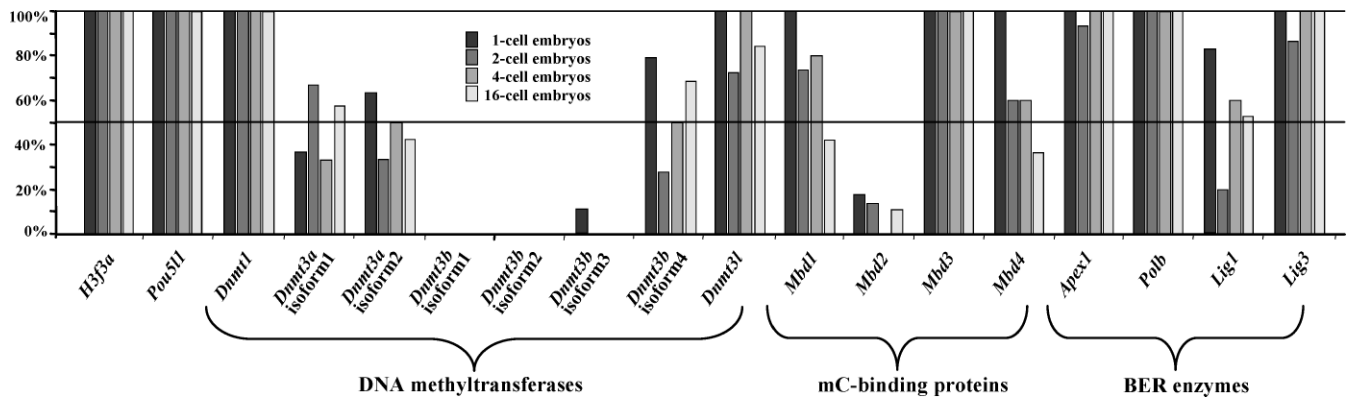


FIG. 2. Gene expression in mouse 1-cell, 2-cell, 4-cell, and 16-cell embryos (indicated by different shades of grey). The histograms show the percentages of individual embryos expressing the indicated gene or isoform. One fourth of the RT reaction from an individual embryo was used for subsequent multiplex PCR. At least 20 embryos of each stage were analyzed.

products were present in all zygotes, but the percentage of embryos with detectable *Mbd1* and *Mbd4* expression steadily decreased from the 2-cell to the 16-cell stage. One plausible explanation is that the zygote contains residual maternal *Mbd1* and *Mbd4* mRNAs, which then gradually disappear during embryo cleavages. *Mbd2* was not detectable in most zygotes and other early-embryo stages, providing further evidence against its function as a zygotic demethylase [17]. Isoforms of de novo methyltransferase *Dnmt3a* were expressed in 30%–60% of embryos from zygote to morula stage. *Dnmt3a* isoform 1 was reported to be more or less ubiquitously expressed at low levels, whereas the shorter *Dnmt3a* isoform 2 is preferentially expressed in embryonic stem (ES) cells and tissues undergoing de novo methylation [10]. Only isoform 4 of de novo methyltransferase *Dnmt3b*, which lacks the catalytic domain, was found to be expressed during mouse preimplantation development in 30%–80% of embryos. Neither *Dnmt3b* isoform 1 (with transmethylation domain), which is known to be enriched in mouse ES cells, nor the somatic isoforms 2 (with transmethylation domain) and 3 (without transmethylation domain) were found to be expressed postzygotically. Maternal *Dnmt3b* isoform 3 transcripts were detected in 10% of zygotes.

Single-Blastomere Analysis

To demonstrate the usefulness of our assay for single-cell analysis, we determined the expression profiles of 118 individual blastomeres from 12 independent 16-cell embryos. Seventeen cells (14%) that did not give any RT-PCR product were excluded from further analysis. Although we cannot exclude the formal possibility that these cells do not express any of the 17 tested genes/isoforms, the complete absence of detectable transcripts is more likely due to technical artifacts (i.e., loss of the cell during preparation or a pipetting error).

It is not unexpected that the expression pattern of the “average” blastomere (Fig. 3A) based on analysis of 101 single cells (Supplemental Table 1) was similar to that of whole embryos of the same developmental stage (Fig. 2, white bars). The mRNAs for *H3f3a* and *Pou5f1* were detected in essentially all analyzed blastomeres from mouse 16-cell embryos. However, there were also statistically significant (using Fisher exact test) expression differences between individual blastomeres and whole embryos. *Dnmt1* ($P = 0.004$), *Mbd3* ($P < 0.001$), *Apex1* ($P = 0.007$), *Polb* ($P = 0.013$), and *Lig3* ($P = 0.001$) mRNAs were detected in all analyzed 16-cell embryos but in only 60%–80% of blastomeres. *Dnmt3l* ($P < 0.001$) was detected in approximately 80% of the embryos and 40% of the

blastomeres. The percentage of *Dnmt3l*-expressing cells in individual embryos ranged from 0% to 75% (Supplemental Table 1). The discrepancies between 16-cell embryos and blastomeres are due to the fact that expression of a particular gene in only one or two cells of an individual embryo is sufficient to generate an RNA-derived product from this embryo in a single-embryo analysis.

Our results clearly demonstrate that the expression of DNA and chromatin modification genes can vary among cells at the same stage of preimplantation development. Using a Bayesian approach (for details, see *Materials and Methods*), there is strong support for differential expression of *Dnmt3b* isoform 4 (ratio score, 9.16×10^{-9}), *Dnmt3l* (ratio score, 4.16×10^{-5}), *Lig3* (ratio score, 4.17×10^{-5}), *Dnmt3a* isoform 1 (ratio score, 0.0001), *Lig1* (ratio score, 0.0011), and *Mbd3* (ratio score, 0.0022) across morula blastomeres. For example, for *Dnmt3a* isoform 1, it is 10 000 times more likely that the true P ranges within (0.2, 0.8) than not. There is weak support for differential expression of *Dnmt1* (ratio score, 0.045), *Dnmt3a* isoform 2 (ratio score, 0.279), and *Apex1* (ratio score, 0.924). Our data do not support differential expression of *Mbd1* (ratio score, 25), *Mbd2* (ratio score, 390727), *Mbd4* (ratio score, 2.1), and *Polb* (ratio score, 3.2). Of course, this is also true for *Dnmt3b* isoforms 1–3, which are almost never detectable in blastomeres, as well as for *Pou5f1* and *H3f3a*, which are expressed in essentially all blastomeres.

Population analysis of gene expression in individual blastomeres is certainly more informative than expression profiling of the entire embryo. We can distinguish two different types of mouse 16-cell embryos based on their blastomere expression patterns. The embryo in Figure 3B (morula m5 in Fig. 4) expresses *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* isoform 4, *Mbd3*, and BER genes in most or all of its individual cells. In contrast, the embryo in Figure 3C (m10 in Fig. 4) contains few cells expressing these DNA and chromatin modification genes. Only one of 12 analyzed cells from this embryo showed detectable mRNA levels for a de novo methyltransferase. Principal component analysis of the single-cell expression profiles of 11 morulae revealed a clear separation of 16-cell embryos (m1–m6) expressing the reprogramming machinery in most cells vs. embryos (m7 and m9–m12) that do not (Fig. 4). This clustering supports our view that the analyzed embryos fall into two distinct groups. However, additional experiments and larger data sets are required to definitively exclude the possibility that there is a continuum of expression profiles among embryos.

The RT-PCR is considered to be the most sensitive technique for mRNA detection and quantification that is

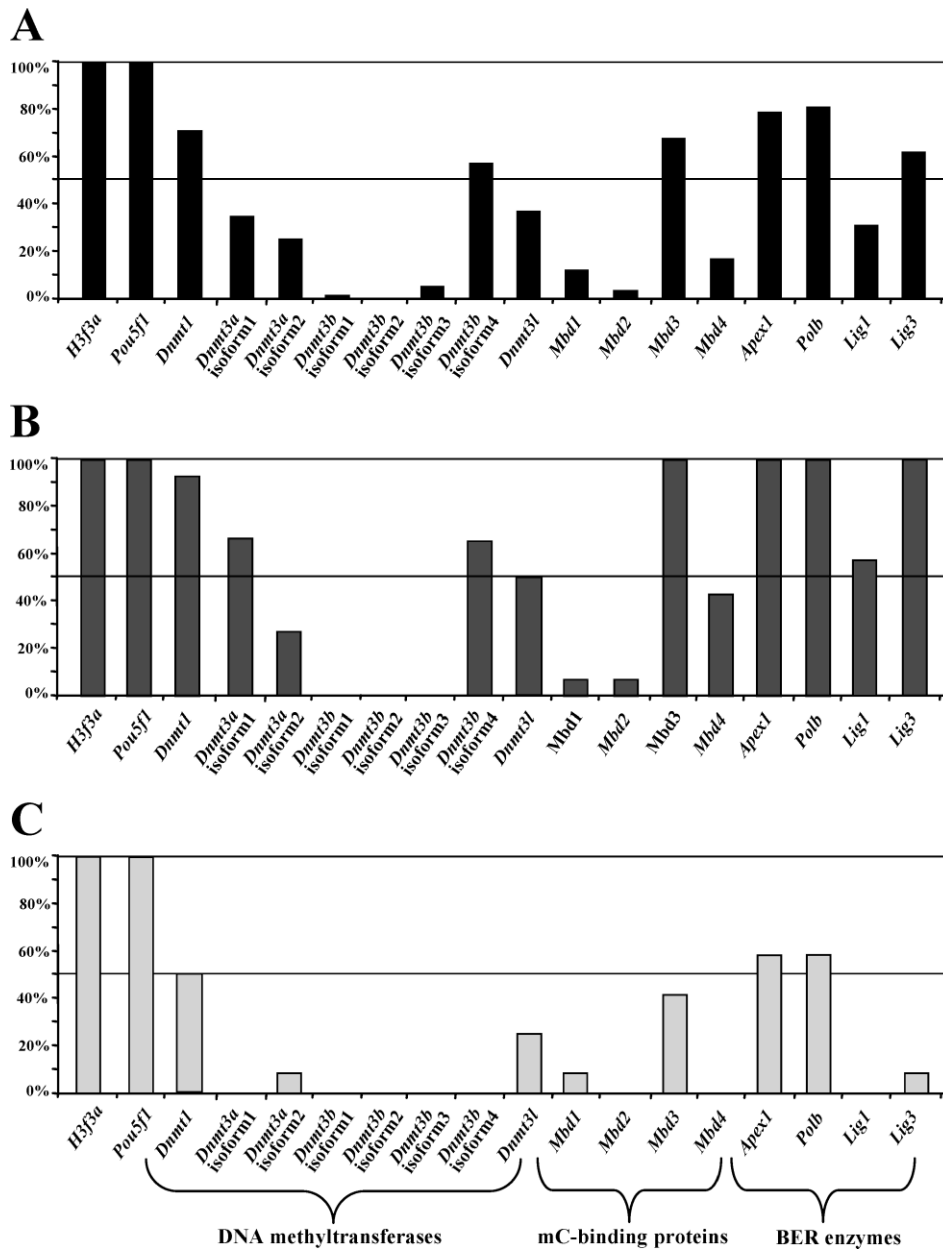


FIG. 3. Gene expression in blastomeres of mouse 16-cell embryos. The bars show the percentages of blastomeres expressing the indicated gene or isoform. One fourth of the RT reaction from a single cell was used for subsequent multiplex PCR. **A**) Average percentages of expressing cells in 16-cell embryos. One hundred one cells from 12 different embryos were analyzed. **B**) Percentages of expressing cells in embryo m5, in which most (of 14 analyzed) cells express the reprogramming machinery. **C**) Percentages of expressing cells in embryo m10, in which most (of 12 analyzed) cells do not show detectable expression of DNA modification genes.

available. Therefore, we compared the sensitivity of our microfluidic chip-based multiplex assay with that of Q PCR of three individual genes. Expression of *Pou5f1*, *Dnmt3l*, and *Lig3* was analyzed by Q PCR in more than 50 blastomeres each. For *Pou5f1*, 52 of 54 analyzed cells (96%) gave an amplification product. The mean \pm SD C_t value was 33.8 ± 2.2 , and the mean \pm SD T_m was $82.9^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$. Four of 54 analyzed blastomeres (7%) were positive for *Dnmt3l* (mean \pm SD $C_t = 36.3 \pm 0.6$; mean \pm SD $T_m = 83.4^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$), and eight of 53 blastomeres (15%) yielded products for *Lig3* (mean \pm SD $C_t = 36.8 \pm 1.75$; mean \pm SD $T_m = 81.0^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$). The higher mean C_t values for *Dnmt3l* and *Lig3* indicate fewer starting molecules (transcripts) in the Q PCR compared with *Pou5f1*. Our AmpliGrid assay showed 100% of blastomeres expressing *Pou5f1*, 63% expressing *Lig3*, and 37% expressing *Dnmt3l*. For qualitative measurements, AmpliGrid technology is at least as sensitive as single-cell Q PCR.

To test whether mRNA expression of a specific gene in 16-cell embryo blastomeres correlates with gene activity in later preimplantation stages, we performed immunofluorescence

staining of the corresponding proteins in 40- to 60-cell embryos. A monoclonal antibody against both isoforms of mouse DNMT3A produced a punctate nuclear staining largely excluding heterochromatic chromocenters in 110 of 168 analyzed late morula-stage blastomeres (66%) (Fig. 5A). The percentages of DNMT3A-positive nuclei in the five analyzed embryos were 47%, 62%, 70%, 92%, and 95%. This is consistent with our observation that 35% of 16-cell blastomeres express *Dnmt3a* isoform 1 mRNA and/or that 25% express *Dnmt3a* isoform 2 mRNA (Fig. 3A). Polyclonal antibodies against human MBD3 stained all (106 of 106 analyzed) nuclei of three different embryos but with somewhat variable intensity. In general, the DAPI-positive heterochromatin exhibited brighter immunofluorescence than the euchromatic remainder of the nucleus (Fig. 5B). By single-cell expression analysis, 68% of blastomeres from 16-cell embryos showed detectable *Mbd3* transcripts. A monoclonal antibody against human APEX1 stained cytoplasm and nucleus of morula-stage blastomeres (data not shown). Because the cytoplasmic staining may represent unspecific background, only 99 of

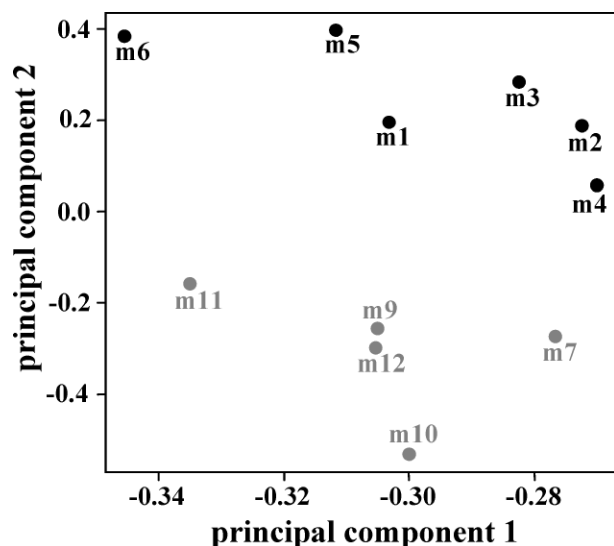


FIG. 4. Principal component plot (each vector is based on the presence or absence of 15 different mRNAs tested) showing clear separation of two clusters of 16-cell embryos. One cluster (indicated by black dots) is represented by morulae m1–m6, expressing the reprogramming machinery in most blastomeres, and a second cluster (grey dots) by morulae m7 and m9–m12, which do not express key genes for reprogramming in most cells.

106 analyzed blastomeres (93%) with stronger (than cytoplasmic background) homogeneous nuclear staining were considered to contain functional (nuclear) APEX1 protein. Two morulae exhibited 79% and 89% APEX1-positive nuclei, whereas three morulae stained positively in all their nuclei. By comparison, 79% of 16-cell blastomeres contained detectable *Apex1* mRNA levels (Fig. 3A). A monoclonal antibody against human POLB produced weak cytoplasmic and homogeneous nuclear staining in late morula-stage embryos (data not shown). Altogether, 106 of 109 analyzed blastomere nuclei (97%) were POLB positive. *Polb* transcripts were detected in 81% of 16-cell blastomeres.

DISCUSSION

There is an increasing requirement for expression analyses at the single-cell level (i.e., individual micromanipulated cells and rare cells isolated by cell sorting or laser capture from larger cell populations or tissues). Individual cells in an early

embryo are the fundamental units for restoring pluripotency during cleavage divisions. Because molecular events (i.e., activation of a particular gene) may display large cell-to-cell variations, a better understanding of the reprogramming process requires expression analyses at the single-blastomere level. Several studies [35–40] have used Q-PCR for quantification of gene expression in individual preimplantation embryos; however, single-cell analysis pushes the limits of the technique. With the notable exception of oocytes that contain large amounts of residual maternal mRNAs, quantification of gene expression in individual embryonic cells by RT-PCR remains difficult [35–40]. Only a few genes and cells can be analyzed by semi-Q-PCR in a reasonable time frame. On the other hand, different protocols have been published for genome-wide expression profiling of single cells on oligonucleotide microarrays claiming that exponential or multiple round linear cDNA amplification from single cells does not change the relative ratios of individual transcripts [41–43]. Global RT-PCR procedures can yield micrograms of cDNA from single cells or embryos, allowing quantitative expression analyses of an almost unlimited number of genes. Although studies [44, 45] using this global strategy have demonstrated biological variation between individual embryos, quantitative expression data were only provided for a few genes. Multiple displacement amplification (MDA) with phi29 polymerase is isothermal and not based on PCR. It arguably is the most reliable and efficient method for whole-genome amplification [46]. It has been used for genome amplification of single sperm [47] and single blastomeres [48]. With some modifications, MDA can also be used for unbiased amplification of cDNA [49]. Even when single-cell cDNA representation and sensitivity are made possible using different amplification strategies, microarray analyses are time-consuming and expensive and, therefore, are not suitable for rapidly screening large numbers of individual cells. AmpliGrid technology does not require amplification of the single-cell transcriptome. It makes use of RT of a single cell in a 1- μ l reaction and subsequent 1- μ l multiplex PCRs of a cDNA dilution. The RT product generated from a single cell is sufficient for a qualitative readout of approximately 40 different genes/transcripts of interest in four to five multiplex PCRs. The most time-consuming step is designing and testing the oligonucleotide primers for multiplex RT-PCR. Once established, our assay has the advantage of speed, high throughput, and accuracy, using only standard laboratory equipment. One obvious application is the validation of results obtained from microarray analyses and other genome-wide techniques in a larger number of individual cells.

Herein, we have analyzed the expression of 17 developmentally important genes/isoforms in individual mouse embryos and embryonal cells. Our results are consistent with previous studies [50, 51] showing that *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, and *Dnmt3l* are expressed during early development. The observed expression patterns promote the idea that *Dnmt1* and *Dnmt3a* encode the enzymatic activity for DNA methylation during mouse preimplantation development and may be stimulated by co-expression of *Dnmt3b* isoform 4 and *Dnmt3l*. However, in this context it is important to emphasize that mRNA expression does not necessarily correlate with functional activity. Although *Dnmt1* transcripts are present throughout all preimplantation stages, DNMT1 protein is retained in the cytoplasm, which prevents its methyltransferase activity. Nuclear localization is only seen in eight-cell embryos but not in other preimplantation stages [52, 53]. Our results also support the conclusion that *Mbd2* and *Mbd3* have distinct roles in early mouse development. *Mbd3* is expressed and is essential in early embryogenesis, whereas *Mbd2* expression

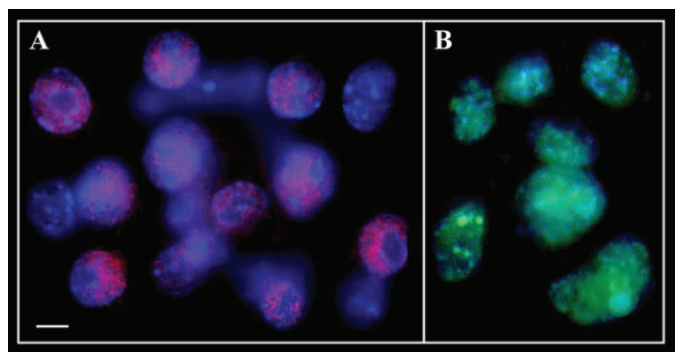


FIG. 5. Immunofluorescence staining of late morula-stage blastomeres. **A)** Partial embryo stained with Texas red-labeled antibody against DNMT3A and counterstained with DAPI. Note the punctate nuclear staining in most but not all cells from this embryo. Bar = 10 μ m. **B)** Partial embryo stained with FITC-labeled antibody against human MBD3 and counterstained with DAPI. Note the strong heterochromatin immunofluorescence.

starts only at the blastocyst stage, and *Mbd2*^{-/-} mice are viable [54, 55]. Our observation that *Apex1*, *Polb*, and *Lig3* are expressed throughout all preimplantation stages argues in favor of the notion that BER is required for embryo development. This is consistent with the observation that homozygous mutants for these BER genes die during embryo development [56–58]. More published information on mRNA and/or protein expression of our study genes in mouse preimplantation embryos and on the phenotype of knockout mice can be found in Supplemental Tables 2 and 3.

Our assay has the reliability and sensitivity for single-cell expression analysis. The histone variant *H3f3a* and the transcription factor *Pou5f1* produced detectable RNA-derived products in all analyzed preimplantation embryos and, therefore, can serve as positive controls. The fact that *Pou5f1* becomes consistently expressed in all morula blastomeres indicates a uniform reactivation of pluripotency during preimplantation development. It has been described previously that embryonic *Pou5f1* mRNA expression is initiated in the mouse at the four- to eight-cell stage, concomitant with nuclear localization of the protein, implying biological activity [25]. In contrast to *H3f3a* and *Pou5f1*, mRNA expression of DNA and chromatin modification genes varied considerably between individual cells from the same embryo and even more dramatically between cell populations from different embryos. One plausible explanation for this cell-to-cell variability may be the engagement in different cell cycle phases, cellular functions, and/or reprogramming states. In addition, when the embryonic genome is reprogrammed during preimplantation development, each nucleus may be probabilistic to a certain extent in its reactivation of gene expression. However, despite the probabilistic nature of gene expression in individual cells [28, 29] and the considerable experimental noise of single-cell analyses, it is noteworthy that by expression profiling of individual blastomeres we can easily distinguish 16-cell embryos that consistently express *Mbd3*, DNMT, and BER genes in most of their cells and embryos in which these genes have not yet been activated in most cells. It is tempting to speculate that embryos with a higher percentage of cells expressing the reprogramming machinery have a higher potential for development.

Although our assay yields only qualitative data, it can provide meaningful expression profiles of individual embryos and blastomeres. Different primer pairs in our RT-PCR multiplex that have the same limit of sensitivity in RNA dilution series showed widely variable results between individual blastomeres or embryos. For example, *Mbd2* was detected in approximately 10%, *Lig1* in approximately 50%, and *Lig3* and *Apex1* in 100% of 16-cell embryos. Therefore, we conclude that the variability in expression between blastomeres or embryos of the same developmental stage is genuine. In control experiments, 100 transcripts of a given gene always produced a positive output and 10 RNA copies in about 80% of the trials. Therefore, when a specific mRNA band is scored as present in our assay, the analyzed cell or embryo is likely to contain at least 10 RNA copies. When the corresponding band is absent, the gene of interest is not transcribed or may be transcribed at very low levels (<10 RNA copies). Inevitably, the presence or absence of a particular band in a given cell or embryo is also affected by technical limitations, experimental variability, and stochastic processes. However, consistent with previous studies [35–45] in different species, our experiments strongly suggest that the observed heterogeneity among blastomeres or embryos is not simply a methodological artifact but a real biological phenomenon. The AmpliGrid expression profile allows conclusions about which study genes are

expressed in an individual blastomere or embryo and which are not.

Many studies on early mammalian embryogenesis may be flawed because the pooling of samples can mask even dramatic modulations of gene expression in individual cells or embryos. We propose that AmpliGrid technology is powerful to assay relative expression and variability of expression of cells and embryos. Totipotency is restored in embryonal cells after fertilization, and within a few cell divisions these totipotent cells become committed to particular lineages. Similar processes may occur during in vitro differentiation of pluripotent stem cells. Characterization of the underlying molecular events requires systematic examination of gene expression profiles in individual cells. So far, no clear picture has emerged about which genes are consistently expressed or misexpressed in embryos with high or low developmental potential. To identify and validate such marker genes, it is useful to compare individual expression profiles of in vivo, in vitro-produced, and somatic cell nuclear transfer embryos. In vitro maturation, superovulation, cryopreservation, in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and nuclear transfer all occur during sensitive time periods for epigenetic genome reprogramming, interfering with or even bypassing essential steps of gametogenesis and early embryogenesis. Although assisted reproductive technologies are widely applied in animals and humans, their effects on gene expression in individual embryos have not been systematically analyzed. Improving human infertility treatment and the in vitro production of animals requires a better knowledge about the inherent cell-to-cell variability of gene expression in early embryos and the extrinsic variations due to manipulation of germ cells and/or embryos. Expression profiling of individual embryos or blastomeres is a valuable research tool. Global RT-PCR methods combined with oligonucleotide arrays allow genome-wide expression analyses for the generation of hypotheses. The much faster and cheaper AmpliGrid technology is most useful for expression analyses of defined subsets of genes in a large number of individual cells or embryos. With increasing information about the expression of developmentally important genes in early embryos, expression analysis of one or two blastomeres from biopsied embryos may even prove useful for embryo quality assessment in assisted reproductive technologies.

REFERENCES

1. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403:501–502.
2. 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* 2001; 98:13734–13738.
3. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293:1089–1093.
4. Haaf T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 310:13–22.
5. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2395–2402.
6. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69:915–926.
7. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99:247–257.
8. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, Tajima S. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:506–512.
9. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 2003; 23:5594–5605.

10. Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 2002; 277:38746–38754.
11. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219–220.
12. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 2004; 279:27816–27823.
13. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins: targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 2001; 268:1–6.
14. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33:245–254.
15. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397:579–583.
16. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23:62–66.
17. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002; 241:172–182.
18. Jost JP. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:4684–4688.
19. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000; 461:83–108.
20. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193:3–34.
21. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:39–85.
22. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002; 419: 583–586.
23. Shi W, Zakhartchenko V, Wolf E. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 2003; 71:91–113.
24. Schulz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993; 8:531–538.
25. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. OCT-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994; 166:259–267.
26. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler HR, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95:379–391.
27. Torres-Padilla ME, Bannister AJ, Hurd PJ, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol* 2006; 50:455–461.
28. Levis JM, Singer RH. Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol* 2003; 13:4–6.
29. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol* 2006; 4:e309.
30. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002:184–200.
31. Bielanska M, Lin Tan S, Ao A. Chromosomal information derived from single blastomeres isolated from cleavage-stage embryos and cultured in vitro. *Fertil Steril* 2003; 79:1304–1311.
32. Rozen S, Skaletsky HJ. In: Krawetz S, Misener S (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000:365–386.
33. Futscher BW, Blake LL, Gerlach JH, Grogan TM, Dalton WS. Quantitative polymerase chain reaction analysis of mdrl mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. *Anal Biochem* 1993; 213:414–421.
34. Kelley MR, Jurgens JK, Tentler J, Emanuele NV, Blutt SE, Emanuele MA. Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique is comparative, quantitative, and rapid: uses in alcohol research involving low abundance mRNA species such as hypothalamic LHRH and GRF. *Alcohol* 1992; 10:185–189.
35. Krüssel JS, Simon C, Rubio MC, Pape AR, Wen Y, Huang HY, Bielfeld P, Polan ML. Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 2206–2211.
36. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A Jr, Sirisathien S, Brackett B, Niemann H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 2001; 16:893–901.
37. Hartshorn C, Anshelevich A, Wangh LJ. Rapid single-tube method for quantitative preparation and analysis of RNA and DNA in samples as small as one cell. *BMC Biotechnol* 2005; 5:e2.
38. Jeong YJ, Choi HW, Shin HS, Cui XS, Kim NH, Gerton GL, Jun JH. Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2005; 71:284–289.
39. Li SSL, Liu YH, Tseng CN, Singh S. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340:48–53.
40. Smith C, Berg D, Beaumont S, Standley NT, Wells DN, Pfeffer AL. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* 2007; 133:231–242.
41. Iscove NN, Barabara M, Gu M, Gibson M, Modi C, Winegarden N. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol* 2002; 20:940–943.
42. Hartmann CH, Klein CA. Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:e143.
43. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Ono Y, Uno KD, Yamada RG, Ueda HR, Saitou M. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:e42.
44. Metcalfe AD, Bloor DJ, Lieberman BA, Kimber SJ, Brison DR. Amplification of representative cDNA pools from single human oocytes and pronucleate embryos. *Mol Reprod Dev* 2003; 65:1–8.
45. Metcalfe AD, Hunter HR, Bloor DJ, Lieberman BA, Picton HM, Leese HJ, Kimber SJ, Brison DR. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation development and fragmentation. *Mol Reprod Dev* 2004; 68:35–50.
46. Panelli S, Damiani G, Espen L, Micheli G, Sgaramella V. Towards the analysis of the genomes of single cells: further characterisation of the multiple displacement amplification. *Gene* 2006; 372:1–7.
47. Jiang Z, Zhang X, Dekar R, Jin L. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 91–99.
48. Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E, Fassihi H, Black C, Braude P, Ogilvie CM, Abbs S. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping: paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:110–119.
49. Wang G, Maher E, Brennan C, Chin L, Leo C, Kaur M, Zhu P, Rook M, Wolfe JL, Makrigiorgos GM. DNA amplification method tolerant to sample degradation. *Genome Res* 2004; 14:2357–2366.
50. Huntriss J, Hinkins M, Oliver B, Harris SE, Beazley JC, Rutherford AJ, Gosden RG, Lanzendorf SE, Picton HM. Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev* 2004; 67:323–336.
51. Vassena R, Schramm RD, Latham KE. Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:430–436.
52. Cardoso MC, Leonhardt H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 1999; 147:25–32.
53. Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 2002; 245:304–314.
54. Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 2001; 15:710–723.
55. Kantor B, Makedonski K, Shemer R, Razin A. Expression and localization of components of the histone deacetylase multiprotein repressor complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr Patterns* 2003; 3:697–702.
56. Xanthoudakis S, Smeyne RJ, Wallace JD, Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:8919–8923.
57. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossman H, Rajewski K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265:103–106.
58. Puebla-Osorio N, Lacey DB, Alt FW, Zhu C. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3935–3941.