

Der Einfluss assistierter
Reproduktionstechniken auf die
epigenetische Reprogrammierung in der
frühen Embryogenese und Gametogenese
im Mausmodell

D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Matthias Linke

geb. am 12.09.1979 in Lutherstadt Wittenberg

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Widmung

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Danksagung	VI
1 Einleitung	1
1.1 Epigenetik.....	1
1.1.1 Epigenetische Steuerung der Genexpression.....	2
1.1.1.1 <i>cis</i> -operierende epigenetische Mechanismen.....	2
1.1.1.2 <i>trans</i> -operierende epigenetische Mechanismen.....	5
1.2 Genomische Prägung.....	8
1.2.1 Charakteristika von geprägten Genen.....	9
1.2.2 Genomische Prägung aus evolutionärer Perspektive.....	11
1.2.3 Humane Erkrankungen infolge gestörter genomischer Prägung.....	14
1.3 Epigenetische Reprogrammierung während der frühen Embryogenese und Gametogenese in Säugetieren.....	17
1.3.1 Reprogrammierung der DNA-Methylierung in der Zygote.....	17
1.3.2 Reprogrammierung der DNA-Methylierung in den primordialen Keimzellen.....	21
1.4 Assistierte Reproduktionstechniken und damit assoziierte epigenetische Störungen beim Menschen.....	24
1.4.1 Ovarielle Induktion.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	27
2.2 Mausversuche.....	27
2.2.1 Mauszucht.....	27
2.2.2 Ovarielle Stimulation (Superovulation) und Verpaarung.....	27
2.2.3 Präparation muriner Spermien.....	28
2.2.4 Kryokonservierung muriner Spermien.....	29
2.2.5 Präparation von Oozyten-Kumuluszellkomplexen.....	29
2.2.6 <i>In-vitro</i> -Fertilisation.....	29
2.2.7 Motilitätsmessung muriner Spermien.....	29

2.2.8	DNA-Extraktion aus Mausspermien	30
2.2.9	Bisulfitbehandlung der Spermien-DNA.....	31
2.2.10	Präparation von Präimplantationsembryonen.....	31
2.3	Reverse Transkription (RT) im Multiplexformat auf AmpliGrid™ Glasobjektträgern	31
2.4	Absolute Quantifizierung der mRNA durch Real-time PCR	33
2.4.1	Erstellen einer Standardkurve	33
2.4.2	Quantifizierung der Zielgene	34
2.5	<i>Whole mount</i> -Immunfluoreszenzfärbung von Präimplantationsembryonen	34
2.6	Bisulfitbehandlung genomischer DNA.....	35
2.7	Limiting Dilution der Bisulfit-behandelten DNA	36
2.8	MultiPlex-PCR	38
2.9	SinglePlex (semi)-nested PCR	38
2.10	Pyrosequenzierung	40
2.11	Oligonukleotidsequenzen	42
2.12	Datenanalyse	44
2.12.1	Datenbanken und bioinformatische Analyseprogramme	44
2.12.2	Statistik.....	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Absolute Quantifizierung der Zieltranskripte	46
3.1.1	Standardkurven aus rekombinanter DNA.....	46
3.1.2	Ovarielle Induktion führt zur differentiellen Genexpression von <i>Apex1</i> , <i>Mbd3</i> und <i>Polb</i> in Mausembryonen.....	46
3.1.3	Die embryonale Expression von <i>Lig1</i> , <i>Lig3</i> , <i>Mbd2</i> und <i>Mbd4</i> wird durch Superovulation der Muttertiere nicht beeinflusst.....	49
3.2	Korrelation der <i>Apex1</i> -Expression auf mRNA- und Protein-Niveau	51
3.2.1	Nachweis der differentiellen Genexpression von APEX1 auf Proteinebene	51
3.3	DNA-Methylierungsanalysen an Präimplantationsembryonen	53
3.3.1	Digitale Bisulfitpyrosequenzierung	53
3.4	Der Einfluss ovarieller Induktion auf den Imprintingstatus von <i>H19</i> & <i>Snrpn</i> ...	56
3.5	Epigenetische Effekte der Kryokonservierung muriner Spermien	63

3.5.1	Quantifizierung der Spermienmotilität	63
3.5.2	Einfluss der Kryokonservierung murine Spermatozoen auf den epigenetischen Status geprägter Gene	64
3.5.3	Effekte der Kryokonservierung von Spermatozoen auf die F1-Generation.....	71
4	Diskussion.....	86
4.1	Einfluss der ovariellen Stimulation auf die Expression potentieller epigenetischer Reprogrammierungsfaktoren	86
4.1.1	Expressionsanalysen in Präimplantationsembryonen: technische Aspekte	86
4.1.2	Ovarielle Stimulation der Muttertiere führt zu differentieller Genexpression von <i>Apex1</i> , <i>Polb</i> und <i>Mbd3</i> in Morulae.....	89
4.1.3	Ovarielle Induktion und Apoptose in Präimplantationsembryonen	92
4.1.4	Der Einfluss der ovariellen Induktion auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der genomischen Prägung	95
4.2	Kryokonservierung männlicher Gameten – Analysen der genomischen Prägung in Spermatozoen und <i>in vitro</i> -gezeugten Mausembryonen	103
4.2.1	Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermatozoen.....	105
4.2.2	Paternale Transmission – Effekte der Kryokonservierung in F1-Hybridembryonen	109
5	Literaturverzeichnis	114
6	Anhang.....	155
6.1	Abbildungsverzeichnis	155
6.2	Tabellenverzeichnis	158
6.3	Abkürzungsverzeichnis	159
6.4	Lebenslauf	162
6.5	Publikationen und Kongressteilnahmen.....	163

Zusammenfassung

Seit der Geburt von Louise J. Brown (1978) als erstem künstlich erzeugtem Kind hat sich die Nachfrage nach assistierten Reproduktionstechniken (ART) stark erhöht. Der Anteil der nach *In-vitro*-Fertilisation (IVF) oder Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) geborenen Kinder macht mittlerweile abhängig vom betrachteten Industrieland zwischen 1-4% an der Gesamtgeburtenszahl aus.

In zahlreichen Studien korreliert eine erhöhte Prävalenz für seltene Imprinting-Erkrankungen, wie z.B. Beckwith-Wiedemann oder Angelman-Syndrom, mit der Geburt nach assistierten Reproduktionstechniken. Es ist bekannt, dass die medizinischen Interventionen zur Behandlung von Sub- und Infertilität in sehr sensitive Phasen der epigenetischen Reprogrammierung des Embryos und der Keimzellen eingreifen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die ovarielle Stimulation einen Einfluss auf die epigenetische Integrität von geprägten Genen in murinen Präimplantationsembryonen hat. Die in diesem Zusammenhang entwickelte digitale Bisulfitpyrosequenzierung gewährleistet die Analyse der DNA-Methylierung auf Einzelallelebene durch eine adäquate Verdünnung der Probe im Vorfeld der PCR.

Die ovarielle Induktion führte zu einem erhöhten Rate an Epimutationen des paternalen *H19*-Allels, sowie des maternalen *Snrpn*-Allels. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Expression von drei potentiellen Reprogrammierungsgenen (*Apex1*, *Polb*, *Mbd3*) in Embryonen aus hormonell stimulierten Muttertieren dereguliert ist. Whole-Mount Immunfluoreszenzfärbungen für APEX1 korrelierten dessen differentielle Genexpression mit dem Proteinlevel. Anzeichen früher apoptotischer Vorgänge äußerten sich in Embryonen aus hormonell induzierten Muttertieren in der hohen Rate an Embryonen, die keines der drei Transkripte exprimierten oder weniger APEX1-positive Blastomeren aufwiesen.

In einer weiteren Fragestellung wurde untersucht, ob die Kryokonservierung muriner Spermatozoen den epigenetischen Status geprägter Gene in den Keimzellen beeinflusst. Die Analyse von F1-Zweizellembryonen, die durch IVF mit den jeweiligen

Zusammenfassung

Spermatozoen eines Männchens generiert wurden, diente der Aufklärung möglicher paternalen Transmissionen. Insgesamt konnten keine signifikanten Auswirkungen der Kryokonservierung auf den epigenetischen Status in Spermatozoen und F1-Embryonen ermittelt werden.

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Mit dem Begriff Epigenetik werden Regulationsmechanismen umschrieben, die in multizellulären Organismen letztendlich zu der enormen Vielfalt an Zelllinien und deren Vorläufern beitragen, obwohl die DNA jeder Zelle nahezu identisch ist. Epigenetische Modifikationen von DNA und Chromatin führen zusammen mit anderen Prozessen zu einem großen Spektrum an transkriptionellen Signaturen und damit zu den spezifischen Expressionsmustern eines Zelltyps.

Conrad Hal Waddington verknüpfte 1942 die Theorien von Aristoteles, William Harvey und Casper Friedrich Wolff über die „Epigenese“ mit neueren Erkenntnissen sowohl in klassischer Genetik als auch in der Embryologie und führte den Begriff der Epigenetik ein. Ursprünglich definierte Waddington Epigenetik als den Zweig der Biologie, der kausale Wechselwirkungen zwischen Genen und deren Produkten studiert, die schließlich in einen Phänotyp münden (WADDINGTON 1942). Während der Ansatz von Waddington vor allem die Interaktionen zwischen Genotyp und äußeren Umwelteinflüssen als Grundlage der phänotypischen Plastizität heranzieht, wird das Konzept später durch NANNEY (1957) um den Faktor stabiler Vererbung epigenetischer Faktoren ergänzt (HAIG 2012). Nach heutigem Kenntnisstand kann man Epigenetik als übergeordnete, mitotisch und meiotisch vererbare Regulationsmechanismen der Genexpression definieren, die jedoch selbst nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind (EGGER *et al.* 2004). Solange also die transkriptionelle Resonanz auf einen Stimulus aufrechterhalten wird, ohne dass dieser Reiz permanent vorhanden ist, kann man diese Mechanismen als epigenetisch charakterisieren (BONASIO *et al.* 2010).

1.1.1 Epigenetische Steuerung der Genexpression

An dieser Stelle ist es sinnvoll, epigenetische Regulationsmechanismen hinsichtlich ihrer Wirkweise in *cis*- und *trans*-wirkende Faktoren zu unterteilen (BONASIO *et al.* 2010; MEAGHER 2010). Falls zwei identische DNA-Sequenzen unterschiedlich reguliert werden, wie z.B. bei der X-Inaktivierung in Säugern, dann handelt es sich definitionsgemäß um *cis*-Faktoren (BONASIO *et al.* 2010). Auf die Histonmodifikationen und die DNA-Methylierung als *cis*-agierenden Faktoren, sowie die *trans*-wirkenden ncRNAs (non-coding RNAs) wird im Folgenden ausführlicher eingegangen.

1.1.1.1 *cis*-operierende epigenetische Mechanismen

Histonmodifikationen

Chromatin besteht in seiner kleinsten Verpackungseinheit aus Nukleosomen, die wiederum aus einem Histonkomplex aus basischen Proteinen zusammengesetzt sind. Ein Oktamer aus den jeweils dimeren H2A/H2B und H3/H4-Komplexen (D'ANNA und ISENBURG 1974; KORNBERG und THOMAS 1974) bildet zusammen mit dem „linker“-Histon H1 ein Nukleosom, um das ~145 bp der DNA gewunden sind (PRUNELL *et al.* 1979; WOODCOCK und GHOSH 2010).

Vor allem die Aminosäureketten an den N-Termini von H2A, H2B, H3 und H4 unterliegen einer Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen (siehe Abbildung 1). Die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung ausgewählter Aminosäuren sind nur einige der bisher charakterisierten Varianten (VAN HOLDE 1988; KOUZARIDES 2007). Veränderungen im globulären Bereich und an den C-terminalen Enden der Histone sind vergleichsweise selten (MARGUERON *et al.* 2005). All diese Modifikationen resultieren letztlich in Änderungen der DNA-Histon-Interaktion sowie Variationen der Wechselwirkung unter den Nukleosomen und führen zu übergeordneten Chromatinstrukturen (LUGER *et al.* 1997).

(AZUARA *et al.* 2006; BERNSTEIN *et al.* 2006) und bis zu 20% aller CGI-Promotoren in diesen Zellen ausmachen (KU *et al.* 2008). Es wird spekuliert, dass diese Gene so lange transkriptionell unterdrückt werden, bis externe Signale die Differenzierung einleiten und so die Promotoren sehr schnell auf aktive Transkription programmiert sind (AZUARA *et al.* 2006; BERNSTEIN *et al.* 2006; SANZ *et al.* 2008). Die Ubiquitinylierung von Histonen muss hinsichtlich ihrer Rolle bei der Genexpression abhängig vom Kontext gesehen werden (BHAUMIK *et al.* 2007). Ubiquitiniertes H2A wurde bei dem aktiv transkribierten *HSP70* Gen (*Heat Shock Protein*) in hohem Maße angereichert gefunden, während nicht-transkribierte Satelliten-DNA kaum Ubiquitinylierung an H2A Histonen aufwies (LEVINGER und VARSHAVSKY 1982). Andererseits sind die Nukleosomen des aktiv transkribierten Immunglobulins der κ -Kette nicht ubiquitiniert (HUANG *et al.* 1986). Die Phosphorylierung von Histonen trägt einerseits zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate bei (MAHADEVAN *et al.* 1991; BARRATT *et al.* 1994), andererseits sind bestimmte Histonephosphorylierungen essentiell für die Chromatin-kondensation während Mitose und Meiose (GURLEY *et al.* 1978; WEI *et al.* 1998).

DNA-Methylierung

Die kovalente Verknüpfung einer Methylgruppe mit dem C5-Atom von Cytosin (HOTCHKISS 1948; SINSHEIMER 1955) ist einer der am intensivsten erforschten epigenetischen Regulationsmechanismen. In somatischen Zellen wird Cytosin hauptsächlich in einem CpG-Kontext methyliert (RAMSAHOYE *et al.* 2000) und ist mit transkriptionell inaktiven regulatorischen Bereichen eines Gens assoziiert (MANDEL und CHAMBON 1979; MCGHEE und GINDER 1979; BOYES und BIRD 1991). Es wird zwischen CpG-armen Regionen, die hauptsächlich methyliert vorliegen, und überwiegend hypomethylierten CpG-Inseln (CGI) unterschieden (GRUENBAUM *et al.* 1981; BIRD *et al.* 1985; TAKAI und JONES 2002). Hypermethylierte CpG-arme Bereiche sind i.d.R. intergenisch zu finden, während CpG-Inseln in den regulatorischen Bereichen von rund 70% aller annotierten humanen Gene nachweisbar sind (SAXONOV *et al.* 2006). Erheblichen Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene haben auch sogenannte „CpG island shores“, Bereiche mit bis zu 2 kb Abstand zur eigentlichen CpG-Inseln

(IRIZARRY *et al.* 2009). Neben der Steuerung der spezifischen Genaktivität ist die DNA-Methylierung bei einer Reihe anderer Vorgänge wie z.B. der X-Chromosom-Inaktivierung bei weiblichen Säugern (BARR und BERTRAM 1949; OHNO *et al.* 1959; LYON 1961; WUTZ und JAENISCH 2000), genomischer Prägung (Kapitel 1.2) und bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität (WALSH *et al.* 1998; BOURC'HIS und BESTOR 2004) von entscheidender Bedeutung.

1.1.1.2 *trans*-operierende epigenetische Mechanismen

Autoregulatorische Netzwerke von Transkriptionsfaktoren, die die transkriptionelle Signatur einer Zelle z.B. durch Rückkopplungsmechanismen auch nach externen Stimuli aufrechterhalten, sind sehr weit verbreitete epigenetische Steuerungsprozesse (BONASIO *et al.* 2010).

Spätestens mit der erfolgreichen Reprogrammierung differenzierter Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) mithilfe der ektopischen Expression von Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc wurde klar, dass Transkriptionsfaktoren das Epigenom entscheidend beeinflussen und dessen Status über Zellteilungen hinweg stabil aufrechterhalten (TAKAHASHI und YAMANAKA 2006; WANG *et al.* 2006; VAN DEN BERG *et al.* 2010).

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) durch FIRE *et al.* (1998) wurde eine Vielzahl weiterer Regulationsmechanismen gefunden, die über kleine nicht-kodierende RNAs (sncRNAs) eine Kontrolle des Transkriptionsstatus einer Zelle vermitteln (siehe Abbildung 2). Der Sammelbegriff „*RNA gene silencing*“ beinhaltet neben der eigentlichen RNA-Interferenz auch das „*RNAi-mediated Chromatin silencing*“, also über RNAi vermittelte Heterochromatinzustände, sowie DNA-Rearrangements (FILIPOWICZ *et al.* 2005). Unter einer Vielzahl an bisher kategorisierten kurzen nicht-kodierenden RNAs sind miRNA, piRNA und siRNA am intensivsten erforscht (TAFT *et al.* 2010). Charakteristisch für die Wirkweise dieser drei regulatorischen RNAs ist die Bildung von Argonaut-Protein-RNA-Komplexen mit Endonukleaseaktivität (RAND *et al.* 2004). Nach der Bindung des Komplexes an der

komplementären mRNA können verschiedenen Prozesse (z.B. mRNA-Degradation oder Hemmung der Translation) ablaufen, die aber alle letztendlich zur funktionellen Inhibierung der mRNA führen (JANOWSKI *et al.* 2006; EULALIO *et al.* 2008).

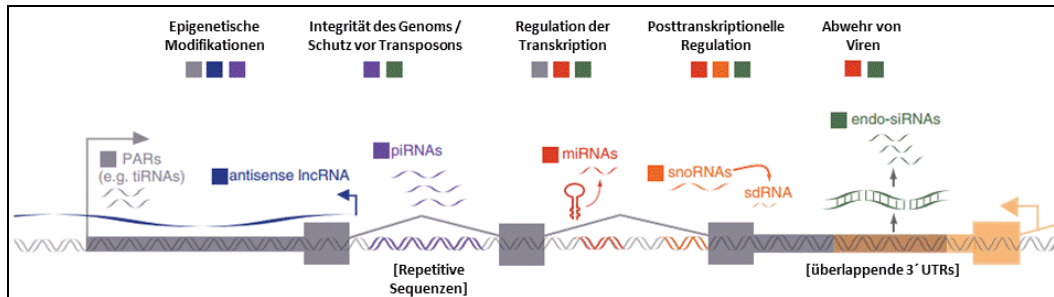


Abbildung 2: RNAi-vermittelte Regulation. Vereinfachtes Schema der Regulationsmechanismen durch RNAi. Jede RNA-Form ist farblich kodiert und unter ihren jeweiligen Funktionsprozessen dargestellt. Pfeile geben die Richtung der Transkription an. PARs: promoter-associated RNAs, lncRNAs: long non-coding RNAs, miRNAs: microRNAs, snoRNAs: small nucleolar RNAs, sdRNAs: sno-derived RNAs, endo-siRNAs: endogenous siRNAs, piRNAs: PIWI-interacting RNAs, tiRNAs: transcription initiation RNAs (modifiziert nach TAFT *et al.* 2010).

Im Gegensatz zu den seit längeren bekannten exogenen siRNAs, sind endogene siRNAs erst kürzlich gefunden und epigenetisch betrachtet, den Prozessen des *Chromatinremodeling (Chromatin-dependent gene silencing)* zugeordnet worden (GHILDIYAL und ZAMORE 2009). Transkribiert werden siRNAs von einer Reihe genomischer Loci, wie beispielsweise Transposons, intergenischen Regionen und sogar mRNAs (GHILDIYAL und ZAMORE 2009).

Bisher sind über 2000 humane microRNAs (<http://www.mirbase.org/>) bekannt (GRIFFITHS-JONES *et al.* 2008), die hauptsächlich posttranskriptionell sowie posttranslational wirken (BRODERSEN und VOINNET 2009) und damit etwa 30% aller proteinkodierenden Gene in Säugetieren regulieren (SAYED und ABDELLATIF 2011). Die Expression von miRNAs wird einerseits epigenetisch gesteuert, auf der anderen

Seite kontrollieren bestimmte miRNAs epigenetische Schlüsselproteine wie z.B. Histondeacetylasen, Komponenten der Polycomb-group-Proteine und DNA-Methyltransferasen (SATO *et al.* 2011).

Die Gruppe der piRNAs wurde erst 2006 von GRIVNA *et al.* entdeckt und spielt eine essentielle Rolle bei der Keimzellentwicklung primär durch die Beteiligung an der Stilllegung von transposablen Elementen (SIOMI *et al.* 2011). Darüber hinaus wurden piRNAs als epigenetische Modulatoren für *CREB2*, einem Schlüsselgen für die neuronale Plastizität, beschrieben (RAJASETHUPATHY *et al.* 2012).

Internationale Forschergruppen, zusammengeschlossen zum ENCODE-Konsortium (*Encyclopedia of DNA Elements*), veröffentlichten 2012 mehrere Publikationen mit einer bisher unerreichten Fülle an genomweiten Datensets (1640) aus 147 unterschiedlichen Zelltypen (ECKER *et al.* 2012). Die Ergebnisse stellen gleich mehrere klassische molekulargenetische Sichtweisen infrage. So sind beispielsweise 98% des humanen Genoms nicht proteinkodierend und wurden in der Vergangenheit oft als Müll-DNA („junk DNA“) bezeichnet (OHNO 1972; ORGEL und CRICK 1980). Jetzt konnten DJEBALI *et al.* (2012) zeigen, dass abhängig vom betrachteten Zeitpunkt und dem Zelltyp bis zu 75% des Genoms transkribiert werden und stellen damit gleichzeitig die herkömmliche Definition eines Gens zur Debatte. Einen großen Teil dieser transkribierten Elemente machen die oben erwähnten kurzen nicht-kodierenden RNAs, sowie lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) aus (BIRNEY *et al.* 2007). Diese Klasse von RNAs kann, bezogen auf die Position ihrer Transkription, *cis*- und *trans*-regulatorisch auf Chromatin wirken (KIM und SUNG 2012). Ein Paradebeispiel für *cis*-regulatorisch wirkende lncRNA ist die Rekrutierung von Proteinkomplexen durch Xist bei der X-Inaktivierung. Infolgedessen werden reprimierende Chromatin- und DNA-Modifikationen etabliert, die zur transkriptionellen Stilllegung (Dosiskompensation) eines der beiden weiblichen X-Chromosomen in Säugern führt (LEE 2010). Weitere wichtige Rollen spielen lncRNAs bei der genomischen Prägung (EDWARDS und FERGUSON-SMITH 2007; WAN und BARTOLOMEI 2008) und Genexpressionsregulation auf Transkriptionsebene (RINN *et al.* 2007).

1.2 Genomische Prägung

Mitte der 1980'er Jahre zeigten Untersuchungen an künstlich erzeugten murinen Zygoten mit diploid maternalem (gynogenetisch) oder paternalem Genotyp (androgenetisch), dass der Beitrag beider elterlichen Genome für die normale Entwicklung des Embryos entscheidend ist (MCGRATH und SOLTER 1984; SURANI *et al.* 1984). Bei Mausembryonen mit maternaler uniparentaler Diploidie entwickelt sich der Embryo bis zum Präimplantationsstadium geringfügig schlechter als normal, bildet dann aber kaum extraembryonales Gewebe. Androgenetische Zygoten entwickeln sich dagegen stark verzögert und zeigen stark ausgeprägtes extraembryonales Gewebe. In beiden Fällen endet die Entwicklung etwa um die Mitte der Trächtigkeit für die Embryonen letal (MCGRATH und SOLTER 1984; SURANI *et al.* 1984). Ursächlich hierfür ist die unterschiedliche Prägung beider parental Genome. Diese Abweichung von den Mendel'schen Vererbungsregeln werden durch Modifikationen der DNA und des Chromatins (siehe Kapitel 1.1.1.1) ermöglicht, die zu einer ausschließlichen bzw. präferentiellen Expression von einem der beiden parental Allele führen (MOORE und HAIG 1991). In der Maus wurden geprägte Gene erstmals Anfang der 1990'er Jahre gefunden (BARLOW *et al.* 1991; BARTOLOMEI *et al.* 1991; DECHIARA *et al.* 1991). Deren Zahl hat sich mittlerweile in der Maus auf über 100 erhöht (<http://www.geneimprint.com>). Durch die Quantifizierung von ganzen Transkriptomen mittels Hochdurchsatzsequenzierung (RNAseq) und der Entwicklung angepasster statistischer Tests wird sich die Zahl an geprägten Genen noch weiter erhöhen. Unter Zuhilfenahme reziproker Kreuzungen zwischen Hybridmausstämmen und der Identifikation von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) zwischen den zwei Stämmen, kann man auf präferentielle Expression eines der beiden Allele schließen (DEVEALE *et al.* 2012).

1.2.1 Charakteristika von geprägten Genen

Es gibt eine Reihe von Merkmalen, die geprägte Gene kennzeichnen. So sind nahezu alle Vertreter geprägter Gene in großen Clustern organisiert, die sich teilweise über mehrere hundert Kilobasen erstrecken und meist mindestens ein nicht-proteinkodierendes RNA-Transkript enthalten (O'NEILL 2005; WAN und BARTOLOMEI 2008). Sogenannte „differenziell-methylierte Regionen“ (DMRs) konnten in der überwiegenden Mehrzahl geprägter Gene identifiziert werden und sind durch differenzielle DNA-Methylierung (RAZIN und CEDAR 1994) und Histonmodifikationen (SELKER 1990; HUCK-HUI und BIRD 1999) der beiden elterlichen Allele gekennzeichnet. Darüber hinaus sind sogenannte „*Imprinting control regions*“ (ICRs), die oft mit DMRs überlappen, wichtig für die Etablierung der differenziellen DNA-Methylierung und deren Aufrechterhaltung während der Entwicklung (SPAHN und BARLOW 2003). Der *H19-Igf2* Locus der Maus auf Chromosom 7 ist eines der am besten untersuchten Imprintingcluster und wird oft als Paradebeispiel für das Konzept der genomischen Prägung aufgeführt (ARNEY 2003). Das von *Igf2* kodierte Protein ist ein wichtiger Faktor für plazentales und embryonales Wachstum und ist aufgrund des Fehlens eines Promoters für die Expression in der adulten Maus in den meisten Zelltypen nicht mehr nachweisbar (DECHIARA *et al.* 1991; CONSTÂNCIA *et al.* 2002). Im Menschen wird *IGF2* auch im Adultstadium exprimiert, hier ist die korrekte Expression des Gens von einem fetalen Promoter abhängig (DE PAGTER-HOLTHUIZEN *et al.* 1987). *H19* kodiert für eine 2,3 kb lange ncRNA, die ähnlich einer mRNA prozessiert, aber nicht translatiert wird (BRANNAN *et al.* 1990; AYESH *et al.* 2002).

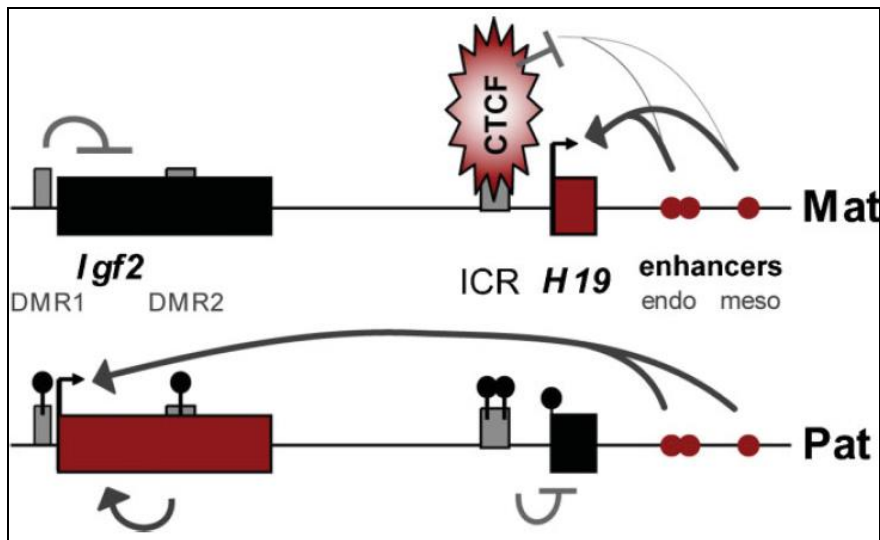


Abbildung 3: Schematische Darstellung und Regulationsmodell des *H19-Igf2* Clusters. Endo- und mesodermale Enhancer für beide Gene sind stromabwärts von *H19* lokalisiert. Die ICR befindet sich 4 kb stromaufwärts von *H19* und wird während der Gametogenese differenziell methyliert. Mat: maternales Allel, pat: paternales Allel. Einzelheiten zum gezeigten „Isolator-Modell“ werden im Text erläutert (GABORY *et al.* 2010).

Das „Isolator-Modell“ (siehe Abbildung 3) ist ein populärer Ansatz zur Erklärung der reziproken elterlichen Expression von *Igf2* und *H19* (BELL und FELSENFELD 2000; HARK *et al.* 2000). Grundlage für das Modell sind die Bindesequenzmotive für das CTCF-Zinkfingerprotein in der ICR. CTCF bindet im unmethylierten Zustand (maternales Allel) an die ICR und verhindert somit, dass die stromabwärts von *H19* liegenden Enhancer die Transkription von maternalem *Igf2* über dessen Promoter forcieren. Die DMR1 und 2 von *Igf2* sind auf dem väterlichen Allel methyliert und steuern die paternale Expression von *Igf2* wahrscheinlich über Chromatinloops (MURRELL *et al.* 2004). Die ICR ist auf dem paternalen Allel methyliert, dadurch kann CTCF nicht binden. Zusätzlich mit der *H19*-Promotermethylierung wird so die väterliche Expression von *H19* unterdrückt. Eine spätere Studie stellt die dreidimensionale Chromatin-

struktur als Regulator in den Fokus. Demnach agiert die ICR mit der DMR1 von *Igf2* auf dem maternalen Allel und sorgt dafür, dass sich dieser Loop in einem repressiven Bereich des Zellkerns befindet. In diesem „Chromatin-Loop-Modell“ bindet die ICR dagegen auf dem paternalen Allel die DMR2 von *Igf2* und bringt diesen Loop in einen aktiv transkribierten Bereich des Nukleus (MURRELL *et al.* 2004).

1.2.2 Genomische Prägung aus evolutionärer Perspektive

Zurzeit gibt es mehrere Konzepte, um das Phänomen der genomischen Prägung aus evolutionärer Sicht zu interpretieren. Genomische Prägung sollte sich im Prinzip negativ auf die Fitness eines Individuums auswirken, da durch die monoallelische Expression eines Gens der Vorteil der Diploidie aufgegeben wird. Der Ausfall des aktiven Allels durch Mutation kann nicht durch das stillgelegte Allel substituiert werden (WILKINS und HAIG 2003). Genauso negativ wirken sich uniparental vererbte Allele eines geprägten Gens aus (ENGEL *et al.* 2006; RENFREE *et al.* 2009). Außerdem werden Epimutationen, die zur Aktivierung des stillgelegten Allels führen, als einer der Hauptgründe für das Auftreten von sporadischen und familiären Krebs diskutiert (OGAWA *et al.* 1993; RAINIER *et al.* 1993).

Obwohl genomische Prägung auch in manchen Insekten und Pflanzen gefunden wurde (LLOYD 2000; GARNIER *et al.* 2008), ist sie doch am weitesten unter Beuteltieren und höheren Säugetieren verbreitet (siehe Abbildung 4). Die genomische Prägung weist in den Plazentatieren (Eutheria) den höchsten Grad an Komplexität und strikter Regulation auf (SUZUKI *et al.* 2005; AGER *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass Imprinting in Marsupialia und Eutheria zum Teil auch als Reaktion gegenüber dem signifikant stärkeren Auftreten von LTR- (*long terminal repeat*) Retrotransposons in deren Genom etabliert wurde (PASK *et al.* 2009).

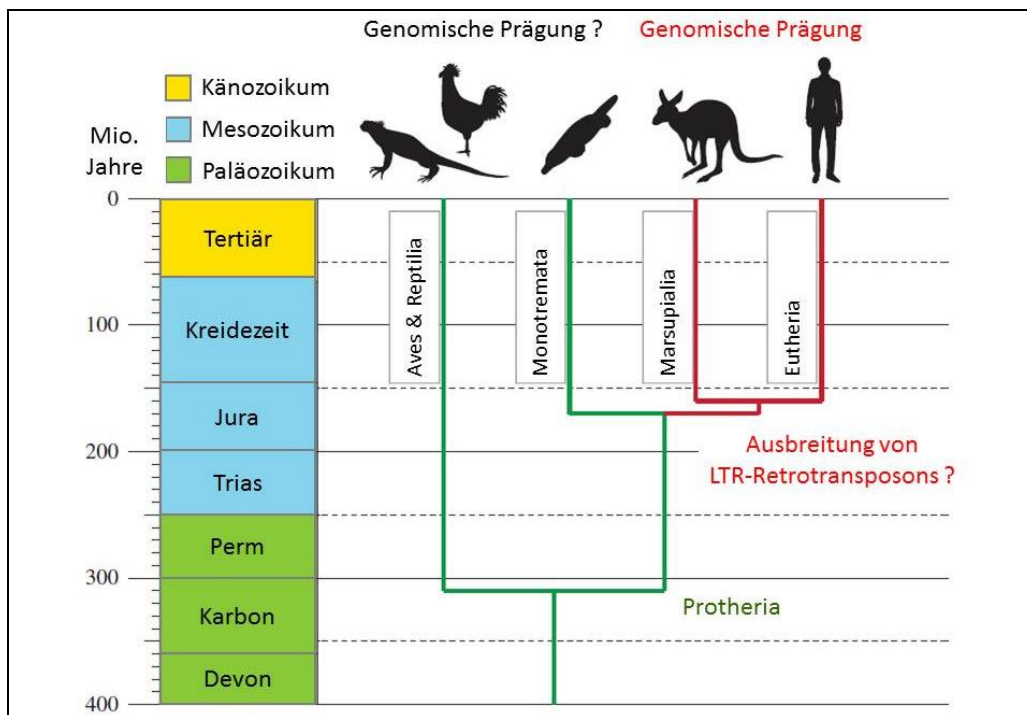


Abbildung 4: Entwicklung der genomischen Prägung während der Evolution einer Auswahl an Wirbeltieren. Die kolorierten Boxen zeigen geologische Perioden. Grüne und rote Linien zeigen die Divergenz zwischen Arten mit und ohne genomischer Prägung (modifiziert nach RENFREE *et al.* 2009).

Ein populäres Modell zur Evolution der genomischen Prägung geht von der Auseinandersetzung zwischen beiden parental Genomen im Embryo aus und ist dementsprechend unter „Genetische-Konflikt-Hypothese“ bekannt (MOORE und HAIG 1991). Demnach gibt es eine Rivalität beider elterlichen Genome um die mütterlichen Ressourcen. Paternal exprimierte Gene, die den maximalen Transfer mütterlicher Ressourcen zum Fötus ermöglichen, werden gegenüber biallelisch exprimierten Genen positiv selektiert. Die optimale Fitness für das Männchen ist erreicht, sofern die Mutter das Maximum an Nährstoffen an die von ihm gezeugten Nachkommen weitergibt, selbst wenn dies nachteilig für die Mutter ist. Die Mutter versucht sich dagegen zu schützen, indem sie diese embryonalen Wachstumsfaktoren unterdrückt. Ihre

optimale Fitness ist erreicht, wenn sie eine ausgewogene Nährstoffverteilung für die aktuelle Trächtigkeit anstrebt, um noch Ressourcen für spätere Schwangerschaften zu haben. Diese Theorie erklärt besonders gut die Richtung der Prägung bei Wachstumsfaktoren und deren Regulation (RENFREE *et al.* 2009). Die „Koadaptionshypothese“ versucht demgegenüber die Entstehung der genomischen Prägung als koadaptive Regulation zwischen embryonaler Entwicklung und dem Verhalten der Mutter während der Schwangerschaft zu erklären (KEVERNE und CURLEY 2008). In dem Modell spielt die Plazenta eine entscheidendere Rolle, da sie nicht nur pränatal die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen sichert, sondern auch postnatal das Fütterungs- und Sexualverhalten sowie den Metabolismus der Mutter (Stimulation der Milchdrüsen) beeinflusst. Gestützt wird die These durch transgenerationale Interaktionen von mütterlichem und fetalem Hypothalamus sowie der Plazenta. Die Steuerung erfolgt über dieselben geprägten Gene unter Einfluss zweier verschiedener Genome in einem Individuum: der Mutter. *Peg3* ist in diesem Zusammenhang am besten untersucht. Die monoallelische Expression im fetalen Hypothalamus und der Plazenta resultiert durch die Stilllegung desselben maternalen Allels, während der Imprint im Hypothalamus der Mutter schon in der Keimbahn von deren Mutter gesetzt wurde. Interessanterweise werden die Imprints der mehrheitlich maternal geprägten (paternal exprimierten) Gene in diesem Zusammenhang in der mütterlichen Gametogenese gesetzt (SURANI 2001). Da diese Gene wesentlich zum Entstehen der fetalen-plazentalen Einheit beitragen, sind sie damit nachteilig für die Mutter im Sinne der Genetischen-Konflikt-Hypothese und nicht mit dieser vereinbar (KEVERNE und CURLEY 2008). Beide Theorien müssen sich nicht unbedingt gegenseitig ausschließen. Es ist vorstellbar, dass der elterliche Konflikt die Kontrolle über die fetale Entwicklung initialisiert und später diese Gene und deren Regulation über Koadaption von Plazenta und Hypothalamus gesteuert werden (RENFREE *et al.* 2009).

1.2.3 Humane Erkrankungen infolge gestörter genomischer Prägung

In Tabelle 1 werden Krankheiten angegeben, die mit einer Störung der genomischen Prägung beim Menschen assoziiert sind. Außerdem werden Imprintingstörungen bei einer Reihe anderer Krankheiten, wie z.B. Alzheimer, atypisches Asthma, Autismus, Diabetes (Typ1 und 2), Psoriasis und Schizophrenie als Ursache vermutet (MORISON *et al.* 2005). Epimutationen, die zur Reaktivierung des stillgelegten Allels führen, werden im Zusammenhang mit der Entstehung von sporadischen und familiär vererbten Krebsformen diskutiert (OGAWA *et al.* 1993; RAINIER *et al.* 1993; REIK und WALTER 2001b).

Angelman (AS) – und Prader-Willi Syndrom (PWS) sind neurogenetische Erkrankungen, die eine geprägte Region auf Chromosom 15 (q11-q13) betreffen. Charakteristisch für AS-Patienten sind Ataxie, objektiv unbegründetes Lachen (Alias: „Happy Puppet Syndrom“), schwere Sprachstörungen und mentale Retardierung. Die überwiegende Mehrzahl der Fälle (~ 70%) beruht auf einer maternalen Deletion dieser Region. In 2-5% der Fälle ist eine paternale uniparentale Disomie 15 (patUPD15) ursächlich. Etwa 2-4% der Fälle können molekulargenetisch auf einen Imprintingdefekt zurückgeführt werden. Bei etwa 10% der AS-Patienten liegt eine Mutation des *UBE3A*-Gens vor und ca. 20% der Fälle sind bisher molekulargenetisch nicht diagnostizierbar (BUIHING 2010).

Bei PWS-Patienten ist hauptsächlich eine paternale Deletion (~ 70%) von 15q11-13 Grund für die Erkrankung, die sich durch geringes Geburtsgewicht, Muskelhypotonie, Adipositas, Minderwuchs, Hypogenitalismus und mentale Retardierung auszeichnet. Weitere molekulargenetische Ursachen für PWS sind maternale UPD15 (~ 25-30%) oder in rund 1% der Fälle ein Imprintingdefekt (BUIHING 2010).

Die Ursache für das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) liegt in der Störung einer geprägten Region auf Chromosom 11p15.5. Das klinische Krankheitsbild ist hoch variabel und beinhaltet die ursprünglich beschriebenen Merkmale, wie Exomphalos, Gigantismus und Makroglossie (BECKWITH 1963; WIEDEMANN 1964), sowie ein erhöh-

tes Risiko für Tumorentwicklung im Kindesalter, Hypoglykämie und faziale Dysmorphien (WEKSBERG *et al.* 2009). Molekulargenetisch ursächlich für BWS ist insbesondere eine segmentale patUPD11 (~ 20%), sowie Mutationen des maternal exprimierten *CDKN1C*-Gens (5-15%) oder eine Epimutation in 11p15 (BLIEK *et al.* 2001; DIAZ-MEYER *et al.* 2003; COOPER *et al.* 2005). Die Region 11p15.5 ist durch zwei ICRs gekennzeichnet: die ICR1 ist die regulatorische Region für die *H19*- und *IGF2*-Expression und die ICR2 kontrolliert die Expression von *CDKN1C*, *KCNQ1* und *KCNQ1OT*. Eine erhöhte Methylierung in der ICR1 führt in rund 5% der BWS-Fälle zur biallelischen Expression von *IGF2*, einem normalerweise paternal exprimierten Gen. In etwa 50% der BWS-Patienten ist die ICR2 betroffen und führt über deren Hypomethylierung zu einer reduzierten Expression von *CDKN1C* (WEKSBERG *et al.* 2009).

Das klinische Krankheitsbild des Silver-Russell Syndroms (SRS) ist gekennzeichnet durch das typische „Silver-Russell-Gesicht“ (RUSSELL 1954), prä- und postnatale Wachstumsretardierung sowie fortgesetzter Kleinwuchs im Kindesalter. In etwa 44% aller SRS-Fälle kann eine aberrante Hypomethylierung der ICR1 (siehe BWS) des paternalen Allels auf Chromosom 11p15.5 als molekulargenetische Ursache diagnostiziert werden (BINDER *et al.* 2011). Eine maternale UPD7 kann in 5-10% der Patienten zur Krankheitsentstehung führen (KOTZOT *et al.* 1995). In fast der Hälfte aller SRS-Fälle kann die klinische Diagnose bisher nicht molekulargenetisch bestätigt werden (BINDER *et al.* 2011).

Tabelle 1: Humane Erkrankungen als Konsequenz gestörter genomischer Prägung (modifiziert nach HIRASAWA und FEIL 2010)

Erkrankung	Häufigkeit	Charakteristika	Chromosomale Region	Involvierte Gene	Hauptursache
Angelman-Syndrom	1/12.000 – 1/20.000	Neurologische Störungen	15q11-q13	<i>UBE3A</i>	-maternale 15q11-q13 Deletion, paternale UPD15 -Mutationen in <i>UBE3A</i> , Epimutationen <i>SNRPN</i> ICR
Prader-Willi-Syndrom	1/10.000 – 1/25.000	Entwicklungsstörungen des Nervensystems	15q11-q13	<i>SNRPN</i> , <i>NDN</i>	-paternale 15q11-q13 Deletion, maternale UPD15 -Epimutationen <i>SNRPN</i> ICR
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	1/15.000	Wachstumsstörungen	11p15	<i>IGF2</i> , <i>CDKN1C</i>	-paternale UPD11, Verlust der Methylierung <i>KvDMRI</i> ICR -Mutationen in <i>CDKN1C</i> , erhöhte Methylierung <i>H19-IGF2</i> ICR -Translokationen, die 11p15 betreffen
Silver-Russell-Syndrom	1/10.000-1/75.000	Wachstumsretardierung	11p15 & 7p12	<i>IGF2</i> , <i>GRB10?</i>	-maternale Duplikation 11p15, maternale UPD7, 7p Duplikationen -erhöhte Methylierung <i>H19-IGF2</i> ICR
Transienter neonataler Diabetes mellitus	1/400.000-1/800.000	Hormonelle und metabolische Störungen	6q24 & 6p22	<i>PLAGL1</i> , <i>ZFP57</i>	-paternale UPD6, paternale Duplikationen 6q24 -Mutation in <i>ZFP57</i>
UPD(14)matSyndrom/Temple-Syndrom	selten	Entwicklungsstörungen	14q32	<i>RTL1</i> , <i>DLK1</i>	-maternale UPD14 -Imprinting-Fehler auf 14q32
UPD(14)patSyndrom	selten	Entwicklungsstörungen	14q32	<i>RTL1</i>	-paternale UPD14 -Imprinting-Fehler auf 14q32
AHO/PHP	selten	Hormonelle und metabolische Störungen	20q13	<i>GNAS</i>	-Imprinting-Fehler im <i>GNAS</i> Locus

1.3 Epigenetische Reprogrammierung während der frühen Embryogenese und Gametogenese in Säugetieren

Im Verlauf der Säugetierentwicklung gibt es zwei entscheidende Phasen, in denen sehr dynamische und tiefgreifende Prozesse der Epigenom-Reprogrammierung stattfinden. In der befruchteten Eizelle startet eine genomweite DNA-Demethylierung, von der nur wenige Regionen und Elemente, wie IAP-Retrotransposons, Zentromerregionen und der überwiegende Anteil an DMRs von geprägten Genen ausgenommen sind (ROUGIER *et al.* 1998; REIK und WALTER 2001a; LANE *et al.* 2003; KOBAYASHI *et al.* 2006; BORGEL *et al.* 2010; TOMIZAWA *et al.* 2011). Die zweite Welle einer genomweiten DNA-Demethylierung findet in den Vorläuferzellen der Gameten statt: den primordialen Keimzellen (PGCs: *Primordial germ cells*). Im Zuge dessen werden in diesen Zellen auch differenziell regulierte Bereiche geprägter Gene demethyliert und das inaktivierte X-Chromosom von weiblichen Säugern reaktiviert (HAYASHI und SURANI 2009). In den folgenden Abschnitten wird im Detail auf die Mechanismen, die zu dieser epigenetischen Reprogrammierung führen, eingegangen.

1.3.1 Reprogrammierung der DNA-Methylierung in der Zygote

Um die Totipotenz der Blastomeren während der frühesten Embryogenese sicherzustellen, müssen die epigenetischen Muster der Genome von Oozyte und Spermium gelöscht werden. Beide Gameten befinden sich vor der Befruchtung in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Oozyte: arretiert in Meiose II und diploid, Spermium: Meiose komplettiert und haploid) und die Genome sind auf Nukleosomenebene unterschiedlich organisiert. Noch vor der Vereinigung der beiden parentalen Pronuklei beginnt eine genomweite DNA-Demethylierung, die in beiden elterlichen Genomen zeitlich und mechanistisch höchst unterschiedlich abläuft (siehe Abbildung 5). Kurz nach dem Umbau der Nukleosomenstruktur des paternalen Genoms, infolgedessen Protamine durch Histone ersetzt werden (BALHORN 2007), wird das paternale Genom aktiv demethyliert und liegt noch vor der ersten Zellteilung hypomethyliert vor (SANTOS *et al.* 2002; WOSSIDLO *et al.* 2010).

Für diese aktive Prozessierung des paternalen Genoms in der Zygote werden momentan drei verschiedenen Mechanismen diskutiert: die Beteiligung der Basenexzisionsreparatur (BER), die Partizipation von Komponenten des Elongatorkomplexes und die enzymatische Oxidation von 5mC (MORGAN *et al.* 2005; FENG *et al.* 2010; WU und ZHANG 2010; SEISENBERGER *et al.* 2013). Hinweise auf eine Beteiligung des BER-Systems ergeben sich durch die Beobachtung, dass die Inhibierung von zwei Schlüsselenzymen dieses Reparaturweges, PARP1 und APE1, zu einer höheren genomweiten DNA-Methylierung führt (HAJKOVA *et al.* 2010). Durch Knockdown-Experimente konnten OKADA *et al.* (2010) zeigen, dass bestimmte Komponenten des Elongatorkomplexes (ELP1, ELP4) notwendig für die Demethylierung des paternalen Pronukleus sind. Gleichzeitig spielt die „Fe-S-Radikal-SAM-Domäne“ von ELP3 eine Rolle bei dieser aktiven Demethylierung. Die Radikal-SAM-Domäne innerhalb des Elongatorkomplexes ist wichtig für dessen Strukturaufrechterhaltung (LI *et al.* 2009), könnte aber auch eine direkte Rolle bei der Entfernung von 5mC spielen (WU und ZHANG 2010). Sollte sich dieser Mechanismus weiter bestätigen, wäre diese Domäne die erste „echte“ Demethylase des Säugergenoms (HENDRICH *et al.* 2001; JIN *et al.* 2008; ENGEL *et al.* 2009; SEISENBERGER *et al.* 2013).

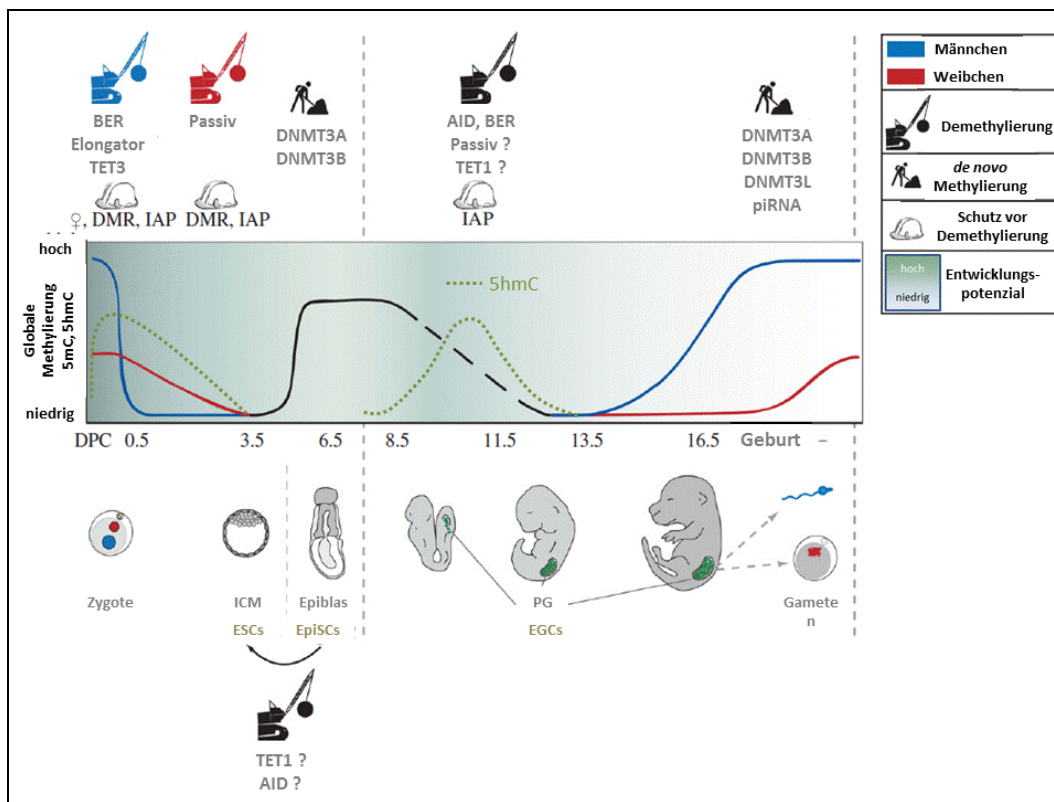


Abbildung 5: Reprogrammierung der DNA-Methylierung in der Säugetierentwicklung. Relativer Anteil von 5-Methylcytosin (väterlich=blau, mütterlich=rot) und 5-Hydroxymethylcytosin von der Befruchtung (0,5 dpc) bis zur Geburt (modifiziert nach LEEB und WUTZ 2012; HACKETT und SURANI 2013; SEISENBERGER *et al.* 2013).

Die rasche Demethylierung des paternalen Genoms konnten MAYER *et al.* (2000) mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in der Zygote nachweisen. Parallel dazu steigt der Gehalt an Oxidationsformen von 5-Methylcytosin im paternalen Genom an (Abbildung 5). Der Grad an 5-Hydroxymethylcytosin (IQBAL *et al.* 2011; WOSSIDLO *et al.* 2011), 5-Formylcytosin und 5-Carboxycytosin (INOUE *et al.* 2011; INOUE und ZHANG 2011) wird entscheidend von den oxidativen Eigenschaften von TET3, einem Mitglied der „ten-eleven translocation“-Genfamilie, geprägt. Diese Dioxygenase liegt hoch angereichert in der Zygote vor. Werden die Enzymfunktionen von TET3 inhibiert, ist die Bildung von 5hmC blockiert (Gu *et al.* 2011; WOSSIDLO *et al.* 2011). Die oxidierten Formen von 5mC sind vermutlich recht stabile Modifikationen, deren Gehalt lediglich

graduell über die folgenden DNA-Replikationen abnimmt (GU *et al.* 2011; INOUE *et al.* 2011; INOUE und ZHANG 2011). In Tabelle 2 sind Proteine angegeben, die eine Rolle im Zusammenhang mit der epigenetischen Reprogrammierung in Embryonen und PGCs spielen.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, nimmt der Grad an DNA-Methylierung im maternalen Genom passiv und damit graduell mit der Zahl an Replikationsereignissen ab. Das mütterliche Genom ist durch Stella (PGC7/Dppa3) vor einer aktiven Demethylierung geschützt (PAYER *et al.* 2003; NAKAMURA *et al.* 2007). Stella selbst wird über H3K9me2 Modifikationen der Nukleosomen angezogen, die charakteristisch für das maternale Genom sowie paternal geprägte Bereiche und repetitive Elemente des väterlichen Genoms in der frühen Embryogenese sind (SANTOS *et al.* 2005; NAKAMURA *et al.* 2012). Der Schutz vor Demethylierung durch Stella besteht darin, dass TET3 bedingt durch die oben erwähnte Chromatinstruktur 5mC nicht oxidieren kann (NAKAMURA *et al.* 2012). Zudem unterdrückt Stella BER-Komponenten im maternalen Pronukleus und damit einen weiteren aktiven Mechanismus der Konversion von 5mC zu Cytosin (HAJKOVA *et al.* 2010; SEISENBERGER *et al.* 2013).

Die DNA-Demethylierungsprozesse im Präimplantationsembryonen können auch teilweise mit dem niedrigen Level an DNMT1 (gilt nicht für DNMT3A und DNMT3B) erklärt werden, der unter der Nachweisgrenze von Immunfluoreszenztechniken liegt (BRANCO *et al.* 2008; HIRASAWA *et al.* 2008). Bestimmte Bereiche des Genoms, wie die meisten DMRs von geprägten Genen, IAPs und Zentromerregionen bleiben jedoch methyliert. Ein konditionaler Knockout von maternal oder zygotisch exprimierter DNMT1 führt allerdings zur Demethylierung oben erwähnter Bereiche im Blastozystenstadium (HIRASAWA *et al.* 2008; SAITOU *et al.* 2012).

Die lang bestehende Ansicht, dass ICRs/DMRs von geprägten Genen dieser genomweiten Demethylierung entgehen, wurde vor kurzem zumindest teilweise in Frage gestellt. TOMIZAWA *et al.* (2011) konnten zeigen, dass vor allem die peripheren Bereiche der DMRs paternal geprägter Gene im Präimplantationsstadium demethyliert

und später *de novo* remethyliert werden. An Tag 3,5 dpc der Entwicklung muriner Präimplantationsembryonen münden die DNA-Demethylierungsprozesse in ein global hypomethyliertes Genom der ICM (*inner cell mass*). Anschließend wird die *de novo* Methylierung initiiert, die im Blastozystenstadium schon relativ große Unterschiede zwischen ICM und Trophektodermzellschicht (TE) aufweist (SANTOS *et al.* 2002; SMITH *et al.* 2012) und am Tag 6,5 dpc weitgehend abgeschlossen ist (BORGEL *et al.* 2010; SMITH *et al.* 2012).

1.3.2 Reprogrammierung der DNA-Methylierung in den primordialen Keimzellen

Die umfassendste Reprogrammierung der DNA-Methylierung findet in den primordialen Keimzellen, den Vorläuferzellen der Gameten, zwischen E 8,5 und E 12,5 statt. Die Spezifizierung der murinen PGCs startet ungefähr an Tag 6,25 dpc (GINSBURG *et al.* 1990). Zu diesem Zeitpunkt sind primordiale Keimzellen - epigenetisch betrachtet - nicht zu unterscheiden von ihren Nachbarzellen, die sich zu somatischen Zellen entwickeln. Da es sich nur um etwa 40 Zellen handelt und die Keimzellen am Tag E 13,5 bereits einen geschlechtsabhängigen Zellzyklusarrest eingenommen haben müssen (♀ Embryonen: Meiose I, Prophase I, Diplotän; ♂ Embryonen: Mitose G1), ist ein sehr robuster und möglicherweise aus multiparallelen Mechanismen bestehender Reprogrammierungsprozess nötig ((MCLAREN und LAWSON 2005; HACKETT *et al.* 2012). Über BMP4- (*bone morphogenetic protein*) und WNT3- (*wingless-type MMTV integration site family, member 3*) Signale werden in einem Teil der proximal gelegenen Epiblastzellen Transkriptionsprofile initiiert, die letztendlich in einer Wiederaufnahme der Expression von Pluripotenzmarkern münden (LAWSON *et al.* 1999; VINCENT *et al.* 2005; KURIMOTO *et al.* 2008; YAMAJI *et al.* 2008; OHINATA *et al.* 2009). Ab E 7,5 migrieren die PGCs in Richtung Genitalleiste, die sie am Tag E 10,5 erreichen und besiedeln (SAITOU *et al.* 2002; SEKI *et al.* 2007). HACKETT *et al.* (2013) konnten jetzt erstmals zeigen, dass die Demethylierung von PGCs zwischen E 9,5 und 10,5 stattfindet und mit dem gleichzeitigen Anstieg von 5hmC verbunden ist. In den PGCs wird die Oxidation von 5mC zu 5hmC durch TET1 und TET2 gewährleistet

(HAJKOVA *et al.* 2010). Gleichzeitig wird die Expression von *Dnmt3a*, *Dnmt3b* und *Uhrf1*, also Schlüsselenzymen für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung bzw. die *de novo*-DNA-Methylierung, durch BLIMP1 und PRDM14 unterdrückt (KANEDA *et al.* 2004; BOSTICK *et al.* 2007; KURIMOTO *et al.* 2008; YAMAJI *et al.* 2008). Nach Tag E 11,5 nimmt der Grad an 5hmC durch die DNA-Replikation ab (HACKETT *et al.* 2013). Verglichen mit den umliegenden Zellen sind die Komponenten des BER Systems hochreguliert, ein Fakt der für dessen Beteiligung an der aktiven Konversion von 5mC zu Cytosin in PGCs spricht (HAJKOVA *et al.* 2010; CORTELLINO *et al.* 2011). Der Höhepunkt der globalen Demethylierung in den murinen PGCs an E 11,5 ist offensichtlich ein Trigger für bedeutende Prozesse, wie z.B. das Neusetzen der parentalen Imprints in Abhängigkeit des Geschlechts (SASAKI und MATSUI 2008; HAJKOVA *et al.* 2010). Entscheidende Gene für die Keimzellentwicklung wie *Dazl* (*deleted in azoospermia-like*) oder *Sycp3* (*synaptonemal complex protein 3*) müssen im Anschluss durch Promotermethylierung sicher stillgelegt werden, um nicht durch ektopische Signale zur Tumorentstehung beizutragen (MAATOUK *et al.* 2006; BORGEL *et al.* 2010; JANIC *et al.* 2010).

Tabelle 2: Cytosinmodifikationen und involvierte Proteine. AID, *activation-induced deaminase*; AP, Apurin/Apyrimidin; APOBEC1, *apolipoprotein B mRNA editing protein, catalytic polypeptides*; DNMT, *DNA methyltransferase*; ESC, *embryonic stem cells*; IAP, *intracisternal A particle*; IgM, *immunoglobulin M*; LINE1, *long interspersed nuclear element 1*; LOI, *Loss of Imprinting*; PGC, *primordial germ cell*; siRNA, *short interfering RNA*; ssDNA, *single strand DNA*; TET, *ten-eleven translocation*; UHRF1, *ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1* (modifiziert nach SAITOU *et al.* 2012).

Protein	Funktion	Phänotyp Knockout/Knockdown Mäuse, ESCs	Referenzen
DNMT1	Transfer von Methylgruppen auf CpGs in hemimethylierter DNA während der Replikation	letal im Embryonenstadium kurz nach der Gastrulation, umfängliche genomweite DNA-Demethylierung	(BESTOR <i>et al.</i> 1988; LI <i>et al.</i> 1992; LEI <i>et al.</i> 1996)
DNMT2	Methylierung kleiner nichtkodierender RNAs	<i>Dnmt2</i> KOs sind lebensfähig, fertil und zeigen normale DNA-Methylierungsmuster; Aufhebung der RNA Methyltransferaseaktivität	(OKANO <i>et al.</i> 1998b; GOLL <i>et al.</i> 2006)
DNMT3A	Etablierung der DNA-Methylierung während der frühen Embryonalentwicklung und in den Keimzellen (essentiell für die Setzung der Imprints in der Gametogenese zusammen mit DNMT3L)	<i>Dnmt3a</i> KOs sind lebensfähig, sterben aber kurz nach der Geburt; Verlust der genomischen Prägung in weiblichen und männlichen Keimzellen	(OKANO <i>et al.</i> 1998a; OKANO <i>et al.</i> 1999; KANEDA <i>et al.</i> 2004)

Einleitung

Protein	Funktion	Phänotyp Knockout/Knockdown Mäuse, ESCs	Referenzen
DNMT3B	Etablierung der DNA-Methylierung während der frühen Embryonalentwicklung und in den Keimzellen (kritisch für die Methylierung von perizentromeren <i>Major</i> - und <i>Minorsatellit</i> repeats)	<i>Dnmt3b</i> KOs : letal zwischen E 13,5 und E 16,5 Demethylierung von <i>Major</i> - und <i>Minorsatellites</i>	(OKANO <i>et al.</i> 1998a; OKANO <i>et al.</i> 1999; KANEDA <i>et al.</i> 2004; UEDA <i>et al.</i> 2006)
DNMT3L	keine katalytische Aktivität, essentiell für die Imprints in Oozyten und die Stilllegung von Repeatsequenzen in männlichen Keimzellen	<i>Dnmt3l</i> KOs sind lebensfähig; <i>Dnmt3l</i> KO-Männchen sind steril, weil in deren Keimzellen LINE1 und IAP-Elemente reaktiviert werden und zeigen zudem Defekte in der Meiose; <i>Dnmt3l</i> KO-Weibchen haben keinen lebensfähigen Nachwuchs (Neuralrohrdefekte, teilweise durch bialelische Expression maternal geprägter Gene aufgrund von LOI)	(BOURC'HIS <i>et al.</i> 2001; HATA <i>et al.</i> 2002; BOURC'HIS und BESTOR 2004; WEBSTER <i>et al.</i> 2005)
NP95 (UHRF1)	Rekrutierung von DNMT1 zur Replikationsgabel	letal im Embryonenstadium kurz nach der Gastrulation, umfängliche genomweite DNA-Demethylierung (ähnlicher Phänotyp wie <i>Dnmt1</i> KO)	(FUJIMORI <i>et al.</i> 1998; BOSTICK <i>et al.</i> 2007; SHARIF <i>et al.</i> 2007)
TET1	Konversion von 5mC zu 5hmC; kann den Zugang von DNMTs zur DNA durch Bindung an unmethylierte CpG-reiche Regionen via CXXC-Domäne verhindern	<i>Tet1</i> KOs sind lebensfähig und fertil; haben eine reduzierte Wurfgröße und sind teilweise kleiner; <i>Tet1</i> Knockdown Embryos formen keine gewöhnliche Blastozyste; <i>Tet1</i> Knockdown ESC zeigen morphologische Auffälligkeiten, gesenkte Alkaline Phosphatase-Aktivität, reduzierte 5hmC und erhöhte 5mC Level in TET1 Binderegionen; <i>Tet1</i> KO ESCs sind pluripotent, Maus Embryonen aus Tetraploid-Komplementär-Assays entwickeln sich normal	(TAHILIANI <i>et al.</i> 2009; ITO <i>et al.</i> 2010; SZWAGIERCZAK <i>et al.</i> 2010; DAWLATY <i>et al.</i> 2011; KOH <i>et al.</i> 2011; XU <i>et al.</i> 2011)
TET2	Konversion von 5mC zu 5hmC	<i>Tet2</i> Knockdown ESC zeigen normale Morphologie, normale Alkaline Phosphatase-Aktivität aber reduzierte 5hmC Level; Mutationen in <i>Tet2</i> resultieren in Hämato-poese-Erkrankungen	(LANGEMEIJER <i>et al.</i> 2009; FIGUEROA <i>et al.</i> 2010; ITO <i>et al.</i> 2010; SZWAGIERCZAK <i>et al.</i> 2010; KOH <i>et al.</i> 2011; MORAN-CRUSIO <i>et al.</i> 2011; QUIVORON <i>et al.</i> 2011)
TET3	Konversion von 5mC zu 5hmC	maternaler <i>Tet3</i> KO zeigt kein erhöhtes 5hmC Level im paternalen Genom, häufiger Tod des Embryos; Zygoten, denen <i>Tet3</i> siRNA injiziert wurde, zeigen kaum 5hmC Gehalt in den paternalen Pronuklei	(ITO, SHINSUKE <i>et al.</i> 2010; SZWAGIERCZAK <i>et al.</i> 2010; GU <i>et al.</i> 2011; IQBAL <i>et al.</i> 2011; WOSSIDLO <i>et al.</i> 2011)
AID	Desaminierung von Cytosin zu Uracil in ssDNA, von 5mC zu Thymin, von 5hmC zu 5hmU	<i>AID</i> Knockdown führt zu reduzierter epigenetischer Reprogrammierung; <i>AID</i> Knockout Mäuse zeigen reduzierte genomweite Demethylierung in PGCs (E 13,5); <i>AID</i> Knockout Mäuse haben Probleme mit dem Klassenwechsel bei Antikörperproduktion (CSR) und somatischen Hypermutationen, resultierend in einem Hyper-IgM Phänotyp	(MURAMATSU <i>et al.</i> 1999; MURAMATSU <i>et al.</i> 2000; MORGAN <i>et al.</i> 2004; BHUTANI <i>et al.</i> 2010; POPP <i>et al.</i> 2010; GUO <i>et al.</i> 2011)
APOBEC1	Desaminierung von Cytosin zu Uracil in RNA und DNA, von 5mC zu Thymin, von 5hmC zu 5hmU	kein offensichtlicher Phänotyp	(NAVARATNAM <i>et al.</i> 1993; TENG <i>et al.</i> 1993; HIRANO <i>et al.</i> 1996; MORRISON <i>et al.</i> 1996; MORGAN <i>et al.</i> 2004; GUO <i>et al.</i> 2011)

1.4 Assistierte Reproduktionstechniken und damit assoziierte epigenetische Störungen beim Menschen

Mit der Einführung der *in-vitro*-Fertilisation (IVF) im Jahr 1978 (STEPTOE und EDWARDS 1976; STEPTOE und EDWARDS 1978) wurde ein Meilenstein für die assistierten Reproduktionstechniken (ART) in der Humanmedizin erreicht. Seitdem hat die Nachfrage nach entsprechenden Techniken stark zugenommen und der Anteil an durch ART erzeugten Kindern beträgt, abhängig vom betrachteten Industrieland, zwischen 1-4% der Gesamtzahl an Neugeborenen (DE MOUZON *et al.* 2010; SAVAGE *et al.* 2011). Inzwischen hat die Technik der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) stark an Bedeutung gewonnen und die IVF als Hauptverfahren der Reproduktionsmedizin abgelöst (DE MOUZON *et al.* 2010).

Es besteht ein enormes wissenschaftliches Interesse an den möglichen Folgen dieser Eingriffe, zumal alle diese Techniken in sehr sensitive Phasen der zuvor erwähnten epigenetischen Reprogrammierungsprozesse eingreifen. Mehrere Studien an Tiermodellen konnten Auswirkungen der IVF und/oder *in-vitro*-Embryonenkultur mit Störungen der genomischen Prägung korrelieren (DOHERTY *et al.* 2000; KHOSLA *et al.* 2001; YOUNG *et al.* 2001; FERNÁNDEZ-GONZALEZ *et al.* 2004; MANN *et al.* 2004; CORCORAN *et al.* 2006; FAUQUE *et al.* 2010a; MARKET VELKER *et al.* 2012).

Das „*Large Offspring*“-Syndrom wird relativ häufig in der Nutztierhaltung nach IVF beobachtet. Die betroffenen Tiere fallen durch überproportionale Größe bei der Geburt auf, die letztlich auf einem vergleichsweise starken fötalen Wachstum durch gestörte genomische Prägung beruht (WILLADSEN *et al.* 1991; YOUNG *et al.* 2001).

In einer kürzlich veröffentlichten humanmedizinischen Kohortenstudie konnten, im Gegensatz zu früheren Studien (HANSEN *et al.* 2002; RIMM *et al.* 2004; HANSEN *et al.* 2005; SCHIEVE *et al.* 2005) kein erhöhtes Risiko für Geburtsdefekte nach IVF gefunden werden (DAVIES *et al.* 2012). Es wird zunehmend deutlicher, dass die verwendete Kontrollgruppe entscheidend für die Signifikanz der Statistik ist (SAVAGE *et al.* 2011; DAVIES *et al.* 2012). Väterliche oder mütterliche Subfertilität (GNOTH *et al.* 2005) ist

einer der Hauptgründe dafür, dass sich Paare gezwungenermaßen für die assistierte Reproduktion entscheiden müssen (ZHU *et al.* 2006; KÄLLÉN *et al.* 2010). Daher ist eine Kontrollgruppe bestehend aus subfertilen Paaren mit natürlicher Schwangerschaft besser geeignet, als die Gesamtzahl an Schwangerschaften in der Population (WILLIAMS und SUTCLIFFE 2009; SAVAGE *et al.* 2011). Im Gegensatz zur IVF konnten DAVIES *et al.* (2012) jedoch für ICSI ein erhöhtes Risiko für Geburtsdefekte nachweisen und damit die Daten im Mausmodell (KOHDA *et al.* 2011) unterstützen. Zudem konnte vor kurzem nachgewiesen werden, dass ICSI zu primären Epimutationen im murinen Modell führt. Diese Störungen werden transgenerational nicht weitergegeben, da die Imprints in den Keimzellen gelöscht und wieder korrekt gesetzt werden (DE WAAL *et al.* 2012a).

1.4.1 Ovarielle Induktion

Obwohl die ovarielle Stimulation schon seit Ende der zwanziger Jahre des 20. Jahrhunderts bekannt ist (SMITH und ENGLE 1927; COLE und HART 1930), wurden deren Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung erst ab Ende der achtziger Jahre erforscht (FOSSUM *et al.* 1989; ERTZEID und STORENG 1992; ERTZEID und STORENG 2001; VAN DER AUWERA und D'HOOGHE 2001). Spätere Studien untersuchten mögliche Effekte der Superovulation aus epigenetischer Perspektive und stellten in diesem Zusammenhang die Etablierung und Aufrechterhaltung epigenetischer Modifikationen der DNA in den Mittelpunkt. SHI und HAAF (2002) konnten mithilfe von 5-Methylcytosin-spezifischer Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass murine Zweizeller aus superovulierten Weibchen deutlich häufiger Defekte in der Reprogrammierung der DNA-Methylierung aufwiesen als die Kontrollen. Diese genomweiten Daten werden durch eine Reihe von Studien zur locusspezifischen DNA-Methylierung im Menschen und im Mausmodell unterstützt. Sowohl in Oozyten (BORGHOL *et al.* 2006; SATO *et al.* 2007; KHOUREIRY *et al.* 2008), als auch in Präimplantationsembryonen (FAUQUE *et al.* 2007; EL HAJJ *et al.* 2011) und Plazenten (FORTIER *et al.* 2008) liegen Daten zur Störung der genomischen Prägung durch ovarielle Induktion vor.

Die hormonelle Stimulation von Mausweibchen mit Gonadotropinen (Superovulation)

führt zu Epimutationen in den Eizellen (SATO *et al.* 2007), dem Blastozystenstadium der Embryonen (MARKET-VELKER *et al.* 2010) und ändert die Expression geprägter Gene in der Plazenta (FORTIER *et al.* 2008).

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Auf sehr konventionelle molekularbiologische Techniken wie DNA- und RNA-Extraktionen, Polymeraseketten-Reaktion, Gelelektrophorese oder etwa das Herstellen von Laborstandardlösungen wird hier nicht im Detail eingegangen. Sofern diese Techniken nicht für die Arbeit mit limitierenden Probenmengen modifiziert werden mussten, sind Standardprotokolle verwendet worden (SAMBROOK und RUSSELL 2001).

2.2 Mausversuche

2.2.1 Mauszucht

Zur Untersuchung der Genexpression an Präimplantationsembryonen wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) genutzt. Bei den Analysen zur DNA-Methylierung in Hybridembryonen wurde auf Kreuzungen zwischen C57BL/6J-Weibchen und CAST/Ei-Männchen zurückgegriffen. Das Management der Zuchtlinien erfolgte in der Zentralen Tierversuchseinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz unter Leitung von Prof. Dr. Reifenberg.

2.2.2 Ovarielle Stimulation (Superovulation) und Verpaarung

Superovulierte C57BL/6J Weibchen wurden durch intraperitoneale Injektionen von 7,5 IE eCG (Intervet, Unterschleissheim, Deutschland) bzw. 7,5 IE hCG (Intervet) 44-48 h später generiert. Direkt im Anschluss wurden diese 6-8 Wochen alten Weibchen je nach experimentellem Ansatz entweder mit C57BL/6J oder CAST/Ei-Männchen verpaart. Ovulation und Fertilisierung erfolgen etwa 13 h später, etwa um den Mittelpunkt des Dunkelzyklus (NAGY *et al.* 2002). Der Zeitpunkt 24 h nach hCG Injektion wird somit als 0,5 *days post conceptionem* (dpc) definiert.

Die Arbeitsschritte zur Gewinnung muriner Spermien (2.2.3), deren Kryokonservierung (2.2.4), die Gewinnung von Oozyten-Kumuluszell-komplexen (2.2.5) und die anschließende *in vitro*-Fertilisation (2.2.6) erfolgten durch die technische Assistenz der ZVTE unter Leitung von Elena Wiese.

2.2.3 Präparation muriner Spermien

Um die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Spermien selbst sowie dadurch bedingte transgenerationale Effekte beobachten zu können, werden die Spermien eines Männchens gewonnen und anschließend 1:1 zwischen einem Arbeitsablauf für frische bzw. kryokonservierte Spermien aufgeteilt.

Die etwa 3-6 Monate alten C57BL/6J- (zu Beginn der IVF-Versuche) bzw. CAST/Ei-Männchen müssen zeitlich synchronisiert mit den Hormoninjektionen der Weibchen präpariert werden. Etwa 15 bis 45 min bevor die Weibchen den Zeitpunkt 14 h Post-hCG Injektion erreichen, wird mit der Präparation der Böcke begonnen. Dazu werden *cauda epididymis* und *vas deferens* der Männchen freipräpariert und paarweise in eine Petrischale mit je 300 μ l *Cryoprotective-Medium* (CPM: 18% w/v Raffinose; 3% w/v Magermilchpulver; 477 μ M Monothioglycerol, Wasser) überführt. Das CPM-Medium wurde vorher mit Mineralöl überschichtet und auf 37°C vorgewärmt. Anschließend werden die Spermien durch Druck auf das Gewebe aus Nebenhoden und Samenleitern in das Medium überführt. Die Petrischale wird sofort für 10 min in einen Inkubator gestellt, der auf 37°C geheizt ist und ein Atmosphäremisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ aufweist.

Die 300 μ l eines der beiden CPM-Tropfen werden komplett kryokonserviert. Von dem zweiten CPM-Tropfen werden 20 μ l in einer anschließenden IVF mit vorgeschalteter Motilitätsmessung (2.2.7) verwendet (Arbeitsablauf frische Spermien). In diesem Fall werden die 20 μ l in 500 μ l MVF-Medium (Mouse Vitro Fert; Cook K - RVFE - 50; Cook Medical; Brisbane, Australien) überführt und eine IVF durchgeführt. Die restli-

chen 280 µl aus dem Arbeitsablauf für frische Spermien werden für die DNA-Extraktion (2.2.8) eingesetzt.

2.2.4 Kryokonservierung muriner Spermien

300 µl aus der Spermienpräparation wurden nach OSTERMEIER *et al.* (2008) kryokonserviert und nach 1 Woche wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte analog zu 2.2.3 eine Motilitätsmessung und IVF mit 20 µl Volumen und die DNA-Extraktion mit 280 µl CPM + Spermien.

2.2.5 Präparation von Oozyten-Kumuluszellkomplexen

2-5 B6/J Mausweibchen werden pro IVF ca. 13-14 h nach hCG-Injektion nach NAGY *et al.* (2002) präpariert und Oozyten-Kumuluszellkomplexe in MVF-Medium (Cook Medical) gesammelt.

2.2.6 *In-vitro*-Fertilisation

Etwa 2-4 Oozyten-Kumuluszellkomplexen aus 2.2.5 wurden in 500 µl MVF-Medium aus 2.2.3 überführt. Die IVF wurde für 4 h bei 37°C, sowie unter einem Atmosphäremischung aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ inkubiert. Anschließend wurden die mutmaßlichen Zygoten zum Waschen in neues MVF-Medium (150 µl) überführt. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Die aufgereinigten mutmaßlichen Zygoten wurden ÜN in KSOM-Medium (+Aminosäuren; Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland) bei 37°C und unter einem Atmosphäremischung aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ inkubiert (OSTERMEIER *et al.* 2008). Die Qualität der Embryonen wurde am Folgetag beurteilt.

2.2.7 Motilitätsmessung muriner Spermien

Die Beweglichkeit der Mausspermien wurde direkt vor einer IVF mittels IVOS (Integrated Visual Optical System; Hamilton Thorne, Beverly, USA) gemessen. Die Ar-

beiten wurden von der technischen Assistenz der ZVTE unter Leitung von Elena Wiese nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8 DNA-Extraktion aus Mausspermien

Die DNA-Isolierung aus Mausspermien erfolgte mit einem modifiziertem Protokoll des DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (*User developed protocol 1*) von Qiagen (Hilden, Deutschland). Etwa 280 μ l aus der Spermienpräparation (Schritt 2.2.3 und 2.2.4) wurden mit 10 ml Puffer 1 (150 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8,0) in einem 15 ml Falconröhrchen gemischt und 10 s gevortext. Nach dem Abzentrifugieren für 10 min bei 2500 x g (Centrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde der Überstand verworfen, so dass noch etwa 1 ml Puffer 1 und das Pellet übrig blieben. Anschließend wurde für 10 s gevortext und der Mix in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Falconröhrchen wurde nochmals mit 0,5 ml Puffer 1 gefüllt, kurz gevortext und die Flüssigkeit in das Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt diente dazu, eventuell verbliebenes Zellmaterial zurückzugewinnen. Nach dem Abzentrifugieren für 2 min bei 16100 x g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet in Puffer 2 (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1% SDS; 2% β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Anschließend wurde mit 100 μ l Proteinase K (15 mg/ml) für 2 h bei 56°C inkubiert. Eine zweite Proteinase K-Behandlung erfolgte mit 20 μ l (15 mg/ml) Enzym für 2 h bei 56°C. Danach erfolgte die Zugabe von 400 μ l AL-Puffer (DNeasy[®] Kit), gefolgt von gründlichem vortexen und der Zugabe von 400 μ l Ethanol (96 - 100%). Anschließend wurden 650 μ l der Suspension auf Qiagen Spin Filter-Säulen gegeben, bei 5900 x g für 1 min abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis der ganze Mix des Reaktionsgefäßes auf die Filter-Säule geladen wurde. Im Anschluss erfolgten die Aufreinigung durch Zugabe von 500 μ l AW1-Puffer (DNeasy[®] Kit), Zentrifugation bei 5900 x g für 1 min und Verwerfen des Durchflusses. Danach werden 500 μ l AW2-Puffer (DNeasy[®] Kit) zugegeben und bei 16100 x g für 3 min abzentrifugiert. Die Spin Filter-Säule wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 100 μ l AE-Puffer (DNeasy[®] Kit) eluiert. Nach 1 min Inkubation wird

die DNA durch Zentrifugation bei 5900 x g für 1 min in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, photometrisch quantifiziert und bei -20°C weggefroren.

2.2.9 Bisulfitbehandlung der Spermien-DNA

Die Bisulfitkonversion (Theorie siehe 2.6) der DNA erfolgte mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Es wurden 100 ng DNA aus Schritt 2.2.8 eingesetzt.

2.2.10 Präparation von Präimplantationsembryonen

Kompaktierte Morulae (16-32 Blastomeren) wurden zum Zeitpunkt 2,5 dpc bzw. rund 60 h nach der Befruchtung aus dem Ovidukt der Mausweibchen präpariert. Dazu wurde der Eileiter mithilfe einer Hamilton-Mikrokanüle (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) mit M2-Medium (Sigma -Aldrich, Deutschland) gespült und die Embryonen anschließend mehrfach in M2-Medium gewaschen (NAGY *et al.* 2002). Dieser Schritt diente dazu, mögliche Kontaminationen durch somatische Zellen sowie deren Zellbestandteile auszuschließen. Durch eine ausführliche optische Kontrolle wurde sichergestellt, dass ausschließlich hochqualitative Präimplantationsembryonen für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden. Die Präparation von murinen Blastozysten erfolgte auf identische Weise, jedoch erst zum Zeitpunkt 3,5 dpc. Im Fall einer verzögerten Weiterbearbeitung der Embryonen wurden diese in 10 µl PBS bei -80°C weggefroren.

2.3 Reverse Transkription (RT) im Multiplexformat auf AmpliGrid™ Glasobjektträgern

Um die Menge eines Genprodukts quantifizieren zu können, muss die entsprechende mRNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Die Umwandlung erfolgt durch den Einsatz einer rekombinanten Reversen Transkriptase nach einer genspezifischen Primingstrategie im Multiplexformat (MAY *et al.* 2009). Die Reaktion wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen), angepasst an ein

Endvolumen von 1 μl , durchgeführt.

Der AmpliGrid™ (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) ist ein speziell angefertigter Glasobjektträger, der über 48 Reaktionsplätze verfügt. Diese Flächen besitzen einen zentralen hydrophilen Bereich für die Aufnahme der Reaktionskomponenten und einen hydrophoben Ring für die Zugabe von Mineralöl (Beckman Coulter), um das Verdunsten des Reaktionsansatzes zu verhindern.

Im Vorfeld der Reversen Transkription wurde ein betreffender Embryo in einem Tropfen Kalzium- und Magnesiumfreiem PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurde der Embryo in einem Volumen von ca. 0,3 μl auf den AmpliGrid™ Objektträger transferiert. Der Zugang zur RNA wurde durch Lufttrocknung des Embryos gewährleistet, die zu einer Denaturierung der embryonalen Proteine führt. Anschließend erfolgte ein Verdau der genomischen DNA. Dazu wurde 0,1 μl gDNA Wipeout Puffer (10x) mit 0,6 μl RNase-freiem Wasser gemischt und auf den Embryo pipettiert. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurden die Komponenten mit 5 μl Mineralöl (Beckman Coulter) überschichtet. Im Anschluss wurde der AmpliGrid 2 min bei 42°C auf einem AmpliSpeed ASD100D Cycler (Beckman Coulter) inkubiert. Der Glasobjektträger wurde während der Zwischenschritte auf einem Kühlblock gelagert. Nach dem Verdau der genomischen DNA erfolgte die Reverse Transkription mittels genspezifischer Reverse Primer mit jeweils 0,3 μM Endkonzentration (siehe Tabelle 6). Zudem wurde ein Mastermix für mehrere Ansätze erstellt, der pro Probe aus 0,05 μl Reverser Transkriptase, 0,2 μl Quantiscript RT Puffer (5x) und 0,05 μl RT-Primermix bestand. Die Reaktion erfolgte bei 42°C für 30 min und anschließend 95°C für 3 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Anschließend wurde die Reaktion noch 1:4 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Objektträger wurden zur späteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren oder das RT-Produkt direkt für eine quantitative PCR verwendet.

2.4 Absolute Quantifizierung der mRNA durch Real-time PCR

2.4.1 Erstellen einer Standardkurve

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte absolut, d.h. die Kopienzahlen eines Transkripts wurden anhand einer vorher erstellten Standardkurve ermittelt. Dazu wurde eine konventionelle PCR mit jedem Primerpaar durchgeführt und das Amplifikationsprodukt in einen pCR2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Transformation des Vektors in TOP10-Zellen erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen). Anschließend erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der Plasmide mithilfe des NucleoSpin-Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe eines NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) quantifiziert. Durch die nachfolgende Gleichung kann anhand der bekannten Plasmidlänge, der gemessenen Konzentration und unter Einbeziehung des Gewichts einer Nukleotidbase und der Avogadro-Konstante auf die Kopienzahl geschlossen werden (LI und WANG 2000; WHELAN *et al.* 2003).

$$\frac{(\text{ng} / \mu\text{l DNA})}{(\text{Plasmid} - \text{Länge in bp} * 10^9 * 660)} \times 6,022 * 10^{23} = \text{Moleküle} / \mu\text{l}$$

Die jeweilige Standardreihe eines Zielgens wurde auf derselben 96-well PCR-Platte mitgeführt und mindestens dreimal technisch reproduziert. Bei allen Standardreihen wurden $10^0 - 10^5$ Kopien pro Mikroliter durch serielle 10fach-Verdünnungen aus der photometrisch gemessenen Stammlösung hergestellt und in Duplikaten gemessen. Anhand der Steigung (*slope*) der Regressionsgeraden und der Gleichung $E [\%] = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] * 100$ kann für jedes Amplikon die PCR-Effizienz berechnet werden (HIGUCHI *et al.* 1993; RASMUSSEN 2001). Der Reaktionsansatz pro Probe ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die initiale Denaturierung und Aktivierung der HotStart DNA Polymerase erfolgte bei 95°C für 15 min. Ein Amplifikationszyklus der PCR bestand aus der Denaturierung bei 94°C für 15 s, der Primeranlagerung bei 60°C und 30 s, sowie der Elongation bei 72°C für 30 s. Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurvenana-

lytik durchgeführt, um auszuschließen, dass unspezifisches PCR-Produkt mit in die Genexpressionsanalyse einfluss.

Tabelle 3: Reaktionskomponenten in der qPCR.

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
ABsolute QPCR SYBR Green Low ROX Mix	2x	12,5 µl	1x	ThermoScientific, Surrey, Großbritannien
je Primer	1 µM	1,75 µl	70 nM	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
cDNA	—	0,5 µl	—	—
H ₂ O (höchstrein)	—	8,5 µl	—	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
		Σ = 25 µl		

2.4.2 Quantifizierung der Zielgene

Bedingt durch die Verwendung von SYBR Green konnte die Quantifizierung der Zieltranskripte nur im Singleplex-Modus durchgeführt werden. Die Messung der Transkriptmenge pro Gen erfolgte in Duplikaten und unter Einsatz von 0,5 µl cDNA, so dass mit insgesamt 4 µl RT-Produkt die Expression von mindestens drei Genen pro Morula untersucht werden konnte. Sowohl Reaktionsansatz als auch die Reaktionsbedingungen der qPCR waren mit denen zur Erstellung der Standardkurven identisch. Bei jeder qPCR wurden zudem Negativkontrollen ohne cDNA sowie ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

2.5 *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbung von Präimplantationsembryonen

Die Immunfluoreszenzfärbung wird eingesetzt, um mit Hilfe von Antikörpern die zelluläre Quantität und Lokalisation von Proteinen zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils ein spezifischer Primärantikörper verwendet, der die Zielstruktur erkennt. Mit der Bindung zwischen Primärantikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper kann die Zielstruktur fluoreszenzoptisch nachgewiesen werden.

Der Präfix *Whole mount* bezeichnet den Umstand, dass nicht nur ein Gewebeschnitt, sondern der gesamte Organismus einer Antikörper-basierten Färbung unterliegt. Eine parallele Aufarbeitung beider Proben Gruppen und das Fixieren auf demselben Objektträger lassen es zu, die Expression der Zielproteine in einem gewissen Umfang zu quantifizieren.

Präimplantationsembryonen in den Stadien frühe Morula (8-Zeller), kompakte Morula (16-Zeller) und späte Morula (32-Zeller) wurden in saurer *Tyrode's* Lösung (pH 2,3; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) inkubiert, um die *Zona pellucida* zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Embryonen in 4%igen Paraformaldehyd in PBS für 15 min. Die Permeabilisierung fand in 0,1%igen Triton X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur statt. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen des Primärantikörpers wurde durch eine Inkubation in Blockierungslösung (1% BSA, 0,1% Triton X-100 und 1,5% Ziegen Serum) bei 4°C über Nacht erreicht. Im Anschluss konnte die Inkubation der Präimplantationsembryonen mit dem Primärantikörper (1:100 in Blockierungslösung) für 2 h bei Raumtemperatur erfolgen. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Embryonen für 1 h mit dem Sekundärantikörper (1:100 in Blockierungslösung) inkubiert. Im Anschluss an drei weitere PBS-Waschschritte wurden die Embryonen auf einen Objektträger transferiert und zusammen mit einem kleinen Tropfen Vectashield Mounting Medium (0,1% DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckelt.

Dokumentiert wurden die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Leica Epifluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Graustufenbilder wurden mit der Leica CW 4000 FISH Software aufgenommen und weiter prozessiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten wurde mit der ImageJ Software durchgeführt (COLLINS 2007).

2.6 Bisulfitbehandlung genomischer DNA

Bei einer Bisulfitbehandlung nutzt man den Umstand, dass unmethylierte Cytosine während der Deaminierung mit Natriumbisulfit (NaHSO_3) zu Uracil umgewandelt

werden (FROMMMER *et al.* 1992). Die 5,6-Doppelbindung von Cytosin geht eine Verbindung mit dem Bisulfit-Ion ein und es entsteht eine Zwischenverbindung, die durch Deaminierung in sulfoniertes Uracil umgewandelt wird. Unter basischen Reaktionsbedingungen wird die Sulfongruppe abgespalten und es entsteht Uracil. In der darauf folgenden PCR wird Uracil als Thymidin amplifiziert. Im Gegensatz zu Cytosin ist 5'-Methylcytosin gegen die oben genannten Prozesse unempfindlich. Als Konsequenz einer Bisulfitbehandlung lassen sich so am Ende Primärsequenzunterschiede ableiten.

Zum Zeitpunkt der DNA-Methylierungsanalysen an geprägten Genen in Präimplantationsembryonen war nur ein kommerzieller Kit erhältlich, der nachweislich DNA Mengen < 50 pg konvertieren konnte. Der EZ DNA Methylation Direct™ Kit (Zymo Research, Irvine CA, USA) ermöglicht laut Hersteller zudem eine 99,5%ige Cytosin-Konversionsrate mit einer Rückgewinnungsquote von mehr als 80% der ursprünglich eingesetzten DNA. Als Ausgangsmaterial diente jeweils eine Morula, die in 10 µl PBS aufbewahrt wurde (2.2.10). Hier ergibt sich eine Abweichung vom Herstellerprotokoll, dass den Einsatz von höchstens 9 µl Ausgangsmaterial vorsieht. Alle nachfolgenden Schritte der Reaktion wurden nach Herstellerangaben ausgeführt.

2.7 Limiting Dilution der Bisulfit-behandelten DNA

Das Prinzip der *Limiting Dilution* beruht auf der signifikanten Verdünnung einer Probe, die letztendlich zu einem binären Signal in der nachgeschalteten Analyse führt. Der Begriff *Limiting Dilution* ist vor allem in der Immunologie und Mikrobiologie gebräuchlich. Das Prinzip wurde 1992 im molekularbiologischen Bereich an die PCR angepasst (SYKES *et al.*) und ist in diesem Gebiet seit VOGELSTEIN & KINZLER (1999) eher als digitale PCR bekannt.

Durch die digitale PCR wird also ein „analoges“, auf mehrere Ausgangsmoleküle zurückzuführendes Signal, in eine „digitale“ (Ja/Nein)- Antwort transformiert. Der damit verbundene hohe Verdünnungsfaktor macht den Einsatz der digitalen PCR zumindest mit konventionellem Equipment sehr kostspielig. Aus Gründen der Wirtschaft-

lichkeit wurden daher die Bisulfit- behandelte DNA von Präimplantationsembryonen im Morulastadium 1:70 verdünnt (siehe Abb. 6, B). Faktisch wurden die 10 µl Eluat aus der Bisulfitbehandlung mit 690 µl H₂O (höchstrein) verdünnt und anschließend 10 µl-Portionen über 70 Wells einer 96well-PCR-Platte verteilt. In den Studien zu möglichen paternalen Transmissionen von Spermatozoen auf die F1-Generation, wurden Zweizellembryonen mittels digitaler Bisulfitsequenzierung analysiert und das Bisulfit-Eluat entsprechend 1:14 verdünnt (siehe Abb. 6).

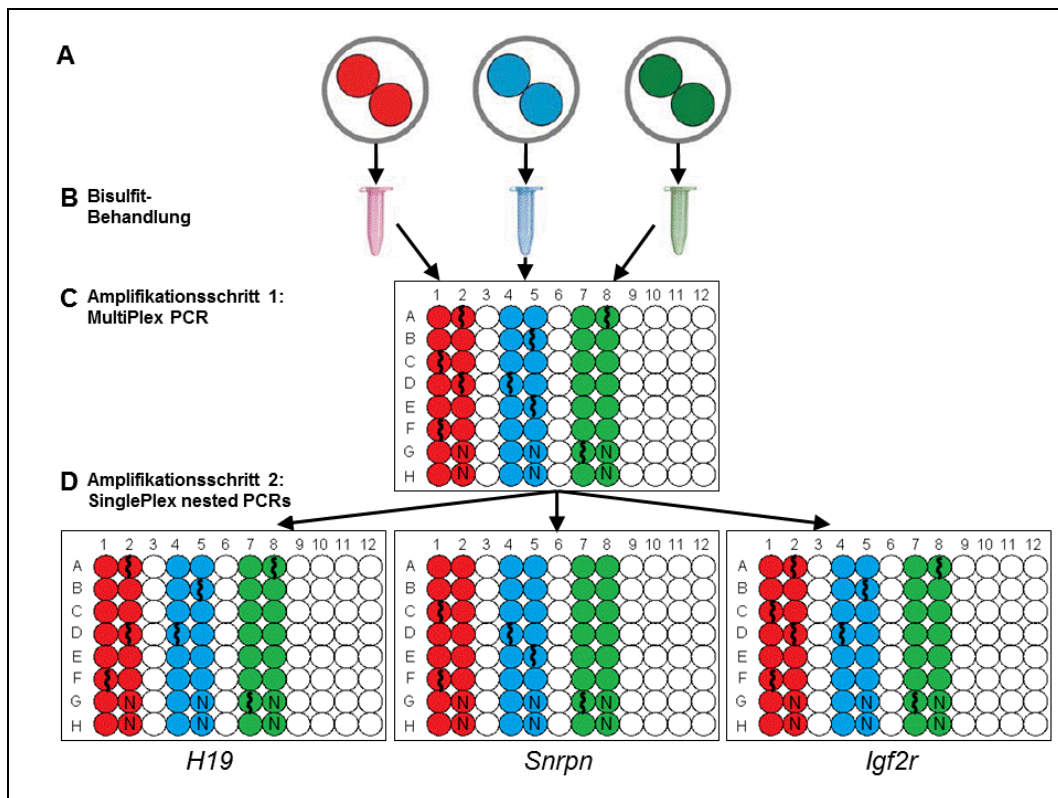


Abbildung 6: Methodik der digitalen PCR am Beispiel von Embryonen im 2-Zellstadium. (A) Überführen der Embryonen in 0,2 ml PCR-Gefäße. Optische Qualitätskontrolle und Inspektion auf mögliche somatische Kontaminationen gehen voraus. (B) Kombinierte DNA Extraktion und Bisulfitbehandlung mit EZ DNA Methylation Direct™ Kit. (C) Limiting Dilution und MultiPlex-PCR für *H19*, *Snrpn* und *Igf2r*. (D) SinglePlex (semi)-nested PCR für jedes der analysierten Gene und anschließende Gelkontrolle. Modifiziert nach EL HAJJ *et al.* (2011).

2.8 MultiPlex-PCR

Um möglichst viele Informationen aus der limitierten Probenmenge zu generieren, wurde im Anschluss an die Verdünnung eine MultiPlex-PCR mit Primern für *H19*, *Igf2r*, *Snrpn* und *Oct4* durchgeführt. Alle Assays der genannten Gene bestehen aus äußeren und inneren Primerpaaren (siehe Tabelle 7). Ein Mastermix der MultiPlex-PCR enthielt alle äußeren Primerpaare und ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die Aktivierung der HotStart DNA-Polymerase erfolgte für 9 min bei 95°C. Ein Amplifikationszyklus bestand aus 94°C für 20 s, 52°C für 30 s und abschließend 72°C für 1 min. Das PCR Programm beinhaltete insgesamt 35 Zyklen.

Tabelle 4: Reaktionskomponenten in der MultiPlex PCR (4 Amplikons parallel).

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
PCR Puffer AmpliTaq Gold	10x	2,5 µl	1x	Life Technologies, Carlsbad CA, USA
MgCl ₂	25 mM	1,3 µl	1,3 mM	Life Technologies, Carlsbad CA, USA
je Primer	10 µM	0,5 µl	0,2 µM	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
dNTPs	je 10 mM	0,5 µl	je 200 µM	Roche, Mannheim, Deutschland
AmpliTaQ Gold	5 U/µl	0,13 µl	0,65 U/Reaktion	Life Technologies, Carlsbad CA, USA
Bisulfit-behandelte DNA	—	10 µl	—	
H ₂ O (höchstrein)		6,57 µl	—	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
		Σ = 25 µl		

2.9 SinglePlex (semi)-nested PCR

Im Anschluss erfolgte mit dem Produkt der MultiPlex-PCR separat für jedes der Gene eine spezifische nested PCR. Einige der PCRs müssen korrekterweise als (semi)-nested bezeichnet werden, da ein Primer in beiden PCRs verwendet wurde (siehe Tabelle 5). Zudem ist je nach Assaydesign einer der beiden Primer in der SinglePlex-

PCR am 5'-Ende biotinyliert. Mit dieser Modifikation wird in der Vorbereitung zur Pyrosequenzierung einzelsträngiges PCR-Produkt generiert. Der Mastermix für eine SinglePlex-PCR zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Reaktionskomponenten in der SinglePlex PCR.

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
PCR Puffer FastStart, MgCl ₂ 20mM	10x	2,5 µl	1x, MgCl ₂ 2 mM	Roche, Mannheim, Deutschland
je Primer	10 µM	1 µl	0,4 µM	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
dNTPs	je 10 mM	0,5 µl	je 200 µM	Roche, Mannheim, Deutschland
FastStart Taq	5 U/µl	0,2 µl	1 U/Reaktion	Roche, Mannheim, Deutschland
MultiPlex PCR Produkt	—	1 µl	—	
H ₂ O (höchstrein)	—	18,8 µl	—	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
		Σ = 25 µl		

Für alle SinglePlex-PCR Amplikons wurden die optimale Annealingtemperatur und die Anzahl der erforderlichen Zyklen experimentell ermittelt. Daher ergibt sich für jeden Assay ein separates PCR-Protokoll.

H19 95°C für 5 min
 95°C für 30 s
 57°C für 30 s } 44 Zyklen
 72°C für 1 min
 4°C für ∞

Igf2r 95°C für 5 min
 95°C für 30 s
 59°C für 30 s } 41 Zyklen
 72°C für 1 min
 4°C für ∞

<i>Snrpn</i>	95°C für 5 min	} 43 Zyklen
	95°C für 30 s	
	55°C für 30 s	
	72°C für 1 min	
	4°C für ∞	
<i>Oct4</i>	95°C für 5 min	} 43 Zyklen
	95°C für 30 s	
	58°C für 30 s	
	72°C für 1 min	
	4°C für ∞	

Die oben erwähnten SinglePlex-Assays wurden auch bei den Spermienproben (siehe 2.2.8) angewendet. Zusätzlich dazu erfolgten mit dieser DNA PCRs für *Plagl1*, sowie für das SINE (*short interspersed nuclear element*) Element B1. Die Analyse dieser Repeatsequenz diente zur Abschätzung der globalen DNA-Methylierung (JEONG und LEE 2005). Das PCR-Thermalcyclerprotokoll (Tetrad2 von BioRad, Hercules, USA) für diese beiden Assays bestand aus 5 min bei 95°C; 46 Zyklen mit 95°C für 30 s, 54°C bzw 56°C für 30 s und 72°C für 1 min; sowie einer Abschlusselongation bei 72°C für 10 min. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7 angegeben.

2.10 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde 1996 entwickelt (RONAGHI *et al.*) und ermöglicht - im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung - die „Echtzeit“-Erfassung der neusynthetisierten Nukleotide durch die DNA-Polymerase. Die zu sequenzierende (PCR-amplifizierte) DNA liegt einzelsträngig vor. Zudem dient ein komplementärer Sequenzierprimer als Ausgangspunkt der Synthese. Durch ein komplexes Enzymsystem wird beim Einbau eines geeigneten Nukleotids (komplementär zur Matrizen-DNA) ein Lichtsignal erzeugt, das durch eine CCD-Kamera erfasst wird. Die kontrollierte Zugabe aller vier Nukleotide in einem sequenzabhängigen Kontext bewirkt daher nur bei

dem Einbau der komplementären Base ein Signal. Die Höhe der Lichtemission ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.

Nach der Auswertung der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel wurde die DNA Methylierung positiv amplifizierter Proben mit dem PSQ96MA Pyrosequencing-Systems (Qiagen) analysiert (Tost *et al.* 2003). Die Proben wurden entsprechend einem Standardprotokoll und unter Verwendung der PyroGold SQA Reagenzien (Qiagen) für die Sequenzierung vorbereitet.

Standardprotokoll:

1. Pro Probe wurden folgende Volumina in eine 96well-PCR-Platte pipettiert:
 - 3 μ l Sepharosebeads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
 - 20 μ l Bindepuffer (Qiagen)
 - 22 μ l PCR-ProduktDie Platte wurde mit einer Folie (ThermoScientific, Surrey, Großbritannien) versiegelt und 5 min bei 1400 min^{-1} gevortext.
2. In eine Pyrosequenzierplatte wurden 1,6 μ l Sequenzierprimer (10 μ M) und 38,4 μ l Annealingpuffer (Qiagen) pipettiert.
3. Mit dem sogenannten PyroMark Vacuum Prep Table (Qiagen) wurde der Probenmix durch Anlegen eines Unterdrucks aus der PCR-Platte angesaugt. Die Sepharosebeads haben dabei die Biotinmodifikation der oben erwähnten PCR-Primer gebunden und wurden wiederum von den Filterspitzen der Ansaugvorrichtung fixiert.
4. Die Ansaugvorrichtung wurde nun nacheinander für jeweils 5 s erst in vergällten 70%igen Ethanol, dann in Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH) und abschließend in Waschpuffer (10 mM Tris-Acetat) überführt. Der ganze Vorgang diente der Präparation und Aufreinigung von einzelsträngigem PCR-Produkt.
5. Über der Pyrosequenzierplatte wurde der Unterdruck abgeschaltet und die Sepharosebeads mit dem einzelsträngigen PCR-Produkt wurden so in den Mix aus Annealingpuffer und Sequenzierprimer überführt.

6. Die Pyrosequenzierplatte wurde für 2 min auf 80°C erhitzt. Dies diente zur Vermeidung von Sekundärstrukturen der DNA. Anschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt, was die Bindung des Sequenzierprimers ermöglichte.
7. Eine Sequenzierkartusche wurde mit allen vier Nukleotiden (Qiagen) sowie Substrat- und Enzymmix (Qiagen) gefüllt. Die Volumina der Komponenten wurden aus dem Sequenzkontext durch die Pyro Q CpG-Software (Qiagen) ermittelt.
8. Pyrosequenzierplatte und Kartusche wurden in den Sequenzierer gestellt und der Lauf gestartet. Die Auswertung erfolgte wieder durch die Pyro Q CpG-Software (Qiagen).

2.11 Oligonukleotidsequenzen

Für die absolute Quantifizierung der Zieltranskripte mittels RT-qPCR wurden die Primer aus Tabelle 6 verwendet. Die Multiplextauglichkeit wurde von MAY *et al.* (2009) gezeigt.

Für DNA-Methylierungsanalysen wurden die PCR-Primer aus Tabelle 7 genutzt. Die Assays der geprägten Gene und von *Oct4* sind (semi)-nested PCR-Ansätze und bestehen folglich aus einem inneren und einem äußeren Primerpaar.

Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen für RT-qPCR.

Assay	5'-3' Forward Primer	5'-3' Reverse Primer	Lokalisation gDNA [Ensembl <i>Mus musculus</i> version 72.38 (GRCm38)]
<i>Lig1</i>	TCAAGTGGTGCCCGAGAG	AGTTCGACGCTTTGGGAAT	Chr.7: 13285277-13286683
<i>Lig3</i>	ACTCGGGTGCAAAACACG	CACCTCCTGCTCATTGTGAA	Chr.11: 82789875-82790569
<i>Mbd2</i>	AGGTAGCAATGACGAGACCC	GCCTCATCTCCACTGTCCA	Chr.18: 70617845-70622705
<i>Mbd3</i>	TGCAGAAGAAGTGGTCAGGA	GGTGTGTAGAGCACTCGCAA	Chr.10:80394008-80394612
<i>Mbd4</i>	AGACAGCATCCCACGGAC	GAGGAGGGGTCCATTCTTG	Chr.6:115845400-115845616
<i>Apex1</i>	ATCAGAAAACCTCAGCCAGTG	GCTCTGCAGTTCAGCCG	Chr.14:50925606-50926245
<i>Polβ</i>	CAGGCGATCCACAAGTACAAT	TTTCTTAGCTTCCGCTCCG	Chr.8: 22650491-22653088
<i>H3f3a</i>	GCAAGAGTGCGCCCTCTACTG	GGCCTCACTGCCTCCTGCAA	multiple Bindestellen

Material und Methoden

Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen für DNA-Methylierungsanalysen. Im Fall von nested PCRs sind äußeres und inneres Primerpaar angegeben. S1, S2, S3: Sequenzierprimer #1-3, Bio: 5`-biotinyliert.

Assay	Funktion	5'-3' Forward Primer	5'-3' Reverse Primer	5'-3' Sequenzierprimer	Lokalisation gDNA [Ensembl <i>Mus musculus</i> version 70.38 (GRCm38)]
geprägte Gene					
<i>H19</i>	äußeres Primerset	AAATTTTAATTTGGTTGTTTTGG	AATCAATTAATAAATAATAAACCC		Chr.7: 142580988 - 142581280
	inneres Primerset	TGGTTGTTTTTGAATATAATGTT	Bio-AAAAACAAAACACCTATACCCCTTC	S1 TTTAAGATGATAGTTATTAG S2 TTGTTTATGGGGTT	Chr.7: 142581000 - 142581167
<i>Igf2r</i>	äußeres Primerset	GGTATTTGAGGGTGTAATGTA	AACCCTAACACAACATAACAACAT		Chr.17: 12742490 - 12742912
	inneres Primerset	GAAGGGTTTTGTGATTAGGGTTAA	Bio-AACCCTAACACAACATAACAACAT	S1 GTTGTAGAGAGGTAAGTTT S2 AAAGGGTTGGATTTTAG	Chr.17: 12742528 - 12742912
<i>Snrpn</i>	äußeres Primerset	TTGGTAGTTGTTTTTTGGTAGGAT	ATAAACCCAAATCTAAAATATTTAATCA		Chr.7: 60004962 - 60005257
	inneres Primerset	Bio-TTGGTAGTTGTTTTTTGGTAGGAT	TAAAATACACTTCACTACTAAAATCCAC	S1 ACAAACCCAACTAACCTTC S2 TCCCAAACAATAACTA S3 ACTCCCTCTCCTCTCTAC	Chr.7: 60004993 - 60005257
<i>Plagl1</i>	äußeres Primerset	GGTTAGGGTAGGTAAGTAGTGAT	TCCCAAAAATTCTTAAAATCCAACATT		Chr.:10: 13091013-13091443
	inneres Primerset	GGTTAGGGTAGGTAAGTAGTGAT	Bio-CCAAAAAACACAAATCACCTCTTCC	S1 GGGTTTGGTGAAAGA S2 GGTGGGAGAAATTGAG	Chr.:10: 13091013-13091344
Pluripotenzmarker					
<i>Oct4</i>	äußeres Primerset	ATGGGGAAGGTGGGTATTT	AAATAACCCCAAAAATAATTAACACAC		Chr.:17: 35505652-35506101
	inneres Primerset	ATGGGGAAGGTGGGTATTT	Bio-AAATAACCCCAAAAATAATTAACACAC	S1 GGGTTTGGTGAAAGA S2 GGTGGGAGAAATTGAG	Chr.:17: 35505652-35506101
Transposable Elemente und repetitive Regionen					
B1	Primerset	GGTGGTGGTGGTGGTTGAGATAG	Bio-AATAACACACACCTTTAATCCCAACACT	S1 TTTGTAGATTAGGTTGGTTT	multiple Bindestellen

2.12 Datenanalyse

2.12.1 Datenbanken und bioinformatische Analyseprogramme

Sämtliche Sequenzinformationen wurden über die Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) in den Versionen 50 (Juli 2008) bis 72 (Juni 2013) sowie die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen. Alle selbstentworfenen Primer wurden unter Benutzung von Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) kreiert und mit Bi-Search (<http://bisearch.enzim.hu/>) *in silico* getestet. Bei dem Design von Oligonukleotiden für die Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA wurde die Pyrosequencing Assay Design Software (Qiagen) verwendet. Für das Auffinden stammspezifischer Polymorphismen zwischen *Mus musculus* und *Mus castaneus* wurde die Mouse Genome Informatics-Datenbank des Jackson Laboratory genutzt (<http://www.informatics.jax.org/>).

2.12.2 Statistik

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit SPSS Version 21 (IBM, Chicago, USA). Mit einer deskriptiven Datenanalyse wurden Box-Whisker-Plots erstellt, die eine gute grafische Darstellung der Streuungs- und Lagemaße erlauben. Die Box (Interquartilsabstand) ist charakterisiert durch das obere und untere Quartil sowie durch die Lage des Median und enthält 50% der mittleren Werte. Die Länge der Whiskers („Antennen“) beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Alle Werte, die sich außerhalb der Whiskers befinden, werden als Ausreißer bezeichnet. Als extreme Ausreißer werden Werte bezeichnet, die mehr als den 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt liegen.

Die Lage der Expressionsdaten wurde mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft. Aufgrund der nicht normalverteilten Expressionswerte wurde für den Gruppenvergleich zwischen Embryonen aus natür-

lich- bzw. superovulierten Weibchen der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test angewendet. Dabei verwirft ein p-Wert $<0,05$ die Nullhypothese H_0 (H_0 : kein Gruppenunterschied).

Der Chi-Quadrat-Test wurde angewendet, um auf Signifikanz bezüglich der Methylierungsunterschiede zwischen beiden Gruppen zu prüfen. Auch hier gilt ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant. Abhängig von der Größe der Stichprobe wurde das Signifikanzniveau nach Fisher (exakter Test, <20 Fälle), Kontinuitätskorrektur (20-60 Fälle) oder durch den Chi-Quadrat-Test nach Pearson (>60 Fälle) ermittelt (BACKHAUS *et al.* 2008).

3 Ergebnisse

3.1 Absolute Quantifizierung der Zieltranskripte

3.1.1 Standardkurven aus rekombinanter DNA

Mithilfe von Standardkurven kann auf die Amplifikationseffizienz der qPCR-Assays geschlossen werden. Für die 8 Zieltranskripte im Rahmen der differentiellen Genexpression nach ovarieller Induktion, wurden Amplifikationseffizienzen zwischen 90 und 108% kalkuliert. Der Regressionswert der Steigung war dabei $> 0,99$ und damit im Sollbereich (Tabelle 8).

Tabelle 8: Kandidatengene der Studien zur differentiellen Genexpression nach ovarieller Induktion. Amplifikationseffizienz und Produktgröße aller Assays auf RNA-Ebene sowie genomischer DNA.

Assay	slope	Effizienz	R ² -Wert der Regressionsgeraden	Größe RT-PCR Produkt	Größe gDNA PCR Produkt
<i>Lig1</i>	-3,59	90%	0,99	241 bp	1406 bp
<i>Lig3</i>	-3,14	108%	0,99	116 bp	694 bp
<i>Mbd2</i>	-3,58	90%	0,99	291 bp	4860 bp
<i>Mbd3</i>	-3,17	107%	0,99	109 bp	604 bp
<i>Mbd4</i>	-3,2	105%	0,99	122 bp	216 bp
<i>Apex1</i>	-3,24	104%	0,99	183 bp	639 bp
<i>Polb</i>	-3,3	101%	0,99	93 bp	2597 bp
<i>H3f3a</i>	-3,18	106%	0,99	213 bp	variabel

3.1.2 Ovarielle Induktion führt zur differentiellen Genexpression von *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* in Mausembryonen

Um den Einfluss der Superovulation auf wichtige Entwicklungsgene zu beurteilen, wurde eine genspezifisch gepimte MultiPlex-RT-Reaktion durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte eine SinglePlex Real-time PCR mit den Zieltranskripten, die dann anhand einer Standardreihe absolut quantifiziert wurden.

Für das komplette Genset (*Apex1*, *Lig1*, *Lig3*, *Mbd2*, *Mbd3*, *Mbd4*, *Polb* und *H3f3a*) wurden Initialuntersuchungen an jeweils 6 Embryonen durchgeführt. Aus diesen Analysen gingen *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* als differentiell reguliert zwischen Embryonen, die aus natürlich ovulierten bzw. hormonell stimulierten C57BL6/J Weibchen stammen, hervor. Für eine belastbare Statistik war die Zahl der untersuchten Embryonen für die drei differentiell regulierten Gene zu klein. Folglich wurde die Zahl der analysierten Embryonen für *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* stark erhöht (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl der untersuchten Embryonen in den zwei Vergleichsgruppen. Statistik zu den 3 differentiell regulierten Kandidatengenen.

Assay	Embryonen aus hormonell stimulierten Weibchen			Embryonen aus natürlich ovulierten Weibchen		
	Zahl der untersuchten Embryonen	Zahl der analysierbaren Embryonen	Zahl der nicht-analysierbaren Embryonen	Zahl der untersuchten Embryonen	Zahl der analysierbaren Embryonen	Zahl der nicht-analysierbaren Embryonen
<i>Mbd3</i>	29	17 (59%)	12 (41%)	31	29 (95%)	2 (5%)
<i>Apex1</i>	36	23 (64%)	13 (36%)	38	32 (84%)	6 (16%)
<i>Polb</i>	18	9 (50%)	9 (50%)	20	16 (80%)	4 (20%)

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich wird, liegt der Median der mRNA-Kopienzahl von Embryonen aus der Kontrollgruppe deutlich höher als bei Embryonen aus hormonell stimulierten Muttertieren. Abbildung 7 verdeutlicht zudem, dass Embryonen mit hoher mRNA-Kopienzahl von *Polb* ausschließlich in der Kontrollgruppe zu finden sind. Insgesamt ist die Quote an Embryonen, die das Zieltranskript nicht exprimieren, in der Gruppe hormonell stimulierter Weibchen deutlich erhöht (siehe Tabelle 9) und erreicht im Extremfall für *Mbd3* mehr als den 8fachen Wert.

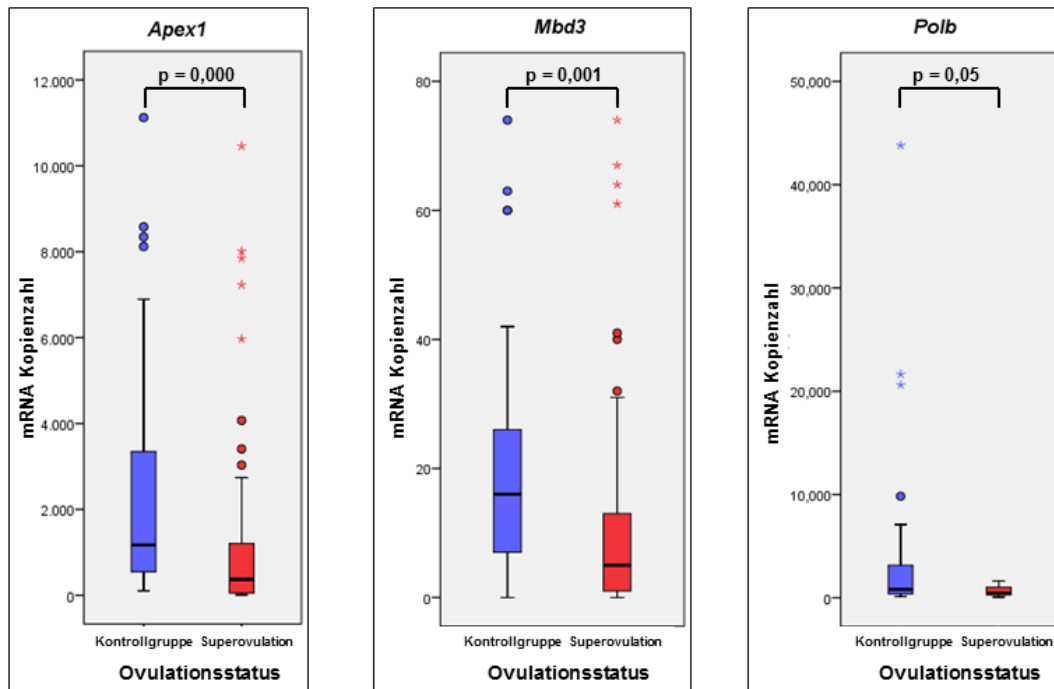


Abbildung 7: Vergleich der mRNA-Kopienzahl von Embryonen im 16-Zellstadium. Statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression konnten bei *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* ermittelt werden (p -Wert $\leq 0,05$). Blau: Muttertier (C57BL6/J) natürlich ovuliert; rot: Muttertier (C57BL6/J) hormonell stimuliert.

3.1.3 Die embryonale Expression von *Lig1*, *Lig3*, *Mbd2* und *Mbd4* wird durch Superovulation der Muttertiere nicht beeinflusst

Die Ausgangsuntersuchungen mit dem kompletten MultiPlex-RT-Set wurden an mindestens sechs Mausembryonen durchgeführt. Dabei gingen *Lig1*, *Lig3*, *Mbd2* und *Mbd4* als differenziell nicht reguliert zwischen beiden Gruppen hervor. Im Gegensatz zu den drei differenziell regulierten Genen aus 3.1.2 ist die Zahl an Embryonen, bei denen keine Expression detektiert werden konnte, ähnlich groß (Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl der untersuchten Embryonen in den zwei Vergleichsgruppen. Statistik zu den nicht regulierten Kandidatengenen.

Assay	Embryonen aus hormonell stimulierten Weibchen			Embryonen aus natürlich ovulierten Weibchen		
	Zahl der untersuchten Embryonen	Zahl der analysierbaren Embryonen	Zahl der nicht-analysierbaren Embryonen	Zahl der untersuchten Embryonen	Zahl der analysierbaren Embryonen	Zahl der nicht-analysierbaren Embryonen
<i>Lig1</i>	9	8 (89%)	1 (11%)	14	13 (93%)	1 (7%)
<i>Lig3</i>	22	21 (95%)	1 (5%)	12	11 (92%)	1 (8%)
<i>Mbd2</i>	6	4 (67%)	2 (33%)	5	4 (80%)	1 (20%)
<i>Mbd4</i>	6	6 (100%)	0 (0%)	6	6 (100%)	0 (0%)

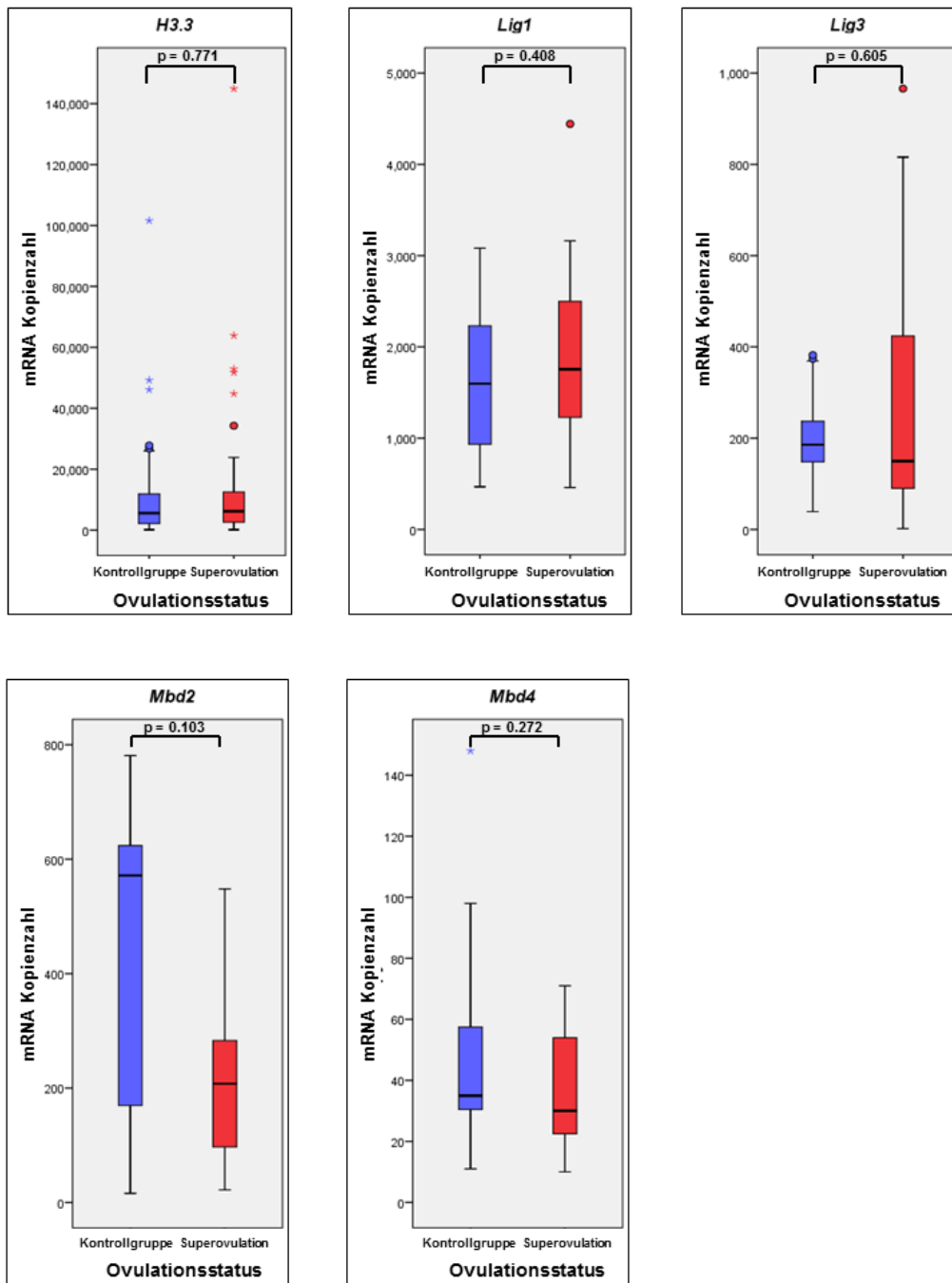


Abbildung 8: Vergleich der mRNA-Kopienzahl von Embryonen im 16-Zellstadium. Keine statistisch signifikanten Genexpressionsunterschiede weisen *H3.3*, *Lig1*, *Lig3*, *Mbd2* und *Mbd4* auf (p-Wert $\geq 0,05$). Blau: Muttertier (C57BL6/J) natürlich ovuliert; rot: Muttertier (C57BL6/J) hormonell stimuliert.

3.2 Korrelation der *Apex1*-Expression auf mRNA- und Protein-Niveau

Die differentielle Genexpression von *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* (siehe 3.1.2) zwischen beiden Versuchsgruppen muss auf funktioneller Ebene evaluiert werden. Um einen Zusammenhang zwischen mRNA-Expression und Proteinmenge herstellen zu können, wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit Präimplantationsembryonen verschiedener Entwicklungsstufen durchgeführt. Da die Expressionsdaten im 16-Zellstadium erhoben wurden und die Zeit für die Translation der mRNA in Proteinprodukt berücksichtigt werden muss, standen hierbei Embryonen im späten Morulastadium (32-Zeller) im Fokus. Hier sollten sich also die detektierten Unterschiede in den mRNA-Kopienzahlen direkt auf die Menge an jeweiligem Protein auswirken, falls kein entscheidender Einfluss posttranskriptioneller Prozesse stattfindet. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde eingesetzt, um die Lokalisation und die Expression von APEX1 zu analysieren. Durch die parallele Bearbeitung von Proben beider Versuchsgruppen und das Fixieren der Embryonen auf demselben Objektträger kann mit Bildanalyseprogrammen, wie ImageJ, ein gewisses Maß an Quantifizierung erreicht werden.

3.2.1 Nachweis der differentiellen Genexpression von APEX1 auf Proteinebene

Eine hormonelle Stimulation der Muttertiere führte auch auf translationaler Ebene zu deutlich geringerer Expression von APEX1. Wie Abbildung 9 zeigt, konnte APEX1 in Morulae (A) und Blastozysten (C) von natürlich ovulierten Muttertieren in nahezu jeder Blastomere nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten beide Embryonenstadien in der Gruppe der hormonell behandelten Muttertiere (B und D) auffallend viele Blastomeren nur sehr schwache Zeichen der APEX1-Expression.

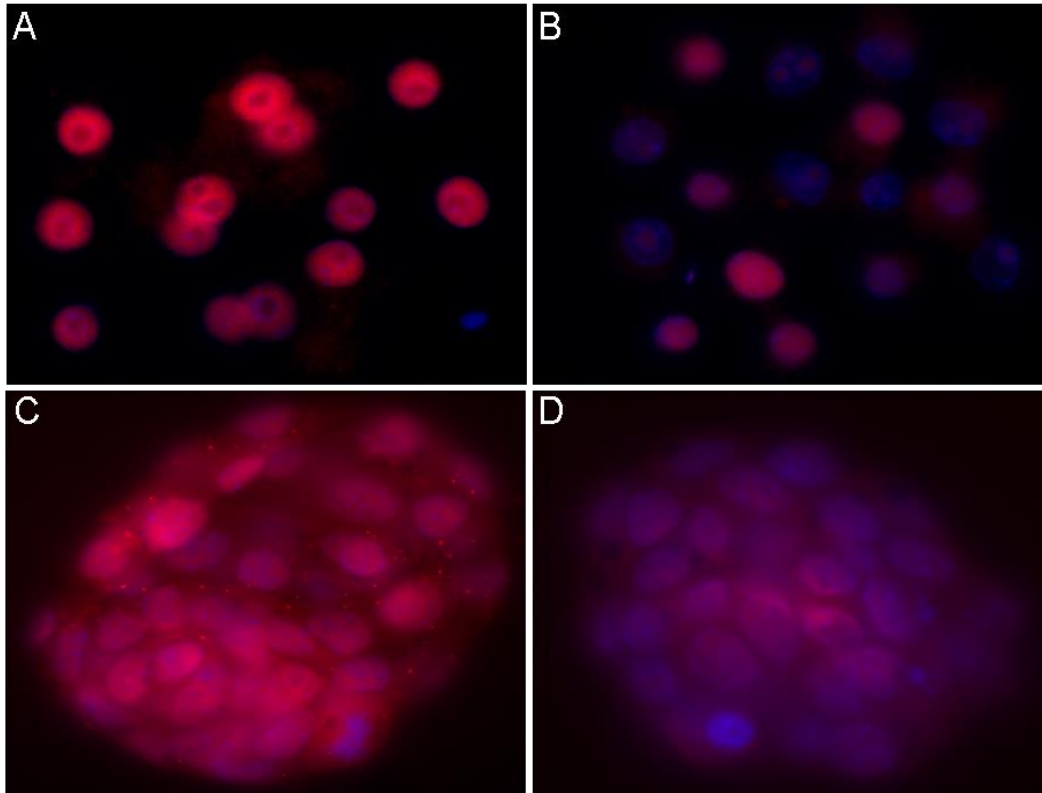


Abbildung 9: Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung. Markierung von frühen (A, B) und späten Morulae (C, D) mit Primärantikörper gegen APEX1 und Texas-red markiertem Sekundärantikörper. Eine Kerngegenfärbung erfolgte mit DAPI. Die Aufnahmen A und C zeigen Embryonen aus der spontan ovulierten Kontrollgruppe, Aufnahmen B und D gehören zur Superovulationsgruppe. Blastomeren mit reduzierter bzw. fehlender Fluoreszenz sind fast ausschließlich in Embryonen aus hormonell stimulierten Muttertieren zu beobachten.

Die Fluoreszenzstärke wurde mithilfe des Programms ImageJ quantifiziert. Bei 8- und 16-Zellern wurde die Intensität jeder einzelnen Blastomere gemessen. Im Fall von Blastozysten wurde die Fluoreszenzintensität des Embryos als Ganzes quantifiziert, da eine klare Abgrenzung der einzelnen Blastomeren nicht mehr möglich war. In Tabelle 11 sind die Durchschnittswerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in unterschiedlichen Embryonalstadien angegeben. Die Kontrollgruppe zeigte durchgehend höhere Werte, die im 8-Zellstadium 80% höher und im Blastozystenstadium 45% höher waren als bei Embryonen, die aus hormonell stimulierten Muttertieren

stammten. Zudem ist die Quote an APEX1 positiven Blastomeren in der Kontrollgruppe höher. Das Auszählen ergab 17% bzw. 4% mehr APEX1 positive Blastomere in 8-Zellern bzw. 16-Zellern der Kontrollgruppe. Insgesamt sind sowohl die Unterschiede der Fluoreszenzintensität als auch die Anzahl positiver Blastomeren im Stadium 16-zelliger Embryonen am geringsten zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität und Anteil der positiv gefärbten Blastomeren in den untersuchten Embryonenstadien.

	Intensität (Ø)		positive / Gesamtzahl Blastomeren	
	Kontrollgruppe	Superovulationsgruppe	Kontrollgruppe	Superovulationsgruppe
8-Zeller	56 (n=8)	31 (n=4)	46/64 (72%)	22/40 (55%)
16-Zeller	36 (n=7)	33 (n=15)	70/88 (80%)	164/215 (76%)
32-Zeller	64 (n=13)	44 (n=10)	nicht bestimmt	nicht bestimmt

3.3 DNA-Methylierungsanalysen an Präimplantationsembryonen

3.3.1 Digitale Bisulfitpyrosequenzierung

Um den transgenerationalen Einfluss der ovariellen Stimulation auf die epigenetische Reprogrammierung in Präimplantationsembryonen analysieren zu können, wurde die bisulfitkonvertierte DNA einzelner 16-Zeller (Morulastadium) mithilfe der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung untersucht. Zusätzlich wurden Zweizellembryonen analysiert, um mögliche epigenetische Effekte durch die Kryokonservierung männlicher Gameten aufzuklären. Durch die Technik der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung wird das Risiko von präferentieller Amplifikation eines der beiden elterlichen Allele minimiert. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die ICR des *H19-Igf2* Locus sowie die DMR von *Snrpn*. Außerdem wurde die Methylierung von *Airn* quantifiziert, einem nicht-kodierenden Antisensetranskript von *Igf2r*, das dessen Expression reguliert. Abbildung 10 verdeutlicht die Ergebnisse der digitalen PCR anhand eines Gelelektrophoresefotos. Die Gelbanden repräsentieren die Produkte der SinglePlex-PCRs

oben erwähnter Gene. Ausgangspunkt der Bisulfitbehandlung sowie der anschließenden Verdünnung und MultiPlex-PCR waren Zweizellembryonen. Im Optimalfall erwartet man für Zweizellembryonen 4 Allele, sofern man einen begrenzten DNA-Schaden durch die Bisulfitkonversion sowie eine hohe Rückgewinnungsrate an bisulfitbehandelter DNA unterstellt.

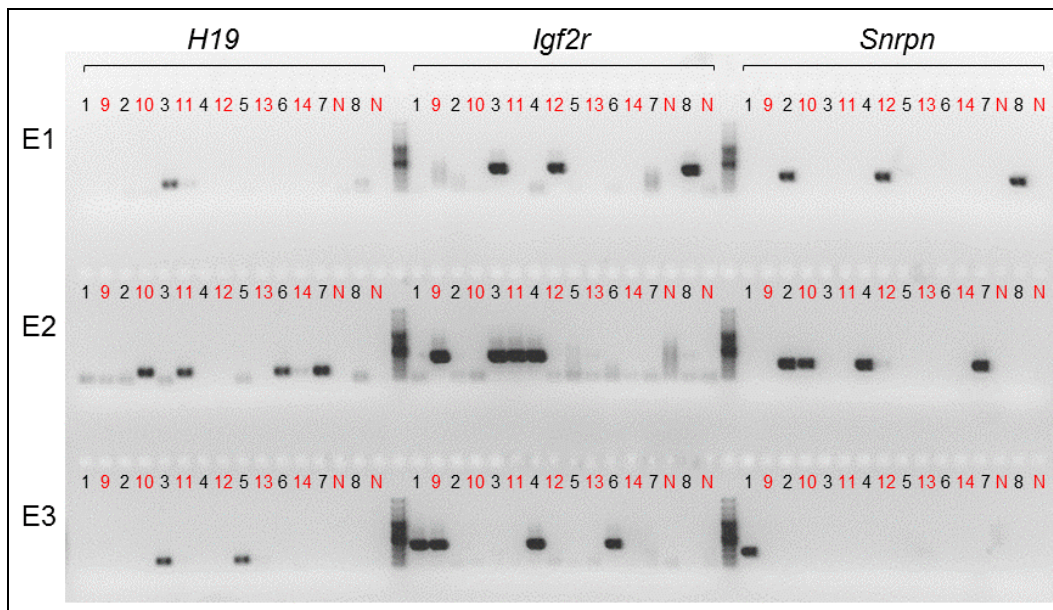


Abbildung 10: Gelelektrophoretische Analyse der digitalen PCR im Vorfeld der Pyrosequenzierung. Gezeigt sind die Ergebnisse zu 3 Zweizellembryonen (E1 – E3) und die PCR-Amplifikons für *H19*, *Igf2r* und *Snrpn*. Die Nummerierung der Proben folgt dem Umstand, dass mit einer 8-Kanalpipette gearbeitet und somit nur jede 2. Tasche im Gel beladen wurde.

Anhand von stammspezifischen SNPs in den untersuchten Hybridembryonen konnten die elterlichen Allele zugeordnet und eine Aussage über eventuelle Epimutationen getroffen werden. Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer digitalen Bisulfitpyrosequenzierung anhand der DMR1 von *Snrpn*. Für das maternal geprägte Gen wird im Normalfall eine Hypermethylierung der maternalen Allele, sowie eine Hypomethylierung der paternalen Allele erwartet.

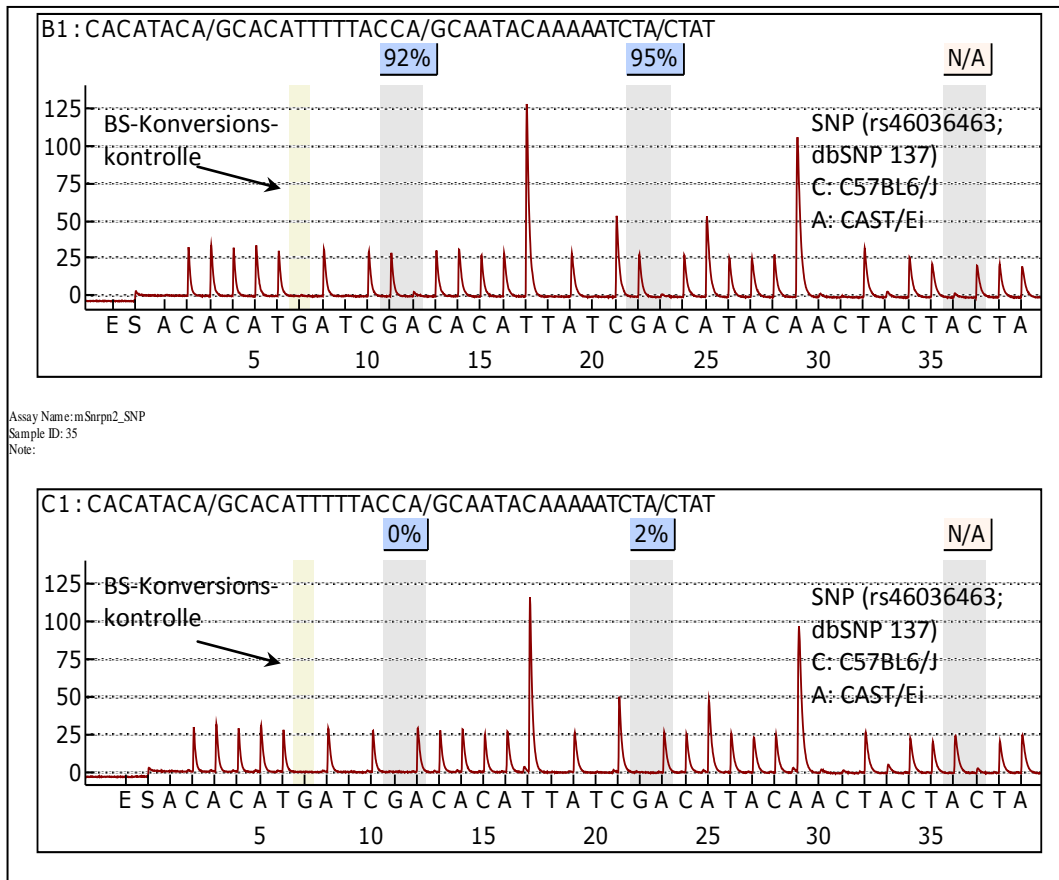


Abbildung 11: Digitale Bisulfitpyrosequenzierung der DMR1 von *Snrpn*. Oben: Pyrogramm eines maternalen C57BL6/J Allels mit erwarteter Hypermethylierung eines maternal geprägten Gens in den untersuchten CpGs. Unten: Pyrogramm eines paternalen CAST/Ei Allels mit erwarteter Hypomethylierung eines maternal geprägten Gens in den analysierten CpGs.

3.4 Der Einfluss ovarieller Induktion auf den Imprintingstatus von *H19* und *Snrpn*

Die digitale Bisulfitpyrosequenzierung von Embryonen im Morula-Stadium wurde durchgeführt, um mögliche transgenerationale Einflüsse der Superovulation auf die ICR von *H19*, sowie die DMR von *Snrpn* zu untersuchen. Im Optimalfall wurden bei den analysierten 16-Zellembryonen im Morulastadium im unreplizierten Zustand des Genoms 32 und nach vollständiger Replikation 64 Kopien eines „*single copy*“-Gens erwartet. Durch die aggressiven chemischen Prozesse während der Bisulfitbehandlung musste mit einer relativ hohen Rate an DNA-Fragmentierung gerechnet werden. Dieser Aspekt führte in der nachfolgenden PCR vor allem bei größeren Amplikons zu drastisch verringerten Amplifikationseffizienzen. Das gesteigerte Risiko ergibt sich dabei aus der höheren Wahrscheinlichkeit eines Bruches im DNA-Template in der zu amplifizierenden Region, der unter den extremen Verdünnungsverhältnissen der digitalen PCR unmittelbar zum Ausfall der PCR führt. Darüber hinaus liegt die Rückgewinnungsquote bisulfitbehandelter DNA selbst bei aktuell erhältlichen Kits im Idealfall nur bei etwa 80% (Zymo Research).

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. In dieser Statistik ist die Anzahl der analysierbaren Embryonen pro Gruppe und analysiertem Locus dokumentiert. Die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele wird nach parentaler Herkunft angegeben. Darüber hinaus werden aberrante Werte der DNA-Methylierung nach Epimutationen und stochastische Mutationen klassifiziert. Als Epimutation wird ein zu mindestens 75% aberrant methyliertes Allel gewertet. Demgegenüber wurden einzelne aberrant methylierte CpGs eines Allels bei Nichtvorhandensein einer Epimutation als stochastische Mutation eingestuft. Keine der beiden Mutationsarten fließt in die jeweilig andere Statistik mit ein. Die Tabelle 13-17 sind nach dem gleichen Schema aufgebaut, kategorisieren gegenüber Tabelle 12 jedoch den Konservierungszustand der Spermatozoen.

Tabelle 12: Statistik zur digitalen Bisulfitpyrosequenzierung von 16-Zellern aus natürlich ovulierten sowie ovariell stimulierten Weibchen. Angegeben sind die Zahl der analysierten Embryonen und die durchschnittliche Anzahl der daraus zurückgewonnenen parental Allele, sowie der Anteil an Epimutationen und stochastischen Mutationen. Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Status Ovulation			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR
natürlich ovuliert	Zahl analysierter Embryonen		9	11
	Zahl zurückgewonnener Allele Ø	maternal paternal	4,6 (53%) 4,1 (47%)	2,4 (41%) 3,4 (59%)
	Epi-mutationen	maternal paternal	0/41 (0%) 1/37 (3%)	0/26 (0%) 1/37 (3%)
	stochastische Mutationen	maternal paternal	4/155 (3%) 11/127 (10%)	4/182 (2%) 0/311 (0%)
ovariell stimuliert	Zahl analysierter Embryonen		10	10
	Zahl zurückgewonnener Allele Ø	maternal paternal	5,2 (60%) 3,5 (40%)	3,0 (42%) 4,2 (58%)
	Epi-mutationen	maternal paternal	1/52 (2%) 4/35 (11%)	2/30 (7%) 0/42 (0%)
	stochastische Mutationen	maternal paternal	0/197 (0%) 9/129 (7%)	8/223 (4%) 2/341 (1%)

In Abbildung 12 bzw. Abbildung 13 sind die Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung für die ICR von *H19* bzw. die DMR von *Snrpn* anhand eines Dot-Diagramms visualisiert. Bei dieser weit verbreiteten Darstellung von DNA-Methylierungsdaten entspricht ein leerer Kreis einem unmethylierten CpG-Dinukleotid, ein ausgefüllter Kreis stellt ein methyliertes Cytosin dar. Jede dazugehörige Linie repräsentiert ein analysiertes Allel.

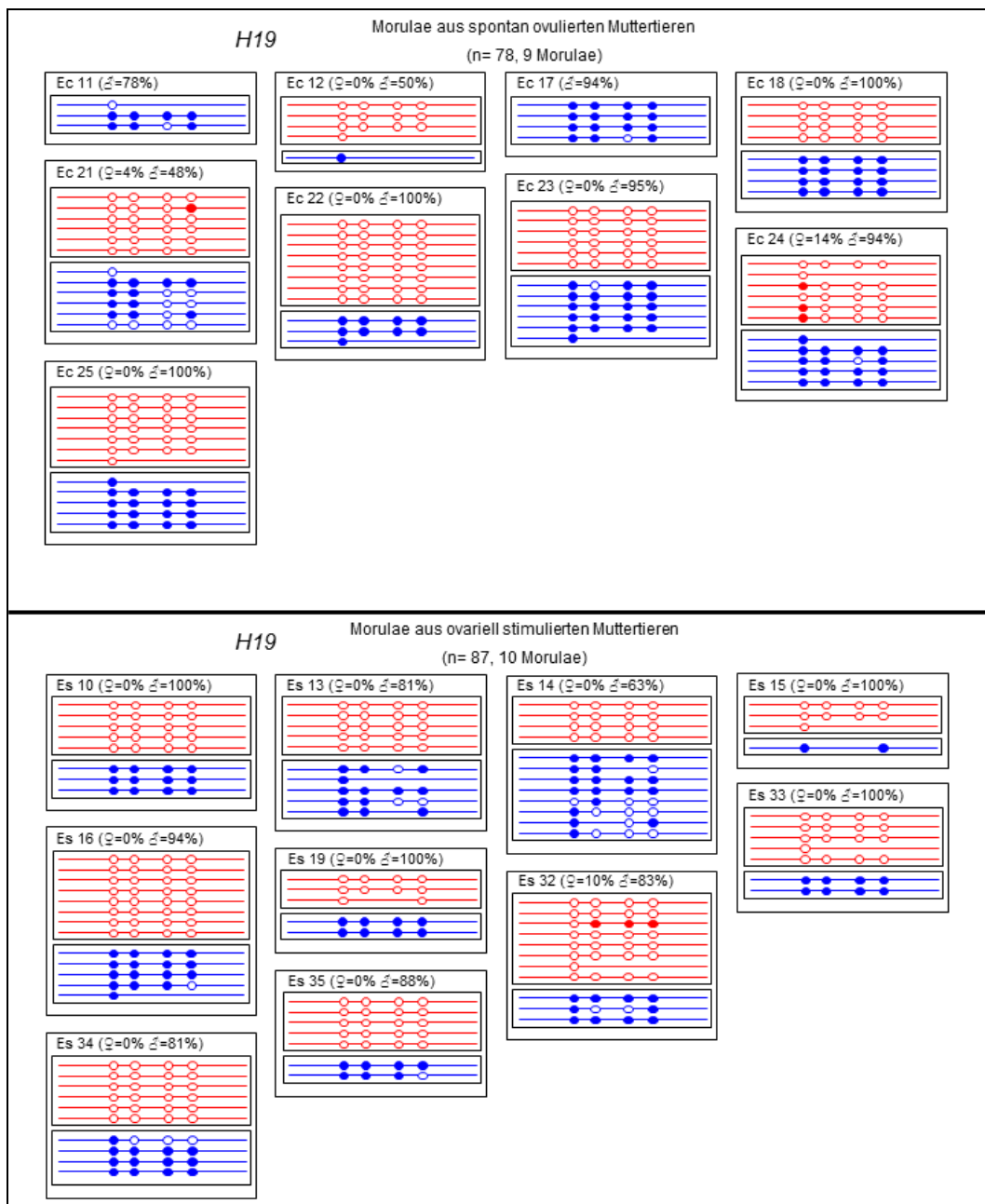


Abbildung 12: Digitale Bisulfitypyrosequenzierung der ICR des *H19-Igf2*-Locus. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in Morulae von natürlich ovulierten (oben) bzw. hormonell stimulierten Muttertieren (unten). Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Ec: Kontrollembryonen (spontan ovuliert); Es: Embryonen aus superovulierten Muttertieren. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

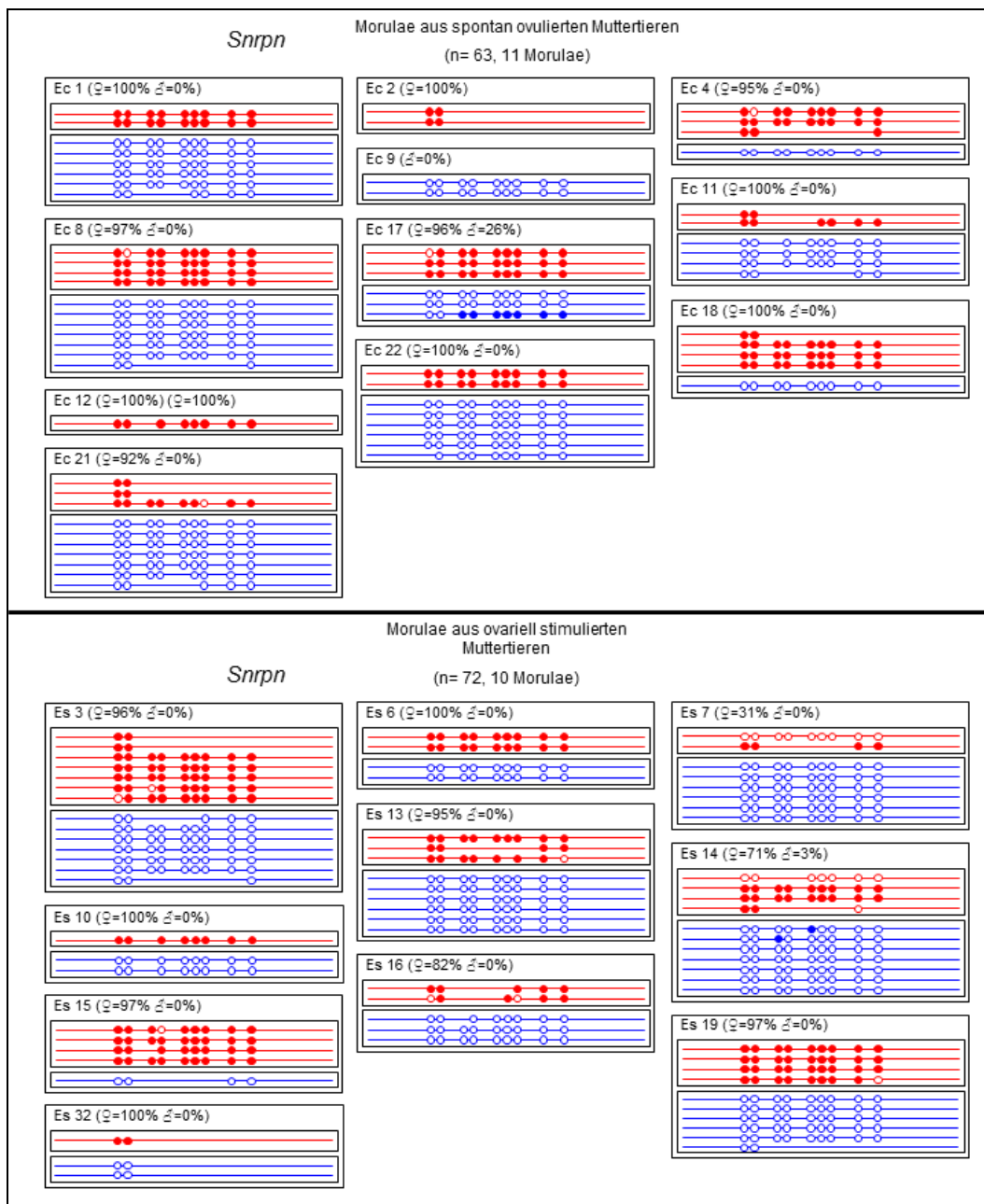


Abbildung 13: Digitale Bisulfityprosequenzierung der DMR von *Snrpn*. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in Morulae von natürlich ovulierten (oben) bzw. hormonell stimulierten Muttertieren (unten). Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Ec: Kontrollembryonen (spontan ovuliert); Es: Embryonen aus superovulierten Muttertieren. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse aus Tabelle 12 für die ICR des *H19-Igf2*-Locus grafisch zusammengefasst. Nach Kriterien stochastischer Mutationen (<75% aberrante CpGs eines Allels) konnten signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (3%) und der Superovulationsgruppe (0%) hinsichtlich des maternalen Allels ermittelt werden. Unter den Voraussetzungen einer Epimutation (>75% aberrante CpGs eines Allels) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen registriert werden. Allerdings konnte hier ein gegensätzlicher Trend beobachtet werden, der eine erhöhte Rate an Aberrationen bei Embryonen der Superovulationsgruppe zeigte.

Ein identisches Muster konnte für das paternale Allel von *H19* ermittelt werden. Nach Kriterien einer Epimutation konnte ein deutlich höherer Anteil an Abweichungen von der erwarteten Hypermethylierung des paternalen Allels nach ovarieller Stimulation identifiziert werden. Präimplantationsembryonen aus ovariell induzierten Muttertieren wiesen fast 4mal mehr Epimutationen im paternalen *H19*-Allel auf (11%), als Embryonen aus spontan ovulierten Muttertieren (3%). Der Anteil an stochastischen Mutationen, die höchstwahrscheinlich keine funktionellen Konsequenzen haben, wich zwischen den beiden Gruppen nicht deutlich voneinander ab. Entsprechend dem maternalen Allel konnte jedoch wieder der gegenteilige Trend zur Abnahme an stochastischen Mutationen für Embryonen der Superovulationsgruppe beobachtet werden.

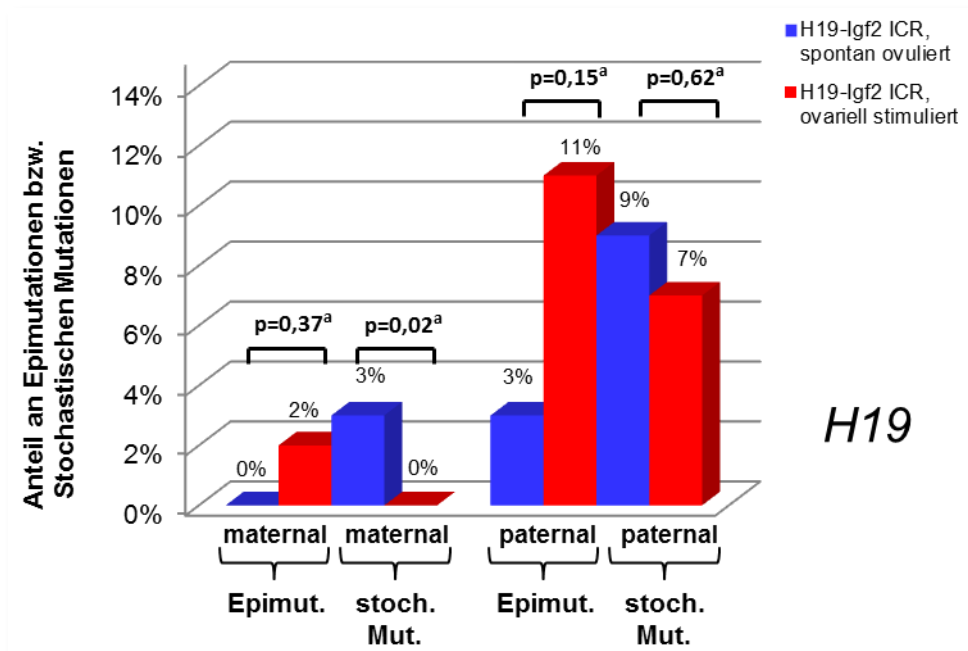


Abbildung 14: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten zum Einfluss der ovariellen Induktion für die ICR des *H19-Igf2*-Locus. Angegeben ist der jeweilige Anteil an Epimutationen (Epimut.) bzw. stochastischen Mutationen (stoch. Mut.) von maternalen und paternalen Allelen, kategorisiert nach spontaner und induzierter Ovulation (p-Wert nach Chi-Quadrat-Test; ^a Chi-Quadrat-Test nach Pearson, ^b Kontinuitätskorrektur).

Abbildung 15 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 12 für die DMR von *Snrpn*. Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren wiesen gegenüber den Kontrollembryonen (0%) einen deutlich höheren Wert an Epimutationen (7%) im mütterlichen *Snrpn*-Allel auf (Normalzustand: hypermethyliert). Auch der Anteil an stochastischen Mutationen des mütterlichen *Snrpn*-Allels war in der Superovulationsgruppe (4%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (2%) höher.

Zum Einfluss der ovariellen Induktion auf die erwartete Hypomethylierung des paternalen *Snrpn*-Allels wurden widersprüchliche Daten erhalten. Einerseits konnten im Gegensatz zu den Kontrollen (3%) keine Epimutationen nach ovarieller Stimulation (0%) der Muttertiere in den Embryonen nachgewiesen werden. Demgegenüber konn-

te jedoch eine leicht erhöhte Rate an stochastischen Mutationen nach der Hormonbehandlung der Muttertiere festgestellt werden.

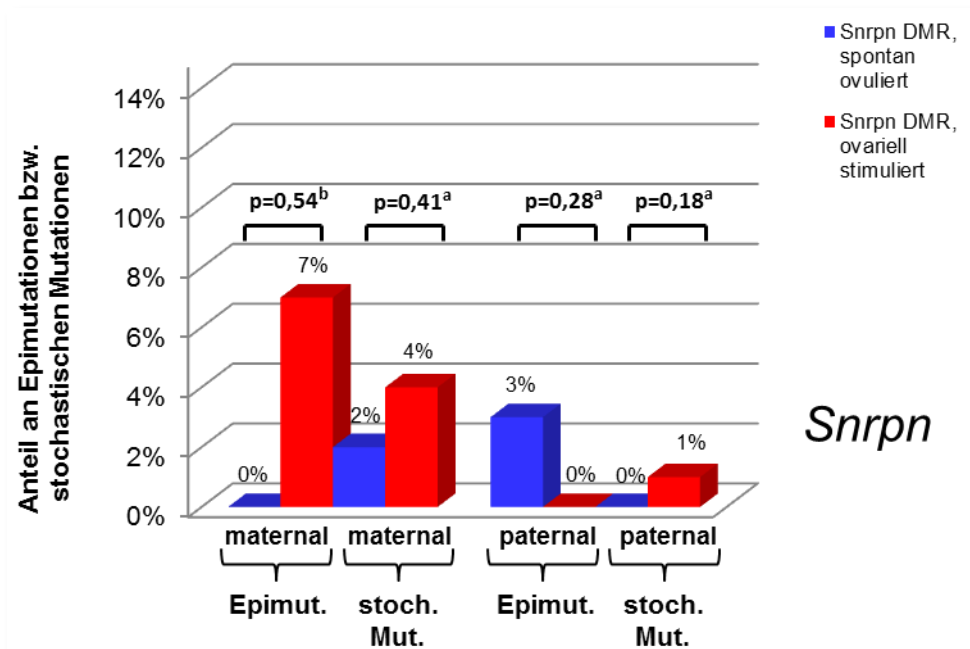


Abbildung 15: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten zum Einfluss der ovariellen Induktion für die DMR des *Snrpn*-Locus. Angegeben ist der jeweilige Anteil an Epimutationen (Epimut.) bzw. stochastischen Mutationen (stoch. Mut.) von maternalen und paternalen Allelen, kategorisiert nach spontaner und induzierter Ovulation (p-Wert nach Chi-Quadrat-Test; ^a Chi-Quadrat-Test nach Pearson, ^b Kontinuitätskorrektur).

3.5 Epigenetische Effekte der Kryokonservierung muriner Spermien

Die optimierte Kryokonservierung muriner Spermien nach OSTERMEIER *et al.* (2008) führt zu deutlich erhöhten Fertilisationsraten nach einer IVF verglichen mit früheren Protokollen. In diesem Teilaspekt der Arbeit soll der Einfluss der Vitrifizierung und des anschließenden Auftauens der Spermien aus epigenetischer Perspektive analysiert werden. Dabei wurden sowohl direkte Einflüsse dieser Prozesse auf die Gameten, als auch potentielle transgenerationale Wirkungen in Präimplantationsembryonen untersucht.

3.5.1 Quantifizierung der Spermienmotilität

In Abbildung 16 sind die Messwerte zur Beweglichkeit der Spermien unmittelbar nach der Präparation des CAST/Ei-Männchens, sowie nach der Kryokonservierung eines Teils dieser Spermien angegeben.

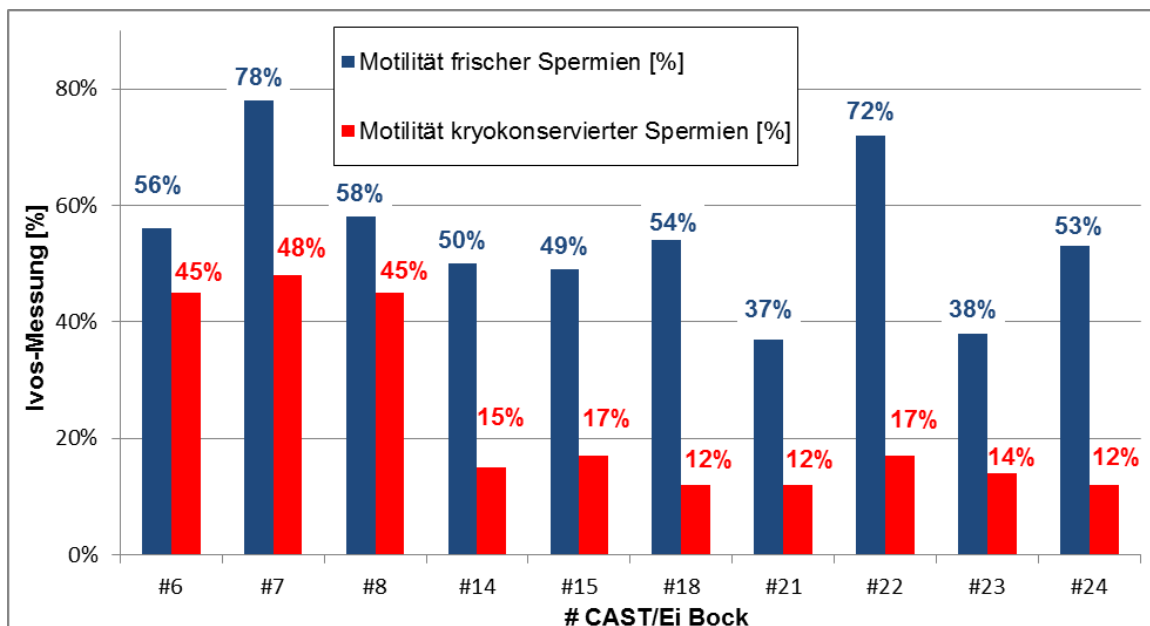


Abbildung 16: Quantifizierung der Spermienmotilität. Angegeben sind die Werte vor (blau) und nach (rot) der Kryokonservierung von Spermienproben eines CAST/Ei-Männchens. Die Werte einiger CAST/Ei-Männchen sind nicht aufgeführt, da eine bzw. beide Messungen fehlen.

Generell konnte eine Abnahme im Anteil beweglicher Spermien nach der Kryokonservierung beobachtet werden. In diesem allgemeingültigen Trend gab es jedoch große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Männchen. Die geringste Abnahme bewegungsfähiger Spermien nach Kryokonservierung (-20%) zeigte sich in den Proben von Männchen Nr. 6. Demgegenüber konnte eine um 76% verringerte Quote der Motilität bei Männchen Nr. 22 beobachtet werden.

3.5.2 Einfluss der Kryokonservierung murine Spermatozoen auf den epigenetischen Status geprägter Gene

Um die Wirkung der Kryokonservierung auf epigenetischer Ebene in Spermien zu untersuchen, wurden die DMRs von *Plagl1* und *Snrpn*, sowie die ICR des *H19-Igf2*-Locus untersucht. Zudem wurde der DNA-Methylierungsstatus von *Airn* analysiert, um letztendlich eine Aussage über die Regulation von *Igf2r* treffen zu können. Die DNA-Methylierung des SINE Elements B1 diene als Schätzmaß der globalen Methylierung. Zusätzlich wurde der proximale Promoter des Pluripotenzmarkers *Oct4* analysiert. Im Folgenden werden DNA Proben, die direkt nach der Präparation der Böcke zur IVF und damit verbunden auch zur DNA-Isolation verwendet wurden, als Kontrollproben bezeichnet.

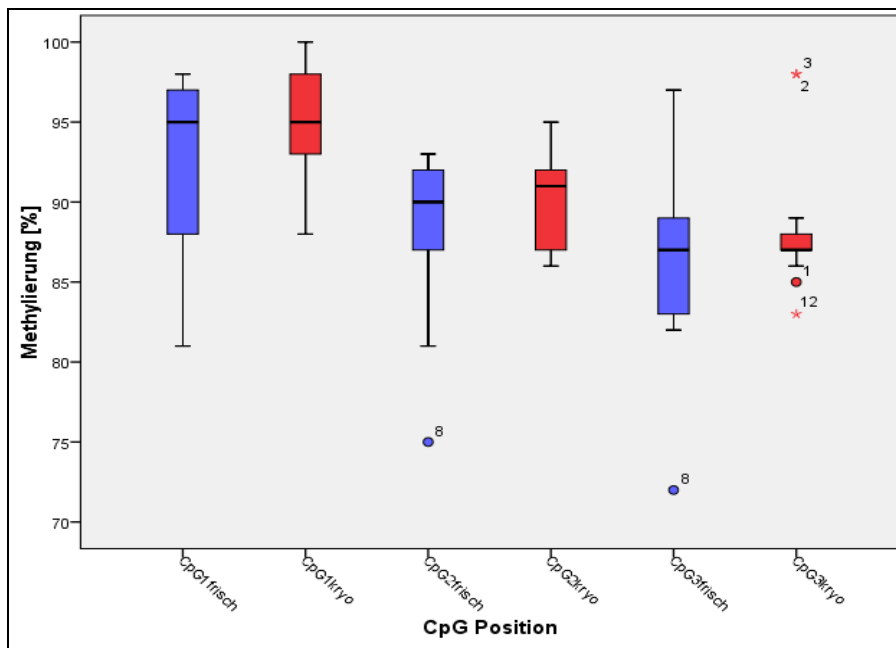


Abbildung 17: Quantifizierung der DNA-Methylierung der ICR des *H19-Igf2*-Locus in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Wie erwartet, zeigte die ICR des *H19-Igf2*-Locus in männlichen Gameten einen hypermethylierten Status (Abbildung 17). Dabei gab es nur vereinzelt auffällige Unterschiede zwischen Kontrollproben und den Proben, die nach Kryokonservierung der Gameten gewonnen wurden. In Abbildung 17 und den folgenden Abbildungen (18-20) wird jedoch ersichtlich, dass für Probe 8 auffällig oft Methylierungswerte erhalten wurden, die Ausreißer oder sogar extreme Ausreißer in den Boxplots darstellen. Im Fall der ICR des *H19-Igf2* Locus machte dieser Unterschied je 5% für CpG2frisch bzw. CpG3frisch aus (Median aller Proben: 90% bzw. 87%, Probe 8: 75% bzw. 72%). Diese evidenten Unterschiede normalisierten sich nach der Kryokonservierung und waren nicht mehr nachzuweisen.

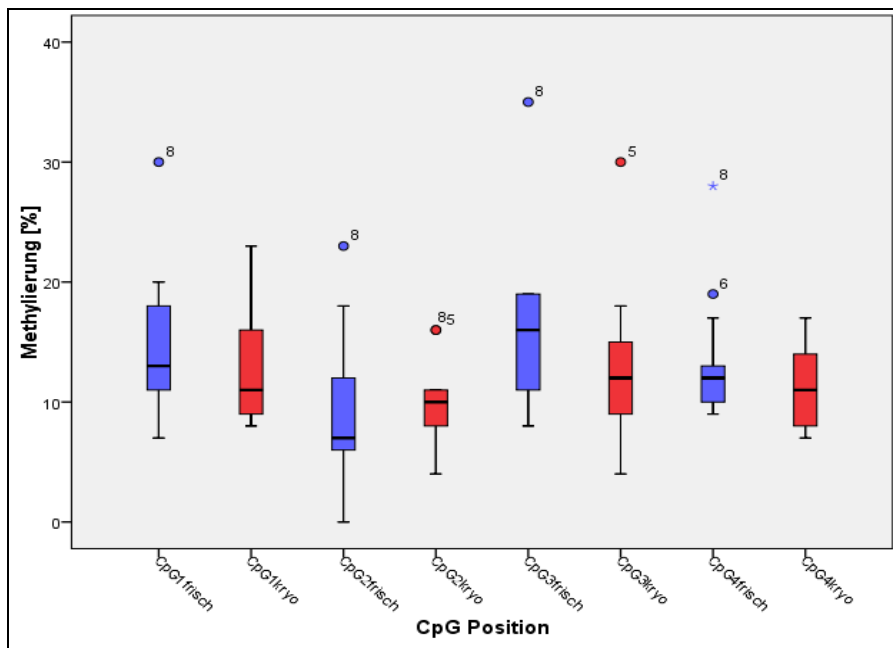


Abbildung 18: Quantifizierung der DNA-Methylierung von *Igf2r* (*Air*) in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Die Methylierung des maternal geprägten Antisensetranskripts *Air* wies die charakteristische Hypomethylierung in männlichen Gameten auf (Abbildung 18). Starke Abweichungen vom Median mehrerer CpGs konnten erneut bei Probe 8 festgestellt werden. Im frisch präparierten Zustand ergab sich für CpG1 ein um mehr als 17% erhöhter Wert im Vergleich zum Median aller Proben (Differenz zwischen Maximum und Median aller Proben). Parallel dazu konnte auch für CpG2frisch ein um 16% erhöhter Wert, für CpG3frisch ein 19% höherer Wert und für CpG4 ein um 16% gesteigerter DNA-Methylierungswert ermittelt werden. Analog zu den Ergebnissen der *H19-Igf2* ICR normalisieren sich die Werte in den kryokonservierten Proben. Lediglich CpG2kryo zeigt noch einen erhöhten Wert (+6%).

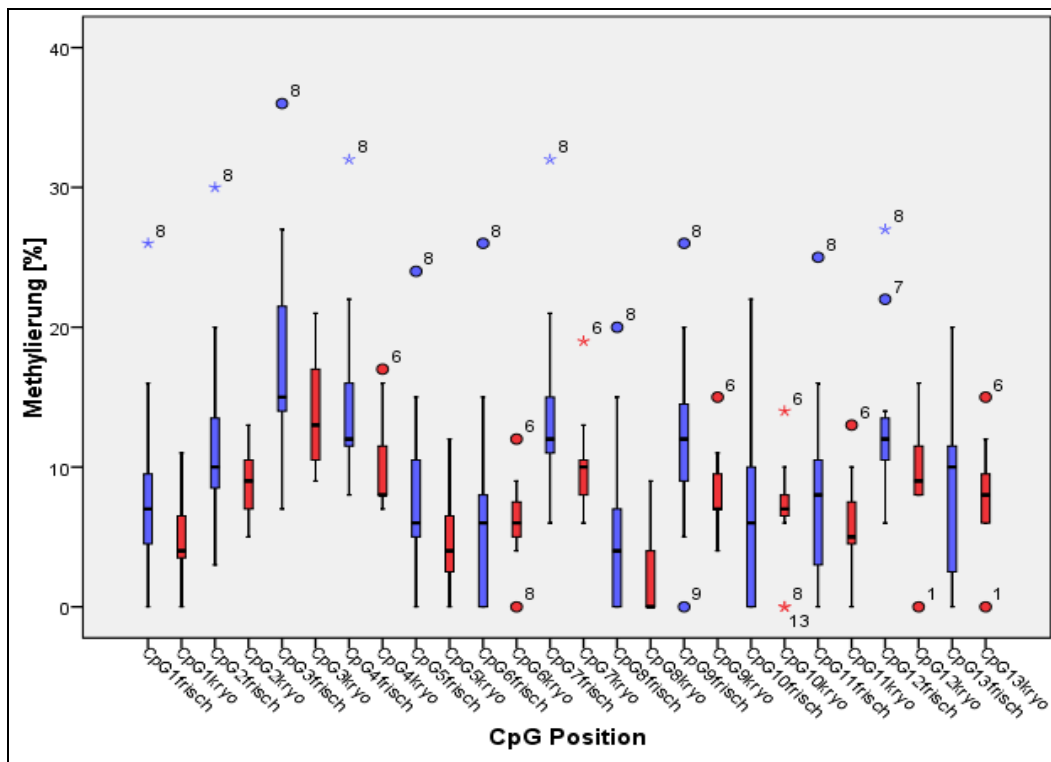


Abbildung 19: Quantifizierung der DNA-Methylierung der DMR von *Plagl1* in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Die Analyse der DNA-Methylierung für die DMR des maternal geprägten Gens *Plagl1* zeigte wie erwartet eine Hypomethylierung in Spermatozoen (Abbildung 19). In den meisten der analysierten CpG-Positionen war ein Rückgang der Methylierung in den kryokonservierten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Für die Methylierung von Männchen Nr. 8 ergaben sich wieder teils sehr drastische Abweichungen vom Median aller Proben. Auch die DMR von *Plagl1* spiegelt die Tatsache wider, dass die Methylierung der Gameten dieses Männchens im frisch präparierten Zustand deutlich abweichende Werte vom Median aller Proben aufweisen. Diese Unterschiede waren jedoch, wie bei den anderen Genen auch, in Proben aus kryokonservierten Spermien nicht mehr erkennbar.

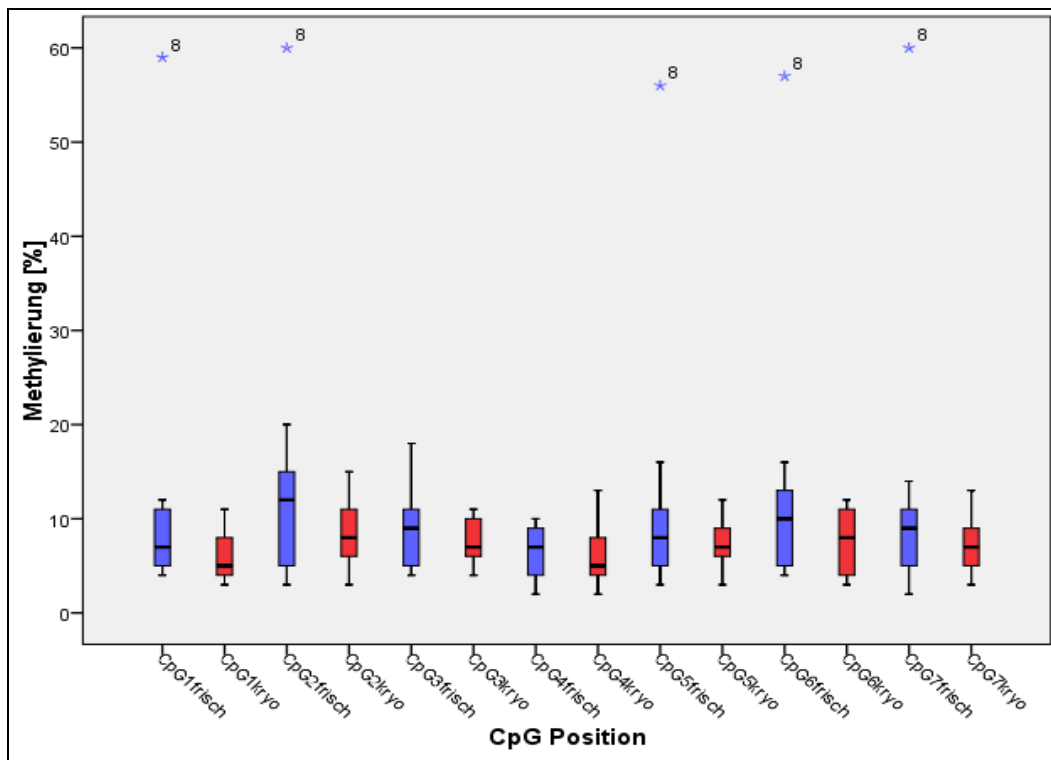


Abbildung 20: Quantifizierung der DNA-Methylierung der DMR von *Snrpn* in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Die Quantifizierung der DMR-Methylierung des maternal geprägten Gens *Snrpn* ergab die erwartete Hypomethylierung dieser Region in männlichen Gameten (Abbildung 20). Prinzipiell ist auch hier der Trend erkennbar, dass die DNA-Methylierung in den Proben aus kryokonservierten Spermatozoen geringer ausgeprägt ist im Vergleich zu den CpGs der Kontrollproben. Bis auf CpG3 (+9%) und CpG4 (+3%) zeigten alle CpGs des *Snrpn*-Assays ungewöhnlich hohe Methylierungswerte in den frischen Spermatozoen-Proben von Männchen 8 (Differenz zwischen Maximum und Median aller Proben). Diese Abweichungen reichen von +52% (CpG1frisch) bis zu +47% (CpG6frisch) im Vergleich zum Median aller Messwerte.

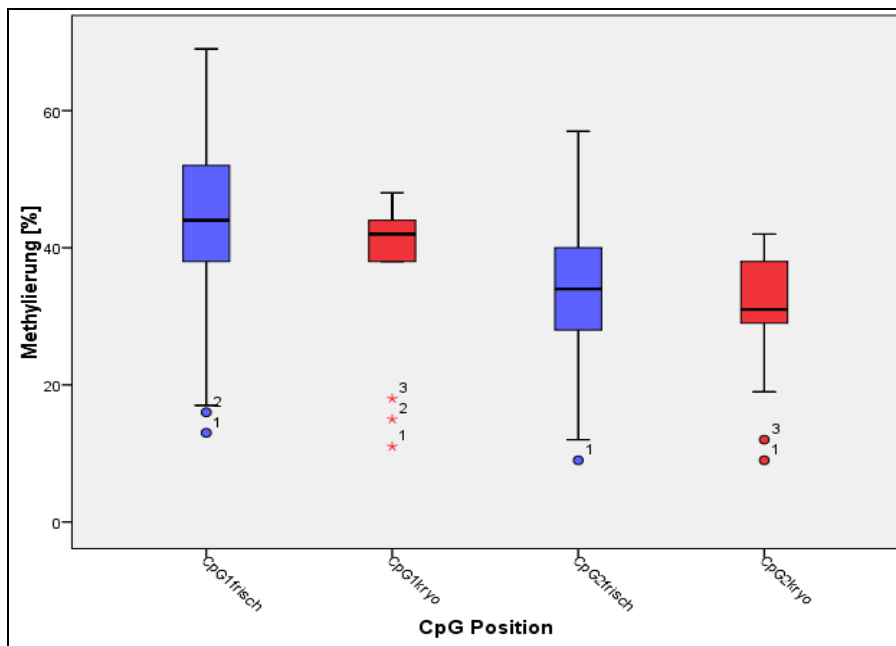


Abbildung 21: Quantifizierung der DNA-Methylierung des proximalen Promoters von *Oct4* in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Die DNA-Methylierungswerte für den proximalen Promoter des Pluripotenzmarkers *Oct4* lagen um die 40% (Abbildung 21). Interessanterweise zeigten die C57BL6/J-Männchen (1-3) im Vergleich zu den CAST/Ei-Männchen (4-13) deutlich niedrigere Werte von um die 20%, die auch mit den Literaturdaten zum C57BL6/J-Stamm konform gehen (YAMAZAKI *et al.* 2006). Für CAST/Ei und C57BL6/J wurden somit stamm-spezifische Unterschiede der DNA-Methylierung von *Oct4* verzeichnet.

Mit über 30.000 Kopien stellt das B1-Element das häufigste repetitive Element im Mausgenom dar und diente in der vorliegenden Arbeit als Schätzmaß für die globale Methylierung (JEONG und LEE 2005). Die Methylierungsanalyse des B1-Elements ergab keine Unterschiede zwischen den Kontrollproben und Proben aus kryokonservierten Spermatozoen (Abbildung 22).

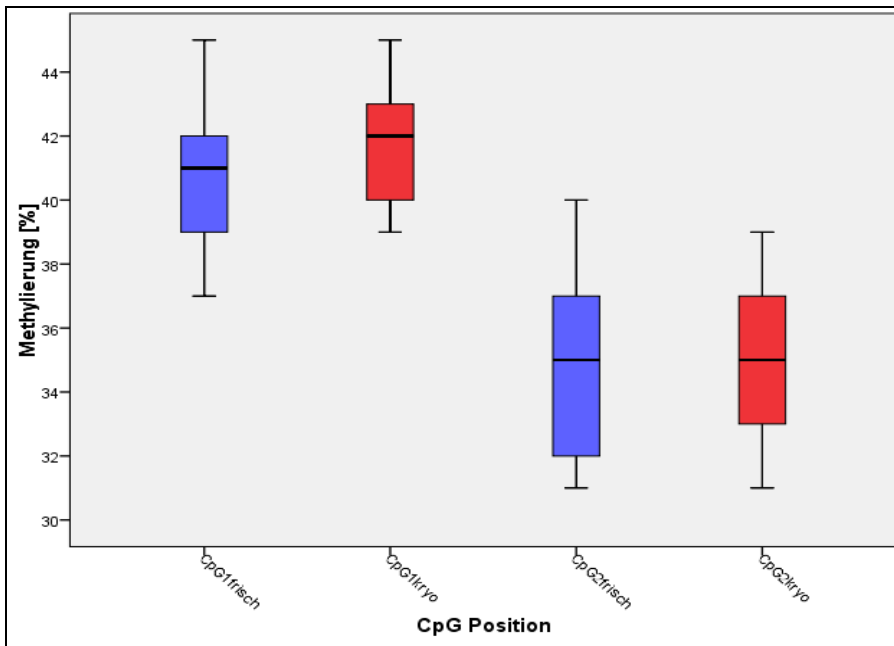


Abbildung 22: Quantifizierung der DNA-Methylierung des B1-Elements in Spermienproben von 13 Männchen. Auf der Abszisse dargestellt sind die jeweiligen CpG-Positionen mit den Methylierungswerten im frischen Zustand (blau) sowie nach Kryokonservierung (rot).

Die auffälligen Ergebnisse zur DNA-Methylierung in den Kontrollproben von Männchen 8 werden im Folgenden nochmals als Diagramm mit verbundenen Datenpunkten verdeutlicht.

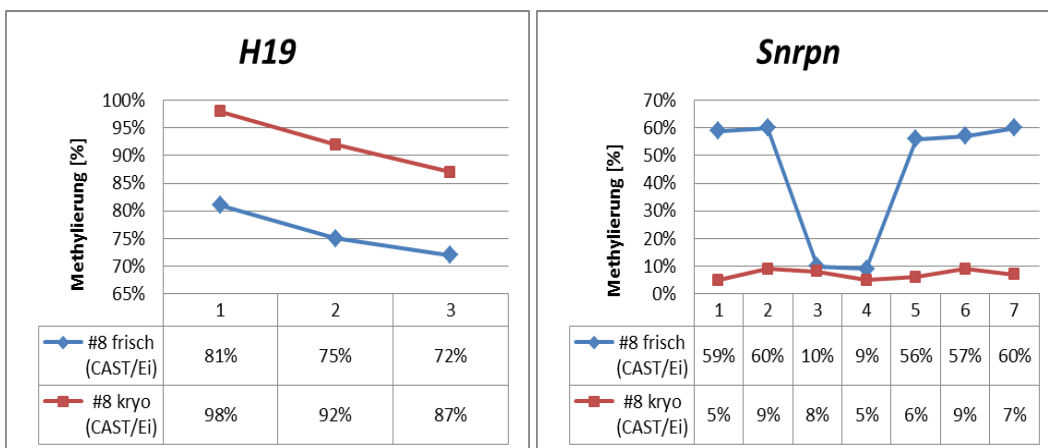


Abbildung 23: Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von H19 und Snrpn. In Blau sind die Werte der Kontrollproben und in Rot die der kryokonservierten Spermatozoen dargestellt.

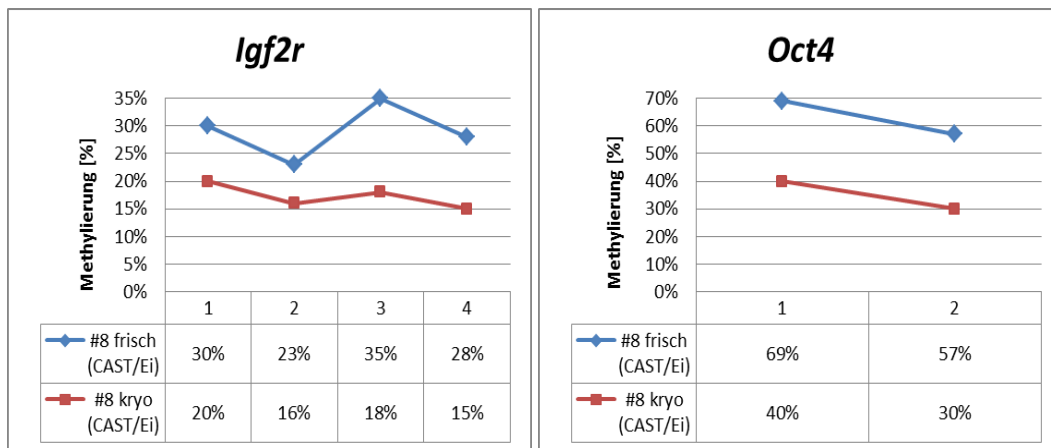


Abbildung 24: Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von *Igf2r* und *Oct4*. In Blau sind die Werte der Kontrollproben und in Rot die der kryokonservierten Spermatozoen dargestellt.

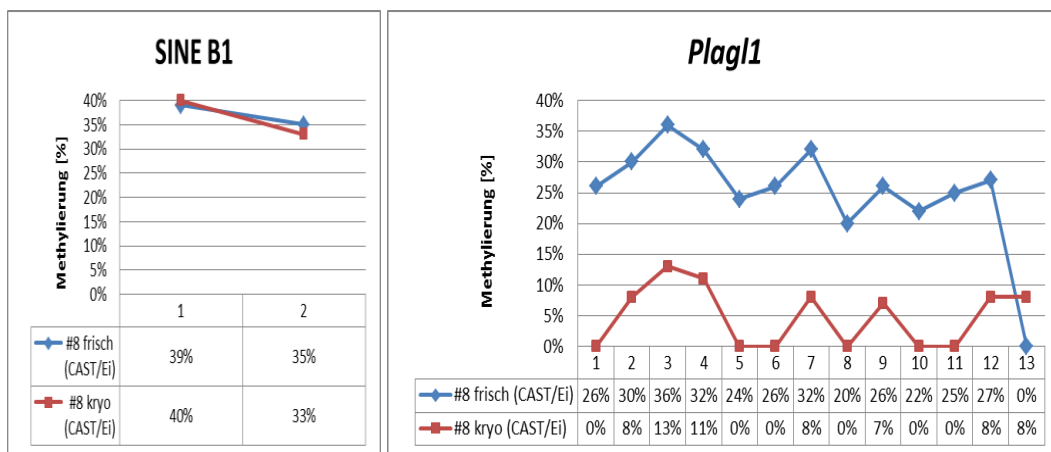


Abbildung 25: Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von B1-Element und *Plag1*.

In Blau sind die Werte der Kontrollproben und in Rot die der kryokonservierten Spermatozoen dargestellt.

3.5.3 Effekte der Kryokonservierung von Spermatozoen auf die F1-Generation

Um den Einfluss der Kryokonservierung auf den epigenetischen Status ausgewählter geprägter Gene in den Nachkommen zu untersuchen, wurden mittels IVF erzeugte Zweizellembryonen analysiert. Von 5 Männchen konnten nach der IVF Zweizeller in ausreichender Menge sowohl mit frischem als auch kryokonservierten Spermatozoen erhalten werden. Nachfolgend wird eine Unterteilung in Epimutationen und Mutatio-

nen, die stochastisch einzelne CpGs betreffen, vorgenommen. Epimutationen drücken den Umstand aus, dass ein nahezu komplettes Allel von der Fehlprägung betroffen ist (>75% fehlgeprägte CpGs eines Allels). In den nachfolgenden Statistiken zu den einzelnen Männchen wird zwischen diesen beiden Typen unterschieden. Sofern eine Epimutation festgestellt wurde, gehen diese fehlgeprägten CpG-Dinukleotide nicht in die stochastischen Mutationen ein. Umgekehrt führen einzeln fehlgeprägte CpGs eines Allels nicht zur Aufnahme in die Epimutationsstatistik.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 6. Angegeben sind die Anzahl an IVF-Embryonen, die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele nach der Bisulfitbehandlung und der Anteil von Epimutationen bzw. stochastischen Mutationen jeweils nach Status der Spermatozoen und dem betrachteten Locus unterteilt (mat.: maternal; pat.: paternal). Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Bock #	Kontrolle/Kryo-konservierung			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR	<i>Igf2r (Air)</i>
#6	Kontrolle	Zahl analysierter Embryonen		1 (E1)	1 (E1)	1 (E1)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	1 (50%) 1 (50%)	2 (100%) 0 (0%)	2 (100%) 0 (0%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	0/1 (0%) 0/1 (0%)	0/2 (0%) /	0/2 (0%) /
		stochastische Mutationen	mat. pat.	0/1 (0%) 0/1 (0%)	2/4 (50%) /	0/4 (0%) /
	Kryo-konservierung	Zahl analysierter Embryonen		3 (E2;3;4)	3 (E2;3;4)	3 (E2;3;4)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	1,7 (85%) 0,3 (15%)	2 (74%) 0,7 (26%)	3,3 (92%) 0,3 (8%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	0/5 (0%) 0/1 (0%)	0/6 (0%) 0/2 (0%)	0/10 (0%) 0/1 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	2/5 (40%) 0/1 (0%)	2/12 (17%) 0/4 (0%)	1/20 (5%) 0/2 (0%)

Die IVF mit frischen Spermatozoen von Männchen Nr. 6 führte lediglich zu einem analysierbaren Zweizellembryo (Tabelle 13). Dennoch konnten für alle 3 Assays PCR-Produkte gewonnen werden, die vorwiegend mütterlichen Ursprungs waren.

Die IVF mit kryokonservierten Spermien von Männchen Nr. 6 resultierte in drei Embryonen, die nach der digitalen PCR zu Amplifikationsprodukten in allen Assays führte. Analog zur IVF mit frischem Sperma konnte der Großteil der PCR-Produkte auf mütterliche Allele zurückgeführt werden.

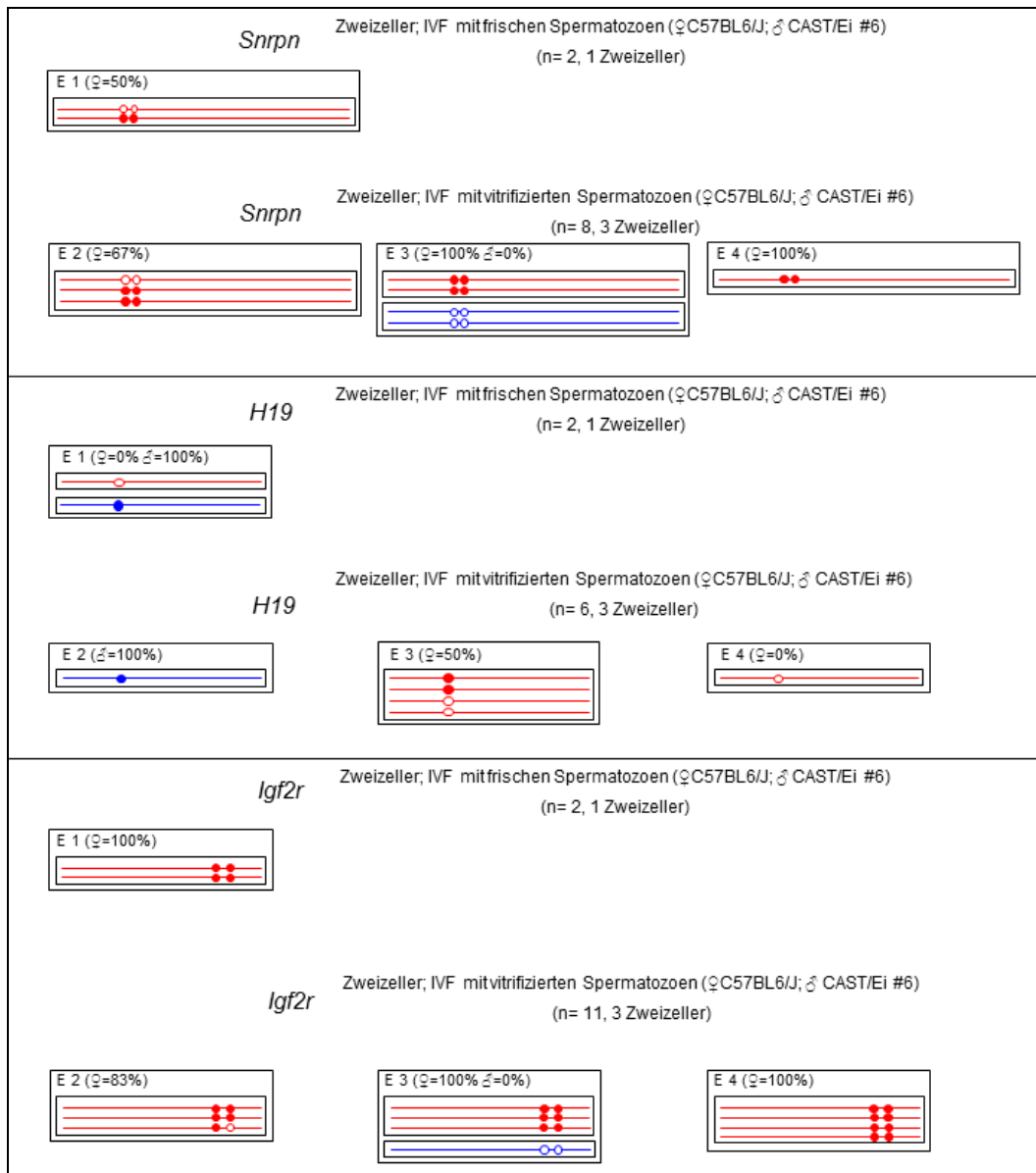


Abbildung 26: Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 6. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in 2-Zellern aus einer IVF mit frischen oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens. Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

Tabelle 14: Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 9. Angegeben sind die Anzahl an IVF-Embryonen, die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele nach der Bisulfitbehandlung und der Anteil von Epimutationen bzw. stochastischen Mutationen jeweils nach Status der Gameten und dem betrachteten Locus unterteilt (mat.: maternal; pat.: paternal). Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Bock #	Kontrolle/Kryokonservierung			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR	<i>Igf2r (Air)</i>
#9	Kontrolle	Zahl analysierter Embryonen		4 (E2;3;7;10)	4 (E2;7;9;10)	4 (E2;3;7;10)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	2 (80%) 0,5 (20%)	1,8 (78%) 0,5 (22%)	1 (56%) 0,8 (44%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	1/8 (13%) 0/2 (0%)	4/7 (60%) 1/2 (50%)	0/4 (0%) 0/3 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	2/10 (20%) 0/2 (0%)	2/63 (3%) 0/18 (0%)	1/20 (5%) 1/14 (7%)
	Kryokonservierung	Zahl analysierter Embryonen		3 (E5; 9; 10)	3 (E2;4;9)	1 (E1)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	1,3 (81%) 0,3 (19%)	1 (77%) 0,3 (23%)	1 (100%) 0 (0%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	1/4 (25%) 0/1 (0%)	1/3 (33%) 0/1 (0%)	1/1 (100%) 0/0 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	0/16 (0%) 0/1 (0%)	0/20 (0%) 0/9 (0%)	0/6 (0%) 0/0 (0%)

Die digitale PCR mit den Embryonen von Männchen Nr. 9 ergab für die IVF mit frischen Spermatozoen 4 analysierbare Zweizeller. Die Zahl der zurückgewonnenen Allele korreliert in den meisten Fällen negativ mit der Größe der Amplikons, d.h. von kleineren PCR-Produkten (*H19*: 167bp; *Snrpn*: 264bp; *Igf2r*: 384bp) konnten im Durchschnitt mehr Produkte detektiert werden. Hinsichtlich der parentalen Herkunft tendiert das Verhältnis wieder maßgeblich Richtung maternaler Allele.

Aus der IVF mit kryokonservierten Spermatozoen konnten für die Assays von *H19* und *Snrpn* jeweils 3 Zweizeller und für *Igf2r* ein Zweizeller analysiert werden. Das Verhältnis von maternalem zu paternalem Allelursprung war wieder zugunsten mütterlicher Kopien verschoben.

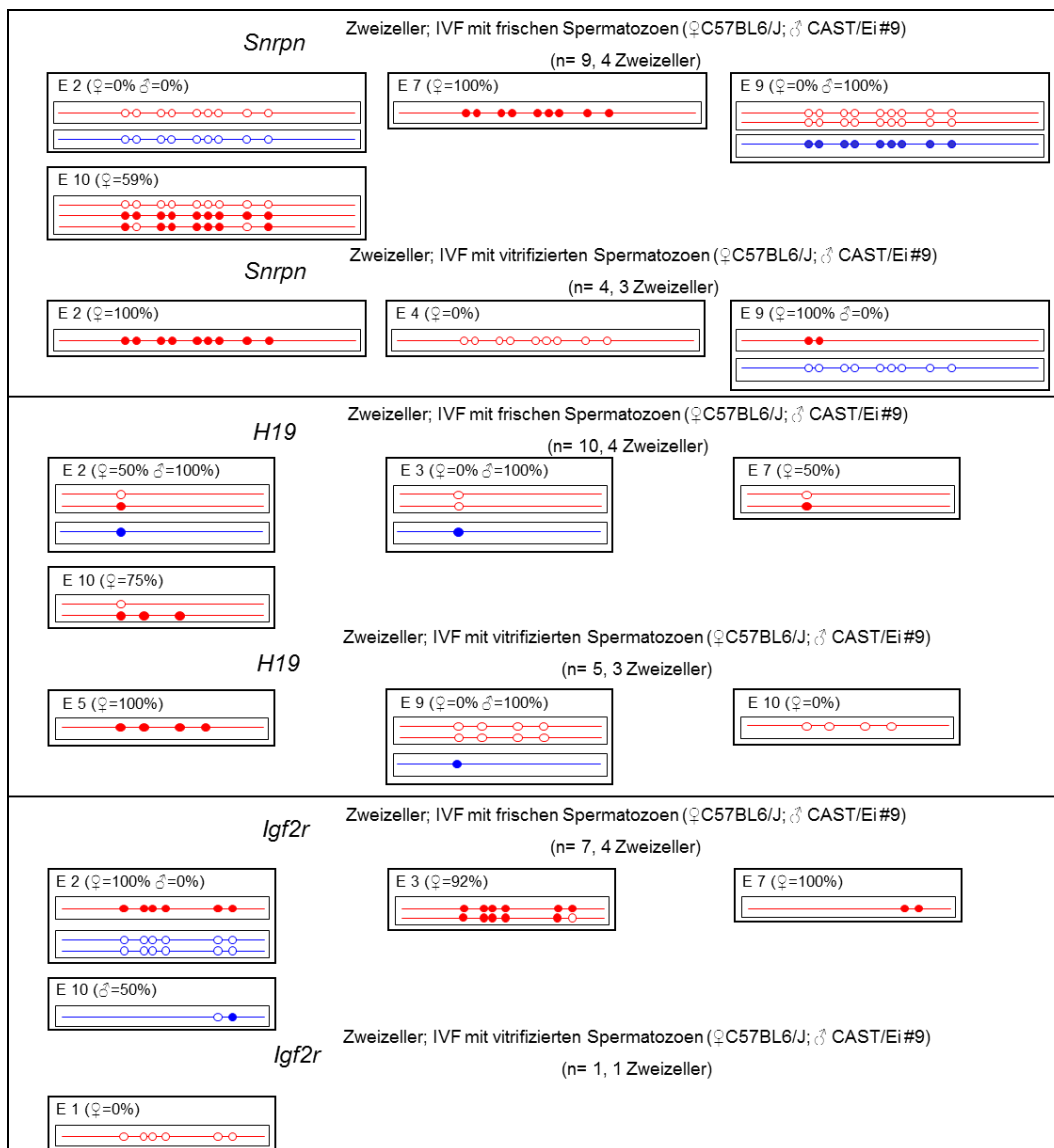


Abbildung 27: Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 9. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in 2-Zellern aus einer IVF mit frischen oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens. Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

Tabelle 15: Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 11. Angegeben sind die Anzahl an IVF-Embryonen, die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele nach der Bisulfitbehandlung und der Anteil von Epimutationen bzw. stochastischen Mutationen jeweils nach Status der Gameten und dem betrachteten Locus unterteilt (mat.: maternal; pat.: paternal). Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Bock #	Kontrolle/Kryokonservierung			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR	<i>Igf2r</i> (<i>Air</i>)
#11	Kontrolle	Zahl analysierter Embryonen		3 (E2;8;9)	9 (E3;4;5;6;7;8;10;11;12)	7 (E3;5;6;7;8;10;12)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	2,3 (88%) 0,3 (12%)	2 (59%) 1,4 (41%)	1 (53%) 0,9 (47%)
		Epimutationen	mat. pat.	1/7 (14%) 0/1 (0%)	2/18 (11%) 1/13 (8%)	0/7 (0%) 0/6 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	0/28 (0%) 0/1 (0%)	0/148 (0%) 0/117 (0%)	5/34 (15%) 0/24 (0%)
	Kryokonservierung	Zahl analysierter Embryonen		4 (E1;2;4;5)	3 (E1;2;4)	0
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	1,3 (72%) 0,5 (28%)	1 (59%) 0,7 (41%)	0 (0%) 0 (0%)
		Epimutationen	mat. pat.	2/5 (40%) 0/2 (0%)	0/3 (0%) 0/2 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	3/10 (30%) 0/5 (0%)	1/13 (8%) 0/18 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)

Die digitale Bisulfitsequenzierung der IVF Embryonen von Männchen Nr. 11 ergab in der Kontrollgruppe abhängig vom betrachteten Assay zwischen 3 und 9 analysierbare Zweizellembryonen und damit höhere Ausbeuten verglichen mit der Kryokonservierungsgruppe (Tabelle 15). Sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der Gruppe der durch IVF mit kryokonservierten Gameten erzeugten Embryonen, konnten tendenziell mehr maternale Allele zurückgewonnen und analysiert werden. In der Kryokonservierungsgruppe konnten nach der digitalen PCR von vier Embryonen Amplifikationsprodukte für *H19*, von drei Embryonen PCR-Produkte für *Snrpn* und kein Produkt für den *Igf2r*-Assay detektiert werden.

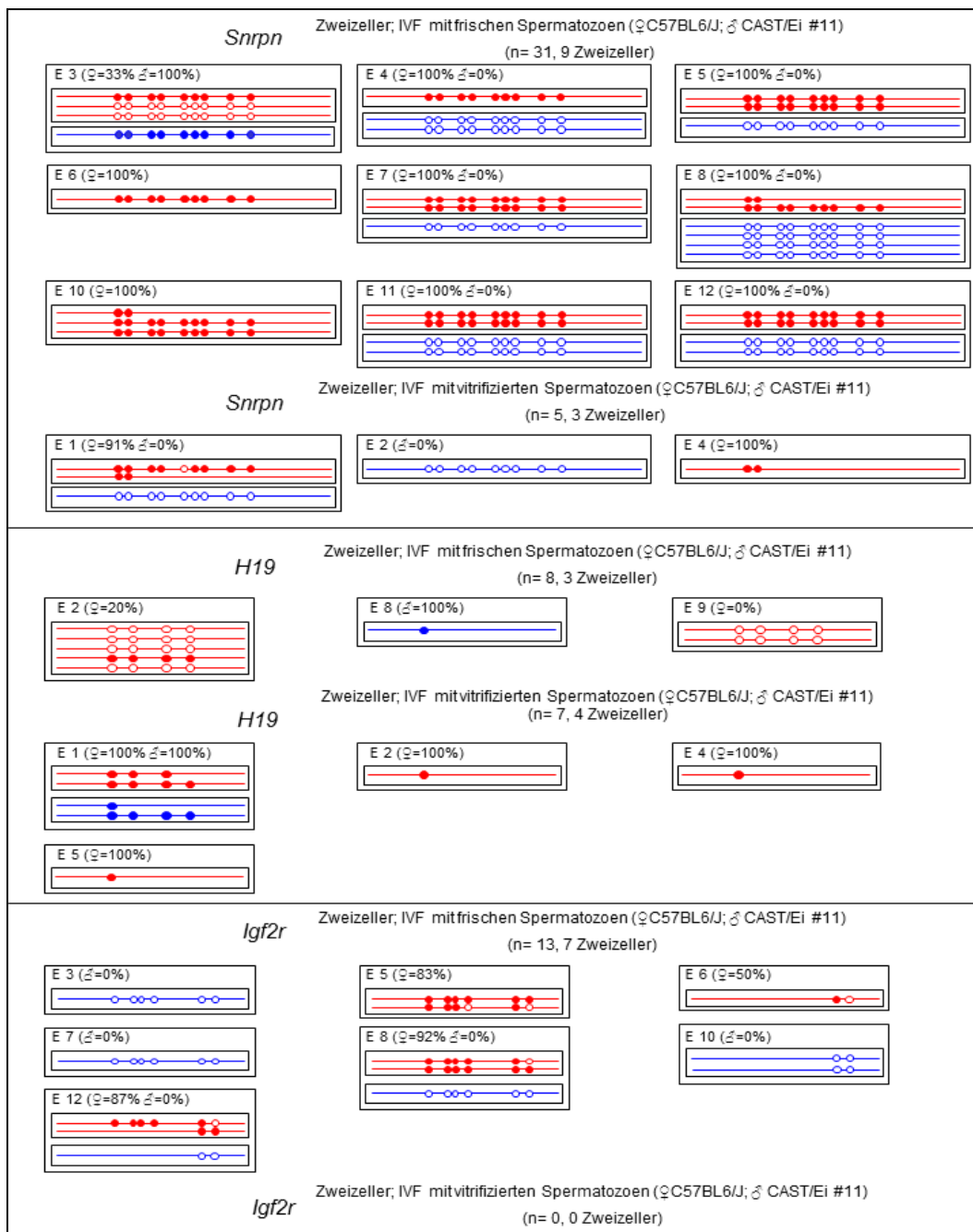


Abbildung 28: Ergebnisse der digitalen Bisulfitypyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 11. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in 2-Zellern aus einer IVF mit frischen oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens. Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

Tabelle 16: Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 13. Angegeben sind die Anzahl an IVF-Embryonen, die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele nach der Bisulfitbehandlung und der Anteil von Epimutationen bzw. stochastischen Mutationen jeweils nach Status der Gameten und dem betrachteten Locus unterteilt (mat.: maternal; pat.: paternal). Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Bock #	Kontrolle/Kryokonservierung			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR	<i>Igf2r (Air)</i>
#13	Kontrolle	Zahl analysierter Embryonen		1 (E5)	1 (E5)	0
		Zahl zurückgewonnener Allele ∅	mat. pat.	3 (75%) 1 (25%)	1 (25%) 3 (75%)	0 (0%) 0 (0%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	2/3 (67%) 0/1 (0%)	0/1 (0%) 0/3 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	1/9 (11%) 0/4 (0%)	0/2 (0%) 1/13 (8%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)
	Kryokonservierung	Zahl analysierter Embryonen		5 (E2;3;4;5;6)	5 (E1;2;3;4;6)	0
		Zahl zurückgewonnener Allele ∅	mat. pat.	0,8 (21%) 3 (79%)	2,4 (44%) 3 (56%)	0 (0%) 0 (0%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	1/4 (25%) 0/12 (0%)	0/12 (0%) 0/15 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	1/7 (14%) 0/24 (0%)	8/24 (33%) 0/30 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse zu beiden Gruppen bezogen auf Männchen Nr. 13 zusammengefasst. Lediglich ein Zweizellembryo war hinsichtlich der *H19*-ICR und der DMR von *Snrpn* analysierbar. Für *H19* konnten hauptsächlich maternale Allele zurückgewonnen werden, während für *Snrpn* das Verhältnis Richtung paternalen Kopien tendierte.

In der Gruppe der durch kryokonservierte Gameten von Männchen Nr. 13 erzeugten IVF-Embryonen konnten für *H19* und *Snrpn* jeweils 5 Zweizeller untersucht werden. Die Rückgewinnungsquote elterlicher Allele ist zugunsten der väterlichen Kopien verschoben. Analog zur Kontrollgruppe konnte auch hier kein Produkt für den *Igf2r*-Assay nach der digitalen PCR detektiert werden.

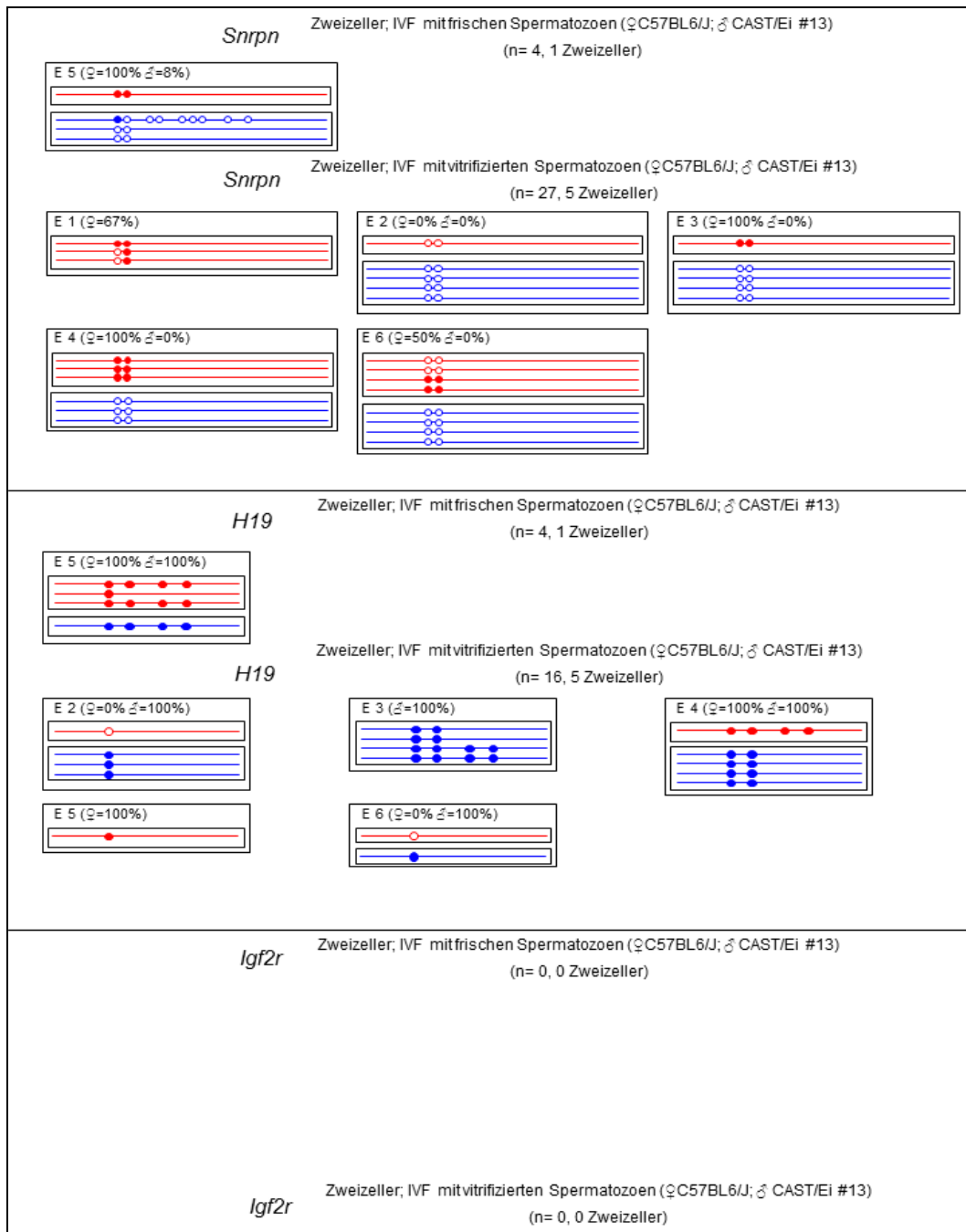


Abbildung 29: Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 13. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in 2-Zellern aus einer IVF mit frischen oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens. Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal).

Tabelle 17: Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 14. Angegeben sind die Anzahl an IVF-Embryonen, die durchschnittliche Zahl zurückgewonnener Allele nach der Bisulfitbehandlung und der Anteil von Epimutationen bzw. stochastischen Mutationen jeweils nach Status der Gameten und dem betrachteten Locus unterteilt (mat.: maternal; pat.: paternal). Bei der Zahl durchschnittlich zurückgewonnener Allele ist in Klammern das Verhältnis zwischen paternalen und maternalen Allelen angegeben.

Bock #	Kontrolle/Kryokonservierung			<i>H19-Igf2</i> ICR	<i>Snrpn</i> DMR	<i>Igf2r (Air)</i>
#14	Kontrolle	Zahl analysierter Embryonen		3 (E1;2;5)	0	3 (E1;2;5)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	1,7 (63%) 1 (37%)	0 (0%) 0 (0%)	2,3 (50%) 2,3 (50%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	0/5 (0%) 0/3 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)	2/7 (29%) 0/7 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	3/5 (60%) 0/3 (0%)	0/0 (0%) 0/0 (0%)	4/38 (11%) 1/38 (3%)
	Kryokonservierung	Zahl analysierter Embryonen		2 (E2;4)	2 (E2;4)	2 (E2;4)
		Zahl zurückgewonnener Allele Ø	mat. pat.	3 (75%) 1 (25%)	2,5 (56%) 2 (44%)	1,5 (60%) 1 (40%)
		Epi-mutationen	mat. pat.	0/6 (0%) 0/2 (0%)	0/5 (0%) 0/4 (0%)	2/3 (67%) 0/2 (0%)
		stochastische Mutationen	mat. pat.	1/17 (6%) 0/2 (0%)	1/17 (6%) 2/29 (7%)	0/18 (0%) 1/12 (8%)

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Analyse von Zweizellembryonen nach IVF mit frischem bzw. kryokonservierten Gameten von Männchen Nr. 14 visuell dargestellt. Zusammengefasst werden diese Resultate in Tabelle 17. Für die Kontrollgruppe konnten jeweils 3 Zweizellembryonen hinsichtlich der *H19*-ICR und dem Antisense-Transkript von *Igf2r* analysiert werden. Für den *Snrpn*-Assay konnte in der Kontrollgruppe kein Embryo ausgewertet werden. Das Verhältnis der elterlichen Herkunft der zurückgewonnenen Allele ist nahezu ausgeglichen.

Jeweils 2 Zweizeller pro Assay konnten in der Gruppe der durch kryokonservierte Gameten von Männchen Nr. 14 erzeugten IVF-Embryonen untersucht werden. Bis auf die ICR von *H19* zeigten die Assays ein ausgewogenes Verhältnis der zurückgewonnenen Allele bezogen auf die parentale Herkunft.

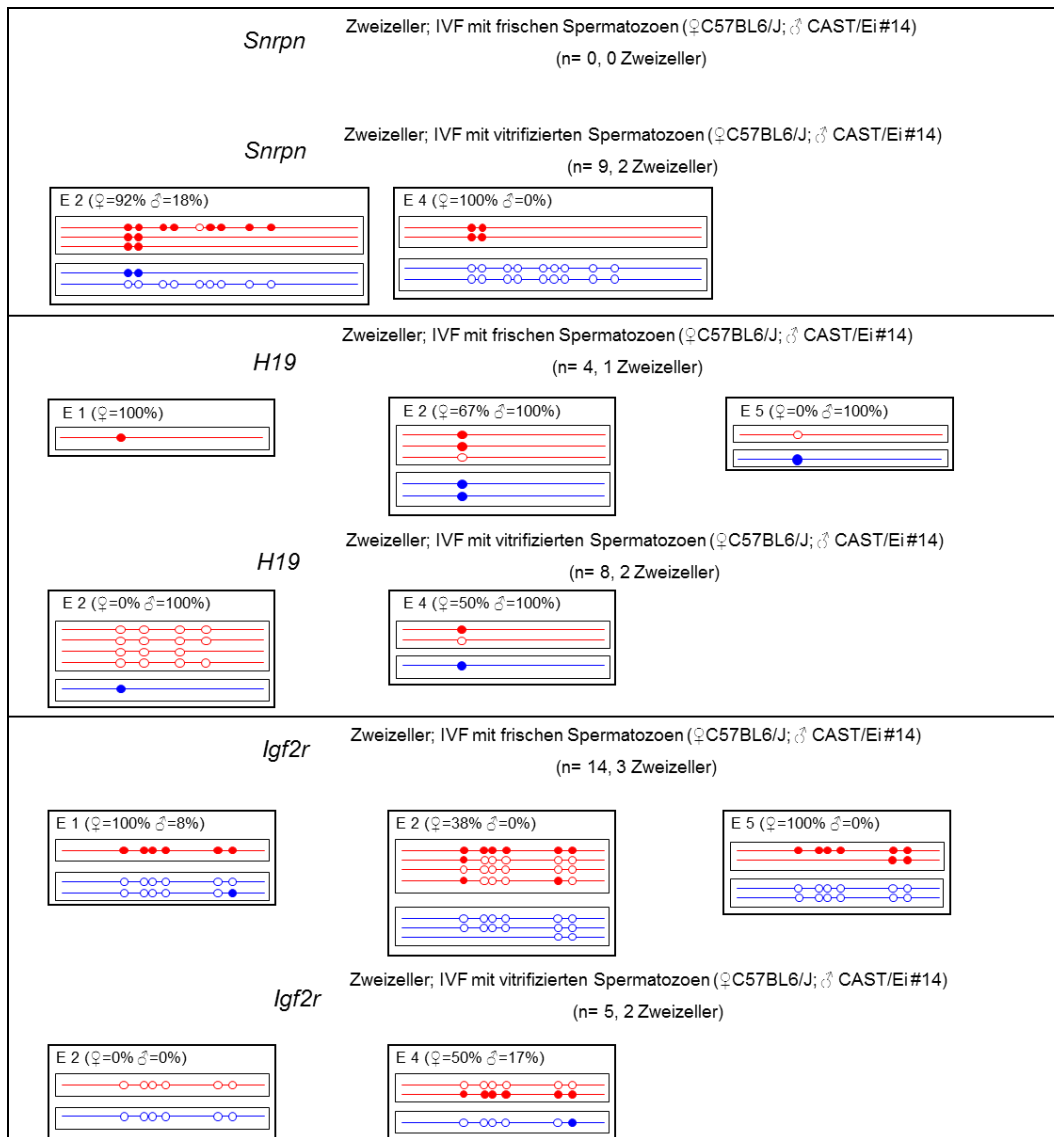


Abbildung 30: Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 14. Dot-Diagramme der jeweiligen CpG Position (leerer Kreis: unmethyliert, gefüllter Kreis: methyliert) in 2-Zellern aus einer IVF mit frischen oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens. Rot dargestellt: maternale Allele, blau: paternale Allele. Die Summe der DNA-Methylierung eines Embryos ist in Prozent angegeben und kategorisiert nach parentaler Herkunft (♀: maternal; ♂: paternal)

In Abbildung 31 sind die Häufigkeiten beider Mutationskategorien aller IVF-Zweizeller nach Zustand (frisch präpariert bzw. kryokonserviert) der Spermatozoen und elterlicher Herkunft des *H19*-Allels grafisch zusammengefasst (Tabelle 13-17). Klassifiziert nach stochastischen Mutationen bzw. Epimutationen ergaben sich nur für das maternale Allel Auffälligkeiten, die sich aber nicht in Gruppenunterschieden äußerten. Für das paternale Allel konnten keine aberranten DNA-Methylierungsmuster festgestellt werden.

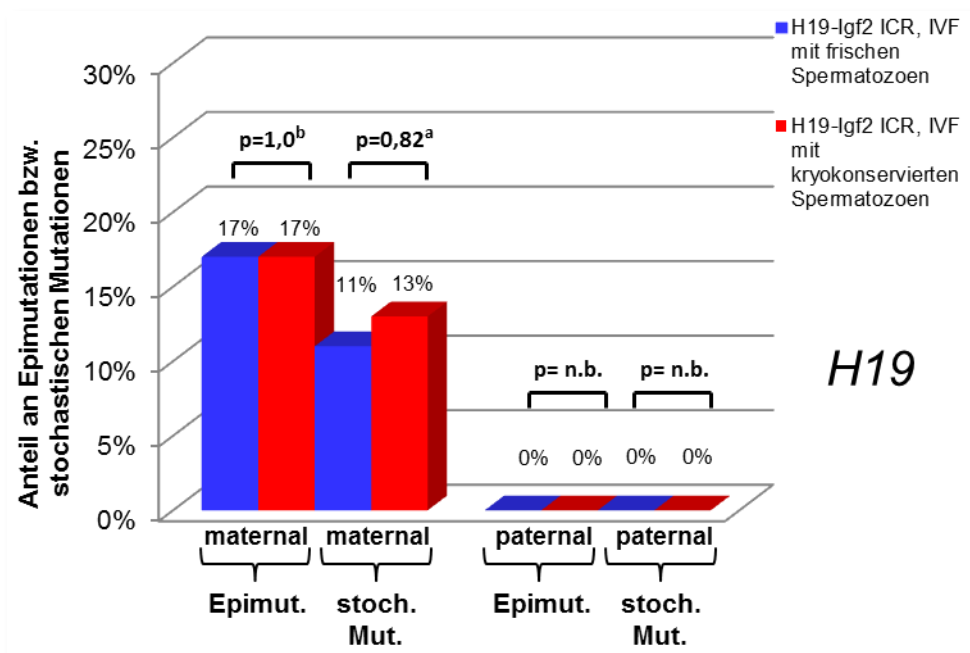


Abbildung 31: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die ICR des *H19-Igf2*-Locus. Angegeben ist der jeweilige Anteil an Epimutationen (Epimut.) bzw. stochastischen Mutationen (stoch. Mut.) von maternalen und paternalen Allelen, kategorisiert nach einer IVF mit frischen bzw. kryokonservierten Spermatozoen (p-Wert nach Chi-Quadrat-Test; ^a Chi-Quadrat-Test nach Pearson, ^b Kontinuitätskorrektur, n.b.: nicht bestimmt).

In Abbildung 32 sind die DNA-Methylierungsdaten der *Snrpn*-DMR aller IVF-Zweizeller grafisch zusammengefasst (Tabelle 13-17). Hinsichtlich des maternalen Allels konnte ein deutlicher Rückgang an Epimutationen bei Kryo-IVF-Embryonen festgestellt werden. Demgegenüber wurde jedoch ein signifikanter Anstieg an stochastischen Mutationen des maternalen Allels bei dieser Embryonengruppe gefunden.

Bezüglich des paternalen *Snrpn*-Allels konnte für Kryo-IVF-Embryonen ebenfalls ein deutlicher Rückgang in der Frequenz von Epimutationen festgestellt werden. Nach stochastischen Mutationen klassifiziert, ergab sich für das paternale *Snrpn*-Allel ein leichter Anstieg in der Kryo-IVF-Embryonengruppe.

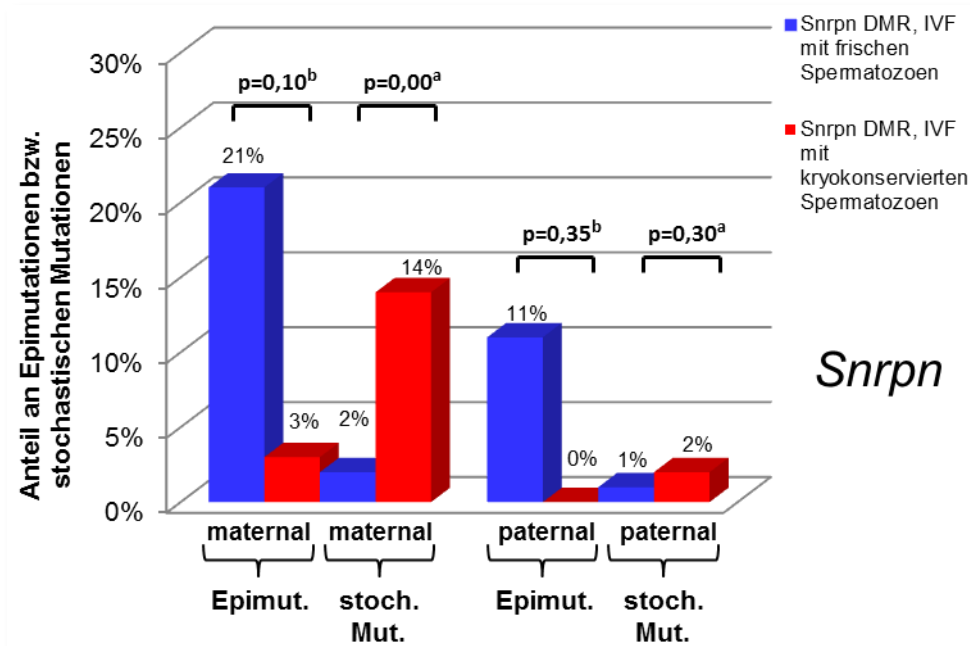


Abbildung 32: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die DMR des *Snrpn*-Locus. Angegeben ist der jeweilige Anteil an Epimutationen (Epimut.) und stochastischen Mutationen (stoch. Mut.) von maternalen und paternalen Allelen, kategorisiert nach einer IVF mit frischen bzw. kryokonservierten Spermatozoen (p-Wert nach Chi-Quadrat-Test; ^a Chi-Quadrat-Test nach Pearson, ^b Kontinuitätskorrektur).

Analog zum maternalen *Snrpn*-Allel ergaben sich auch für das maternale *Igf2r*-Allel abhängig von der Mutationskategorie widersprüchliche DNA-Methylierungsdaten (Abbildung 33). Nach Epimutationen klassifiziert konnten für Kryo-IVF-Embryonen deutlich mehr Aberrationen für das mütterliche Allel festgestellt werden. Demgegenüber sank die Zahl stochastischer Mutationen sehr deutlich für die Gruppe der Kryo-IVF-Embryonen.

Für das paternale Allel konnten hingegen nur stochastische Mutationen ermittelt werden, die in der Kryo-IVF-Embryonengruppe häufiger vorkamen.

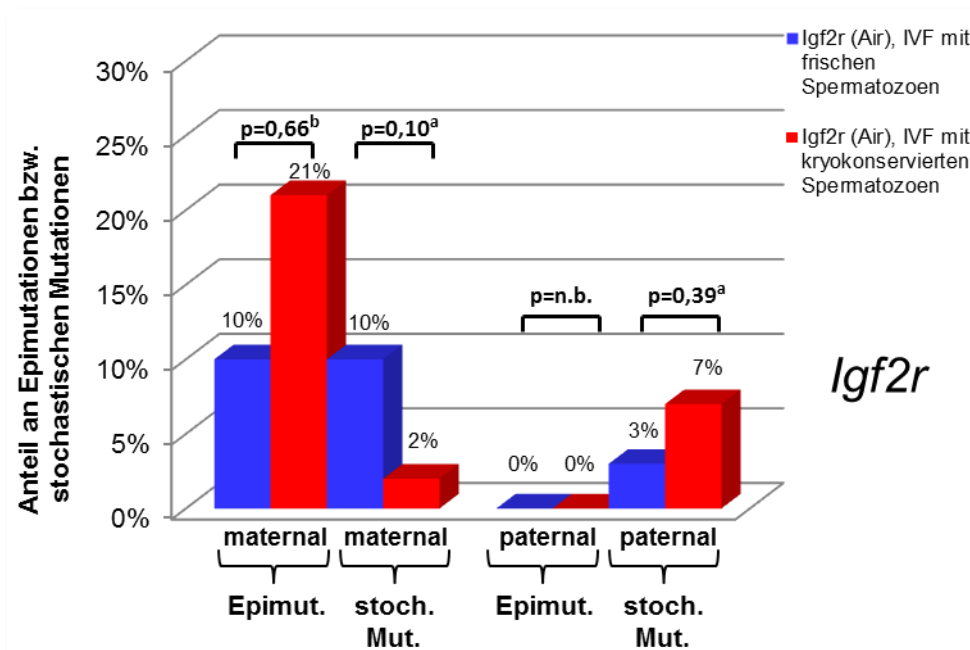


Abbildung 33: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die DMR des *Igf2r*-Locus (*Air*). Angegeben ist der jeweilige Anteil an Epimutationen (Epimut.) und stochastischen Mutationen (stoch. Mut.) von maternalen und paternalen Allelen, kategorisiert nach einer IVF mit frischen bzw. kryokonservierten Spermatozoen (p-Wert nach Chi-Quadrat-Test; ^a Chi-Quadrat-Test nach Pearson, ^b Kontinuitätskorrektur, n.b.: nicht bestimmt).

4 Diskussion

4.1 Einfluss der ovariellen Stimulation auf die Expression potentieller epigenetischer Reprogrammierungsfaktoren

Die ovarielle Stimulation ist gängige Praxis im Rahmen von assistierten Reproduktionstechniken und wird verwendet, um eine hohe Zahl von Ovarialfollikel für die anschließenden reproduktionsmedizinischen Therapien zu erhalten. Auch in der Versuchs- und Nutztierhaltung wird der Prozess der Superovulation benutzt, um höhere Ausbeuten an Eizellen von einer geringen Anzahl an Weibchen zu erreichen.

4.1.1 Expressionsanalysen in Präimplantationsembryonen: technische Aspekte

Bei der absoluten Quantifizierung von mRNA wird die Transkriptmenge anhand eines Vergleichs mit einer vorher erstellten Standardreihe ermittelt. Kloniertes RT-PCR-Produkt (recDNA) als Grundlage einer Standardreihe wurde 1998 erstmals von GERARD *et al.* vorgeschlagen und bietet mehrere Vorteile. Selbst nach langer Lagerungsdauer ist es mit diesem Verfahren möglich, Standardkurven unter hoher Reproduzierbarkeit zu erstellen. Zudem ist recDNA relativ unempfindlich gegenüber der Proofreading-Aktivität der DNA-Polymerase. Im Gegensatz zum reinen RT-PCR-Produkt oder synthetisierten Oligonukleotiden als Standard simuliert recDNA relativ gut die native Länge von mRNA (≈ 2 kb) in der Reversen Transkription (PFAFFL 2004). Die Messungen verlaufen über einen großen dynamischen Bereich linear ($10^0 - 10^5$ Kopien) und erlauben anhand zusätzlich erhobener Parameter eine Berechnung der Amplifikationseffizienz (HIGUCHI *et al.* 1993; RASMUSSEN 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden abhängig vom Assay Amplifikationseffizienzen zwischen 90 und 110% gemessen. Werte in diesem Bereich sind generell als akzeptabel einzustufen, solange der Korrelationskoeffizient $\geq 0,99$ ist und damit die Linearität der Messpunkte in einem validen Bereich liegt. Ist der Wert der Steigung (slope)

einer Standardreihe größer als -3,322; wird das PCR-Produkt pro Zyklus mehr als verdoppelt. Liegt die kalkulierte PCR-Effizienz über 100%, kann dies mehrere Gründe haben. Beispielsweise kann der Eintritt sowohl der Reversen Transkription als auch der PCR in einen gesättigten Bereich dazu führen, dass Ct-Wert-Unterschiede zwischen Proben mit hohem Verdünnungsfaktor in einer Standardreihe weniger deutlich ausfallen. Dies wiederum führt zu einer Änderung der Steigung in diesem Bereich und letztendlich zu einer überschätzten PCR-Effizienz, die artifiziell bedingt ist (PFAFFL 2004). Außerdem wurden verschiedene Eigenschaften der Reversen Transkriptase beschrieben, die zu einer Beeinträchtigung der Reaktionskinetik einer RT-qPCR beitragen können. Am gravierendsten wirken sich RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase-Eigenschaften der Reversen Transkriptase aus (MIZUTANI *et al.* 1970; SPIEGELMAN *et al.* 1970a; SPIEGELMAN *et al.* 1970b; GAO *et al.* 1997; FISHER *et al.* 2003). Diese unerwünschten Aktivitäten können selbst noch nach der Hitzeinaktivierung in der RT-Reaktion bzw. dem HotStart-Aktivierungsschritt in der PCR nachgewiesen werden. Dazu kommen Strangtransfer bzw. -verdrängungsvermögen (FUENTES *et al.* 1996; KULPA *et al.* 1997; NYCZ *et al.* 1998) und eine TdT-Transferase-Aktivität (CHEN und PATTON 2001; POTTER *et al.* 2003), die zu einer verstärkten Bildung von Primer-Dimeren führen kann (CHUMAKOV 1994). Zudem wurde speziell bei limitierenden mRNA-Mengen ($< 10^5$ - 10^6 Kopien) beobachtet, dass die Interaktion der Reversen Transkriptase mit dem RNA/DNA-Template eine der Hauptbarrieren für eine hohe Amplifikationseffizienz in den ersten Zyklen der PCR darstellt. Eine Hitzeinaktivierung bedeutet auch hier, dass nicht zwingend 100% der eingesetzten Reversen Transkriptasen denaturiert werden und damit die Bindestelle für die Taq-Polymerase freigeben (CHANDLER *et al.* 1998).

Obwohl die Technik der RT-qPCR bis heute als Goldstandard für die Genexpressionsmessung gilt, sind ihr neu entwickelte Technologien wie Microarrays oder Next Generation Sequencing (NGS) in vielen Aspekten überlegen. Die Microarraytechnologie wurde vor etwa 25 Jahren entwickelt (BAINS und SMITH 1988; DRAMANAC *et al.* 1989; FODOR *et al.* 1991) und technisch relativ schnell an Analysen zur Genexpression angepasst (SCHENA *et al.* 1995; DERISI *et al.* 1996). Gegenüber der klassischen

RT-qPCR bieten Microarrays die Möglichkeit zur Hochdurchsatzanalyse. Aktuell erhältliche Microarray-Chips bieten die Möglichkeit, den überwiegenden Teil des humanen Transkriptoms zu quantifizieren. Dabei werden sowohl kodierende, als auch nicht kodierende Bereiche (inkl. IncRNAs) und bekannte mRNA-Isoformen abgedeckt (Affymetrix; GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0).

Die Entwicklung von Verfahren zur Hochdurchsatzsequenzierung 2005 (MARGULIES *et al.* 2005) ermöglicht eine Kombination der Vorzüge von Microarrays und RT-qPCR. Mit RNAseq, dem gängigsten Protokoll für NGS-basierte Expressionsprofile, wird hinsichtlich der Sensitivität ein mit der RT-qPCR vergleichbarer dynamischer Bereich erfasst, ein klarer Vorteil gegenüber Microarrays (FU *et al.* 2009; WANG *et al.* 2009; BRADFORD *et al.* 2010). Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit mit RNAseq ein wirklich unverfälschtes Bild des Transkriptoms einer Probe zu erlangen, da theoretisch auch bis dato unbekannte Transkripte und deren Isoformen registriert werden können (WANG *et al.* 2009). Die Möglichkeit, mittels RNAseq allelspezifische Expressionsanalysen durchführen zu können, ist aus epigenetischer Sicht besonders attraktiv (DEVEALE *et al.* 2012). Letztendlich können nun auch genomweite Expressionsstudien durchgeführt werden, die nicht auf Modellorganismen beruhen (CHEUNG *et al.* 2006; HORNETT und WHEAT 2012).

Sowohl für Microarrays als auch RNAseq wurden Arbeitsabläufe entwickelt, um Expressionsprofile von Einzelzellen untersuchen zu können (CHIANG und MELTON 2003; TANG *et al.* 2009). Bislang beruhen die meisten Protokolle aber auf PCR-basierter Amplifikation der cDNA (CHIANG und MELTON 2003; TANG *et al.* 2009) oder *in vitro*-Transkription der RNA (LUO *et al.* 1999) und unterliegen somit systematischen Fehlern ausgehend von der Vervielfältigung des Transkriptoms im Vorfeld der Sequenzierung (HEBENSTREIT 2012).

Bisher sind beide Technologien relativ kostspielig, wenn man die Ausgaben für technische und biologische Replikate einer Analyse einbezieht. Derzeit stellen Microarrays die preisgünstigere Variante der Hochdurchsatzmethoden dar. Angesichts rapide fallender Sequenzierkosten (Preis für 1 humanes Genom 2001: 95 Mio. \$, 2012: ca. 8000 \$; Quelle: NHGRI) und der Entwicklung neuer amplifikationsfreier

Sequenzierplattformen (HOWORKA *et al.* 2001; EID *et al.* 2009), haben NGS-basierte Expressionsanalysen beträchtliches Zukunftspotential.

4.1.2 Ovarielle Stimulation der Muttertiere führt zu differentieller Genexpression von *Apex1*, *Polb* und *Mbd3* in Morulae

In diesem Teilaspekt der Arbeit wurde die Annahme getestet, ob die ovarielle Induktion von Mausweibchen zu Expressionsänderungen potentieller Reprogrammierungsfaktoren der DNA-Methylierung in Präimplantationsembryonen führt. Ein derartiger Effekt, verbunden mit der Herunterregulation der mRNA, konnte zum einen für *Apex1* und *Polb*, zwei Komponenten der Basenexzisionsreparatur (BER), durch absolute Quantifizierung der betreffenden mRNAs mittels RT-qPCR ermittelt werden. Analog dazu konnte auch für *Mbd3*, das für ein Mitglied der 5-Methyl-CpG-Bindedomänepoteine kodiert, eine Herunterregulation der mRNA ermittelt werden.

Die kontinuierliche Expression aller 3 differenziell regulierter Gene ist für die Präimplantationsentwicklung von hoher Relevanz. Entsprechende Maus-Knockoutmodelle enden im homozygoten Zustand embryonal letal (GU *et al.* 1994; XANTHOUDAKIS *et al.* 1996; HENDRICH *et al.* 2001).

Apex1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1) kodiert für ein multifunktionales Enzym, das eine zentrale Rolle im Schutzmechanismus der Zelle gegen oxidativen Stress spielt (SEKI *et al.* 1991a; SEKI *et al.* 1991b). Apurin- und Apyrimidin(AP)-Stellen in der DNA können durch spontane Depurinierung oder durch chemische Prozesse wie Oxidation und Alkylierung entstehen. Die dadurch veränderten Basen der DNA werden von DNA-Glykosylasen erkannt, die im nächsten Schritt die N-Glykosylbindung zwischen Purin bzw. Pyrimidin und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA spalten und die beschädigte Base somit entfernen (LJUNGQUIST *et al.* 1974; LJUNGQUIST und LINDAHL 1974). Es wird geschätzt, dass unter normalen physiologischen Bedingungen jeden Tag pro Zelle etwa 50.000 – 200.000 AP-Stellen entstehen (NAKAMURA *et al.* 1998; NAKAMURA und SWENBERG 1999). AP-Stellen gefährden die Genomintegrität (RAFFOUL *et al.* 2004) durch das Blockieren der Replikation

(SCHAAPER *et al.* 1983), Beeinträchtigungen während der Transkription durch die RNA-Polymerase II (YU *et al.* 2003) oder das Begünstigen von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Doppelstrangbrüchen (WILSTERMANN und OSHEROFF 2001). Als Bestandteil der Basenexzisionsreparatur (BER) hat APEX1 die Funktion, einen Einzelstrangbruch an Glykosylase-prozessierten AP-Stellen einzufügen (FRIEDBERG *et al.* 1994) und ist für mehr als 95% aller modulierten AP-Stellen verantwortlich (DEMPLE und HARRISON 1994).

Sowohl MBD3 (HENDRICH und BIRD 1998) als auch MBD2 sind Kernkomponenten des Mi2/NuRD-Komplexes und auf Aminosäureebene zu über 70% identisch. Während der Knockout von *Mbd3* im Mausmodell embryonal letal endet, sind *Mbd2*-Knockouttiere lebensfähig und zeigen nur marginale Auffälligkeiten, wie z.B. geringere Wurfgröße und niedrigeres Gewicht der Nachkommen ausgelöst durch ein verändertes Fütterungsverhalten der Mutter (HENDRICH *et al.* 2001).

Der Mi2/NuRD-Komplex kann, bezogen auf dessen Proteinuntereinheiten, sehr heterogen sein und je nach Zusammensetzung unterschiedliche Aufgaben erfüllen (DENSLOW und WADE 2007). Charakteristische Proteinfunktionen von Mi2/NuRD Komplexen umfassen u.a. Chromatinremodellierung und den Umbau übergeordneter Chromatinstrukturen, sowie Deacetylase- und Demethylaseaktivität (H4K3me2/1) auf Histonebene (RAMÍREZ und HAGMAN 2009; ZHANG und LI 2011). Zudem weisen aktuelle Veröffentlichungen Mi2/NuRD-Komplexen essentielle Rollen bei der DNA-Reparatur zu (LARSEN *et al.* 2010; MILLER *et al.* 2010; POLO *et al.* 2010; SMEENK *et al.* 2010).

Die 5-Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) von MBD3 weist gegenüber der von MBD2 zwei atypische Aminosäuren auf, die letztendlich die direkte Bindung von MBD3 an mCpG-Positionen verhindern (HENDRICH und BIRD 1998; SAITO und ISHIKAWA 2002). Konsequenterweise konnten YILDIRIM *et al.* (2011) nachweisen, dass der MBD3/NuRD-Komplex an 5hmCpG-Positionen bindet. Zudem findet sich MBD3 häufig kolokalisiert mit TET1 an CpG-reichen Genpromotoren und demzufolge in Regionen, die hochangereichert für 5hmC sind. Im Modell der Autoren wird durch die TET1-vermittelte Oxidation von 5mC der MBD3/NuRD-Komplex rekrutiert und ist

maßgeblich an den beobachteten Effekten, die sich durch Hydroxymethylierung auf die Genexpression ergeben (FICZ *et al.* 2011; PASTOR *et al.* 2011; WILLIAMS *et al.* 2011), beteiligt.

Analog zu den Knockout-Mausmodellen von *Apex1* und *Mbd3* sind auch Mäuse defizient für *Polb* nicht lebensfähig (YAMAGUCHI *et al.* 1987; GU *et al.* 1994; SUGO *et al.* 2000). DNA Polymerase β ist ein Bestandteil des BER-Mechanismus und entfernt in einem 1. katalytischen Schritt das 5'-Phosphat-Ende des durch APEX1 generierten Einzelstrangbruchs (MATSUMOTO und KIM 1995). Durch die Nukleotidyl-Transferaseaktivität der POLB wird anschließend entweder 1 Nukleotid (*short-patch-BER*) oder im Zusammenspiel mit den DNA-Polymerasen δ/ϵ 2-6 Nukleotide (*long-patch-BER*; FROSINA *et al.* 1996; DIANOV *et al.* 1999) komplementär zum unbeschädigten DNA-Strang eingefügt (PELLETIER *et al.* 1994). Zudem konnten POLB kritische Rollen während der Meiose (KIDANE *et al.* 2010) und der Aufrechterhaltung der Genomintegrität in männlichen Keimzellen (KIDANE *et al.* 2011) zugeordnet werden.

Mithilfe absoluter Quantifizierung dieser drei Zieltranskripte im murinen Morulastadium konnte gezeigt werden, dass Embryonen von ovariell stimulierten Muttertieren signifikant weniger mRNA dieser drei Gene exprimieren, als Präimplantationsembryonen aus natürlich ovulierten Weibchen.

Um die biologische Relevanz der differentiellen Genregulation weiter abzuklären, wurden *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Primäres Ziel dieser Arbeiten war der Nachweis der Proteinexpression von APEX1 in späten Morulae bzw. frühen Blastozysten und deren Korrelation mit der beobachteten mRNA-Expression. Die voneinander abweichenden Zeitpunkte der Quantifizierung von mRNA (Morulastadium) und Protein (spätes Morulastadium) wurden gewählt, um der Dynamik und Dauer der Translationsprozesse gerecht zu werden. Setzt man voraus, dass posttranskriptionelle Vorgänge keinen gravierenden Einfluss auf die Menge der Transkripte ausüben und dementsprechend das Level an zytoplasmatischer mRNA überwiegend von der mRNA-Synthese bestimmt wird (TIPPMANN *et al.* 2012), so sollten differenzielle Gen- und Proteinexpression korrelieren (FU *et al.* 2009). Obwohl der

Fokus der APEX1-Quantifizierung auf dessen Charakterisierung in späten Morulae lag, wurden auch *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbungen in 8- bzw. 16-Zellern durchgeführt. In allen drei Entwicklungsstadien konnte eine verringerte APEX1-Expression in Präimplantationsembryonen von ovariell stimulierten Muttertieren beobachtet werden. Die Reduktion der APEX1-Expression in diesen Embryonen war marginal in 16-Zellern (-8%), jedoch sehr deutlich in 8-Zellern (-45%) und in späten Morulae (-31%) verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe. Der maternale Beitrag über die in der Oozyte gespeicherten mRNAs und Proteine sollte keinen maskierenden Effekt auf die Analysen haben, da beide bis zum 2-Zellstadium zu über 90% abgebaut sind (PIKÓ und CLEGG 1982; PAYNTON *et al.* 1988; HAMATANI *et al.* 2004). HAMATANI *et al.* (2004) konnten in einer Mikroarray-basierten Transkriptomstudie die zeitlichen Expressionsmuster von fast 22.000 Genen (SHAROV *et al.* 2003) von der Oozyte bis zur Blastozyste quantifizieren. Dabei konnte *Apex1* einem Gencluster zugeordnet werden, der während des 2- und 4-Zellstadiums signifikant höher exprimiert wird. Danach nimmt die Expression der Gene dieses Clusters bis zum 8-Zellstadium ab, um dann im Morulastadium wieder leicht anzusteigen. Legt man wieder die zeitliche Verzögerung für die Translation der mRNAs zugrunde, so korreliert die Intensität der *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbungen für APEX1 innerhalb der Kontrollgruppe mit den von HAMATANI *et al.* (2004) berichteten mRNA-Expressionsmustern. Verglichen mit den niedrigen Fluoreszenzintensitäten des Morulastadiums (Tabelle 11; Intensitätsdurchschnitt: 36) liegen die des 8-Zellstadiums (Intensität: 56) und der späten Morula (Intensität: 64) deutlich höher. In den Präimplantationsembryonen aus ovariell stimulierten Weibchen liegt die Intensität von 8-Zellern (\emptyset : 31) sogar noch unter der von Morulae (\emptyset : 33) und steigt dann analog zur Kontrollgruppe in späten Morulae an (\emptyset : 44).

4.1.3 Ovarielle Induktion und Apoptose in Präimplantationsembryonen

Ein weiterer Befund neben der differentiellen Genexpression von *Apex1*, *Mbd3* und *Polb* in Präimplantationsembryonen ist die Beobachtung, dass in der Superovulationsgruppe relativ häufig keines der Zieltranskripte detektiert werden konnte. Im Ver-

gleich zur Kontrollgruppe ist die Quote an Embryonen, die keines der Transkripte exprimierten, für *Apex1* etwa 2-fach; für *Polb* 2,5-fach und im Fall von *Mbd3* sogar 8-fach höher (Tabelle 9). Demgegenüber sind bei dem Genset, das durch die ovarielle Induktion nicht beeinflusst wird, keine signifikanten Gruppenunterschiede hinsichtlich dieser Beobachtung erkennbar (Tabelle 10).

Zusätzlich unterstützt wurde dieser Befund durch die Immunfluoreszenzfärbungsdaten der Embryonen beider Gruppen. Deutliche Unterschiede im Verhältnis positiv gefärbter Blastomeren zur Gesamtanzahl an analysierten Blastomeren fallen im 8-Zellstadium auf (Tabelle 11). Insgesamt konnten in der Gruppe von Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren 24% weniger Blastomeren detektiert werden, die positiv für APEX1 gefärbt waren und damit dieses Protein in signifikanter Menge enthielten. Im Morulastadium ist dieser Unterschied auf Proteinebene weitestgehend wieder nivelliert und Embryonen aus natürlich ovulierten Muttertieren weisen nur noch etwa 5% mehr an APEX1-positiven Blastomeren auf. Im späten Morulastadium wurden keine Auszählungen positiv für APEX1 gefärbter Zellen vorgenommen, da die Zuordnung distinkter Blastomere nicht mehr mit der nötigen Sicherheit gewährleistet werden konnte. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenzintensitätsunterschiede in diesem Stadium mit denen in 8-Zellern vergleichbar war. Blastozysten aus ovariell stimulierten Muttertieren exprimierten deutlich weniger APEX1 verglichen mit Embryonen aus der Kontrollgruppe.

Man kann annehmen, dass ein sehr niedriges Transkript- bzw. Proteinlevel innerhalb einer ansonsten morphologisch unauffälligen Blastomere frühe Anzeichen von apoptotischen Vorgängen innerhalb der Zelle darstellen. Bereits während der frühen embryonalen Entwicklung verschiedener Spezies sind Anhaltspunkte von apoptotischen Vorgängen in den Blastomeren zu beobachten. In einigen Mausstämmen kann die Fragmentierung von Blastomeren schon im 1- bis 2-Zellstadium detektiert werden (JURISCOVA *et al.* 1998; BRISON 2000) und markiert damit eine erste Apoptosewelle im Präimplantationsembryo, gefolgt von einer zweiten Welle im Blastozystenstadium (EL-SHERSHABY und HINCHLIFFE 1974). Das primäre Auftreten von Apoptose im 1- bis 2-Zellstadium dient wahrscheinlich der Elimination von nicht-entwicklungsfähigen

Blastomeren um den Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung (JURISICOVA *et al.* 1998; BRISON 2000). Im Blastozystenstadium sind einzelne apoptotische Blastomeren verhältnismäßig häufig und betreffen relativ gesehen eher die ICM als das Trophektoderm (COPP 1978; HANDYSIDE und HUNTER 1986).

Die höhere Apoptoserate in Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren könnte direkt mit der beobachteten differentiellen Genexpression von *Apex1* und *Polb* als Komponenten des BER-Mechanismus zusammenhängen. ZHOU *et al.* (2001) konnten den *in vitro*-Beweis erbringen, dass p53 direkt mit POLB während der Basenexzisionsreparatur interagiert und beobachteten zudem eine Stimulation des gesamten BER-Mechanismus durch p53. Die POLB-vermittelte Entfernung des 5'-Desoxyribosephosphats, das nach dem durch APEX1 produzierten Einzelstrangbruch entsteht, ist der limitierende Schritt während der gesamten BER-Prozesse (SRIVASTAVA *et al.* 1998). Wenig später konnten SEO *et al.* (2002) *in vivo* zeigen, dass p53 die Stabilität des Komplexes aus POLB und DNA erhöht und so wahrscheinlich die Prozessivität der Basenexzisionsreparatur steigert. Im Gegensatz zu ZHOU *et al.* (2001) konnten SEO *et al.* (2002) jedoch keine Interaktion von p53 mit APEX1 nachweisen. Die Folgen eines Knockout von *Polb* wurden auch von SUGO *et al.* (2000) untersucht und deckten sich prinzipiell mit denen von GU *et al.* (1994). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die betroffenen Mausembryonen einen schweren Defekt in der Neurogenese aufwiesen und postmitotische Neuronen apoptotische Merkmale zeigten.

Abgesehen von der 5'-Endonukleaseaktivität von APEX1 im Rahmen des BER-Mechanismus konnten dem Protein eine Reihe weiterer Funktionen zugeschrieben werden. Neben einer 3'-Phosphatase-, 3'-Phosphodiesterase- und einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität (WILSON *et al.* 2003) wurde APEX1 ursprünglich auch als REF-1 (*redox factor-1*) bezeichnet und damit sein Potential als Redoxaktivator von Transkriptionsfaktoren bei Säugetieren charakterisiert (XANTHOUDAKIS und CURRAN 1992; XANTHOUDAKIS *et al.* 1992; RAFFOUL *et al.* 2004; GEORGIADIS *et al.* 2008). Interessanterweise reguliert APEX1 die Expression von p53 auf zwei unterschiedlichen Wegen. Über dessen Redoxfunktion stimuliert APEX1 die Transaktivierungswirkung von p53

als Transkriptionsfaktor. Durch eine Konformationsänderung nach chemischer Reduktion kann p53 eine sehr effiziente DNA-Bindung eingehen (JAYARAMAN *et al.* 1997; GAIDDON *et al.* 1999). Zudem konnten HANSON *et al.* (2005) zeigen, dass APEX1 durch die Förderung einer Tetramerisierung von p53-Dimeren oder höheren oligomeren Formen (de-stacking) ebenfalls zu einer effizienteren DNA-Bindung beiträgt. Insgesamt führen die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen p53 und APEX1 zu einem Gesamtbild, in dem APEX1 eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion als Resonanz auf zellulären Stress einnimmt. p53 gilt als einer der Hauptregulatoren in einem Netzwerk von Signalwegen, die schließlich über den weiteren Weg der Zelle (Zellzyklusarrest, Apoptose, Seneszenz, Autophagozytose etc.) in Abhängigkeit der in- oder extrinsischen Stresseinflüsse entscheiden (BECKERMAN und PRIVES 2010). Diese Rolle von APEX1 wird noch unterstrichen durch die Feststellung, dass ein RNAi-Knockdown von APEX1 zu einer verminderten Proliferationsrate und zu vermehrten Anzeichen von Apoptosevorgängen in Zellkultur führt (FUNG und DEMPLE 2005). Die Akkumulation von AP-Stellen in den RNAi-KD-Zellen führt letztendlich zu den schon erläuterten Gründen von Genominstabilität. Durch Transkomplementierung der APEX1-Defizienz durch Apn1, einem strukturell unverwandten Hefeprotein mit ähnlicher Reparaturfunktion in Bezug auf AP-Stellen, konnten die Effekte zum Großteil rückgängig gemacht werden. Apn1 fehlen die Redoxmodulationsfunktionen von APEX1, so dass mit hoher Sicherheit die BER-Funktion des Enzyms für die beobachteten Effekte verantwortlich ist (FUNG und DEMPLE 2005).

4.1.4 Der Einfluss der ovariellen Induktion auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der genomischen Prägung

Im Mittelpunkt bisheriger Studien zur differentiellen Genexpression nach ovarieller Induktion standen vor allem geprägte Gene. In der Studie von FAUQUE *et al.* (2007) konnte eine reprimierende Wirkung der hormonellen Stimulation auf die *H19*-Expression in murinen Blastozysten nachgewiesen werden. Demgegenüber stellten FORTIER *et al.* (2008) eine Störung der monoallelicen Expression von *H19* und *Snrpn* nach ovarieller Stimulation fest. Beide Gene wurden in 9,5 dpc Embryonen und in

Plazenten biallelisch exprimiert. Aktuelle Studien zeigen, dass die Expression von *H19* einer gewissen embryonalen Entwicklungsrhythmik unterliegt und dessen biallelische Expression etwa zum Zeitpunkt des Blastozystenstadiums einsetzt (MARKET VELKER *et al.* 2012; NEGRÓN-PÉREZ *et al.* 2013). In der Studie von NEGRÓN-PÉREZ *et al.* (2013) wurde gezeigt, dass *H19* in bestimmten Teilen des Präimplantationsembryos zusätzlich paternal exprimiert wird. Diese Bereiche des Trophektoderms differenzieren sich zu den multinukleären Trophoblast-Riesenzellen (PTGCs; *primary trophoblast giant cells*), deren Funktion u.a. die Invasion des Endometriums umfasst und damit wichtig für die Implantation des Embryos ist. Die biallelische Expression war dabei unabhängig vom Ovulationsstatus der Muttertiere und *in vitro*-Effekten der Embryonenkultur. Die *H19*-Expression beider parentaler Allele konnte nicht mit einem „Loss of Imprinting“ (LOI) assoziiert werden, da die Methylierungsmuster der geringen Zahl von PTGC-Vorläuferzellen (~50 Zellen) durch den Rest der embryonalen Zellen (~70 Zellen) maskiert wird. MARKET VELKER *et al.* (2012) beobachteten ein LOI in der ICR von *H19*, sowie der *Snrpn*-DMR muriner Blastozysten, die sich *in vitro* vergleichsweise schnell entwickelt hatten. Konsequenterweise waren diese Embryonen auch von einer aberranten *H19*-Expression gekennzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Technik angewandt, die es ermöglicht, die möglichen epigenetischen Effekte der Superovulation auf einzelne 16-Zell-Embryonen zu analysieren. Dabei wurden die ICR von *H19* sowie die DMR von *Snrpn* hinsichtlich differenzieller DNA-Methylierung untersucht. Um einzelne 16-Zell-Embryonen bezüglich dieser zwei regulatorischen Elemente untersuchen zu können, wurde die Technik der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung entwickelt (EL HAJJ *et al.* 2011). Im Gegensatz zu früheren Studien muss bei dieser Technik nicht auf Pools von Eizellen (HIURA *et al.* 2006; TOMIZAWA *et al.* 2011) oder höhere embryonale Entwicklungsstadien mit entsprechend größeren Zellzahlen (FAUQUE *et al.* 2007; MARKET-VELKER *et al.* 2010) zurückgegriffen werden. Der verbesserte Schutz der DNA während der Bisulfitbehandlung durch das Einbetten in *low melting point* (LMP)-Agarose ist eine weitere Technik, um mit dem limitierenden Zellmaterial sensibel umzugehen (OLEK *et al.* 1996; GEUNS *et al.* 2003; MARKET-VELKER *et al.* 2010; DENOMME

et al. 2011).

In dem vorgestellten Arbeitsablauf zur digitalen Bisulfitpyrosequenzierung wurde besonderer Wert auf die Eignung der PCR-Primer zum Multiplexing verschiedener Zielregionen gelegt. Das Assaydesign beinhaltet die regulatorisch wichtigen Regionen der drei Zielgene in einem nested-PCR-Ansatz. Die Multiplex-PCR mit den äußeren PCR-Primern ist so ausgelegt, dass im Fall von Problemen während nachgeschalteter Prozessschritte eine Wiederholung der genspezifischen Singleplex-PCRs möglich ist. Für den Fall komplexerer Pyrosequenzierassays mit mehreren Sequenzierprimern sind ebenfalls Wiederholungen einzelner positiver Singleplex-PCRs möglich. Theoretisch ist die Anzahl an Amplikons in der Multiplex-PCR in erster Linie vom Endvolumen der PCR abhängig. Dieses Spektrum wird jedoch stark durch die Tatsache eingeschränkt, dass bisulfitbehandelte DNA an Komplexität verliert und damit die Spezifität der Primer entsprechend niedriger ist oder das iterative Primerdesign-Verfahren für die Multiplex-PCR erschwert wird.

Ein weiterer Vorteil der digitalen Form einer Bisulfitpyrosequenzierung ist die Amplifikation ausgehend von einem (bisulfitbehandelten) DNA-Molekül. Das analoge, exponentielle Signal einer konventionellen (q)PCR wird bei der digitalen PCR durch ein binäres, lineares Signal ersetzt (SYKES *et al.* 1992; VOGELSTEIN und KINZLER 1999; SANDERS *et al.* 2011). Insbesondere für epigenetische Analysen zur DNA-Methylierung in Keimzellen oder frühen Embryonen ist die digitale PCR geeignet. Die Beurteilung einzelner Epiallele wird gewährleistet und Misinterpretationen durch Methylierungsmuster somatischer Zellen werden vermieden, solange ein adäquates Kontrollgen mitgeführt wird (EL HAJJ *et al.* 2011). Die Überlegenheit der digitalen PCR gegenüber der konventionellen (analogen) PCR hinsichtlich kritischer Parameter speziell bei Einzelzellanalysen wurde in vielen Studien demonstriert. Problematische Punkte und Eigenschaften einer PCR wie präferentielle Amplifikation, Toleranz gegenüber PCR-Inhibitoren oder *Signal-to-noise*-Verhältnis werden bei der digitalen PCR als insgesamt günstiger beurteilt (KRAYTSBERG und KHRAPKO 2005; HOSHINO und INAGAKI 2012; WHALE *et al.* 2012). Die Verbreitung der digitalen PCR in Forschung und Diagnostik wurde bisher aufgrund höherer Kosten gegenüber vergleichbaren konventionellen PCR-Systemen und erhöhtem Materialaufwand eingeschränkt.

Angesichts neuer Entwicklungen in der Nanofabrikation und mikrofluidischen Systemen stehen mittlerweile Techniken zur Verfügung, die eine Separation einzelner digitaler PCR-Reaktionen im Nano- bzw. Picoliter-Reaktionsvolumina ermöglichen und damit ökonomischer in Bezug auf Verbrauchsmaterialien sind. Zudem können die zu untersuchenden Proben über mehrere zehntausend bis hunderttausend Positionen verteilt werden, um eine höhere Auflösung und Sensitivität zu erreichen (Fluidigm[®], RainDance[™], LifeTechnologies[™]).

Die Rückgewinnungsquote aus 16-Zellern betrug zwischen 7 und 8 Epiallelen und beträgt damit 22-25% der theoretischen Ausbeute im nichtreplizierten Zustand des Embryogenoms (Tabelle 12). Insgesamt bestätigte sich die Feststellung, dass Assays mit längeren Amplikons einem größeren Risiko für die Fragmentierung während der Bisulfitbehandlung unterliegen und sich so eine geringere Rückgewinnungsrate erzielen lässt (Tabelle 12). Durchschnittlich konnten in beiden Ovulationsgruppen 8,7 Allele des *H19*-Assays (167bp) zurückgewonnen werden. Demgegenüber schwankte die durchschnittliche Zahl analysierbarer Allele für den *Snrpn*-Assay (264bp) zwischen 5,8 (Kontrollgruppe) und 7,2 (ovariell induziert). Die Verteilung der elterlichen Epiallele in den analysierten 16-Zellern schwankte bei beiden untersuchten Gruppen leicht um das erwartete 1:1 Verhältnis (Tabelle 12).

Die DNA-Methylierung der Epiallele wurde aus zwei unterschiedlichen Sichtweisen interpretiert. Zum einen erfolgte die Einteilung in Epimutationen, die ein überwiegend aberrant methyliertes Allel (>75%) voraussetzen (EL HAJJ *et al.* 2011). Zum anderen wurde nach Kriterien einer stochastischen aberranten DNA-Methylierung klassifiziert, die nur einzelne CpGs betrifft und höchstwahrscheinlich keine funktionellen Konsequenzen hat (GOYAL *et al.* 2006; SONTAG *et al.* 2006; WEBER *et al.* 2007).

Nach paternalen Epimutationen aufgeschlüsselt, ergeben sich für die *H19*-ICR (paternal geprägt) in der Kontrollgruppe 3% (1 von 37) und in der Superovulationsgruppe 11% (4 von 35) aberrant hypomethylierte Allele. Demgegenüber konnten bei der *Snrpn*-DMR (maternal geprägt) in der Kontrollgruppe 3% (1 von 37) und in der Superovulationsgruppe keine aberrant hypermethylierten väterlichen Allele festgestellt werden. Hinsichtlich aberrant hypermethylierter maternaler Allele der *H19*-ICR erga-

ben sich für die Kontrollgruppe 0% (0 von 41) gegenüber 2% (1 von 52) in der Superovulationsgruppe. Für die *Snrpn*-DMR konnten in der Kontrollgruppe keine aberrant hypomethylierten mütterlichen Allele gefunden werden. In der Gruppe von Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren hingegen machen diese aberrant methylierten Allele 7% (2 von 30) der Gesamtzahl aus (Tabelle 12). Trotz dieser hohen Differenz wird keine statistische Signifikanz erreicht ($p=0,54$), da die verglichenen Fallzahlen zu gering sind. Da die Stichprobe maternaler *Snrpn*-Allele ($n=56$) weniger als 60 Fälle beinhaltet, muss der p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Kontinuitätskorrektur verwendet werden (BACKHAUS *et al.* 2008). Mit zusätzlichen Daten ließe sich die Fallzahl relativ leicht erhöhen und bei Fortbestand des beobachteten Verhältnisses statistische Signifikanz erreichen. Würde man schon bei den 56 Fällen der Stichprobe den Chi-Quadrat-Test nach Pearson (> 60 Fälle) anwenden, würde sich ein p-Wert von 0,18 ergeben. Diese Vorgehensweise führt letztendlich dazu, dass unter den Voraussetzungen stochastischer Mutationen vergleichsweise schnell statistische Signifikanz erreicht wird. Die Stichprobengröße machen hier sämtliche CpGs aller Allele aus, die damit entsprechend viele Fälle enthält (EL HAJJ *et al.* 2011).

Werden die Daten rein nach stochastischen Einzel-CpG-Fehlern ausgewertet, gehen also nur CpG-Positionen von Allelen mit weniger als 75% aberranter Methylierung in die Analyse ein, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings ist die Tendenz erkennbar, dass in erster Linie das normalerweise hypermethylierte Allel von der Störung betroffen ist.

Die in dieser Arbeit erfassten Daten zur DNA-Methylierung in geprägten Genen nach Superovulation fügen sich in einen Teil der gegenwärtigen Literatur ein. Die Störung in der Aufrechterhaltung der genomischen Prägung von *H19* (MARKET-VELKER *et al.* 2010; DE WAAL *et al.* 2012b) und *Snrpn* (MARKET-VELKER *et al.* 2010) wurde bereits gezeigt. Folgerichtig wurden aberrante Expressionsmuster von *H19* (FAUQUE *et al.* 2007; FORTIER *et al.* 2008; DE WAAL *et al.* 2012b) und *Snrpn* (FORTIER *et al.* 2008; DE WAAL *et al.* 2012b) nach ovarieller Induktion demonstriert.

Grundsätzlich sind drei Szenarien denkbar, wie sich die ovarielle Stimulation auf die Erhaltung der genomischen Prägung auswirkt. Zunächst könnte die Hormonbehandlung die Aufrechterhaltung der Imprints zum Zeitpunkt der Bereitstellung antraler Follikel beeinträchtigen. Weiterhin vorstellbar ist ein maternal-embryonaler Effekt, der zu Änderungen in epigenetisch kodierten Informationen während und kurz nach der Verschmelzung beider parentaler Genome in der Zygote führt. Letztendlich kommen auch Milieuveränderungen des Gebärmuttertraktes durch Superovulation als Faktor für gestörte genomische Prägung in Präimplantations-embryonen infrage (VAN MONTFOORT *et al.* 2012).

Die auffällig hohe Rate an aberrant hypomethylierten paternalen *H19*-Allelen in der Superovulationsgruppe wird hauptsächlich durch die Fehlprägung mehrerer Allele in Embryo 14 (Abbildung 12) bestimmt. Trotzdem könnte ein Zusammenhang zwischen der deutlich geringeren Expression von *Mbd3* in Embryonen aus ovariell induzierten Muttertieren und den offensichtlichen Problemen in der Aufrechterhaltung der paternalen Hypermethylierung in der *H19*-ICR bestehen. REESE *et al.* (2007) konnten zeigen, dass ein RNAi-Knockdown von *Mbd3*-mRNA zu einer biallelischen Expression von *H19* in Blastozysten führt. Die differentielle Genexpression von *H19* in Embryonen aus dem RNAi-Ansatz war direkt auf eine Störung der DNA-Hypermethylierung des paternalen Allels in der *H19*-ICR zurückzuführen. Darüber hinaus konnten frühere Beobachtungen bestätigt werden, dass MBD3 den Chromatin-Remodellierungskomplex Mi-2/NuRD stabilisiert (KAJI *et al.* 2006). Eine direkte Bindung von MBD3 an 5mC wurde bisher nicht beobachtet und mit dessen Peptidstruktur innerhalb der 5-Methyl-CpG-Bindedomäne begründet (HENDRICH und BIRD 1998; SAITO und ISHIKAWA 2002). Daher gibt es zwei Möglichkeiten, wie MBD3 Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Hypermethylierung paternaler Allele innerhalb der *H19*-ICR nehmen kann.

Einerseits vorstellbar ist die direkte Bindung von MBD3 an 5hmC (YILDIRIM *et al.* 2011) in der *H19*-ICR. Für diesen Fall würde man jedoch eine hohe Dichte an 5hmC in der *H19*-ICR erwarten, da eine Mischung von 5mC und 5hmC die direkte Bindung von MBD3 verhindert (YILDIRIM *et al.* 2011). Die Rekrutierung von NuRD an 5-Hydroxymethylcytosin-markierte Zielsequenzen durch dessen MBD3-Untereinheit

wird komplementiert durch die Deacetylierung von H3K27. Die Reprimierung der Genaktivität dieser Zielgene wird noch verstärkt, in dem Polycomb-group-Proteine (PRC2: *Polycomb Repressive Complex 2*) die Methylierung von H3K27 bewirken (REYNOLDS *et al.* 2012). In der Tat konnte am humanen *H19-IGF2*-Locus eine hohe Anreicherung für 5hmC nachgewiesen werden (NESTOR *et al.* 2012). Der absolute Gehalt an 5hmC in dieser Region war dabei stark abhängig vom betrachteten Gewebe sowie der Lage (intergenisch, intronisch, exonisch) und variierte zwischen 37-70% (Gehirn) und 0,9-4,3% (Blut). Die erhöhte Rate an Epimutationen des paternalen *H19*-Allels (aberrante Hypomethylierung) könnte auch einen Verlust der 5-Hydroxymethylmodifikation der analysierten Cytosine umfassen, denn durch die konventionelle Bisulfit(pyro)sequenzierung kann nicht zwischen 5mC und 5hmC unterschieden werden (HUANG *et al.* 2010). Ein Knockdown von *Mbd3* führt zu einem reduzierten 5-hmC-Niveau in ESCs (YILDIRIM *et al.* 2011). Zusammen mit der Beobachtung, dass MBD3 mit TET1 kolokalisiert (YILDIRIM *et al.* 2011), *Tet1*- bzw. *Mbd3*-KD-ESCs ähnliche Phänotypen aufweisen (KAJI *et al.* 2006; KOH *et al.* 2011) und ein KD von *Tet1* zu einer umfassenden Delokalisation von MBD3 führt (YILDIRIM *et al.* 2011), kann ein differenziertes Modell zur Beteiligung von MBD3 an der 5hmC-Biologie entworfen werden. Denkbar wäre, dass MBD3 an 5hmC-Zielsequenzen bindet und TET1 rekrutiert, um benachbarte 5mCs weiter zu oxidieren. Vorstellbar wäre aber auch der Fall, dass MBD3 an 5hmC-Sequenzen bindet und sie vor einer weiteren Oxidation schützt (YILDIRIM *et al.* 2011). Wenn die Aufrechterhaltung der paternalen Prägung von *H19* tatsächlich entscheidend von der Bindung von MBD3 im Rahmen des Mi-2/NuRD-Komplexes abhängt, dann müssen die bisherigen Daten zur DNA-Methylierung des *H19-Igf2*-Locus mit neuen Methoden reevaluiert werden, die zwischen 5mC und 5hmC diskriminieren können (BOOTH *et al.* 2012; YU *et al.* 2012). Weiter Studien zur genomweiten Verteilung von 5hmC bekräftigen die Feststellung, dass 5hmC überdurchschnittlich oft in der *H19-Igf2*-Region zu finden ist. In den Arbeiten von FICZ *et al.* (2011) und WU *et al.* (2011) konnte übereinstimmend beobachtet werden, dass 5hmC gehäuft oszillierend um das Bindesequenzmotif von CTCF vorkommt. Die murine *H19-ICR* enthält 4 CTCF-Bindestellen (FAUQUE *et al.* 2010b), die eine wichtige Rolle im „Chromatin-Loop“-

Modell zur Regulation dieses Locus (MURRELL *et al.* 2004; siehe 1.2.1) spielen. Wenn Embryonen aus ovariell induzierten Muttertieren signifikant weniger MBD3 exprimieren, dann könnte auch hier die MBD3-vermittelte Bindung des Mi-2/NuRD-Komplexes gestört sein. Dieser Umstand kann wiederum zu einer geänderten übergeordneten Chromatinstruktur in diesen Embryonen führen (HAN *et al.* 2008; ITO *et al.* 2013). Für die *Snrpn*-DMR von Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren wurde ebenfalls ein höherer Anteil von Epimutationen für das normalerweise hypermethylierte maternale Allel beobachtet. Für die DMR von *Snrpn* sind jedoch bisher keine erhöhten 5hmC-Level detektiert worden. Außerdem enthält die DMR keine CTCF-Bindestellen.

Eine weitere Möglichkeit, MBD3 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der paternalen Prägung der *H19*-ICR sowie der maternalen Prägung der *Snrpn*-DMR zuzuschreiben, ist die über MBD3 vermittelte Stabilität des Mi-2/NuRD-Komplex (HENDRICH *et al.* 2001; KAJI *et al.* 2006). Die beobachteten niedrigen mRNA-Kopienzahlen von *Mbd3* in Embryonen aus ovariell stimulierten Muttertieren führen möglicherweise dazu, dass der MBD3-NuRD-Komplex nicht in der erforderlichen Quantität bereitgestellt werden kann. Folglich wären die multifunktionalen Rollen von MBD3-NuRD (DENSLOW und WADE 2007; SMEENK *et al.* 2010; LAI und WADE 2011) stark eingeschränkt. Der Verlust von MBD3 in murinen ESCs hat keine Auswirkungen auf das Selbsterneuerungspotenzial dieser Zellen, führt jedoch zu einem gestörten Differenzierungsprozess (KAJI *et al.* 2006). Erklärt wird dieser Effekt mit der Fähigkeit des MBD3-NuRD-Komplexes, die Expression wichtiger Pluripotenzfaktoren wie ELF4, ELF5, TBX3, und ZFP42 zu unterdrücken (REYNOLDS *et al.* 2012). Im Gegensatz zu MBD2-NuRD bindet MBD3-NuRD eher an Promotoren von aktiv transkribierten Genen und ist nicht in der Lage, durch die Bindung eine Chromatinkonformationsänderung von Euchromatin zu Heterochromatin zu initiieren (GÜNTHER *et al.* 2013).

4.2 Kryokonservierung männlicher Gameten – Analysen der genomischen Prägung in Spermatozoen und *in vitro*-gezeugten Mausembryonen

Im Rahmen des Zuchtmanagements der Labormaus wurden früh Techniken entwickelt, um den umständlichen Transport lebender Tiere auf ein Minimum zu begrenzen. Die Kryokonservierung von Mausembryonen wurde erstmals in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben (WHITTINGHAM *et al.* 1972; WILMUT 1972). Seitdem sind zahllose Methoden und Protokolle für die Konservierung und Revitalisierung von Mausstämmen entwickelt worden (FRAY 2009a; FRAY 2009b; GUAN *et al.* 2012). Die Kryokonservierung ist deshalb so effizient, weil alle biologischen Prozesse unterhalb der Glasübergangstemperatur von Wasser (-130°C bei einem Druck von 1bar) stoppen. Wird dieser Abkühlvorgang entsprechend schnell vorgenommen (Vitrifizierung), so entsteht eine feste Form von Wasser ohne Kristallstruktur. Die unregelmäßige Anordnung der Wassermoleküle, vergleichbar mit der eines Gases, begünstigt die Konservierung von biologischem Material (GUAN *et al.* 2012). Es konnte u.a. demonstriert werden, dass tiefgefrorene Embryonen eine einmalige Strahlendosis, die äquivalent zu einer 2000-jährigen Hintergrundstrahlung gewählt war (200 cGy), unbeschadet überstehen und sich nach dem Auftauen normal entwickeln (GLENISTER *et al.* 1984; GUAN *et al.* 2012). Die Kryokonservierung von Präimplantationsembryonen war bisher die bevorzugte Methode, nicht benötigte Mausstämmen zu archivieren (GUAN *et al.* 2012). Sofern Nutzer auf Stämme mit komplexem Hintergrund und/oder multiplen genetischen Modifikationen zurückgreifen müssen, wird die Kryokonservierung von Embryonen weiterhin genutzt (DONAHUE *et al.* 2012). Die Archivierung von Spermatozoen ist zudem ausgeschlossen in Fällen von maternal vererbten Änderungen und problematisch, wenn keine geeignete Eizellenspende vorhanden ist und ein genomweites Interesse am Genotyp von kongenen oder Inzuchtstämmen besteht (MARSCHALL und HRABÉ DE ANGELIS 1999; GUAN *et al.* 2012).

Der Durchbruch in der Kryokonservierung muriner Spermatozoen wurde erst 1992 erreicht, nachdem ein geeignetes Kryoschutzmedium gefunden wurde (NAKAGATA und TAKESHIMA 1992). Mittlerweile hat sich die Kryokonservierung von Spermien bei

der Archivierung von Mausstämmen durchgesetzt, die weniger tiefgreifend verändert sind. Anders als bei der Embryokryokonservierung unterliegen die Spender keiner Hormonbehandlung und Arbeiten mit Spermatozoen sind relativ unproblematisch (TAO *et al.* 1995). Zudem können Zuchten konserviert werden, die durch eine reduzierte weibliche Reproduktionsrate charakterisiert sind (SZTEIN *et al.* 1997). Aktuelle Großprojekte wie das *International Knockout Mouse Consortium* (IKMC), *Knockout Mouse Project* (KOMP+KOMP²) oder das *European Conditional Mouse Mutagenesis* (EUCOMM) Projekt mit dem Ziel, für jedes Gen der Maus eine Nullmutationen zu generieren (AUSTIN *et al.* 2004; THE INTERNATIONAL MOUSE KNOCKOUT CONSORTIUM 2007), werden eine Fülle weiterer transgener Stämme erzeugen und erzeugen immensen Druck auf die Konservierung/Archivierung dieser transgenen Tiere (KNIGHT und ABBOTT 2002). Der Schwachpunkt der Kryokonservierung von Spermien ist die dafür notwendige Verfügbarkeit von assistierten Reproduktionstechniken wie IVF oder ICSI und der damit verbundene Aufwand für trainiertes Personal und Equipment. Inzwischen hat jedoch die überwiegende Mehrzahl an Tierzuchtzentren die ökonomischen Vorteile der künstlichen Befruchtung realisiert, die sich u.a. aus einer weitaus höheren Produktionsrate (TAKEO und NAKAGATA 2011) und weniger beanspruchtem Raum für die Verpaarungen ergeben (MARSCHALL und HRABÉ DE ANGELIS 1999; GUAN *et al.* 2012). Da Spermatozoen eines einzigen Männchens 20mal mehr Nachwuchs erzeugen können, als die Embryonen eines einzigen Weibchens, lassen sich die Zuchten für die Aufrechterhaltung eines Stammes drastisch verkleinern (MARSCHALL und HRABÉ DE ANGELIS 1999). Nicht zuletzt aufgrund niedrigerer Kosten für die Lagerung der Proben, entwickelt sich das „Spermfreezing“ als ein integraler Bestandteil im Konzept eines zeitgemäßen Zuchtmanagements (NAKAGATA 2000; OSTERMEIER *et al.* 2008; TAKEO und NAKAGATA 2011). Momentan werden etwa 25% aller Stämme der ZVTE Mainz kryokonserviert. Dabei entfallen etwa 98% auf die Kryokonservierung von Spermatozoen und ca. 2% auf die Embryonenkryokonservierung (pers. Mitteilung: Elena Wiese).

Die Fertilitätsraten von kryokonservierten Spermatozoen variieren sehr stark und sind eng mit dem genetischen Hintergrund des Spermiendonors verknüpft (SONGSASEN und LEIBO 1997; NAKAGATA 2000). Insbesondere Spermatozoen des populären C57BL/6-Stamms reagieren äußerst empfindlich auf die mit der Kryokonservierung verbundenen Einfrier- und Auftauprozesse (NAKAGATA und TAKESHIMA 1993; SONGSASEN und LEIBO 1997; SZTEIN *et al.* 2000; NISHIZONO *et al.* 2004; YILDIZ *et al.* 2007).

Eine Forschergruppe des „Jackson-Laboratory“ um OSTERMEIER *et al.* stellte 2008 ein verbessertes Protokoll für die Vitrifizierung muriner Spermien vor. Das Standardprotokoll für die Kryokonservierung von Spermatozoen (TADA *et al.* 1990; NAKAGATA und TAKESHIMA 1992) wurde modifiziert, indem Monothioglycerol als Radikalfänger für zu hohe Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS: *reactive oxygen species*) eingesetzt wurde (CHATTERJEE und GAGNON 2001; VISCONTI *et al.* 2002). Zusammen mit optimierten Temperaturprotokollen und Inkubationszeiten konnten erhebliche Verbesserungen in der Fertilitätsrate mit kryokonservierten Spermatozoen erreicht werden. Konkret konnten für den C57BL6/J-Stamm Fertilisationsraten von 70% mit kryokonservierten Spermien erreicht werden. Die Ausbeute an 2-Zellern konnte im Vergleich zu früheren Studien (SZTEIN *et al.* 2000) um das 5-6fache gesteigert werden.

4.2.1 Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermatozoen

In diesem Teilaspekt der Arbeit sollte die Kryokonservierung hinsichtlich potentieller Risiken für die Integrität epigenetisch kodierter Informationen (DNA-Methylierung) untersucht werden. Dazu wurden die regulatorischen Regionen der drei geprägten Gene *H19*, *Igf2r* (*Air*) und *Snrpn* in Spermatozoen und den daraus mittels IVF generierten F1-Embryonen analysiert. Die Kryokonservierung wurde analog zu OSTERMEIER *et al.* (2008) durchgeführt und richtete sich damit direkt am „Jackson-Laboratory“, einer führenden Institution in der Mausgenetik, aus.

Die Motilität der Spermatozoen des CAST/Ei-Stammes war nach den Einfrier- und Auftauprozessen der Kryokonservierung deutlich reduziert. Der relative Vergleich der

Motilität-Messung von frischen Spermatozoen mit der von kryokonservierten Spermien desselben Männchens zeigte eine Abnahme bewegungsfähiger Spermatozoen von 20% (Männchen 6) bis zu 78% (Männchen 18; Abbildung 16). Damit wurden die Beobachtungen von OSTERMEIER *et al.* (2008) bestätigt, die für den C57BL6/J-Stamm eine etwa 75%ige Reduktion von Spermien mit intakter Membran nach der Kryokonservierung ermittelten. Stammspezifische Unterschiede in der Toleranz von Kryoschäden an Spermatozoen sind seit längerem bekannt (SONGSASEN und LEIBO 1997). Auch aus Interspezies-Sicht können große Variationen bezüglich der Widerstandsfähigkeit von Spermatozoen gegenüber den mit der Kryokonservierung verbundenen Prozessen beobachtet werden (SONGSASEN und LEIBO 1997; YU *et al.* 2002; CHAVEIRO *et al.* 2006; ROCA *et al.* 2006). Verschiedene Faktoren, wie z.B. genetische Prädisposition (THURSTON *et al.* 2002), die Regulation von *Housekeeping*-Genen (CASAS *et al.* 2009; CASAS *et al.* 2010) und des Zellvolumens (CHAVEIRO *et al.* 2006), sowie die Rolle des Seminalplasmas (JOBIM *et al.* 2004; ASADPOUR *et al.* 2007) werden als Ursache dieser Variabilität diskutiert. Verschiedene Gründe für die spezielle Empfindlichkeit von murinen Spermien werden in der Literatur erörtert. Erwiesenermaßen reagieren murine Spermien äußerst sensitiv auf mechanischen Stress (SCHREUDERS *et al.* 1996; KATKOV und MAZUR 1998). Kryokonservierte Spermatozoen werden vor dem Einfrieren in Kryohalme (*Straws*) gefüllt und müssen nach dem Auftauen in die IVF-Lösung transferiert werden. Damit sind kryokonservierte Spermien insgesamt deutlich mehr Transferschritten im Vorfeld einer IVF ausgesetzt. Deutlich schwerwiegender wirken sich osmotischer Stress und Kryoschäden durch die Einfrier- und Auftauprozesse auf murine Spermatozoen aus. Die Wahl und Komposition des Kryoprotektivums hat deshalb entscheidenden Einfluss auf die Revitalisierungseffizienz der kryokonservierten Spermatozoen. Die Schutzwirkung geht zum einen von der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks innerhalb der Zelle aus. Die im Schutzmittel enthaltenen Kohlenhydrate erlauben die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Membranphospholipiden und sorgen so für die Integrität und Stabilisierung der Zellmembran (STRAUSS *et al.* 1986). Außerdem agiert das Schutzmedium als Energiequelle für die Spermatozoen (HOLT 2000).

Die Analyse der DNA-Methylierung in murinen Spermatozoen vor und nach den Kryokonservierungsprozessen ergab insgesamt keine signifikanten Gruppenunterschiede. Ein interessanter Nebenbefund ergibt sich bei der Betrachtung der DNA-Methylierung des proximalen *Oct4*-Promoters (Abbildung 21). Spermatozoen von C57BL6/J Männchen (Nr. 1-3) weisen deutlich weniger Methylierung (~20%) im *Oct4*-Promoter im Vergleich zu CAST/Ei-Männchen (~40%) auf. Die Werte zur DNA-Methylierung in C57BL6/J-Spermatozoen stimmen mit Werten aus der Literatur überein (YAMAZAKI *et al.* 2006).

Aus den Boxplots (Abbildung 17-20) wird deutlich, dass die Messwerte der frisch präparierten Spermien eines Männchens (Nr. 8) teilweise sehr deutlich vom Median der anderen Proben abweichen. Interessanterweise bestehen diese signifikanten Abweichungen nur in den geprägten Genen und nicht im B1-Element oder dem proximalen Promoter des Pluripotenzmarkers *Oct4*. Offensichtlich führt die Kryokonservierung der Spermatozoen dieses Männchens zu einer Normalisierung der Werte in den geprägten Genen. Die Spermatozoen von sub- oder infertilen Männern sind häufig gekennzeichnet von abnormen Werten hinsichtlich der DNA-Methylierung geprägter Gene (MARQUES *et al.* 2004; HOUSHDARAN *et al.* 2007; KOBAYASHI *et al.* 2007; BOISSONNAS *et al.* 2009; MARQUES *et al.* 2010; POPLINSKI *et al.* 2010). Man könnte vermuten, dass nur die (epi)genetisch fittesten Spermatozoen die Prozesse rund um die Kryokonservierung ohne schwerwiegende DNA-Schäden überstehen. Für diese Annahme spricht unter anderem auch die Beobachtung von OSTERMEIER *et al.* (2008), dass sich signifikant mehr lebend geborene Mäuse aus Zweizellembryonen entwickeln, die mit kryokonservierten Spermatozoen erzeugt wurden. Bei 9 von 12 analysierten Stämmen, die als Spermiodonoren fungierten, konnte diese Korrelation gefunden werden. In diesem Zusammenhang ergeben sich sehr eindrucksvolle Entwicklungsraten insbesondere für die bedeutenden Stämme C57BL/6J und BALB/cJ. TUNC und TREMELLEN (2009) konnten nachweisen, dass infertile Männer einen höheren Grad an DNA-Fragmentierung sowie ein niedrigeres Level an globaler Methylierung aufweisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ursächlich ist die erhöhte Produktion von ROS, da die Verabreichung eines Antioxidans zur Inversion der genannten Effekte führte. Grundsätzlich sind oxidative Prozesse die Hauptursache

für DNA-Schäden in Spermatozoen. Männliche Keimzellen sind sehr viel stärker von diesen Effekten betroffen als weibliche Keimzellen. Bei Wirbeltieren werden vor allem die unterschiedliche Biologie der Keimzellreifung zwischen den Geschlechtern und die abweichende Proteinausstattung der Gameten für die voneinander abweichende Sensibilität auf oxidative Schäden verantwortlich gemacht. Der Reifeprozess von Spermatozoen durchläuft angesichts der schiereren Anzahl von Zellen insgesamt mehr Teilungen als der von Oozyten und wird über den Großteil der Lebensspanne aufrechterhalten, während der Pool an Eizellen schon im Verlauf der fötalen Entwicklung angelegt wird (ELLEGREN 2007). Zudem sind gegen Ende der Spermatogenese sämtliche DNA-Reparaturprozesse abgeschaltet (OLSEN *et al.* 2005), sodass nicht reparierte DNA-Läsionen in den Spermatozoen potentielle Risiken für die Nachkommenschaft darstellen (VELANDO *et al.* 2008). Um die Bewegungsfähigkeit der Spermien zu gewährleisten, muss für den Bewegungsapparat viel Energie in Form von mitochondrialer Zellatmung bereitgestellt werden (VISHWANATH und SHANNON 1997). Der Gradient zwischen dem niedrigen zytoplasmatischen Niveau an Antioxidantien (DE LAMIRANDE und GAGNON 1995) und dem hohen Level an ROS, erzeugt durch die Atmungsprozesse, wird so noch zusätzlich verstärkt. Ein Großteil der Kryoschäden an Spermatozoen werden durch oxidativen Stress verursacht (CHATTERJEE und GAGNON 2001; THOMSON *et al.* 2009). Dementsprechend würden durch die Kryokonservierung die ohnehin schon hohen Level an ROS in sub- und infertilen Männchen nochmals drastisch erhöht und damit zusätzlich zu der Heterogenität unter den Spermatozoen eines Männchens beitragen. Es wäre also vorstellbar, dass vorgeschädigte Subpopulationen (HOLT und VAN LOOK 2004) unter den Spermatozoen nach der Kryokonservierung nicht mehr zu einer Befruchtung der Eizellen in einer IVF beitragen können. Bezogen auf die Ergebnisse zur DNA-Methylierung in Spermatozoen (Männchen Nr. 8) würde das bedeuten, dass die DNA von kryogeschädigten Subpopulationen so stark fragmentiert ist, dass kein signifikanter Beitrag mehr in die Analysen fließt.

Mit assistierten Reproduktionstechniken wie IVF oder ICSI werden natürliche biologische Selektionsmechanismen umgangen. Allein die Länge des weiblichen Reproduktionstrakts stellt einen wichtigen Filter dar. Der Energieaufwand der Spermatozoen,

um die Eizelle zu erreichen, erhöht die intrazelluläre ROS-Konzentration. Diese wiederum reagieren mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran und führen letztendlich zum Verlust von Membranfluidität und –integrität (MISRO *et al.* 2004; VELANDO *et al.* 2008). Daher sollten oxidativ-vorgeschädigte Spermatozoen die zusätzlichen Angriffe der Radikale auf ihrem Weg zur Eizelle kaum überstehen. Ein weiterer Auslesemechanismus findet mit dem Eintritt der Spermatozoen in den Schleim des Gebärmutterhalses statt. Diese Region ist hoch angereichert mit ROS-produzierenden Leukozyten (FEKI *et al.* 2004), die somit abermals ein sehr reaktives Milieu schaffen. Danach erfolgt bei Säugetieren im Uterus ein hochkoordinierter Prozess (Kapazitation), der zu einer ganzen Reihe von biochemischen Änderungen in Spermatozoen führt. Diese Veränderungen sind letztendlich wichtig für die Kommunikation zwischen Spermium und Eizelle bei der Befruchtung (BEDFORD 2004; VELANDO *et al.* 2008). Die Prozesse der Kapazitation führen zu einer gesteigerten Motilität (FRASER *et al.* 2005) und Hyperaktivierung der Spermien, um schließlich die *Zona pellucida* der Eizelle zu durchdringen (DE JONGE 2005). Für die Kapazitation ist ein gewisses Maß an ROS nötig (BEDFORD 2004). Für Spermatozoen, die nicht synchron zu diesen hochkoordinierten Prozessen sind, stellt eine verfrühte Kapazitation wiederum eine potentielle Gefahr für oxidative DNA-Schäden dar (VELANDO *et al.* 2008). Man könnte also die Kryokonservierung als einen Filter ansehen, der im Vorfeld einer IVF zu einer positiven Selektion an (epi)genetisch fitten Spermatozoen führt.

4.2.2 Paternale Transmission – Effekte der Kryokonservierung in F1-Hybridembryonen

Es ist bekannt, dass während der Lebenszeit eines Organismus in den meisten seiner somatischen Zellen epigenetische Informationen durch die Interaktion mit der Umwelt etabliert werden. Im Gegensatz zu epigenetischen Modifikationen der Keimzellen, spielen diese jedoch bei der Transmission an die nächste Generation keine Rolle (DAXINGER und WHITELAW 2012). Bisher sind nur wenige Beispiele solcher Epiallele bekannt, die relativ stabil durch meiotische Teilungen über mehrere Generationen vererbt werden (MORGAN *et al.* 1999; RAKYAN *et al.* 2003; DRUKER *et al.*

2004; WEINHOUSE *et al.* 2011). Im Mausmodell sind alle metastabilen Epiallele mit der Insertion eines repetitiven Elements in der Nähe des betreffenden Gens verbunden (RAKYAN *et al.* 2002). Je nach Gehalt an DNA-Methylierung in regulatorisch wichtigen Bereichen dieser repetitiven Elemente wird die Expression dieser Gene gesteuert (MORGAN *et al.* 1999).

Obwohl klassisches Imprinting nicht zu den transgenerational vererbaren epigenetischen Informationen gezählt wird, sollen mögliche Folgen einer Kryokonservierung von Spermatozoen auf geprägte Gene in der nächsten Generation untersucht werden. Dazu wurden durch IVF erzeugte F1-Hybridembryonen im 2-Zellstadium untersucht, die jeweils mit frisch präparierten oder kryokonservierten Spermatozoen desselben Männchens erzeugt wurden. Die Analyse der DNA-Methylierung erfolgte für die regulatorisch wichtigen Regionen von *H19*, *Igf2r* (*Air*) und *Snrpn* mittels digitaler Bisulfitpyrosequenzierung.

Das Verhältnis zwischen analysierbaren maternalen und paternalen Allelen in 2-Zellern war deutlich zugunsten maternaler Allele verschoben (Tabelle 13-17). In dieser Studie konnten für den *H19*-Assay insgesamt 48 maternale und 26 paternale Allele zurückgewonnen werden. Damit sind maternale Allele etwa 1,8fach überrepräsentiert. Für den *Igf2r*-Assay wurde ebenfalls ein 1,8fach höherer Anteil maternaler Allele ermittelt (34 x mat.; 19 x pat.). Der *Snrpn*-Assay spiegelt ein 1,4fach höheren Anteil maternaler Allele wider (57 x mat.; 42 x pat.). Ein ähnliches Verhältnis von zurückgewonnenen parental Allelen wurde auch in einer anderen mittels digitaler Bisulfitpyrosequenzierung durchgeführten Studie beobachtet (EL HAJJ 2011; EL HAJJ *et al.* 2011). Als Ursache kann ein systematischer Fehler, etwa durch präferentielle Amplifikation oder Allel-Dropout, nahezu ausgeschlossen werden, da die Technik bei 16-Zellern zu dem erwarteten 1:1 Verhältnis führte. Möglicherweise kommt als Ursache aber in Frage, dass das paternale Genom noch nicht vollständig reaktiviert und der Übergang vom Protamin-reichen Chromatin der Spermatozoen zum Histon-verpackten Chromatin des Embryos noch nicht vollständig abgeschlossen ist (NONCHEV und TSANEV 1990; ADENOT *et al.* 1997). Dies könnte dazu führen, dass die paternalen Allele im Rahmen der Bisulfitbehandlung und PCR-

Amplifikation weniger gut zugänglich sind. Wahrscheinlichere Ursache ist aber die fortwährende Präsenz des zweiten Polkörpers im 2-Zellembryo, der entsprechend ein zusätzliches maternales Allel beisteuern würde (BARTHOLOMEUSZ 2003). Zudem ist noch nicht abschließend geklärt, ob der zweite Polkörper nicht auch im Stande ist, analog zum maternalen Pronukleus, DNA zu replizieren (HOWLETT und BOLTON 1985; KAUFMAN 1992; BARTHOLOMEUSZ 2003).

Grundsätzlich fällt bei den Analysen der 2-Zellembryonen auf, dass bei allen drei geprägten Genen die maternalen Allele stärker von Epimutationen betroffen sind. Dieser Umstand ist unabhängig von der Prägung des Gens und auch nicht speziell mit der Kryokonservierung assoziiert. Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass entweder die ovarielle Induktion der Weibchen oder die IVF für die beobachteten aberranten DNA-Methylierungsmuster entscheidend ist.

Für den *H19*-Assay konnte insgesamt ein sehr hoher Anteil von maternalen Epimutationen sowohl in der IVF-Kontrollgruppe, als auch in der IVF-Kryogruppe ermittelt werden (beide 17%; Abbildung 17). Demgegenüber konnten für beide Gruppen keine Epimutationen in paternalen Allelen beobachtet werden. LI *et al.* (2005) konnten in ES-Zellen aus murinen Blastozysten zeigen, dass die IVF in einer aberranten Erhöhung der DNA-Methylierung des maternalen *H19*-Allels resultiert. Zudem wurde nachgewiesen, dass auch Histonmodifikationen im *H19-Igf2*-Locus durch die *in vitro*-Fertilisation beeinflusst werden. Auf dem paternalen Allel wurden nach IVF aktivierende (H3K4me) Modifikationen beobachtet und maternale Allele waren angereichert mit reprimierenden Histonvarianten (H3K9me). Konsequenterweise führten diese Veränderungen nach einer IVF zusammen mit der aberranten DNA-Methylierung des maternalen Allels zu einer gestörten *H19*-Expression. Es muss betont werden, dass bei vielen Embryonen nur einer der beiden *H19*-Assays (siehe Tabelle 7) funktionierte und deshalb jeweils nur eine CpG und der benachbarte SNP analysiert werden konnte. Daher fehlen sehr häufig die im zweiten *H19*-Assay enthaltenen 3 CpGs. Aus diesem Grund wäre es theoretisch möglich, dass nur eine von vier CpGs aberrant methyliert war und damit folgerichtig in die Kategorie der stochastischen Mutationen fallen würde. Im Gegensatz zu den

analysierten 16-Zellern kann damit in 2-Zellern sehr häufig ein aberranter Zugewinn an Methylierung in der ICR des maternalen *H19*-Allels beobachtet werden. In der Mehrzahl der Fälle liegt die Hypermethylierung des maternalen *H19*-Allels im Mosaik vor. Dieses Ergebnis spricht daher eher für eine Störung in der Aufrechterhaltung des epigenetischen Status als für eine Beeinträchtigung in der Etablierung der epigenetischen Informationen. Wenn nach stochastischen Mutationen unterschieden wird, sind bezüglich des *H19*-Assays kaum Auffälligkeiten zu verzeichnen. Eine Ursache solcher aberranten Methylierungsmuster kann u.U. auch eine Bisulfitbehandlung sein, die unter der vom Hersteller zugesicherten Konvertierungseffizienz lag (EL HAJJ *et al.* 2011).

Die DMR von *Snrpn* zeigte analog zu *H19* hauptsächlich Epimutationen auf dem maternalen Allel. Die Fehlprägung äußerte sich hier jedoch in der Hypomethylierung des mütterlichen Allels. Trotz 18% Differenz zwischen Kontrollgruppe (21%) und Kryo-IVF-Gruppe (3%) konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Ein ähnliches Bild lieferte das paternale *Snrpn*-Allel. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied für die deutlich geringere Quote an Epimutationen in der Kryo-IVF-Gruppe erhalten werden. Die Gründe dafür wurden unter 4.1.3 diskutiert. Bezüglich des Auftretens von stochastischen Mutationen konnte ein signifikanter Anstieg im maternalen Allel der Kryo-IVF-Gruppe festgestellt werden. Wie schon erwähnt, bleiben diese stochastischen Mutationen höchstwahrscheinlich ohne funktionelle Konsequenzen für den Embryo (GOYAL *et al.* 2006; SONTAG *et al.* 2006; WEBER *et al.* 2007).

Analog zu *H19* und *Snrpn* ist das Antisensetranskript von *Igf2r* (*Airn*) hauptsächlich von maternalen Epimutationen gekennzeichnet (Abbildung 33). Im Gegensatz zu den beiden anderen Genen kann jedoch ein Anstieg der Epimutationen in der Kryo-IVF-Gruppe (+11%) verzeichnet werden. Damit wäre hier ein negativer Effekt der IVF mit kryokonservierten Spermatozoen zu verzeichnen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass für *Igf2r* die geringste Stichprobengröße vorliegt (maternal: 34 Allele, paternal: 19 Allele) und damit noch keine gesicherten Erkenntnisse hinsichtlich dieses Effekts vorliegen.

Die Ergebnisse zu epigenetischen Effekten der Kryokonservierung zeigen deutlich, dass weder die epigenetische Prägung in Spermatozoen (*H19*, *Igf2r*, *Snrpn*, *Plagl1*), noch die in der F1-Generation (*H19*, *Snrpn*) negativ beeinflusst werden. Lediglich für *Igf2r* konnte in der Kryo-IVF-Gruppe ein Anstieg von Epimutationen registriert werden. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf einer sehr geringen Stichprobengröße und müssen mit der dementsprechenden Unsicherheit interpretiert werden.

Im Grundsatz unterstützen diese Resultate damit den Befund von KLÄVER *et al.* (2012). Die Autoren konnten in einer Studie zu humanen kryokonservierten Spermatozoen ebenfalls keine abnorme DNA-Methylierung in maternal (*LIT1*, *MEST*, *SNRPN*) und paternal geprägten Genen (*MEG3*, *H19*) detektieren. Zudem blieb auch die Methylierung von repetitiven Elementen (*ALU*, *LINE1*), eines Spermatogenese-spezifischen Gens (*VASA*) und des *MTHFR*-Gens, einem Marker für männliche Infertilität, durch Kryokonservierung unbeeinflusst.

5 Literaturverzeichnis

Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P. und Thompson, E. M. (1997). "Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos." *Development* **124**(22): 4615-4625.

Ager, E., Suzuki, S., Pask, A., Shaw, G., Ishino, F. und Renfree, M. B. (2007). "Insulin is imprinted in the placenta of the marsupial, *Macropus eugenii*." *Developmental Biology* **309**(2): 317-328.

Allfrey, V. G., Faulkner, R. und Mirsky, A. E. (1964). "Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**(5): 786–794.

Arney, K. L. (2003). "H19 and Igf2 - enhancing the confusion?" *Trends in Genetics* **19**(1): 17-23.

Asadpour, R., Alavi-Shoushtari, S. M., Rezaii, S. A. und Ansari, M. H. K. (2007). "SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability." *Animal Reproduction Science* **102**(3): 308-313.

Austin, C. P., Battey, J. F., Bradley, A., Bucan, M., Capecchi, M., Collins, F. S., . . . Zambrowicz, B. (2004). "The Knockout Mouse Project." *Nature Genetics* **36**(9): 921-924.

Ayesh, S., Matouk, I., Schneider, T., Ohana, P., Laster, M., Al-Sharef, W., . . . Hochberg, A. (2002). "Possible physiological role of H19 RNA." *Molecular Carcinogenesis* **35**(2): 63-74.

Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jorgensen, H. F., John, R. M., . . . Fisher, A. G. (2006). "Chromatin signatures of pluripotent cell lines." *Nature Cell Biology* **8**(5): 532-538.

Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. und Weiber, R. (2008). *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung*, Springer.

Bains, W. und Smith, G. C. (1988). "A novel method for nucleic acid sequence determination." *Journal of Theoretical Biology* **135**(3): 303-307.

Balhorn, R. (2007). "The protamine family of sperm nuclear proteins." *Genome Biology* **8**(9): 227.

Barlow, D. P., Stoger, R., Herrmann, B. G., Saito, K. und Schweifer, N. (1991). "The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus." *Nature* **349**(6304): 84-87.

Barr, M. L. und Bertram, E. G. (1949). "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis." *Nature* **163**(4148): 676-677.

Barratt, M. J., Hazzalin, C. A., Cano, E. und Mahadevan, L. C. (1994). "Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(11): 4781-4785.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., . . . Zhao, K. (2007). "High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome." *Cell* **129**(4): 823-837.

Bartholomeusz, R. (2003). "Review of the longevity of the second polar body in the mouse." *Zygote* **11**(1): 23-34

Bartolomei, M. S., Zemel, S. und Tilghman, S. M. (1991). "Parental imprinting of the mouse H19 gene." *Nature* **351**(6322): 153-155.

Beckerman, R. und Prives, C. (2010). "Transcriptional Regulation by P53." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(8).

Beckwith, J. B. (1963). Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele, hyperplasia of kidneys and pancreas, and Leydig-cell hyperplasia: Another syndrome? *Western Society for Pediatric Research (abstract)*, Los Angeles.

Bedford, J. M. (2004). "Enigmas of mammalian gamete form and function." *Biological Reviews* **79**(2): 429-460.

Bell, A. C. und Felsenfeld, G. (2000). "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." *Nature* **405**(6785): 482-485.

Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., . . . Lander, E. S. (2006). "A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells." *Cell* **125**(2): 315-326.

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. und Ingram, V. (1988). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases." *Journal of Molecular Biology* **203**(4): 971-983.

Bhaumik, S. R., Smith, E. und Shilatifard, A. (2007). "Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis." *Nature Structural & Molecular Biology* **14**(11): 1008-1016.

Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y. und Blau, H. M. (2010). "Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation." *Nature* **463**(7284): 1042-1047.

Binder, G., Begemann, M., Eggemann, T. und Kannenberg, K. (2011). "Silver-Russell syndrome." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **25**(1): 153-160.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. und Macleod, D. (1985). "A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA." *Cell* **40**(1): 91-99.

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., . . . de Jong, P. J. (2007). "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." *Nature* **447**(7146): 799-816.

Bliek, J., Maas, S. M., Ruijter, J. M., Hennekam, R. C. M., Alders, M., Westerveld, A. und Mannens, M. M. A. M. (2001). "Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant *H19* and not *KCNQ1OT1* methylation: occurrence of *KCNQ1OT1* hypomethylation in familial cases of BWS." *Human Molecular Genetics* **10**(5): 467-476.

Boissonnas, C. C., Abdalaoui, H. E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J. M., Gut, I., . . . Jammes, H. (2009). "Specific epigenetic alterations of *IGF2-H19* locus in spermatozoa from infertile men." *European Journal of Human Genetics* **18**(1): 73-80.

Bonasio, R., Tu, S. und Reinberg, D. (2010). "Molecular Signals of Epigenetic States." *Science* **330**(6004): 612-616.

Booth, M. J., Branco, M. R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W. und Balasubramanian, S. (2012). "Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution." *Science* **336**(6083): 934-937.

- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schubeler, D., Sasaki, H., . . . Weber, M. (2010). "Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development." *Nature Genetics* **42**(12): 1093-1100.
- Borghol, N., Lornage, J., Blachère, T., Sophie Garret, A. und Lefèvre, A. (2006). "Epigenetic status of the *H19* locus in human oocytes following in vitro maturation." *Genomics* **87**(3): 417-426.
- Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P. O., Clark, A., Pradhan, S. und Jacobsen, S. E. (2007). "UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells." *Science* **317**(5845): 1760-1764.
- Bourc'his, D. und Bestor, T. H. (2004). "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." *Nature* **431**(7004): 96-99.
- Bourc'his, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B. und Bestor, T. H. (2001). "Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints." *Science* **294**(5551): 2536-2539.
- Boyes, J. und Bird, A. (1991). "DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein." *Cell* **64**(6): 1123-1134.
- Bradford, J., Hey, Y., Yates, T., Li, Y., Pepper, S. und Miller, C. (2010). "A comparison of massively parallel nucleotide sequencing with oligonucleotide microarrays for global transcription profiling." *BMC Genomics* **11**(1): 282.
- Branco, M. R., Oda, M. und Reik, W. (2008). "Safeguarding parental identity: Dnmt1 maintains imprints during epigenetic reprogramming in early embryogenesis." *Genes & Development* **22**(12): 1567-1571.
- Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S. und Tilghman, S. M. (1990). "The product of the *H19* gene may function as an RNA." *Molecular and Cellular Biology* **10**(1): 28-36.
- Brison, D. R. (2000). "Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: Regulation by survival factors." *Human Fertility* **3**(1): 36-47.
- Brodersen, P. und Voinnet, O. (2009). "Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**(2): 141-148.
- Buiting, K. (2010). "Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* **154C**(3): 365-376.

Casas, I., Sancho, S., Ballester, J., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., . . . Bonet, S. (2010). "The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability." *Theriogenology* **74**(6): 940-950.

Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M. und Bonet, S. (2009). "Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins." *Theriogenology* **72**(7): 930-948.

Chandler, D. P., Wagon, C. A. und Bolton, H. (1998). "Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and Its Implications for Quantitative RT-PCR." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2): 669-677.

Chatterjee, S. und Gagnon, C. (2001). "Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing." *Molecular Reproduction and Development* **59**(4): 451-458.

Chaveiro, A., Liu, J., Engel, B., Critser, J. K. und Woelders, H. (2006). "Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males." *Cryobiology* **53**(3): 349-359.

Chen, D. und Patton, J. T. (2001). "Reverse Transcriptase Adds Nontemplated Nucleotides to cDNAs During 5'-RACE and Primer Extension." *BioTechniques* **30**: 574-582.

Cheung, F., Haas, B., Goldberg, S., May, G., Xiao, Y. und Town, C. (2006). "Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology." *BMC Genomics* **7**(1): 272.

Chiang, M.-K. und Melton, D. A. (2003). "Single-Cell Transcript Analysis of Pancreas Development." *Developmental cell* **4**(3): 383-393.

Chumakov, K. M. (1994). "Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation." *Genome Research* **4**(1): 62-64.

Cole, H. H. und Hart, G. H. (1930). "The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat." *American Journal of Physiology* **93**(1): 57-68.

Collins, T. J. (2007). "ImageJ for microscopy." *BioTechniques* **43**(1): 25-30.

Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., . . . Reik, W. (2002). "Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth." *Nature* **417**(6892): 945-948.

Cooper, W. N., Luharia, A., Evans, G. A., Raza, H., Haire, A. C., Grundy, R., . . . Maher, E. R. (2005). "Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome." *European Journal of Human Genetics* **13**(9): 1025-1032.

Copp, A. J. (1978). "Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst: I. A study of cellular proliferation." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **48**(1): 109-125.

Corcoran, D., Fair, T., Park, S., Rizos, D., Patel, O. V., Smith, G. W., . . . Lonergan, P. (2006). "Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos." *Reproduction* **131**(4): 651-660.

Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., . . . Bellacosa, A. (2011). "Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair." *Cell* **146**(1): 67-79.

D'Anna, J. A., Jr. und Isenberg, I. (1974). "A Histone Cross-Complexing Pattern." *Biochemistry* **13**: 4992 - 4997.

Davies, M. J., Moore, V. M., Willson, K. J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., . . . Chan, A. (2012). "Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects." *New England Journal of Medicine* **366**(19): 1803-1813.

Dawlaty, Meelad M., Ganz, K., Powell, Benjamin E., Hu, Y.-C., Markoulaki, S., Cheng, Albert W., . . . Jaenisch, R. (2011). "Tet1 Is Dispensable for Maintaining Pluripotency and Its Loss Is Compatible with Embryonic and Postnatal Development." *Cell Stem Cell* **9**(2): 166-175.

Daxinger, L. und Whitelaw, E. (2012). "Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals." *Nature Reviews Genetics* **13**(3): 153-162.

De Jonge, C. (2005). "Biological basis for human capacitation." *Human Reproduction Update* **11**(3): 205-214.

de Lamirande, E. und Gagnon, C. (1995). "Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects." *Human Reproduction* **10**(suppl 1): 15-21.

de Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J. A., Ferraretti, A. P., Korsak, V., . . . The European IVf-monitoring Consortium, f. t. E. S. o. H. R. a. E. (2010). "Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE." *Human Reproduction* **25**(8): 1851-1862.

de Pagter-Holthuizen, P., Jansen, M., van Schaik, F. M. A., van der Kammen, R., Oosterwijk, C., Van den Brande, J. L. und Sussenbach, J. S. (1987). "The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters." *FEBS Letters* **214**(2): 259-264.

de Waal, E., Yamazaki, Y., Ingale, P., Bartolomei, M., Yanagimachi, R. und McCarrey, J. R. (2012a). "Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(11): 4163-4168.

de Waal, E., Yamazaki, Y., Ingale, P., Bartolomei, M. S., Yanagimachi, R. und McCarrey, J. R. (2012b). "Gonadotropin stimulation contributes to an increased incidence of epimutations in ICSI-derived mice." *Human Molecular Genetics* **21**(20): 4460-4472.

DeChiara, T. M., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1991). "Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene." *Cell* **64**(4): 849-859.

Demple, B. und Harrison, L. (1994). "Repair of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology." *Annual Review of Biochemistry* **63**(1): 915-948.

Denomme, M. M., Zhang, L. und Mann, M. R. W. (2011). "Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition." *Fertility and Sterility* **96**(3): 734-738.e732.

Denslow, S. A. und Wade, P. A. (2007). "The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation." *Oncogene* **26**(37): 5433-5438.

DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., . . . Trent, J. M. (1996). "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer." *Nature Genetics* **14**(4): 457-460.

DeVeale, B., van der Kooy, D. und Babak, T. (2012). "Critical Evaluation of Imprinted Gene Expression by RNA-Seq: A New Perspective." *PLoS Genetics* **8**(3): e1002600.

Dianov, G. L., Prasad, R., Wilson, S. H. und Bohr, V. A. (1999). "Role of DNA Polymerase β in the Excision Step of Long Patch Mammalian Base Excision Repair." *Journal of Biological Chemistry* **274**(20): 13741-13743.

Diaz-Meyer, N., Day, C. D., Khatod, K., Maher, E. R., Cooper, W., Reik, W., . . . Higgins, M. J. (2003). "Silencing of *CDKN1C* (*p57KIP2*) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith–Wiedemann syndrome." *Journal of Medical Genetics* **40**(11): 797-801.

Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., . . . Gingeras, T. R. (2012). "Landscape of transcription in human cells." *Nature* **489**(7414): 101-108.

Doherty, A. S., Mann, M. R. W., Tremblay, K. D., Bartolomei, M. S. und Schultz, R. M. (2000). "Differential Effects of Culture on Imprinted *H19* Expression in the Preimplantation Mouse Embryo." *Biology of Reproduction* **62**(6): 1526-1535.

Donahue, L. R., Hrabe de Angelis, M., Hagn, M., Franklin, C., Lloyd, K. C. K., Magnuson, T., . . . Davisson, M. T. (2012). "Centralized mouse repositories." *Mammalian Genome* **23**(9-10): 559-571.

Dramanac, R., Labat, I., Brukner, I. und Crkvenjakov, R. (1989). "Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: Theory of the method." *Genomics* **4**(2): 114-128.

Druker, R., Brukner, T. J., Lehrbach, N. J. und Whitelaw, E. (2004). "Complex patterns of transcription at the insertion site of a retrotransposon in the mouse." *Nucleic Acids Research* **32**(19): 5800-5808.

Ecker, J. R., Bickmore, W. A., Barroso, I., Pritchard, J. K., Gilad, Y. und Segal, E. (2012). "Genomics: ENCODE explained." *Nature* **489**(7414): 52-55.

Edwards, C. A. und Ferguson-Smith, A. C. (2007). "Mechanisms regulating imprinted genes in clusters." *Current Opinion in Cell Biology* **19**(3): 281-289.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. und Jones, P. A. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* **429**(6990): 457-463.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., . . . Turner, S. (2009). "Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules." *Science* **323**(5910): 133-138.

El-Shershaby, A. M. und Hinchliffe, J. R. (1974). "Cell redundancy in the zona-intact preimplantation mouse blastocyst: a light and electron microscope study of dead cells and their fate." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **31**(3): 643-654.

El Hajj, N. (2011). Epimutations in Germ-Cell and Embryo Development: Possible Consequences for Assisted Reproduction. Würzburg, *Julius-Maximilians-Universität*. **PhD-Thesis**: 1-134.

El Hajj, N., Trapphoff, T., Linke, M., May, A., Hansmann, T., Kuhtz, J., . . . Haaf, T. (2011). "Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes." *Epigenetics* **6**(10): 1176-1188.

Ellegren, H. (2007). "Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**(1606): 1-10.

Engel, N., Thorvaldsen, J. L. und Bartolomei, M. S. (2006). "CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus." *Human Molecular Genetics* **15**(19): 2945-2954.

Engel, N., Tront, J. S., Erinle, T., Nguyen, N., Latham, K. E., Sapienza, C., . . . Liebermann, D. A. (2009). "Conserved DNA methylation in *Gadd45a*^{-/-} mice." *Epigenetics* **4**(2): 98-99.

Ertzeid, G. und Storeng, R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. **96**: 649-655.

Ertzeid, G. und Storeng, R. (2001). "The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice." *Human Reproduction* **16**(2): 221-225.

Eulalio, A., Huntzinger, E. und Izaurralde, E. (2008). "Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing." *Cell* **132**(1): 9-14.

Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoche, M.-A., Dandolo, L., Vaiman, D. und Jammes, H. (2007). "Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos." *BMC Developmental Biology* **7**(1): 116.

Fauque, P., Mondon, F., Letourneur, F., Ripoche, M.-A., Journot, L., Barboux, S., . . . Vaiman, D. (2010a). "In Vitro Fertilization and Embryo Culture Strongly Impact the Placental Transcriptome in the Mouse Model." *PLoS ONE* **5**(2): e9218.

Fauque, P., Ripoche, M.-A., Tost, J., Journot, L., Gabory, A., Busato, F., . . . Jammes, H. (2010b). "Modulation of imprinted gene network in placenta results in normal development of in vitro manipulated mouse embryos." *Human Molecular Genetics* **19**(9): 1779-1790.

Feki, N. C., Thérond, P., Couturier, M., Liméa, G., Legrand, A., Jouannet, P. und Auger, J. (2004). "Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus." *Molecular Human Reproduction* **10**(2): 137-142.

Feng, S., Jacobsen, S. E. und Reik, W. (2010). "Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development." *Science* **330**(6004): 622-627.

Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramírez, M. A., . . . Gutiérrez-Adán, A. (2004). "Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(16): 5880-5885.

Ficz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., . . . Reik, W. (2011). "Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation." *Nature* **473**(7347): 398-402.

Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., . . . Melnick, A. (2010). "Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation." *Cancer Cell* **18**(6): 553-567.

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A. und Pillai, R. S. (2005). "Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs." *Current Opinion in Structural Biology* **15**(3): 331-341.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.

Fisher, T. S., Darden, T. und Prasad, V. R. (2003). "Mutations Proximal to the Minor Groove-Binding Track of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Differentially Affect Utilization of RNA versus DNA as Template." *Journal of Virology* **77**(10): 5837-5845.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. und Solas, D. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." *Science* **251**(4995): 767-773.

Fortier, A. L., Lopes, F. L., Darricarrère, N., Martel, J. und Trasler, J. M. (2008). "Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta." *Human Molecular Genetics* **17**(11): 1653-1665.

Fossum, G., Davidson, A. und Paulson, R. (1989). "Ovarian hyperstimulation inhibits embryo implantation in the mouse." *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* **6**(1): 7-10.

Fraser, L. R., Adeoya-Osiguwa, S., Baxendale, R. W., Mededovic, S. und Osiguwa, O. O. (2005). "First Messenger Regulation of Mammalian Sperm Function via Adenyl Cyclase/cAMP." *Journal of Reproduction and Development* **51**(1): 37-46.

Fray, M. D. (2009a) in *Biological Methods for Archiving and Maintaining Mutant Laboratory Mice. Part I: Conserving Mutant Strains*. Methods in Molecular Biology (ed. E. J. Cartwright) Humana Press, **561**: 301-319.

Fray, M. D. (2009b) in *Biological Methods for Archiving and Maintaining Mutant Laboratory Mice. Part II: Recovery and Distribution of Conserved Mutant Strains*. Methods in Molecular Biology (ed. E. J. Cartwright) Humana Press, **561**: 321-332.

Friedberg, E. C., Walker, G. C. und Siede, W. (1994). DNA repair and mutagenesis. Washington, DC., ASM Press.

Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., . . . Paul, C. L. (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(5): 1827-1831.

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., . . . Dogliotti, E. (1996). "Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* **271**(16): 9573-9578.

Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., . . . Khaitovich, P. (2009). "Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics." *BMC Genomics* **10**(1): 161.

Fuentes, G. M., Fay, P. J. und Bambara, R. A. (1996). "Relationship between Plus Strand DNA Synthesis and Removal of Downstream Segments of Rna by Human Immunodeficiency Virus, Murine Leukemia Virus and Avian Myeloblastoma Virus Reverse Transcriptases." *Nucleic Acids Research* **24**(9): 1719-1726.

Fujimori, A., Matsuda, Y., Takemoto, Y., Hashimoto, Y., Kubo, E., Araki, R., . . . Muto, M. (1998). "Cloning and mapping of *Np95* gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation." *Mammalian Genome* **9**(12): 1032-1035.

Fung, H. und Demple, B. (2005). "A Vital Role for Ape1/Ref1 Protein in Repairing Spontaneous DNA Damage in Human Cells." *Molecular Cell* **17**(3): 463-470.

Gabory, A., Jammes, H. und Dandolo, L. (2010). "The *H19* locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development." *BioEssays* **32**(6): 473-480.

Gaiddon, C., Moorthy, N. C. und Prives, C. (1999). "Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 *in vivo*." *EMBO Journal* **18**(20): 5609-5621.

Gao, G., Orlova, M., Georgiadis, M. M., Hendrickson, W. A. und Goff, S. P. (1997). "Conferring RNA polymerase Activity to a DNA polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(2): 407-411.

Garnier, O., Laoueuillé-Duprat, S. und Spillane, C. (2008). "Genomic imprinting in plants." *Epigenetics* **3**(1): 14-20.

Georgiadis, M. M., Luo, M., Gaur, R. K., Delaplane, S., Li, X. und Kelley, M. R. (2008). "Evolution of the redox function in mammalian apurinic/apyrimidinic endonuclease." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **643**(1-2): 54-63.

Gerard, C. J., Olsson, K., Ramanathan, R., Reading, C. und Hanaia, E. G. (1998). "Improved Quantitation of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Plasmid-DNA Complementarity Determining Region III Standards." *Cancer Res* **58**(17): 3957-3964.

Geuns, E., De Rycke, M., Van Steirteghem, A. und Liebaers, I. (2003). "Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos." *Human Molecular Genetics* **12**(22): 2873-2879.

Ghildiyal, M. und Zamore, P. D. (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nature Reviews Genetics* **10**(2): 94-108.

Ginsburg, M., Snow, M. H. und McLaren, A. (1990). "Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation." *Development* **110**(2): 521-528.

Glenister, P. H., Whittingham, D. G. und Lyon, M. F. (1984). "Further studies on the effect of radiation during the storage of frozen 8-cell mouse embryos at -196°C ." *Journal of Reproduction and Fertility* **70**(1): 229-234.

Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J. und Freundl, G. (2005). "Definition and prevalence of subfertility and infertility." *Human Reproduction* **20**(5): 1144-1147.

Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., . . . Bestor, T. H. (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2." *Science* **311**(5759): 395-398.

Goyal, R., Reinhardt, R. und Jeltsch, A. (2006). "Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase." *Nucleic Acids Research* **34**(4): 1182-1188.

Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. und Enright, A. J. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." *Nucleic Acids Research* **36**(suppl 1): D154-D158.

Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z. und Lin, H. (2006). "A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells." *Genes & Development* **20**(13): 1709-1714.

Gruenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H. und Razin, A. (1981). "Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA." *FEBS Letters* **124**(1): 67-71.

Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H. und Rajewsky, K. (1994). "Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." *Science* **265**(5168): 103-106.

Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., . . . Xu, G.-L. (2011). "The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes." *Nature* **477**(7366): 606-610.

Guan, M., Marschall, S., Raspa, M., Pickard, A. R. und Fray, M. D. (2012). "Overview of new developments in and the future of cryopreservation in the laboratory mouse." *Mammalian Genome* **23**(9-10): 572-579.

Günther, K., Rust, M., Leers, J., Boettger, T., Scharfe, M., Jarek, M., . . . Renkawitz, R. (2013). "Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences." *Nucleic Acids Research* **41**(5): 3010-3021.

Guo, Junjie U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.-I. und Song, H. (2011). "Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain." *Cell* **145**(3): 423-434.

Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L. und Tobey, R. A. (1978). "Histone Phosphorylation and Chromatin Structure during Mitosis in Chinese Hamster Cells." *European Journal of Biochemistry* **84**(1): 1-15.

Hackett, J. A., Sengupta, R., Zylitz, J. J., Murakami, K., Lee, C., Down, T. A. und Surani, M. A. (2013). "Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine." *Science* **339**(6118): 448-452.

Hackett, J. A. und Surani, M. A. (2013). "DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**(1609).

Hackett, J. A., Zylitz, J. J. und Surani, M. A. (2012). "Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline." *Trends in Genetics* **28**(4): 164-174.

Haig, D. (2012). "Commentary: The epidemiology of epigenetics." *International Journal of Epidemiology* **41**(1): 13-16.

Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P. und Surani, M. A. (2010). "Genome-Wide Reprogramming in the Mouse Germ Line Entails the Base Excision Repair Pathway." *Science* **329**(5987): 78-82.

Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. und Ko, M. S. H. (2004). "Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development." *Developmental Cell* **6**(1): 117-131.

Han, L., Lee, D.-H. und Szabó, P. E. (2008). "CTCF Is the Master Organizer of Domain-Wide Allele-Specific Chromatin at the *H19/Igf2* Imprinted Region." *Molecular and Cellular Biology* **28**(3): 1124-1135.

Handyside, A. und Hunter, S. (1986). "Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation." *Roux's archives of developmental biology* **195**(8): 519-526.

Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N. und Kurinczuk, J. J. (2005). "Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review." *Human Reproduction* **20**(2): 328-338.

Hansen, M., Kurinczuk, J. J., Bower, C. und Webb, S. (2002). "The Risk of Major Birth Defects after Intracytoplasmic Sperm Injection and in Vitro Fertilization." *New England Journal of Medicine* **346**(10): 725-730.

Hanson, S., Kim, E. und Deppert, W. (2005). "Redox factor 1 (Ref-1) enhances specific DNA binding of p53 by promoting p53 tetramerization." *Oncogene* **24**(9): 1641-1647.

Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. und Tilghman, S. M. (2000). "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus." *Nature* **405**(6785): 486-489.

Hata, K., Okano, M., Lei, H. und Li, E. (2002). "Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice." *Development* **129**(8): 1983-1993.

Hayashi, K. und Surani, M. A. (2009). "Resetting the Epigenome beyond Pluripotency in the Germline." *Cell stem cell* **4**(6): 493-498.

Hebenstreit, D. (2012). "Methods, Challenges and Potentials of Single Cell RNA-seq." *Biology* **1**(3): 658-667.

Hendrich, B. und Bird, A. (1998). "Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins." *Molecular and Cellular Biology* **18**(11): 6538-6547.

Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V. A. und Bird, A. (2001). "Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development." *Genes & Development* **15**(6): 710-723.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R. (1993). "Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions." *Nature Biotechnology* **11**(9): 1026-1030.

Hirano, K.-I., Young, S. G., Farese, R. V., Jr., Ng, J., Sande, E., Warburton, C., . . . Davidson, N. O. (1996). "Targeted Disruption of the Mouse *apobec-1* Gene Abolishes Apolipoprotein B mRNA Editing and Eliminates Apolipoprotein B48." *The Journal of Biological Chemistry* **271**(17): 9887-9890.

Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R. und Sasaki, H. (2008). "Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development." *Genes & Development* **22**(12): 1607-1616.

Hirasawa, R. und Feil, R. (2010). "Genomic imprinting and human disease." *Essays in Biochemistry* **48**(1): 187-200.

Hiura, H., Obata, Y., Komiyama, J., Shirai, M. und Kono, T. (2006). "Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice." *Genes to Cells* **11**(4): 353-361.

Holt, W. V. (2000). "Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences." *Theriogenology* **53**(1): 47-58.

Holt, W. V. und Van Look, K. J. W. (2004). "Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality." *Reproduction* **127**(5): 527-535.

Hornett, E. und Wheat, C. (2012). "Quantitative RNA-Seq analysis in non-model species: assessing transcriptome assemblies as a scaffold and the utility of evolutionary divergent genomic reference species." *BMC Genomics* **13**(1): 361.

Hoshino, T. und Inagaki, F. (2012). "Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR." *Systematic and Applied Microbiology* **35**(6): 390-395.

Hotchkiss, R. D. (1948). "The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography." *The Journal of Biological Chemistry* **175**(1): 315-332.

Houshdaran, S., Cortessis, V. K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P. W. und Sokol, R. Z. (2007). "Widespread Epigenetic Abnormalities Suggest a Broad DNA Methylation Erasure Defect in Abnormal Human Sperm." *PLoS ONE* **2**(12): e1289.

Howlett, S. K. und Bolton, V. N. (1985). "Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **87**(1): 175-206.

Howorka, S., Cheley, S. und Bayley, H. (2001). "Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores." *Nature Biotechnology* **19**(7): 636-639.

Huang, S. Y., Barnard, M. B., Xu, M., Matsui, S., Rose, S. M. und Garrard, W. T. (1986). "The active immunoglobulin kappa chain gene is packaged by non-ubiquitin-conjugated nucleosomes." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **83**(11): 3738-3742.

Huang, Y., Pastor, W. A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R. und Rao, A. (2010). "The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing." *PLoS ONE* **5**(1): e8888.

Huck-Hui, N. und Bird, A. (1999). "DNA methylation and chromatin modification." *Current Opinion in Genetics & Development* **9**(2): 158-163.

- Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C. und Zhang, Y. (2011). "Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development." *Cell Research* **21**(12): 1670-1676.
- Inoue, A. und Zhang, Y. (2011). "Replication-Dependent Loss of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Preimplantation Embryos." *Science* **334**(6053): 194.
- Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G. P. und Szabó, P. E. (2011). "Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **108**(9): 3642-3647.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., . . . Feinberg, A. P. (2009). "The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores." *Nature Genetics* **41**(2): 178-186.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. und Zhang, Y. (2010). "Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification." *Nature* **466**(7310): 1129-1133.
- Ito, Y., Nativio, R. und Murrell, A. (2013). "Induced DNA demethylation can reshape chromatin topology at the *IGF2-H19* locus." *Nucleic Acids Research* **41**(10): 5290-5302.
- Janic, A., Mendizabal, L., Llamazares, S., Rossell, D. und Gonzalez, C. (2010). "Ectopic Expression of Germline Genes Drives Malignant Brain Tumor Growth in *Drosophila*." *Science* **330**(6012): 1824-1827.
- Janowski, B. A., Huffman, K. E., Schwartz, J. C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D. S., . . . Corey, D. R. (2006). "Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing." *Nature Structural & Molecular Biology* **13**(9): 787-792.
- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S. und Prives, C. (1997). "Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53." *Genes & Development* **11**(5): 558-570.
- Jeong, K.-S. und Lee, S. (2005). "Estimating the total mouse DNA methylation according to the B1 repetitive elements." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **335**(4): 1211-1216.
- Jin, S.-G., Guo, C. und Pfeifer, G. P. (2008). "GADD45A Does Not Promote DNA Demethylation." *PLoS Genetics* **4**(3): e1000013.

Jobim, M. I. M., Oberst, E. R., Salbego, C. G., Souza, D. O., Wald, V. B., Tramontina, F. und Mattos, R. C. (2004). "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability." *Theriogenology* **61**(2): 255-266.

Juriscicova, A., Latham, K. E., Casper, R. F. und Varmuza, S. L. (1998). "Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development." *Molecular Reproduction and Development* **51**(3): 243-253.

Kaji, K., Caballero, I. M., MacLeod, R., Nichols, J., Wilson, V. A. und Hendrich, B. (2006). "The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells." *Nature Cell Biology* **8**(3): 285-292.

Källén, B., Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G. und Otterblad Olausson, P. (2010). "Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years." *Human Reproduction* **25**(4): 1026-1034.

Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E. und Sasaki, H. (2004). "Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting." *Nature* **429**(6994): 900-903.

Katkov, I. I. und Mazur, P. (1998). "Influence of Centrifugation Regimes on Motility, Yield, and Cell Associations of Mouse Spermatozoa." *Journal of Andrology* **19**(2): 232-241.

Kaufman, M. H. (1992). *The Atlas of Mouse Development*. New York, Academic Press.

Keverne, E. B. und Curley, J. P. (2008). "Epigenetics, brain evolution and behaviour." *Frontiers in Neuroendocrinology* **29**(3): 398-412.

Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W. und Feil, R. (2001). "Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expression of Imprinted Genes." *Biol Reprod* **64**(3): 918-926.

Khoureiry, R., Ibalá-Rhondane, S., Méry, L., Blachère, T., Guérin, J. F., Lornage, J. und Lefèvre, A. (2008). "Dynamic CpG methylation of the *KCNQ10T1* gene during maturation of human oocytes." *Journal of Medical Genetics* **45**(9): 583-588.

Kidane, D., Dalal, S., Keh, A., Liu, Y., Zelterman, D. und Sweasy, J. B. (2011). "DNA polymerase beta is critical for genomic stability of sperm cells." *DNA Repair* **10**(4): 390-397.

- Kidane, D., Jonason, A. S., Gorton, T. S., Mihaylov, I., Pan, J., Keeney, S., . . . Sweasy, J. B. (2010). "DNA polymerase β is critical for mouse meiotic synapsis." *EMBO Journal* **29**(2): 410-423.
- Kim, E.-D. und Sung, S. (2012). "Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks." *Trends in plant science* **17**(1): 16-21.
- Kläver, R., Bleiziffer, A., Redmann, K., Mallidis, C., Kliesch, S. und Gromoll, J. (2012). "Routine cryopreservation of spermatozoa is safe — Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29**(9): 943-950.
- Knight, J. und Abbott, A. (2002). "Mouse genetics: Full house." *Nature* **417**(6891): 785-786.
- Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., . . . Arima, T. (2007). "Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients." *Human Molecular Genetics* **16**(21): 2542-2551.
- Kobayashi, H., Suda, C., Abe, T., Kohara, Y., Ikemura, T. und Sasaki, H. (2006). "Bisulfite sequencing and dinucleotide content analysis of 15 imprinted mouse differentially methylated regions (DMRs): paternally methylated DMRs contain less CpGs than maternally methylated DMRs." *Cytogenetic and Genome Research* **113**(1-4): 130-137.
- Koh, K. P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., . . . Rao, A. (2011). "Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells." *Cell Stem Cell* **8**(2): 200-213.
- Kohda, T., Ogonuki, N., Inoue, K., Furuse, T., Kaneda, H., Suzuki, T., . . . Ishino, F. (2011). "Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **410**(2): 282-288.
- Kornberg, R. D. und Thonmas, J. O. (1974). "Chromatin Structure: Oligomers of the Histones." *Science* **184**(4139): 865-868.
- Kotzot, D., Schmitt, S., Bernasconi, F., Robinson, W. P., Lurie, I. W., Ilyina, H., . . . Schinzel, A. (1995). "Uniparental disomy 7 in Silver—Russell syndrome and primordial growth retardation." *Human Molecular Genetics* **4**(4): 583-587.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* **128**(4): 693-705.

Kraytsberg, Y. und Khrapko, K. (2005). "Single-molecule PCR: an artifact-free PCR approach for the analysis of somatic mutations." *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**(5): 809-815.

Ku, M., Koche, R. P., Rheinbay, E., Mendenhall, E. M., Endoh, M., Mikkelsen, T. S., . . . Bernstein, B. E. (2008). "Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains." *PLoS Genetics* **4**(10): e1000242.

Kulpa, D., Topping, R. und Telesnitsky, A. (1997). "Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors." *EMBO Journal* **16**(4): 856-865.

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K. und Saitou, M. (2008). "Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice." *Genes & Development* **22**(12): 1617-1635.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**(6824): 116-120.

Lai, A. Y. und Wade, P. A. (2011). "Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex." *Nature Reviews Cancer* **11**(8): 588-596.

Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J. und Reik, W. (2003). "Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse." *genesis* **35**(2): 88-93.

Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., . . . Jansen, J. H. (2009). "Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes." *Nature Genetics* **41**(7): 838-842.

Larsen, D. H., Poinsignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M. R., Hari, F. J., . . . Lukas, J. (2010). "The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage." *The Journal of Cell Biology* **190**(5): 731-740.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., . . . Hogan, B. L. (1999). "Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." *Genes & Development* **13**(4): 424-436.

Lee, J. T. (2010). "The X as Model for RNA's Niche in Epigenomic Regulation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(9).

Leeb, M. und Wutz, A. (2012). "Establishment of epigenetic patterns in development." *Chromosoma* **121**(3): 251-262.

Lei, H., Oh, S. P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K. A., Jaenisch, R. und Li, E. (1996). "De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells." *Development* **122**(10): 3195-3205.

Levinger, L. und Varshavsky, A. (1982). "Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the drosophila genome." *Cell* **28**(2): 375-385.

Li, E., Bestor, T. H. und Jaenisch, R. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* **69**(6): 915-926.

Li, Q., Fazly, A. M., Zhou, H., Huang, S., Zhang, Z. und Stillman, B. (2009). "The Elongator Complex Interacts with PCNA and Modulates Transcriptional Silencing and Sensitivity to DNA Damage Agents." *PLoS Genetics* **5**(10): e1000684.

Li, T., Vu, T. H., Ulaner, G. A., Littman, E., Ling, J.-Q., Chen, H.-L., . . . Hoffman, A. R. (2005). "IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an *Igf2-H19* imprinting epigenetic switch." *Molecular Human Reproduction* **11**(9): 631-640.

Li, X. und Wang, X. (2000). "Application of real-time polymerase chain reaction for the quantitation of interleukin-1beta mRNA upregulation in brain ischemic tolerance." *Brain Research Protocols* **5**(2): 211-217.

Ljungquist, S., Andersson, A. und Lindahl, T. (1974). "A Mammalian Endonuclease Specific for Apurinic Sites in Double-stranded Deoxyribonucleic Acid: II. FURTHER STUDIES ON THE SUBSTRATE SPECIFICITY." *Journal of Biological Chemistry* **249**(5): 1536-1540.

Ljungquist, S. und Lindahl, T. (1974). "A Mammalian Endonuclease Specific for Apurinic Sites in Double-stranded Deoxyribonucleic Acid: I. PURIFICATION AND GENERAL PROPERTIES." *Journal of Biological Chemistry* **249**(5): 1530-1535.

Lloyd, V. (2000). "Parental Imprinting in *Drosophila*." *Genetica* **109**(1-2): 35-44.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. und Richmond, T. J. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.

Luo, L., Salunga, R. C., Guo, H., Bittner, A., Joy, K. C., Galindo, J. E., . . . Erlander, M. G. (1999). "Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes." *Nature Medicine* **5**(1): 117-122.

Lyon, M. F. (1961). "Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.)." *Nature* **190**(4773): 372-373.

Maatouk, D. M., Kellam, L. D., Mann, M. R. W., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M. S. und Resnick, J. L. (2006). "DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages." *Development* **133**(17): 3411-3418.

Mahadevan, L. C., Willis, A. C. und Barratt, M. J. (1991). "Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors." *Cell* **65**(5): 775-783.

Mandel, J. L. und Chambon, P. (1979). "DNA methylation: organ specific variations in the methylation pattern within and around ovalbumin and other chicken genes." *Nucleic Acids Research* **7**(8): 2081-2103.

Mann, M. R. W., Lee, S. S., Doherty, A. S., Verona, R. I., Nolen, L. D., Schultz, R. M. und Bartolomei, M. S. (2004). "Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture." *Development* **131**(15): 3727-3735.

Margueron, R., Trojer, P. und Reinberg, D. (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" *Current Opinion in Genetics & Development* **15**(2): 163-176.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., . . . Rothberg, J. M. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature* **437**(7057): 376-380.

Market-Velker, B. A., Zhang, L., Magri, L. S., Bonvissuto, A. C. und Mann, M. R. W. (2010). "Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner." *Human Molecular Genetics* **19**(1): 36-51.

Market Velker, B. A., Denomme, M. M. und Mann, M. R. W. (2012). "Loss of Genomic Imprinting in Mouse Embryos with Fast Rates of Preimplantation Development in Culture." *Biology of Reproduction* **86**(5): 143, 141-116.

Marques, C. J., Carvalho, F., Sousa, M. und Barros, A. (2004). "Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis." *The Lancet* **363**(9422): 1700-1702.

Marques, C. J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A. und Sousa, M. (2010). "Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa." *Fertility and Sterility* **94**(2): 585-594.

Marschall, S. und Hrabé de Angelis, M. (1999). "Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space." *Trends in Genetics* **15**(4): 128-131.

Matsumoto, Y. und Kim, K. (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair." *Science* **269**(5224): 699-702.

May, A., Kirchner, R., Müller, H., Hartmann, P., El Hajj, N., Tresch, A., . . . Haaf, T. (2009). "Multiplex RT-PCR Expression Analysis of Developmentally Important Genes in Individual Mouse Preimplantation Embryos and Blastomeres." *Biology of Reproduction* **80**(1): 194-202.

Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. und Haaf, T. (2000). "Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome." *Nature* **403**(6769): 501-502.

McGhee, J. D. und Ginder, G. D. (1979). "Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken [beta]-globin genes." *Nature* **280**(5721): 419-420.

McGrath, J. und Solter, D. (1984). "Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes." *Cell* **37**(1): 179-183.

McLaren, A. und Lawson, K. A. (2005). "How is the mouse germ-cell lineage established?" *Differentiation* **73**(9-10): 435-437.

Meagher, R. B. (2010). "The Evolution of Epitype." *The Plant Cell Online* **22**(6): 1658-1666.

Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S. und Jackson, S. P. (2010). "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining." *Nature Structural and Molecular Biology* **17**(99): 1144-1151.

Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D. und Hess, J. L. (2002). "MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters." *Molecular Cell* **10**(5): 1107-1117.

Misro, M. M., Choudhury, L., Upreti, K., Gautam, D., Chaki, S. P., Mahajan, A. S. und Babbar, R. (2004). "Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile." *International Journal of Andrology* **27**(2): 82-87.

Mizutani, S., Boettiger, D. und Temin, H. M. (1970). "A DNA-dependent DNA Polymerase and a DNA Endonuclease in Virions of Rous Sarcoma Virus." *Nature* **228**(5270): 424-427.

Moore, T. und Haig, D. (1991). "Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war." *Trends in Genetics* **7**(2): 45-49.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., . . . Levine, Ross L. (2011). "Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation." *Cancer Cell* **20**(1): 11-24.

Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W. und Petersen-Mahrt, S. K. (2004). "Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues: IMPLICATIONS FOR EPIGENETIC REPROGRAMMING." *The Journal of Biological Chemistry* **279**(50): 52353-52360.

Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W. und Reik, W. (2005). "Epigenetic reprogramming in mammals." *Human Molecular Genetics* **14**(suppl 1): R47-R58.

Morgan, H. D., Sutherland, H. G. E., Martin, D. I. K. und Whitelaw, E. (1999). "Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse." *Nature Genetics* **23**(3): 314-318.

Morison, I. M., Ramsay, J. P. und Spencer, H. G. (2005). "A census of mammalian imprinting." *Trends in Genetics* **21**(8): 457-465.

Morrison, J. R., Pászty, C., Stevens, M. E., Hughes, S. D., Forte, T., Scott, J. und Rubin, E. M. (1996). "Apolipoprotein B RNA editing enzyme-deficient mice are viable despite alterations in lipoprotein metabolism." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **93**(14): 7154-7159.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. und Honjo, T. (2000). "Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme." *Cell* **102**(5): 553-563.

Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. und Honjo, T. (1999). "Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells." *The Journal of Biological Chemistry* **274**(26): 18470-18476.

Murrell, A., Heeson, S. und Reik, W. (2004). "Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops." *Nature Genetics* **36**(8): 889-893.

Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. und Behringer, R. (2002). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Nakagata, N. (2000). "Cryopreservation of mouse spermatozoa." *Mammalian Genome* **11**(7): 572-576.

Nakagata, N. und Takeshima, T. (1992). "High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation." *Theriogenology* **37**(6): 1283-1291.

Nakagata, N. und Takeshima, T. (1993). "Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains." *Jikken dobutsu. Experimental animals* **42**(3): 317-320.

Nakamura, J. und Swenberg, J. A. (1999). "Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues." *Cancer Research* **59**(11): 2522-2526.

Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S.-Y., Kow, Y. W. und Swenberg, J. A. (1998). "Highly Sensitive Apurinic/Apyrimidinic Site Assay Can Detect Spontaneous and Chemically Induced Depurination under Physiological Conditions." *Cancer Research* **58**(2): 222-225.

Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., . . . Nakano, T. (2007). "PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis." *Nature Cell Biology* **9**(1): 64-71.

Nakamura, T., Liu, Y.-J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., . . . Nakano, T. (2012). "PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos." *Nature* **486**(7403): 415-419.

Nakayama, J.-i., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. und Grewal, S. I. S. (2001). "Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly." *Science* **292**(5514): 110-113.

Nanney, D. L. (1957). "Epigenetic control systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**: 712.

Navaratnam, N., Morrison, J. R., Bhattacharya, S., Patel, D., Funahashi, T., Giannoni, F., . . . Scott, J. (1993). "The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase." *The Journal of Biological Chemistry* **268**(28): 20709-20712.

- Negrón-Pérez, V. M., Echevarría, F. D., Huffman, S. R. und Rivera, R. M. (2013). "Determination of Allelic Expression of *H19* in Pre- and Peri-Implantation Mouse Embryos." *Biology of Reproduction* **88**(4): 97.
- Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., . . . Meehan, R. R. (2012). "Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes." *Genome Research* **22**(3): 467-477.
- Nishizono, H., Shioda, M., Takeo, T., Irie, T. und Nakagata, N. (2004). "Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing Is Related to Cellular Injury." *Biology of Reproduction* **71**(3): 973-978.
- Nonchev, S. und Tsanev, R. (1990). "Protamine-histone replacement and DNA replication in the male mouse pronucleus." *Molecular Reproduction and Development* **25**(1): 72-76.
- Nycz, C. M., Dean, C. H., Haaland, P. D., Spargo, C. A. und Walker, G. T. (1998). "Quantitative Reverse Transcription Strand Displacement Amplification: Quantitation of Nucleic Acids Using an Isothermal Amplification Technique." *Analytical Biochemistry* **259**(2): 226-234.
- O'Neill, M. J. (2005). "The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals." *Human Molecular Genetics* **14**(suppl 1): R113-R120.
- Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Maw, M. A., . . . Reeve, A. E. (1993). "Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour." *Nature* **362**(6422): 749-751.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T. und Saitou, M. (2009). "A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice." *Cell* **137**(3): 571-584.
- Ohno, S. (1972). "So much "junk" DNA in our genome." *Brookhaven symposia in biology* **23**: 366-370.
- Ohno, S., Kaplan, W. D. und Kinosita, R. (1959). "Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*." *Experimental Cell Research* **18**(2): 415-418.
- Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T. und Zhang, Y. (2010). "A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation." *Nature* **463**(7280): 554-558.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. und Li, E. (1999). "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell* **99**(3): 247-257.

Okano, M., Xie, S. und Li, E. (1998a). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nature Genetics* **19**(3): 219-220.

Okano, M., Xie, S. und Li, E. (1998b). "Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells." *Nucleic Acids Research* **26**(11): 2536-2540.

Olek, A., Oswald, J. und Walter, J. (1996). "A Modified and Improved Method for Bisulphite Based Cytosine Methylation Analysis." *Nucleic Acids Research* **24**(24): 5064-5066.

Olsen, A.-K., Lindeman, B., Wiger, R., Duale, N. und Brunborg, G. (2005). "How do male germ cells handle DNA damage?" *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**(2, Supplement): 521-531.

Orgel, L. E. und Crick, F. H. C. (1980). "Selfish DNA: the ultimate parasite." *Nature* **284**(5757): 604-607.

Ostermeier, G. C., Wiles, M. V., Farley, J. S. und Taft, R. A. (2008). "Conserving, Distributing and Managing Genetically Modified Mouse Lines by Sperm Cryopreservation." *PLoS ONE* **3**(7): e2792.

Pask, A., Papenfuss, A., Ager, E., McColl, K., Speed, T. und Renfree, M. (2009). "Analysis of the platypus genome suggests a transposon origin for mammalian imprinting." *Genome Biology* **10**(1): R1.

Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., . . . Rao, A. (2011). "Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells." *Nature* **473**(7347): 394-397.

Payer, B., Saitou, M., Barton, S. C., Thresher, R., Dixon, J. P. C., Zahn, D., . . . Surani, M. A. (2003). "stella Is a Maternal Effect Gene Required for Normal Early Development in Mice." *Current Biology* **13**(23): 2110-2117.

Paynton, B. V., Rempel, R. und Bachvarova, R. (1988). "Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse." *Developmental Biology* **129**(2): 304-314.

Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H. und Kraut, J. (1994). "Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP." *Science* **264**(5167): 1891-1903.

Pfaffl, M. W. (2004) in *Quantification strategies in real-time PCR. A-Z of quantitative PCR* (ed. S. A. Bustin) *Intl Univ Line* La Jolla: 87-112.

Pikó, L. und Clegg, K. B. (1982). "Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos." *Developmental Biology* **89**(2): 362-378.

Polo, S. E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y. und Jackson, S. P. (2010). "Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4." *EMBO Journal* **29**(18): 3130-3139.

Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B. und Gromoll, J. (2010). "Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of *MEST* and *IGF2/H19 ICR1*." *International Journal of Andrology* **33**(4): 642-649.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., . . . Reik, W. (2010). "Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency." *Nature* **463**(7284): 1101-1105.

Potter, J., Zheng, W. und Lee, J. (2003). Thermal stability and cDNA synthesis capability of SuperScript™ III reverse transcriptase, *Focus*®.

Prunell, A., Kornberg, R., Lutter, L., Klug, A., Levitt, M. und Crick, F. (1979). "Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin." *Science* **204**(4395): 855-858.

Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, Cécile K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., . . . Bernard, Olivier A. (2011). "TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis." *Cancer Cell* **20**(1): 25-38.

Raffoul, J. J., Cabelof, D. C., Nakamura, J., Meira, L. B., Friedberg, E. C. und Heydari, A. R. (2004). "Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE/REF-1) Haploinsufficient Mice Display Tissue-specific Differences in DNA Polymerase β -Dependent Base Excision Repair." *Journal of Biological Chemistry* **279**(18): 18425-18433.

Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E. und Feinberg, A. P. (1993). "Relaxation of imprinted genes in human cancer." *Nature* **362**(6422): 747-749.

Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T. und Kandel, Eric R. (2012). "A Role for Neuronal piRNAs in the Epigenetic Control of Memory-Related Synaptic Plasticity." *Cell* **149**(3): 693-707.

Rakyan, V. K., Blewitt, M. E., Druker, R., Preis, J. I. und Whitelaw, E. (2002). "Metastable epialleles in mammals." *Trends in Genetics* **18**(7): 348-351.

Rakyan, V. K., Chong, S., Champ, M. E., Cuthbert, P. C., Morgan, H. D., Luu, K. V. K. und Whitelaw, E. (2003). "Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine *Axin^{Fu}* allele occurs after maternal and paternal transmission." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(5): 2538-2543.

Ramírez, J. und Hagman, J. (2009). "The Mi-2/NuRD complex: A critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer." *Epigenetics* **4**(8): 532-536.

Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P. und Jaenisch, R. (2000). "Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(10): 5237-5242.

Rand, T. A., Ginalski, K., Grishin, N. V. und Wang, X. (2004). "Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**(40): 14385-14389.

Rasmussen, R. (2001) in *Quantification on the LightCycler. Rapid Cycle Real-time PCR* (ed. S. Meuer, C. Wittwer und K. Nakagawara) *Methods and Applications Springer Press Heidelberg*: 21-34.

Razin, A. und Cedar, H. (1994). "DNA methylation and genomic imprinting." *Cell* **77**(4): 473-476.

Reese, K. J., Lin, S., Verona, R. I., Schultz, R. M. und Bartolomei, M. S. (2007). "Maintenance of Paternal Methylation and Repression of the Imprinted *H19* Gene Requires MBD3." *PLoS Genetics* **3**(8): e137.

Reik, W. und Walter, J. (2001a). "Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote." *Nature Genetics* **27**(3): 255-256.

Reik, W. und Walter, J. (2001b). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." *Nature Reviews Genetics* **2**(1): 21-32.

Renfree, M. B., Hore, T. A., Shaw, G., Marshall Graves, J. A. und Pask, A. J. (2009). "Evolution of Genomic Imprinting: Insights from Marsupials and Monotremes." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**(1): 241-262.

Reynolds, N., Latos, P., Hynes-Allen, A., Loos, R., Leaford, D., O'Shaughnessy, A., . . . Hendrich, B. (2012). "NuRD Suppresses Pluripotency Gene Expression to Promote Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment." *Cell stem cell* **10**(5): 583-594.

Rimm, A. A., Katayama, A. C., Diaz, M. und Katayama, K. P. (2004). "A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **21**(12): 437-443.

Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A., . . . Chang, H. Y. (2007). "Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs." *Cell* **129**(7): 1311-1323.

Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J. M. und Martínez, E. A. (2006). "Factors influencing boar sperm cryosurvival." *Journal of Animal Science* **84**(10): 2692-2699.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M. und Nyrén, P. (1996). "Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release." *Analytical Biochemistry* **242**(1): 84-89.

Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Pàldi, A. und Viegas-Péquignot, E. (1998). "Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development." *Genes & Development* **12**(14): 2108-2113.

Russell, A. (1954). "A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples)." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **47**(12): 1040-1044.

Saito, M. und Ishikawa, F. (2002). "The mCpG-binding Domain of Human MBD3 Does Not Bind to mCpG but Interacts with NuRD/Mi2 Components HDAC1 and MTA2." *Journal of Biological Chemistry* **277**(38): 35434-35439.

Saitou, M., Barton, S. C. und Surani, M. A. (2002). "A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice." *Nature* **418**(6895): 293-300.

Saitou, M., Kagiwada, S. und Kurimoto, K. (2012). "Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells." *Development* **139**(1): 15-31.

Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J. und Foy, C. A. (2011). "Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification." *Analytical Chemistry* **83**(17): 6474-6484.

Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. und Dean, W. (2002). "Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo." *Developmental Biology* **241**: 172-182.

Santos, F., Peters, A. H., Otte, A. P., Reik, W. und Dean, W. (2005). "Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos." *Developmental Biology* **280**(1): 225-236.

Sanz, L. A., Chamberlain, S., Sabourin, J.-C., Henckel, A., Magnuson, T., Hugnot, J.-P., . . . Arnaud, P. (2008). "A mono-allelic bivalent chromatin domain controls tissue-specific imprinting at Grb10." *EMBO Journal* **27**(19): 2523-2532.

Sasaki, H. und Matsui, Y. (2008). "Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond." *Nature Reviews Genetics* **9**(2): 129-140.

Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T. und Arima, T. (2007). "Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes." *Human Reproduction* **22**(1): 26-35.

Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J. und Shimizu, K. (2011). "MicroRNAs and epigenetics." *FEBS Journal* **278**(10): 1598-1609.

Savage, T., Peek, J., Hofman, P. L. und Cutfield, W. S. (2011). "Childhood outcomes of assisted reproductive technology." *Human Reproduction* **26**(9): 2392-2400.

Saxonov, S., Berg, P. und Brutlag, D. L. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(5): 1412-1417.

Sayed, D. und Abdellatif, M. (2011). "MicroRNAs in Development and Disease." *Physiological Reviews* **91**(3): 827-887.

Schaaper, R. M., Kunkel, T. A. und Loeb, L. A. (1983). "Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**(2): 487-491.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. und Brown, P. O. (1995). "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray." *Science* **270**(5235): 467-470.

Schieve, L. A., Rasmussen, S. A. und Reefhuis, J. (2005). "Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data." *Fertility and Sterility* **84**(5): 1320-1324.

Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C. und Kouzarides, T. (2004). "Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes." *Nature Cell Biology* **6**(1): 73-77.

Schreuders, P. D., Jetton, A. E., Baker, J. L., Critser, J. K. und Mazur, P. (1996). "Mechanical and chill sensitivity of mouse sperm." *Cryobiology* **33**: 676-677.

Sealy, L. und Chalkley, R. (1978). "DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I." *Nucleic Acids Research* **5**(6): 1863-1876.

Seisenberger, S., Peat, J. R., Hore, T. A., Santos, F., Dean, W. und Reik, W. (2013). "Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**(1609).

Seki, S., Akiyama, K., Watanabe, S., Hatsushika, M., Ikeda, S. und Tsutsui, K. (1991a). "cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III." *Journal of Biological Chemistry* **266**(31): 20797-20802.

Seki, S., Ikeda, S., Watanabe, S., Hatsushika, M., Tsutsui, K., Akiyama, K. und Zhang, B. (1991b). "A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities: purification and characterization." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1079**(1): 57-64.

Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., . . . Saitou, M. (2007). "Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice." *Development* **134**(14): 2627-2638.

Selker, E. U. (1990). "DNA methylation and chromatin structure: a view from below." *Trends in Biochemical Sciences* **15**(3): 103-107.

- Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R. und Smith, M. L. (2002). "Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence." *Oncogene* **21**(5): 731-737.
- Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S.-i., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., . . . Koseki, H. (2007). "The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA." *Nature* **450**(7171): 908-912.
- Sharov, A. A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D. B., Qian, Y., VanBuren, V., . . . Ko, M. S. H. (2003). "Transcriptome Analysis of Mouse Stem Cells and Early Embryos." *PLoS Biology* **1**(3): e74.
- Shi, W. und Haaf, T. (2002). "Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure." *Molecular Reproduction and Development* **63**(3): 329-334.
- Sinsheimer, R. L. (1955). "The action of pancreatic deoxyribonuclease. II. Isomeric dinucleotides." *Journal of Biological Chemistry* **215**(2): 579-583.
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. und Aravin, A. A. (2011). "PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**(4): 246-258.
- Smeenk, G., Wiegant, W. W., Vrolijk, H., Solari, A. P., Pastink, A. und van Attikum, H. (2010). "The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage." *The Journal of Cell Biology* **190**(5): 741-749.
- Smith, P. E. und Engle, E. T. (1927). "Experimental evidence regarding the rôle of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system." *American Journal of Anatomy* **40**(2): 159-217.
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A. und Meissner, A. (2012). "A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo." *Nature* **484**(7394): 339-344.
- Songsasen, N. und Leibo, S. P. (1997). "Cryopreservation of Mouse Spermatozoa." *Cryobiology* **35**(3): 255-269.
- Sontag, L. B., Lorincz, M. C. und Georg Luebeck, E. (2006). "Dynamics, stability and inheritance of somatic DNA methylation imprints." *Journal of Theoretical Biology* **242**(4): 890-899.

- Spahn, L. und Barlow, D. (2003). "An ICE pattern crystallizes." *Nature Genetics* **35**(1): 11-12.
- Spiegelman, S., Burny, A., Das, M. R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. und Watson, K. (1970a). "DNA-directed DNA Polymerase Activity in Oncogenic RNA Viruses." *Nature* **227**(5262): 1029-1031.
- Spiegelman, S., Burny, A., Das, M. R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. und Watson, K. (1970b). "Synthetic DNA-RNA Hybrids and RNA-RNA Duplexes as Templates for the Polymerases of the Oncogenic RNA Viruses." *Nature* **228**(5270): 430-432.
- Srivastava, D. K., Vande Berg, B. J., Prasad, R., Molina, J. T., Beard, W. A., Tomkinson, A. E. und Wilson, S. H. (1998). "Mammalian Abasic Site Base Excision Repair: IDENTIFICATION OF THE REACTION SEQUENCE AND RATE-DETERMINING STEPS." *Journal of Biological Chemistry* **273**(33): 21203-21209.
- Step toe, P. C. und Edwards, R. G. (1976). "Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy." *The Lancet* **307**(7965): 880-882.
- Step toe, P. C. und Edwards, R. G. (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." *The Lancet* **312**(8085): 366.
- Strauss, G., Schurtenberger, P. und Hauser, H. (1986). "The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **858**(1): 169-180.
- Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y. und Koyama, H. (2000). "Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β ." *EMBO J* **19**(6): 1397-1404.
- Surani, M. A. (2001). "Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance." *Nature* **414**(6859): 122-128.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C. und Norris, M. L. (1984). "Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis." *Nature* **308**(5959): 548-550.
- Suzuki, S., Renfree, M. B., Pask, A. J., Shaw, G., Kobayashi, S., Kohda, T., . . . Ishino, F. (2005). "Genomic imprinting of *IGF2*, *p57^{KIP2}* and *PEG1/MEST* in a marsupial, the tammar wallaby." *Mechanisms of Development* **122**(2): 213-222.

- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J. und Morley, A. A. (1992). "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution." *BioTechniques* **13**(3): 444-449.
- Sztejn, J. M., Farley, J. S. und Mobraaten, L. E. (2000). "In Vitro Fertilization with Cryopreserved Inbred Mouse Sperm." *Biol Reprod* **63**(6): 1774-1780.
- Sztejn, J. M., Farley, J. S., Young, A. F. und Mobraaten, L. E. (1997). "Motility of Cryopreserved Mouse Spermatozoa Affected by Temperature of Collection and Rate of Thawing." *Cryobiology* **35**(1): 46-52.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F. und Leonhardt, H. (2010). "Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA." *Nucleic Acids Research* **38**(19): e181.
- Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K. und Ogawa, S. (1990). "Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol." *Journal of Reproduction and Fertility* **89**(2): 511-516.
- Taft, R. J., Pang, K. C., Mercer, T. R., Dinger, M. und Mattick, J. S. (2010). "Non-coding RNAs: regulators of disease." *The Journal of Pathology* **220**(2): 126-139.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., . . . Rao, A. (2009). "Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1." *Science* **324**(5929): 930-935.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* **126**(4): 663-676.
- Takai, D. und Jones, P. A. (2002). "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(6): 3740-3745.
- Takeo, T. und Nakagata, N. (2011). "Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 Mouse Sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin." *Biology of Reproduction* **85**(5): 1066-1072.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., . . . Surani, M. A. (2009). "mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell." *Nature Methods* **6**(5): 377-382.

Tao, J., Du, J., Kleinhans, F. W., Critser, E. S., Mazur, P. und Critser, J. K. (1995). "The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* **104**(2): 231-236.

Teng, B., Burant, C. F. und Davidson, N. O. (1993). "Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein." *Science* **260**(5115): 1816-1819.

The International Mouse Knockout Consortium (2007). "A Mouse for All Reasons." *Cell* **128**(1): 9-13.

Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J. A. und Clark, A. M. (2009). "Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis." *Human Reproduction* **24**(9): 2061-2070.

Thurston, L. M., Siggins, K., Mileham, A. J., Watson, P. F. und Holt, W. V. (2002). "Identification of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Markers Linked to Genes Controlling Boar Sperm Viability Following Cryopreservation." *Biology of Reproduction* **66**(3): 545-554.

Tippmann, S. C., Ivanek, R., Gaidatzis, D., Scholer, A., Hoerner, L., van Nimwegen, E., . . . Schübeler, D. (2012). "Chromatin measurements reveal contributions of synthesis and decay to steady-state mRNA levels." *Molecular Systems Biology* **8**.

Tomizawa, S.-i., Kobayashi, H., Watanabe, T., Andrews, S., Hata, K., Kelsey, G. und Sasaki, H. (2011). "Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes." *Development* **138**(5): 811-820.

Tost, J., Dunker, J. und Gut, I. G. (2003). "Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing." *BioTechniques* **35**(1): 152-156.

Tunc, O. und Tremellen, K. (2009). "Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **26**(9-10): 537-544.

Ueda, Y., Okano, M., Williams, C., Chen, T., Georgopoulos, K. und Li, E. (2006). "Roles for Dnmt3b in mammalian development: a mouse model for the ICF syndrome." *Development* **133**(6): 1183-1192.

van den Berg, D. L. C., Snoek, T., Mullin, N. P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., . . . Poot, R. A. (2010). "An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic Stem Cells." *Cell stem cell* **6**(4): 369-381.

Van der Auwera, I. und D'Hooghe, T. (2001). "Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development." *Human Reproduction* **16**(6): 1237-1243.

van Holde, K. E. (1988) in *Chromatin. Molecular Biology* (ed. A. Rich) Springer New York.

van Montfoort, A. P. A., Hanssen, L. L. P., de Sutter, P., Viville, S., Geraedts, J. P. M. und de Boer, P. (2012). "Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance." *Human Reproduction Update* **18**(2): 171-197.

Velando, A., Torres, R. und Alonso-Alvarez, C. (2008). "Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice." *Bioessays* **30**(11-12): 1212-1219.

Vincent, S. D., Dunn, N. R., Sciammas, R., Shapiro-Shalef, M., Davis, M. M., Calame, K., . . . Robertson, E. J. (2005). "The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse." *Development* **132**(6): 1315-1325.

Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. und Diekman, A. B. (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." *Journal of Reproductive Immunology* **53**(1): 133-150.

Vishwanath, R. und Shannon, P. (1997). "Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature." *Reproduction, fertility, and development* **9**(3): 321-331.

Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1999). "Digital PCR." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(16): 9236–9241.

Waddington, C. H. (1942). "The Epigenotype." *Endeavour* **1**: 18–20.

Walsh, C. P., Chaillet, J. R. und Bestor, T. H. (1998). "Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation." *Nature Genetics* **20**(2): 116-117.

Wan, L.-B. und Bartolomei, M. S. (2008) in *Regulation of Imprinting in Clusters: Noncoding RNAs Versus Insulators. Long-Range Control of Gene Expression* (ed. V. van Heyningen und R. E. Hill) Elsevier Publishing New York, NY, USA, **61**: 207-223.

Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W. und Orkin, S. H. (2006). "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." *Nature* **444**(7117): 364-368.

Wang, Z., Gerstein, M. und Snyder, M. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nature Reviews Genetics* **10**(1): 57-63.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M. und Schübeler, D. (2007). "Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome." *Nature Genetics* **39**(4): 457-466.

Webster, K. E., O'Bryan, M. K., Fletcher, S., Crewther, P. E., Aapola, U., Craig, J., . . . Scott, H. S. (2005). "Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **102**(11): 4068-4073.

Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A. und Allis, C. D. (1998). "Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(13): 7480-7484.

Weinhouse, C., Anderson, O. S., Jones, T. R., Kim, J., Liberman, S. A., Nahar, M. S., . . . Dolinoy, D. C. (2011). "An expression microarray approach for the identification of metastable epialleles in the mouse genome." *Epigenetics* **6**(9): 1105-1113.

Weksberg, R., Shuman, C. und Beckwith, J. B. (2009). "Beckwith-Wiedemann syndrome." *European Journal of Human Genetics* **18**(1): 8-14.

Whale, A. S., Huggett, J. F., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., . . . Scott, D. J. (2012). "Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation." *Nucleic Acids Research* **40**(11): e82-e82.

Whelan, J. A., Russell, N. B. und Whelan, M. A. (2003). "A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR." *Journal of Immunological Methods* **278**(1-2): 261-269.

Whittingham, D. G., Leibo, S. P. und Mazur, P. (1972). "Survival of Mouse Embryos Frozen to -196° and -269°C." *Science* **178**(4059): 411-414.

Wiedemann, H. R. (1964). "Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie. Un syndrome nouveau ?" *Journal de genétique humaine* **13**: 223-232.

Wilkins, J. F. und Haig, D. (2003). "What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression." *Nature Reviews Genetics* **4**(5): 359-368.

Willadsen, S. M., Janzen, R. E., McAlister, R. J., Shea, B. F., Hamilton, G. und McDermand, D. (1991). "The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle." *Theriogenology* **35**(1): 161-170.

Williams, C. und Sutcliffe, A. (2009). "Infant outcomes of assisted reproduction." *Early Human Development* **85**(11): 673-677.

Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M. T., Johansen, J. V., Cloos, P. A. C., Rappsilber, J. und Helin, K. (2011). "TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity." *Nature* **473**(7347): 343-348.

Wilmot, I. (1972) in *The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing*. Life sciences. Pt. 2: Biochemistry, general and molecular biology (ed. Pergamon Press New York, **11**: 1071-1079.

Wilson, K. J. I., T.M., S. und D.R., M. (2003). "Repair mechanisms for oxidative DNA damage." *Frontiers in Bioscience* **8**: d963–d981.

Wilstermann, A. M. und Osheroff, N. (2001). "Base Excision Repair Intermediates as Topoisomerase II Poisons." *Journal of Biological Chemistry* **276**(49): 46290-46296.

Woodcock, C. L. und Ghosh, R. P. (2010). "Chromatin Higher-order Structure and Dynamics." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(5).

Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., . . . Walter, J. (2010). "Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes." *EMBO Journal* **29**(11): 1877-1888.

Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., . . . Walter, J. (2011). "5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming." *Nature Communications* **2**: 241.

Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., . . . Zhang, Y. (2011). "Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells." *Genes & Development* **25**(7): 679-684.

Wu, S. C. und Zhang, Y. (2010). "Active DNA demethylation: many roads lead to Rome." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**(9): 607-620.

Wutz, A. und Jaenisch, R. (2000). "A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation." *Molecular Cell* **5**(4): 695-705.

Xanthoudakis, S. und Curran, T. (1992). "Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity." *EMBO Journal* **11**(2): 653–665.

Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. und Curran, T. (1992). "Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme." *EMBO Journal* **11**(9): 3323–3335.

Xanthoudakis, S., Smeyne, R. J., Wallace, J. D. und Curran, T. (1996). "The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(17): 8919-8923.

Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., . . . Shi, Yujiang G. (2011). "Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells." *Molecular Cell* **42**(4): 451-464.

Yamaguchi, M., Hirose, F., Hayashi, Y., Nishimoto, Y. und Matsukage, A. (1987). "Murine DNA polymerase beta gene: mapping of transcription initiation sites and the nucleotide sequence of the putative promoter region." *Molecular and Cellular Biology* **7**(5): 2012-2018.

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., . . . Saitou, M. (2008). "Critical function of *Prdm14* for the establishment of the germ cell lineage in mice." *Nature Genetics* **40**(8): 1016-1022.

Yamazaki, Y., Fujita, T. C., Low, E. W., Alarcón, V. B., Yanagimachi, R. und Marikawa, Y. (2006). "Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos." *Molecular Reproduction and Development* **73**(2): 180-188.

Yildirim, O., Li, R., Hung, J.-H., Chen, Poshen B., Dong, X., Ee, L.-S., . . . Fazio, Thomas G. (2011). "Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells." *Cell* **147**(7): 1498-1510.

Yildiz, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R., Liu, L. und McKerlie, C. (2007). "Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse." *Reproduction* **133**(3): 585-595.

Young, L. E., Fernandes, K., McEvoy, T. G., Butterwith, S. C., Gutierrez, C. G., Carolan, C., . . . Sinclair, K. D. (2001). "Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture." *Nature Genetics* **27**(2): 153-154.

Yu, I., Songsasen, N., Godke, R. A. und Leibo, S. P. (2002). "Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates." *Cryobiology* **44**(1): 62-78.

Yu, M., Hon, Gary C., Szulwach, Keith E., Song, C.-X., Zhang, L., Kim, A., . . . He, C. (2012). "Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome." *Cell* **149**(6): 1368-1380.

Yu, S.-L., Lee, S.-K., Johnson, R. E., Prakash, L. und Prakash, S. (2003). "The Stalling of Transcription at Abasic Sites Is Highly Mutagenic." *Molecular and Cellular Biology* **23**(1): 382-388.

Zhang, Y. und Li, Y. (2011). "The Expanding Mi-2/NuRD Complexes: A Schematic Glance." *Proteomics Insights* **3**: 79-109.

Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H. und Prives, C. (2001). "A role for p53 in base excision repair." *EMBO J* **20**(4): 914-923.

Zhu, J. L., Basso, O., Obel, C., Bille, C. und Olsen, J. (2006). "Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort." *BMJ* **333**: 679.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Histonmodifikationen der nukleosomalen Kernproteine.	3
Abbildung 2:	RNAi-vermittelte Regulation.	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung und Regulationsmodell des <i>H19-Igf2</i> Clusters.	10
Abbildung 4:	Entwicklung der genomischen Prägung während der Evolution einer Auswahl an Wirbeltieren.	12
Abbildung 5:	Reprogrammierung der DNA-Methylierung in der Säugetierentwicklung.	19
Abbildung 6:	Methodik der digitalen PCR am Beispiel von Embryonen im 2-Zellstadium.	37
Abbildung 7:	Vergleich der mRNA-Kopienzahl von Embryonen im 16-Zellstadium...	48
Abbildung 8:	Vergleich der mRNA-Kopienzahl von Embryonen im 16-Zellstadium...	50
Abbildung 9:	Whole Mount-Immunfluoreszenzfärbung.	52
Abbildung 10:	Gelelektrophoretische Analyse der digitalen PCR im Vorfeld der Pyrosequenzierung.	54
Abbildung 11:	Digitale Bisulfitpyrosequenzierung der DMR1 von <i>Snrpn</i>	55
Abbildung 12:	Digitale Bisulfitpyrosequenzierung der ICR des <i>H19-Igf2</i> -Locus.	58
Abbildung 13:	Digitale Bisulfitpyrosequenzierung der DMR von <i>Snrpn</i>	59
Abbildung 14:	Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten zum Einfluss der ovariellen Induktion für die ICR des <i>H19-Igf2</i> -Locus.	61

Abbildung 15:	Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten zum Einfluss der ovariellen Induktion für die DMR des <i>Snrpn</i> -Locus.	62
Abbildung 16:	Quantifizierung der Spermienmotilität.	63
Abbildung 17:	Quantifizierung der DNA-Methylierung der ICR des <i>H19-Igf2</i> -Locus in Spermienproben von 13 Männchen.	65
Abbildung 18:	Quantifizierung der DNA-Methylierung von <i>Igf2r</i> (<i>Air</i>) in Spermienproben von 13 Männchen.	66
Abbildung 19:	Quantifizierung der DNA-Methylierung der DMR von <i>Plagl1</i> in Spermienproben von 13 Männchen.	67
Abbildung 20:	Quantifizierung der DNA-Methylierung der DMR von <i>Snrpn</i> in Spermienproben von 13 Männchen.	68
Abbildung 21:	Quantifizierung der DNA-Methylierung des proximalen Promoters von <i>Oct4</i> in Spermienproben von 13 Männchen.	69
Abbildung 22:	Quantifizierung der DNA-Methylierung des B1-Elements in Spermienproben von 13 Männchen.	70
Abbildung 23:	Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von <i>H19</i> und <i>Snrpn</i>	70
Abbildung 24:	Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von <i>Igf2r</i> und <i>Oct4</i>	71
Abbildung 25:	Männchen 8 - Quantifizierung der DNA-Methylierung von B1-Element und <i>Plagl1</i>	71
Abbildung 26:	Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 6.	74
Abbildung 27:	Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 9.	76
Abbildung 28:	Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 11.....	78
Abbildung 29:	Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 13.	80

Abbildung 30: Ergebnisse der digitalen Bisulfitpyrosequenzierung bei IVF-Embryonen von Männchen 14.	82
Abbildung 31: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die ICR des <i>H19-Igf2</i> -Locus.....	83
Abbildung 32: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die DMR des <i>Snrpn</i> -Locus.	84
Abbildung 33: Zusammenfassung der DNA-Methylierungsdaten aller IVF-Zweizeller für die DMR des <i>Igf2r</i> -Locus (<i>Air</i>).....	85

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Humane Erkrankungen als Konsequenz gestörter genomischer Prägung	16
Tabelle 2:	Cytosinmodifikationen und involvierte Proteine.....	22
Tabelle 3:	Reaktionskomponenten in der qPCR.....	34
Tabelle 4:	Reaktionskomponenten in der MultiPlex PCR (4 Amplikons parallel).	38
Tabelle 5:	Reaktionskomponenten in der SinglePlex PCR.....	39
Tabelle 6:	Oligonukleotidsequenzen für RT-qPCR.....	42
Tabelle 7:	Oligonukleotidsequenzen für DNA-Methylierungsanalysen.	43
Tabelle 8:	Kandidatengene der Studien zur differentiellen Genexpression nach ovarieller Induktion.....	46
Tabelle 9:	Anzahl der untersuchten Embryonen in den zwei Vergleichsgruppen..	47
Tabelle 10:	Anzahl der untersuchten Embryonen in den zwei Vergleichsgruppen..	49
Tabelle 11:	Quantifizierung der Fluoreszenzintensität und Anteil der positiv gefärbten Blastomeren in den untersuchten Embryonenstadien.....	53
Tabelle 12:	Statistik zur digitalen Bisulfitpyrosequenzierung von 16-Zellern aus natürlich ovulierten sowie ovariell stimulierten Weibchen.....	57
Tabelle 13:	Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 6.....	72
Tabelle 14:	Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 9.....	75
Tabelle 15:	Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 11.....	77
Tabelle 16:	Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 13.....	79
Tabelle 17:	Zusammenfassung der Daten zu Männchen Nr. 14.....	81

6.3 Abkürzungsverzeichnis

5caC	5-Carboxycytosin
5fmC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5hmU	5-Hydroxymethyluracil
5mC	5-Methylcytosin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CCD-Kamera	<i>Charge-coupled Device</i> -Sensor basierende Kamera
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGI	<i>CpG island</i> (CpG-Insel)
cGy	centigray (0,01 Gy)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin (5'-3')
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpc	<i>days post conceptionem</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eCG	equines Choriongonadotropin
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
H ₂ O	bidest. doppelt destilliertes Wasser
hCG	humanes Choriongonadotropin
IAP	<i>Intracisternal A-type particle</i> (murines Retrotransposon)
ICM	Innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
i.d.R.	in der Regel

IE	Internationale Einheit
kb	Kilobasen
KO	<i>Knock-Out</i> (Nullmutation eines oder mehrerer Gene)
M	molar (Molarität, Stoffmengenkonzentration)
Mb	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NHGRI	<i>National Human Genome Research Institute</i>
O ₂	Sauerstoff
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
PGC	<i>primordial germ cell</i> (Primordiale Keimzellen)
qPCR	quantitative PCR (Real-time PCR)
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative PCR auf cDNA zur Genexpressionsmessung
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>

Anhang

TE	Tris-EDTA
TE	Trophektoderm
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel
vs.	Versus
w/v	Massenkonzentration
♀	weiblich
♂	männlich

6.4 Lebenslauf

6.5 Publikationen und Kongressteilnahmen

Publikationen:

Rieusset A, Schaller F, Unmehopa U, Matarazzo V, Watrin F, **Linke M**, Georges B, Bischof J, Dijkstra F, Bloemsma M, Corby S, Michel FJ, Wevrick R, Zechner U, Swaab D, Dudley K, Bezin L, Muscatelli F. (2013). "Stochastic Loss of Silencing of the Imprinted *Ndn/NDN* Allele, in a Mouse Model and Humans with Prader-Willi Syndrome, Has Functional Consequences" *PLoS Genetics* **9**(9): e1003752

Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, **Linke M**, Teufel A, Zechner U, Strand D, Thorgeirsson SS, Galle PR, Strand S. (2013). "SIRT6 dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in HCC patients." *Hepatology*. **58**(3): 1054–1064.

Held E, Salilew-Wondim D, **Linke M**, Zechner U, Rings F, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. (2013). "Transcriptome fingerprint of bovine 2-cell stage blastomeres is directly correlated with the individual developmental competence of the corresponding sister blastomere." *Biology of Reproduction*. **87**(6):154

Shao K, Koch C, Gupta MK, Lin Q, Lenz M, Laufs S, Denecke B, Schmidt M, **Linke M**, Hennies HC, Hescheler J, Zenke M, Zechner U, Šarić T, Wagner W. (2013). "Induced pluripotent mesenchymal stromal cell clones retain donor-derived differences in DNA methylation profiles." *Molecular Therapy*. **21**(1):240-50

Linke M, May A, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. (2013). "The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in mouse preimplantation embryos." *Cytogenetic and Genome Research*. **139**(2):71-79

Fatima A, Xu G, Shao K, Papadopoulos S, Lehmann M, Arnáiz-Cot JJ, Rosa AO, Nguemo F, Matzkies M, Dittmann S, Stone SL, **Linke M**, Zechner U, Beyer V, Hennies HC, Rosenkranz S, Klauke B, Parwani AS, Haverkamp W, Pfitzer G, Farr M, Cleemann L, Morad M, Milting H, Hescheler J, Saric T. (2011). "In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells." *Cellular Physiology and Biochemistry*. **28**(4):579-592

El Hajj N, Trapphoff T, **Linke M**, May A, Hansmann T, Kuhtz J, Reifenberg K, Heinzmann J, Niemann H, Daser A, Eichenlaub-Ritter U, Zechner U, Haaf T. (2011). "Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes." *Epigenetics*. **6**(10): 1176-1188

Kongressteilnahmen:

Linke M, Fischer K, Zechner U, Strand S. (2012). "Determining the role of SIRT6 as an epigenetic regulator of gene expression in hepatocytes" Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik, Nürnberg (Poster).

Linke M, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. (2011). "The effects of cryopreservation on mouse sperm: epigenetic analysis of sperm and offspring." 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Regensburg (Poster).

Linke M, May A, El Hajj N, Daser A, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. (2010). "Ovarian stimulation leads to downregulation of developmentally important reprogramming genes and aberrant imprinted gene methylation in mouse preimplantation embryos." 1.Tagung - Netzwerk für Reproduktionswissenschaften, Gießen (Poster).

Linke M, May A, El Hajj N, Daser A, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. (2010). "Ovarian stimulation leads to downregulation of developmentally important reprogramming genes and aberrant imprinted gene methylation in mouse preimplantation embryos." 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hamburg (Vortrag).

Linke M, El Hajj N, Hansmann T, May A, Atri S, Daser A, Zechner U, Haaf T. (2009). "Limiting dilution analysis of low amounts of bisulfite-modified DNA: representative methylation patterns from 10 oocytes and individual morula embryos." 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Aachen (Vortrag).

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Linke M, May A, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. (2013). "The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in mouse preimplantation embryos." *Cytogenetic and Genome Research* **139**(2):71-9

El Hajj N, Trapphoff T, **Linke M**, May A, Hansmann T, Kutzt J, Reifenberg K, Heinzmann J, Niemann H, Daser A, Eichenlaub-Ritter U, Zechner U, Haaf T. (2011). "Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes." *Epigenetics* **6**(10): 1176-1188