

**Gezielte Veränderungen von DNA Modifikationen in der
Mauszygote und deren Analyse im Zusammenhang der
epigenetischen Reprogrammierung und der präimplantiven
Entwicklung**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von
Sarah Fuchs

Saarbrücken
2017

Tag des Kolloquiums: 14.03.2018

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Jörn Walter
Prof. Dr. Uwe Walldorf

Vorsitz Prof. Dr. Uli Müller

Akad. Mitarbeiter: Dr. Björn Becker

„Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“

Albert Einstein

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörn Walter danken für die Ermöglichung meiner Dissertation, in der er mir ein hohes Maß an Freiheit und Vertrauen entgegengebracht hat, und für die Hinführung auf die sehr interessante Fragestellung meiner Doktorarbeit. Auch danke ich ihm für die hilfreichen Diskussionen und seine Unterstützung während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Dissertation.

Ein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wolf Reik für die zur Verfügungstellung der Konstrukte der cDNA von mTET3 und mTET1, auf welcher große Teile der Arbeit basieren.

Bei Konstantin Lepikhov möchte ich mich in besonderer Weise für die wertvolle Zusammenarbeit, die hilfreichen Gespräche und seine liebenswerte Art bedanken.

Des Weiteren danke ich Jie Lan für die schöne gemeinsame Doktorandenzeit und für seine stete Hilfsbereitschaft. Ebenso bei Pascal Giehr. Ihm danke ich für die tolle Unterstützung in Rat und Tat in Sachen Hairpin- Bisulfit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Judith Gottfreund dafür bedanken, dass sie während ihrer Bachelorarbeit und danach, so fleißig Amplikons generiert hat und mich damit unterstützt hat. Für hilfreiche Diskussionen und heitere Gespräche, auch fernab biologischer Themen, möchte ich mich herzlich bei Nina Gasparoni und Anna Tartakowski bedanken. Für die Erleichterung des Laboralltags möchte ich mich bei Christina LoPorto, Jasmin Kirch, Tabea Trampert, Katharina Faber und Beate Schmitt bedanken. Eva Dilly danke ich für die gute Pflege der Mäuse und die Hilfe bei Fragen „rund um die Maus“. Bei Sascha Tierling möchte ich mich für die gelungene Zusammenarbeit in der Lehre bedanken. Jil Gasparoni, Pavlo Lutsik, Karl Norström, Abdul Salhab danke ich für ihre Hilfe in bioinformatischen Fragen. Bei Nicole Jundel möchte ich mich herzlich für die Hilfe in bürokratischen Fragen und für die schönen Gespräche bedanken. Ich hoffe, es werden noch viele folgen.

Der gesamten Arbeitsgruppe und allen Ehemaligen danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die großartige Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, dass sie immer für mich da sind, an mich glauben und mich unbedingt und in jeder möglichen Weise unterstützen. Meinem Bruder danke ich von Herzen dafür, dass ich immer auf ihn zählen kann und wir so viel miteinander lachen können.

Timm danke ich aus tiefem Herzen, dass er an meiner Seite ist.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Epigenetik	1
1.2	Epigenetik und Differenzierung	2
1.3	DNA- Methylierung	3
1.4	Histonmodifikationen	6
1.5	TET Enzyme und die oxidierten Derivate von 5mC als regulative Ebene	7
1.5.1	Expression und Funktion der TET Enzyme	10
1.5.2	5hmC, 5fC und 5caC und ihre Aufgaben	12
1.6	Mechanismen der DNA Demethylierung	13
1.6.1	Passive, replikationsabhängige Demethylierung	14
1.6.2	Aktive, reparaturabhängige Demethylierung – Basenexzisionsreparatur und die Thymin DNA Glykosylase (TDG)	15
1.7	Reprogrammierung in der Mausentwicklung	21
1.7.1	Dynamik der DNA- Methylierung in der Mauszygote	24
1.7.2	DNA- Methylierungsdynamik vom 2-Zellembryo bis zur Blastozyste	27
1.7.3	Epigenetische Reprogrammierung in primordialen Keimzellen	30
1.8	Zielsetzung	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Antikörper	33
2.1.2	Chemikalien	33
2.1.3	Enzyme/Proteine	35
2.1.4	Geräte	36
2.1.5	Kulturmedien	37
2.1.6	Lösungen und Puffer	37
2.1.7	Oligonukleotide	38
2.1.8	Reaktionskits	39
2.1.9	Mäuse	40
2.1.10	Prokaryotische Zellen	40
2.1.11	cDNA	40
2.1.12	Plasmid	40
2.1.13	Software	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Klonieren der eGFP- Fusionsproteine	42

2.2.2	Plasmidisolierung	43
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)	43
2.2.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA oder <i>in vitro</i> transkribierter mRNA	44
2.2.5	DNA Aufreinigung	44
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	44
2.2.7	Schneiden der DNA mittels Restriktionsendonukleasen	44
2.2.8	Ligation	45
2.2.9	Transformation	45
2.2.10	Kontrolle der Klonierungsstellen	45
2.2.11	<i>In vitro</i> Transkription	45
2.2.12	Experimentelles Arbeiten mit Mäusen und Mausembryonen	45
2.2.13	Gewinnung von Spermien	46
2.2.14	Gewinnung von Oozyten	47
2.2.15	<i>In vitro</i> Fertilisation	47
2.2.16	Mikroinjektion von Zygoten und Oozyten	47
2.2.17	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (engl. Intracytoplasmatic sperm injection; ICSI)	49
2.2.18	Immunfluoreszenzanalyse	50
2.2.19	Analyse neu synthetisierter DNA oder RNA	51
2.2.20	Analyse der Immunfluoreszenzaufnahmen	52
2.2.21	Blockieren der Replikation in Zygoten	52
2.2.22	Induktion von Strangbrüchen in Zygoten mittels Methylmethansulfonat	52
2.2.23	Analyse der Entwicklung der Embryonen	52
2.2.24	Selektion und Präparation der Embryonen zum Sequenzieren	52
2.2.25	Bisulfitsequenzierung	53
2.2.26	Bisulfitbehandlung	53
2.2.27	Hairpin- Bisulfit	54
2.2.28	<i>M.Sss1</i> assisted hairpin-bisulfite sequencing – MA-HPBS- Sequenzierung	54
2.2.29	Bisulfit- PCR	55
2.2.30	MiSeq	56
2.2.31	Auswertung der Hairpin- Sequenzierungsdaten	56
2.2.32	Statistik	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Überexpression verschiedener TET Varianten im präimplantiven Embryo	58
3.1.1	Entwicklungspotenzial der Embryonen, welche zygotisch TET Varianten überexprimieren	60
3.1.2	Immunfluoreszenzanalyse von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in Zygoten, welche TET Varianten überexprimieren	61
3.1.3	Analyse des Oxidations- und Demethylierungsschutz des maternalen Genoms in der Zygote	65
3.1.4	TET Überexpression und γ H2A.X- Signale	66
3.1.5	Der Einfluss der TET Überexpression auf spätere Stadien der präimplantiven Entwicklung	68

3.1.6	Der Einfluss der TET Überexpression auf die Methylierungsdynamik während der epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote	73
3.2	Effekte der Überexpression der Thymin DNA Glykosylase im präimplantiven Embryo	87
3.2.1	Das Entwicklungspotenzial von Embryonen, die zygotisch TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren	87
3.2.2	Immunfluoreszenz- Analysen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote	89
3.2.3	Basenexzisionsreparatur in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren	91
3.2.4	Effekte der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf Histonmodifikationen und PGC7/Stella	92
3.2.5	Der Einfluss der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC, und 5caC während der Präimplantationsphase – vom 2-Zellembryo bis zur Blastozyste	93
3.2.6	Analyse der globalen Expression im 2-Zellembryo, welcher TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimiert	96
3.2.7	Sequenzierungsanalyse von 5fC und 5caC von mSat, L1 und IAPs in Zygoten, die TDGwt überexprimieren	98
4	Diskussion	102
4.1	Die Überexpression von verschiedenen TET Formen und die Auswirkung auf den frühen Mausembryo	103
4.1.1	5mC, 5hmC, 5fC und 5caC nach der Überexpression von TETFL und TETCD	104
4.1.2	Das Überwinden des Schutzes des maternalen Genoms vor Oxidation und Demethylierung	111
4.1.3	TET1CD als Initiator von Reparaturmechanismen und aktiver Demethylierung	112
4.1.4	Die basengenaue Analyse der Demethylierung nach der Überexpression von TET in repetitiven Elementen	114
4.1.5	Das epigenetische Gleichgewicht und das Entwicklungspotenzial	124
4.2	Die Überexpression von TDG und die Auswirkungen auf das epigenetische Gleichgewicht und die präimplantive Entwicklung	129
4.2.1	Die Überexpression von TDGwt und TDGmut verändern das Gleichgewicht von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote und dem 2- Zellembryo	130
4.2.2	Die Überexpression von TDGwt oder TDGmut in Kombination mit TET1CD	131
4.2.3	Die Molekulare DNA- Analyse von repetitiven Elementen in Zygoten, die TDGwt überexprimieren	133
4.2.4	5hmC, 5fC, 5caC und ihre Interaktion mit Histonmodifikationen	140
4.2.5	Die Effekte der Überexpression von TDG und TET im präimplantiven Embryo – Ein Gedächtniseffekt	142
4.2.6	Die Expression nach der Verschiebung des epigenetischen Gleichgewichts durch TDGwt, TDGmut und TET1CD	144
4.2.7	Die Effekte der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf die Entwicklung	147
4.3	Fazit	155

5	Zusammenfassung	156
6	Summary	157
7	Referenzen	158
8	Anhang	175
8.1	Überexpression der TET Enzym Varianten	175
8.2	Überexpression von TDGwt und TDGmut	194
9	Abkürzungsverzeichnis	216
10	Abbildungsverzeichnis	219
11	Tabellenverzeichnis	223
12	Lebenslauf	226

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Neues Leben entsteht durch die Fusion von Eizelle und Spermium. Das Verschmelzen dieser beiden Zellen bildet die Zygote, aus welcher ein kompletter Organismus mit all seinen unterschiedlichen Zelltypen und Geweben hervorgeht. Alle Zellen dieses Organismus' tragen demnach das gleiche genetische Material, bestehend aus Sequenzen der Basen Cytosin, Guanin, Thymin und Adenin. Damit nun unterschiedliche Zelltypen und Gewebe gebildet werden können, bedarf es einer Ebene der Regulation, durch die die zelltypspezifischen Sequenzabschnitte (Gen) zum richtigen Zeitpunkt abgelesen werden. Die dafür verantwortlichen Regulationsmechanismen sind also der DNA- Sequenz „übergeordnet“. Dies fasst man unter dem Begriff Epigenetik zusammen, wobei Epi im Griechischen auf, darüber, darauf bedeutet. Die Definition von Epigenetik ist demnach „Das Studium von mitotisch und/oder meiotisch vererbaren Charakteristika der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen der DNA- Sequenz erklärbar sind“ (Riggs & Porter 1996). Die Genfunktion, also das An- und Abschalten von Genen, wird über die Modifizierung von Cytosinen (zum Beispiel Methylierung) in regulativen Regionen gelenkt (Kapitel 1.3). Zudem ist die DNA um Proteine gewunden (Histone), die über definierte Modifikationen die Genexpression und die DNA- Packung (mit)regulieren (Kapitel 1.4 und Abbildung 1.1).

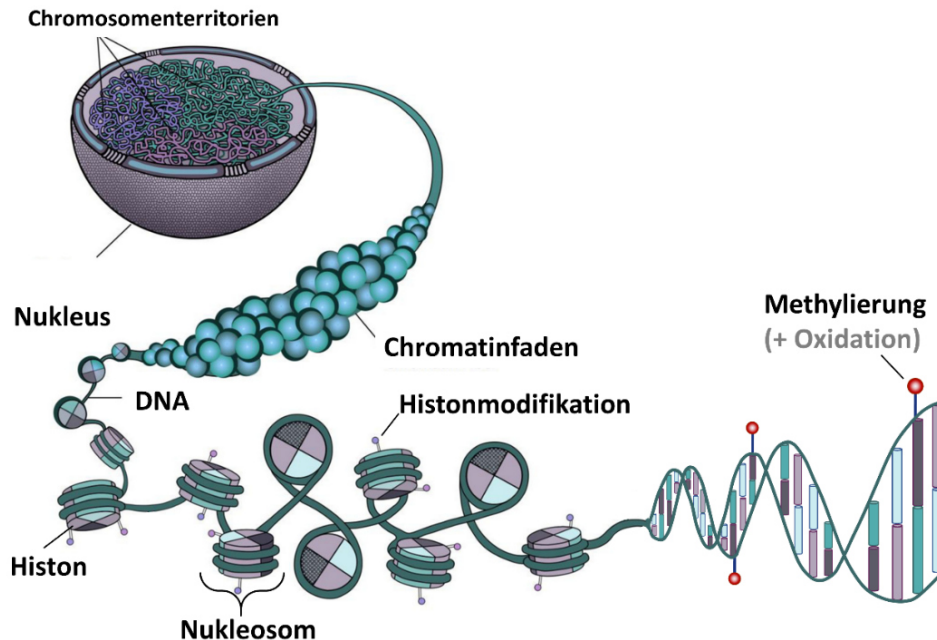


Abbildung 1.1 Die Struktur der DNA (Chromatinstruktur). Dargestellt ist die DNA mit ihren möglichen Modifikationen. Die DNA kann am C5 des Cytosins modifiziert werden (methyliert und oxidiert). Zudem ist die DNA um Histone (basische Proteine) gewunden, was die Nukleosomenstruktur bildet. Auch die Histone können modifiziert werden. Die DNA- und Histonmodifikationen sind in Kombination für die Genregulation von essentieller Bedeutung. Zudem bedingen sie die Kondensation (Packung) der DNA, wodurch die komplette DNA in den Zellkern „gepackt“ werden kann. Abbildung modifiziert nach (Rosa & Shaw 2013).

1.2 Epigenetik und Differenzierung

Mit Hilfe eines definierten DNA- und Histonmodifikationsmusters wird Zellen ihre Identität zugewiesen. Eine solche Identitätszuweisung/Differenzierung vollzieht sich beispielsweise im Verlauf der Entwicklung eines Organismus. In der Säugerentwicklung werden die ersten epigenetischen Muster im frühen Embryo etabliert, was zur Differenzierung der zu diesem Zeitpunkt undifferenzierten Zellen führt (Kapitel 1.7.3). Diese Muster werden zwar bei der Zellteilung von Mutter- zu Tochterzelle weitergegeben, eine transgenerationale Vererbung dieser Muster findet jedoch nicht statt.

Ein Modell der Epigenetik und der durch sie bedingten Differenzierung von Zellen wurde einst von Conrad Waddington in den 1950ern entworfen (Abbildung 1.2). Hierbei rollt die „Alleskönner“- Zelle (Zygote) wie ein Stein in ein Tal und tritt an jedem Scheideweg eine spezielle Differenzierungsrichtung ein. Auf diesem Weg unterliegen die Zellen dynamischen und umfangreichen epigenetischen Umstrukturierungen, die meist mit einem Zugewinn von epigenetischen Modifikationen und der Etablierung spezifischer Epigenome einhergehen. Die totipotente Zygote besitzt die einzigartige Eigenschaft, sich in alle embryonalen und extraembryonalen Gewebe differenzieren zu können. Während die Zelle den Berg der Differenzierung herunterrollt, verliert sie ihre Totipotenz und ist auf ihrem Weg zu einer differenzierten Zelle zunächst pluripotent. Das bedeutet, dass sich aus dieser Zelle nun alle embryonalen Gewebe, entwickeln können. Ein Beispiel hierfür sind embryonale Stammzellen (engl. embryonic stem cells; ESC). Die pluripotente Zelle kann nun verschiedene Wege der Differenzierung einschlagen und geht zunächst in einen multipotenten Zustand über. Dies bedeutet, dass sich die Zelle in alle Zelltypen einer bestimmten Linie entwickeln kann, wie zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen. Hierbei handelt es sich um adulte Stammzellen, die sich in alle Zellen des Blutsystems entwickeln können. Im Tal angekommen, sind die Zellen ausdifferenziert und haben nur noch unipotente Eigenschaften. Sie können jetzt ausschließlich Zellen des gleichen Zelltyps bilden (Beispiel Fibroblasten). Seit den 1960er Jahren ist bekannt, dass die Zelle auch den Berg „hinaufrollen“ kann (Abbildung 1.2). So können Zellidentitäten und EpiGenome nicht nur etabliert/programmiert, sondern auch gelöscht/reprogrammiert werden, wodurch differenzierte Zellen in einen Grundzustand zurückversetzt werden (Gurdon 1962; De Robertis & Gurdon 1977). Nach intensiver Forschung und erfolgreichen somatischen Zellkerntransfer Experimenten¹ (engl. somatic cell nuclear transfer, SCNT) in Krallenfröschen, Schafen (Dolly) und Mäusen (Gurdon 1962; De Robertis & Gurdon 1977; Wilmut et al. 1997; Wakayama et al. 1998), gelang im Jahr 2006 das bahnbrechende Experiment somatische Zellen nur mittels vier definierter Proteine (Yamanaka- Faktoren OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC; OSKM) in einen Stammzell- ähnlichen Zustand zurückzubringen (Takahashi & Yamanaka 2006). Diese Zellen bezeichnet man als induzierte pluripotente Stammzellen, iPSCs (engl. induced pluripotent stem cells) (siehe auch Kapitel 1.7.2.1). iPSCs lassen sich wieder in verschiedene Zelltypen differenzieren, womit

¹ Somatischer Zellkerntransfer (SCNT) ist das Einbringen einer somatischen Zelle in eine entkernte Eizelle. Dadurch wird die somatische Zelle (epigenetisch) reprogrammiert und verliert ihre Differenzierung. Die so entstandene Zelle/Klon hat das Potenzial ein Lebewesen auszubilden. Diesen Vorgang nennt man Klonen.

sie ein vielversprechender Ausgangspunkt für die personalisierte regenerative Medizin sind. So könnten in Zukunft beispielsweise neurodegenerative Krankheiten durch Reprogrammierung und Differenzierung individueller Zellen behandelt werden. In der Säugerentwicklung sind zwei Reprogrammierungswellen bekannt, in denen die Zellen ihre (epigenetische) Identität verlieren und in einen Grundzustand zurückversetzt werden. Die erste Welle erfolgt nach der Befruchtung und erbringt die totipotente Zygote (Kapitel 1.7). Die zweite Welle erfolgt in den Urkeimzellen, aus welchen die Gameten entstehen (Kapitel 1.7.3).

Das ursprüngliche Waddington-Modell zeigt zudem, dass das Schicksal der Zellen und der epigenetische Status auch abhängig von der Umwelt sind. So „kommuniziert“ die Umwelt mit dem Epigenom, welches durch dynamische Änderungen einige Anpassungen ermöglicht.

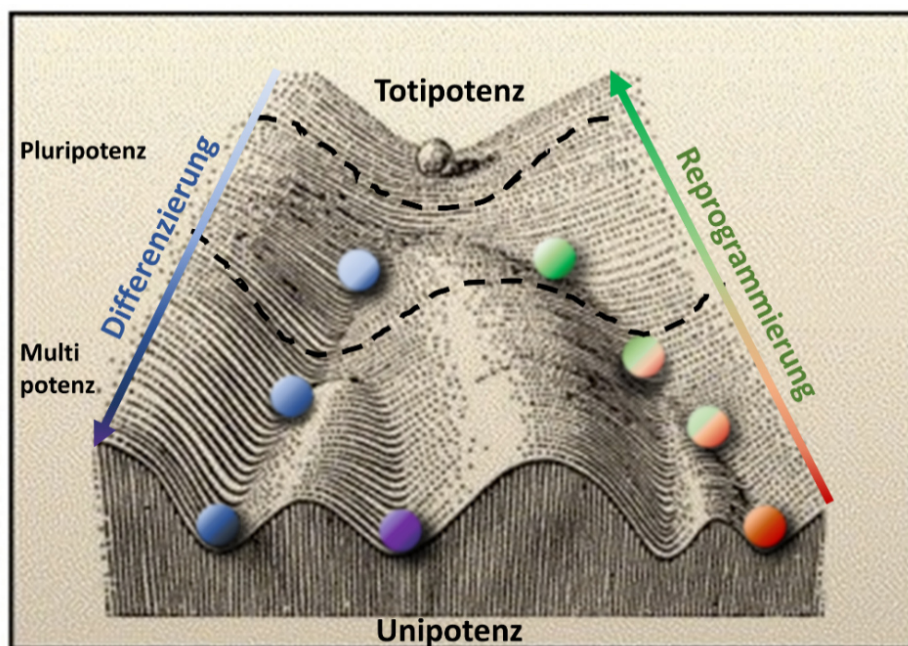


Abbildung 1.2 Modell der Epigenetik nach Waddington Die Entwicklung eines Organismus beginnt mit der totipotenten Zygote. Diese teilt sich viele tausend Male bis ein gesamter Organismus entstanden ist. Auf ihrem Weg schlagen die verschiedenen Zellen unterschiedliche Differenzierungswege ein, welche auch von bestimmten Umweltfaktoren abhängen können. Differenzierte Zellen können auch wieder in den Grundzustand reprogrammiert werden. Abbildung modifiziert nach Waddington (Waddington, C. H. The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology (Alen & Unwin, 1957).

1.3 DNA- Methylierung

Eine der prominentesten und best- untersuchtesten epigenetischen DNA- Modifikation ist die Methylierung des Cytosins an der C5 Position (Abbildung 1.5). 5- Methylcytosin (5mC) ist vom einzelligen Bakterium über Pilze und Pflanzen bis hin zum komplexen Säugetier zu finden und besitzt vielfältige Funktionen (Feng et al. 2010). Bakterien nutzen die DNA- Methylierung, um ihr eigenes Genom zu kennzeichnen und es vor dem Abbau durch Endonukleasen, die Fremd- DNA zerstören, zu schützen. In Säugern ist die DNA- Methylierung für die (zelltypspezifische) Genregulation, das Stilllegen von repetitiven Elementen, das genomische Imprinting, die X- Inaktivierung und die Organisation der Chromatinstruktur verantwortlich. Dabei kommt die Methylierung in Säugern vorwiegend im symmetrischen CpG Kontext vor, in Oozyten und ESCs konnte jedoch auch nicht- CpG- Methylierung

detektiert werden (Ramsahoye et al. 2000). CpG Positionen sind im Genom verhältnismäßig selten vorhanden und liegen zu 60-80% methyliert vor (Smith & Meissner 2013). In einzelnen Bereichen findet man Akkumulationen von CpG- Positionen, welche als CpG- Insel (engl. CpG islands; CGI) bezeichnet werden. Diese sind vor allem in Startpositionen der Transkription (engl. transcriptional start site; TSS) von Haushalts- und Entwicklungsgenen zu finden und liegen vornehmlich unmethyliert vor (Zhu et al. 2008). Sind sie hingegen methyliert führt das meist zu einem langzeitigen Stilllegen des Gens (Imprint, X- Inaktivierung) (Deaton & Bird 2011). Ein etwas vereinfachtes Modell ist demnach: sind CpGs in einer regulatorischen Region methyliert, wird das Gen nicht transkribiert, sind sie hingegen unmethyliert, wird das Gen abgelesen. 5mC kann dabei erstens direkt das Binden von aktivierenden Proteinen verhindern (Watt & Molloy 1988) und zweitens erlaubt es das Binden von Expressionsrepressor-Proteinen (Boyes & Bird 1991; Hendrich & Bird 1998). Dazu gehören beispielsweise die MBD- Proteine (engl. Methyl-binding domain protein), welche speziell an 5mC binden und weitere Faktoren (zum Beispiel Histonedecetylasen; HDAC) rekrutieren, die das Chromatin modellieren und in einen repressiven Zustand versetzen (Klose & Bird 2006). Neuere Daten zeigen jedoch, dass 5mC auch zelltypspezifisch Transkriptionsfaktoren bindet und somit aktivierend wirken kann (Spruijt & Vermeulen 2014; S. Hu et al. 2013). Neben der Methylierung spielen in der Genregulation auch die Histonmodifikationen (Kapitel 1.4) eine entscheidende Rolle, sodass ein Zusammenspiel beider die Expression der Gene bestimmt (Deaton & Bird 2011).

Die meisten Sequenzen des Säugergenoms sind transkriptionell inaktiv. So besteht das Genom zu 40% aus repetitiven und transposablen Elementen (TE). Die TEs bestehen aus drei Klassen: den long interspersed nuclear elements (LINEs), short interspersed nuclear elements (SINEs) und long terminal repeats (LTR) (Waterston et al. 2002). Diese Elemente sind stark methyliert, damit ihre Aktivität unterbunden wird, was nötig ist, um die Stabilität des Genoms zu wahren (Yoder et al. 1997; Bestor & Bourc'his 2004; Walsh et al. 1998). Ihr hypomethylierter Zustand führt zum „Springen“ der TEs in andere Genomabschnitte (copy- paste- Mechanismus), was wiederum zu Insertionsmutationen oder Chromosomenbrüchen führen kann (Slotkin & Martienssen 2007). So sind zum Beispiel verschiedene Krebsarten mit dem hypomethylierten, aktiven Zustand von TEs assoziiert (Bollati et al. 2009). Im Gegensatz dazu übernimmt die Expression von TEs wichtige Funktionen in der Entwicklung der Maus. Schon während der Oozytenreifung werden einige TEs exprimiert und tragen zur Reprogrammierung nach der Befruchtung bei (Kapitel 1.7) (Peaston et al. 2004). Diese Reprogrammierungsereignisse beinhalten eine genomweite Demethylierung, die die Sequenzen verschiedener TEs mit einbezieht, was letztlich zur Expression führt (darunter Line1 und MuERV1) (Kigami et al. 2002; Inoue et al. 2012; Kim et al. 2004). So ist für die präimplantive Entwicklung die Expression von Line1 (L1) essentiell, fehlt sie, bleiben die Embryonen im 2- Zellstadium stehen (Beraldi et al. 2006). Zudem ist MuERV1- LTR an der Bildung eines pluripotenten transkriptionellen Netzwerks beteiligt, welches einen transienten Zustand während der Reprogrammierung zu iPSCs, in einer kleinen Population von ESCs und im 2- Zellstadium einnimmt und die DNA- Demethylierung initiiert (Macfarlan et al. 2012; Eckersley-Maslin

et al. 2016). Weiterhin ist das Stilllegen von repetitiven Sequenzen in perizentromerischen Regionen sehr wichtig für die genomische Stabilität und, damit die Chromosomenanlagerung und -Segregation fehlerfrei ablaufen kann (Gopalakrishnan et al. 2009).

Beim genomischen Imprinting werden Gene in der Keimbahn elternspezifisch für eine monoallelische Expression gekennzeichnet. Dadurch wird dann entweder das mütterliche oder das väterliche Allel ausgeprägt (Plasschaert & Bartolomei 2014). Dies geschieht durch die Methylierung spezieller Regionen (engl. differential methylated Regions; DMR), die ab diesem Zeitpunkt in somatischen Zellen stabil bleibt (Reik & Dean 2001). Defekte der Methylierung in diesen Regionen rufen oftmals starke mentale, kognitive und körperliche Einschränkungen hervor (Peters 2014).

Neben einzelnen Genen/Loci, kann mit Hilfe von CpG Methylierung auch das ganze X- Chromosom in weiblichen Säugern transkriptionell stillgelegt werden. Dies geschieht zum Zwecke der Dosiskompensation, da im weiblichen Säugerorganismus zwei X- Chromosomen vorliegen (Heard et al. 1997; I Okamoto, A P Otte, C D Allis, D Reinberg 2004). Diese Stilllegung durch DNA- Methylierung führt in Kombination mit Histonmodifikationen dazu, dass die DNA sehr eng gepackt ist. Die Umkehr dieses Zustandes ist im Laufe der embryonalen Entwicklung möglich (2- Zellembryo, Morula, PGCs) und ist unter anderem auf eine genomweite Demethylierung zurückzuführen (Ohhata & Wutz 2013).

Die DNA-Methylierung wird durch DNA- Methyltransferasen (DNMT) vermittelt, wozu S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor verwendet wird (Martin & McMillan 2002). Es können verschiedene DNMTs unterschieden werden. Die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 und die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b, die für bestimmte Aufgaben (Etablierung von Imprints) die katalytisch inaktive DNMT3L als Kofaktor benötigen (Kareta et al. 2006; Chedin et al. 2002). Die beiden DNMT3 präferieren weder hemi- noch vollmethylierte Positionen und sind demnach nicht am Aufrechterhalten von Methylierungsmustern beteiligt, sondern sind für das Etablieren neuer Muster verantwortlich (*de novo*) (Hsieh 2005) (Abbildung 1.3). Sie übernehmen wichtige *de novo* Methylierungsaufgaben in der Differenzierung, während der Embryonal- und Keimzellentwicklung (Okano et al. 1999; Gowher & Jeltsch 2001; Kaneda et al. 2004). Charakteristischerweise sind DNMT3a/b deshalb stark in ESCs und dem präimplantiven Embryo exprimiert, während sie in somatischen Zellen weniger stark vorkommen (Li et al. 2006; Hirasawa et al. 2008). Nachdem das Methylierungsmuster im frühen Embryo etabliert ist, muss es bei jeder Zellteilung weitergegeben werden. Dafür ist die DNMT1 verantwortlich, welche nach der Replikation hemimethylierte CpG-Positionen erkennt und das Methylierungsmuster vom Mutter- auf den Tochterstrang überträgt (Probst et al. 2009). Fehlt DNMT1, kommt es zur genomweiten (passiven) Demethylierung und der Embryo ist nicht überlebensfähig (Li et al. 1992) (Abbildung 1.3). In der präimplantiven Entwicklung gibt es neben der somatischen DNMT1 (DNMT1s) eine besondere Isoform, die oozytenspezifische DNMT1 (DNMT1o) (Doherty et al. 2002).

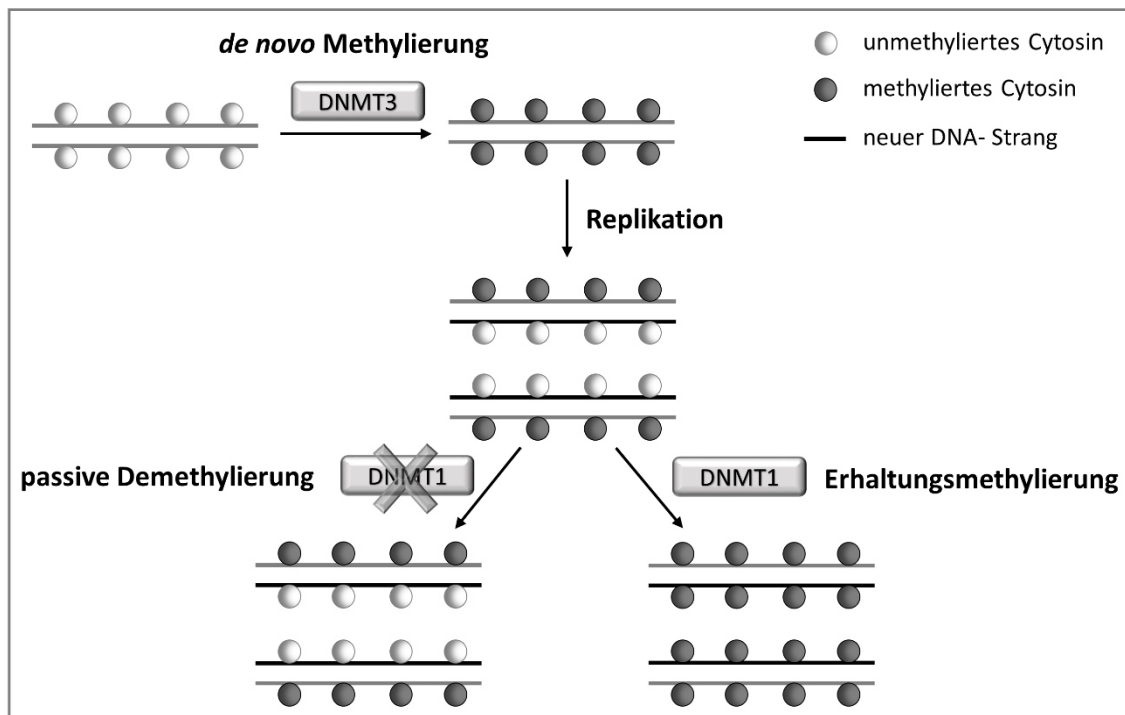


Abbildung 1.3 Funktionen der Methyltransferasen. Die de novo Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b etablieren die Methylierungsmuster in den reifenden Keimzellen und während der Differenzierung im frühen Embryo. Die etablierten Muster müssen nun von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Dies geschieht durch die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1. Fehlt diese, kommt es mit jeder Zellteilung zu einer Halbierung der Methylierung. Diesen Mechanismus nennt man passive Demethylierung (siehe auch Kapitel 1.6.1)

1.4 Histonmodifikationen

Neben der DNA-Methylierung spielen auch die Histonmodifikationen eine entscheidende Rolle in der epigenetischen Regulation. Histone sind hochkonservierte basische Proteine, die sich zu Oktameren zusammenlagern, und um die sich die DNA windet. Diese Struktur nennt man Nukleosom ($2 \times \text{H2A} + 2 \times \text{H2B} + 2 \times \text{H3} + 2 \times \text{H4} + \text{DNA} = \text{Nukleosom}$, Abbildung 1.1) (Kornberg & Lorch 1999). Die N-terminalen Enden der Histone können sehr dynamisch unterschiedlich modifiziert werden, was Auswirkungen auf das Binden von Proteinen und auf die Kondensation der DNA hat und damit auch Einfluss auf die Genregulation nehmen kann. In Tabelle 1.1 sind die prominentesten Modifikationen und ihre Funktionen aufgelistet. Die Histonacetyltransferase (HAT) -vermittelte Acetylierung bestimmter Lysine von H3 und H4 wirkt dekodensierend. Dies basiert auf der vermehrten positiven Ladung und führt zu einer offenen, transkriptionell aktiven Chromatinstruktur (Euchromatin) (Bannister & Kouzarides 2011). Die Methylierung von Lysinresten kann je nach modifiziertem Lysin unterschiedliche Aufgaben besitzen. Sind H3K4 und H3K36 methyliert, übernehmen sie aktivierende Funktionen, wobei H3K4me_{2/3} an TSS angereichert ist und H3K36me₃ sich im Genkörper transkribierter Gene befindet (Schneider et al. 2004; Bannister et al. 2005). Die Methylierung von H4K20, H3K27 und H3K9 wirkt hingegen reprimierend (Kouzarides 2002). So ist H3K27me₃ beispielsweise ein Marker des fakultativen Heterochromatins, welches auch aktive Gene besitzt. Dahingegen ist H3K9me₃ ein Marker des konstitutiven Heterochromatins, welches langfristig stillgelegte Gene aufweist und zum Beispiel in Zentromerregionen gehäuft vorkommt (Trojer & Reinberg 2007).

Tabelle 1.1 Histonmodifikation und ihre Funktion nach Kouzarides 2007

Modifikation	modifizierte Position	Funktion
Acetylierung	K-ac	Transkription, Replikation, Kondensation, Reparatur
Methylierung Lysin	Kme1, Kme2, Kme3	Transkription, Reparatur
Methylierung Arginin	Rme1, Rme2a, Rme2s	Transkription
Phosphorylierung	S-ph, T-ph	Transkription, Reparatur, Kondensation

Ähnlich wie die DNA- Methylierung können die Histonmodifikationen von Proteinen mit bestimmten Domänen gelesen werden, wodurch die Funktion der Modifikationen erst ausgeprägt werden (Bannister & Kouzarides 2011). So können ganze Proteinkomplexe (Polycomb Repressor Complex, PRC) an H3K27me/H3K9me binden, die die Transkription unterbinden und die DNA kondensieren (enger packen, weniger zugänglich machen) (Schwartz & Pirrotta 2007). An H3K4me3 hingegen können bestimmte Transkriptionsfaktoren binden (Vermeulen et al. 2007). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass sich Histonmodifikationen und DNA- Methylierung gegenseitig bedingen können. So führt die Interaktion von umethyliertem H3K4 und DNMT3L zu einer Rekrutierung von DNMT3a, wodurch die *de novo* Methylierung im frühen Embryo reguliert wird (Ooi et al. 2007). Demnach werden viele CpGs *de novo* methyliert, außer sie befinden sich in CGIs, die stark mit H3K4me angereichert sind (Cedar & Bergman 2009).

So ergeben DNA- Methylierung und Histonmodifikationen in ihrer Gesamtheit einen Code für die Regulation der DNA auf Ebene der Genexpression und der Chromatinstruktur. Neben der DNA- Methylierung spielen jedoch auch weitere, neuerlich entdeckte oxidierte Versionen des Cytosins eine Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und auch der Krebsentwicklung und können die Expression (mit-) regulieren (Kapitel 1.5).

1.5 TET Enzyme und die oxidierten Derivate von 5mC als regulative Ebene

Im Jahr 1953 wurde ein oxidiertes Derivat von 5mC, nämlich 5- Hydroxymethylcytosin (5hmC), im Bakteriophagen genom gefunden (WYATT & COHEN 1953). Auch im Gehirn der Ratte konnte 5hmC in hohen Mengen nachgewiesen werden, wobei diese Beobachtungen weitestgehend ohne Beachtung blieben (Penn et al. 1972). Die Base geriet erst wieder im Jahr 2009 in den Fokus der Wissenschaft, als zwei Arbeitsgruppen ihre Existenz nachweisen konnten. So gelang es Kriaucionis & Heintz 5hmC zu deutlichen Mengen in den Purkinje Zellen des Gehirns zu detektieren. Die dafür verantwortlichen Enzyme wurden von Tahiliani et al. nach- und zugewiesen. Dabei handelt es sich um die 2OG-Fe(II) abhängigen Oxygenasen Ten- eleven- translocation (TET) Enzyme (Tahiliani et al. 2009). Im weiteren Verlauf der Forschung wurde schnell klar, dass die TET Enzyme nicht nur 5mC zu 5hmC oxidieren können, sondern auch 5hmC weiter zu 5- Formylcytosin (5fC) und 5- Carboxylcytosin (5caC) (siehe Abbildung 1.5) (Ito et al. 2011; Maiti & Drohat 2011). Diese drei oxidierten Modifikationen konnten im Säuger genom, wenn auch nur in geringen Mengen, nachgewiesen werden. In mESCs sind beispielsweise 3% aller Cytosine methyliert, 0,13% hydroxymethyliert, 0,002% formyliert und 0,0003% carboxyliert (Ito et al. 2011).

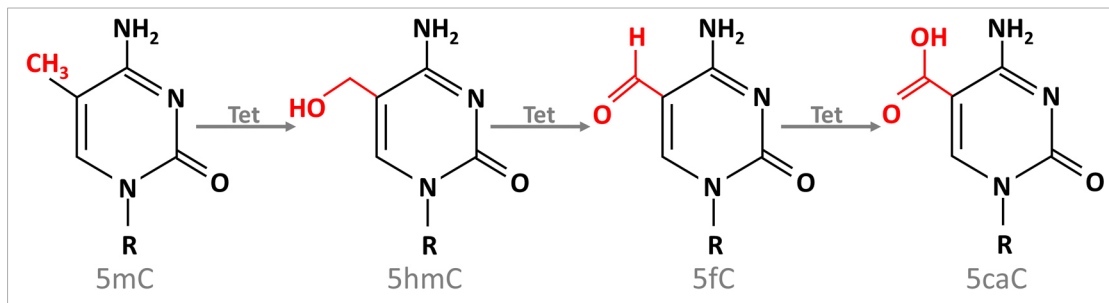


Abbildung 1.5 Die stufenweise Oxidation von 5mC, 5fC und 5caC durch die TET Proteine.

Die drei paralogen Gene der TET Enzyme sind durch die Triplikation ihres Vorgängers entstanden (Iyer et al. 2009). Sie sind strukturell in eine regulative N-terminale Region und eine C-terminale katalytische Domäne (engl. catalytic domain, CD) gegliedert (Abbildung 1.4). Die CxxC-Domäne der N-terminalen Region bildet eine wichtige regulative Komponente von TET1 und TET3 und bindet vornehmlich an nicht methylierte CpGs (Xu et al. 2012; Jin et al. 2016). Sie ist jedoch verzichtbar, denn auch ohne die CxxC-Domäne bindet die katalytische Domäne (NLS enthalten) der TET Enzyme an die DNA, jedoch weitestgehend unkontrolliert (Ito et al. 2010; Tahiliani et al. 2009). TET2 ist in seinem Aufbau besonders (Abbildung 1.4). Eine Inversion des Chromosoms hat die CxxC-Domäne von dem restlichen TET2 Gen abgespalten, sodass CxxC nun von einem eigenen Gen (IDAX) in umgekehrter Richtung transkribiert wird (Ko et al. 2013; Iyer et al. 2011; Iyer et al. 2009). Die Funktion von IDAX ist ähnlich der CxxC-Domäne von TET1 und TET3, denn es bindet unmethylierte CpGs und rekrutiert TET2 (Ko et al. 2013).

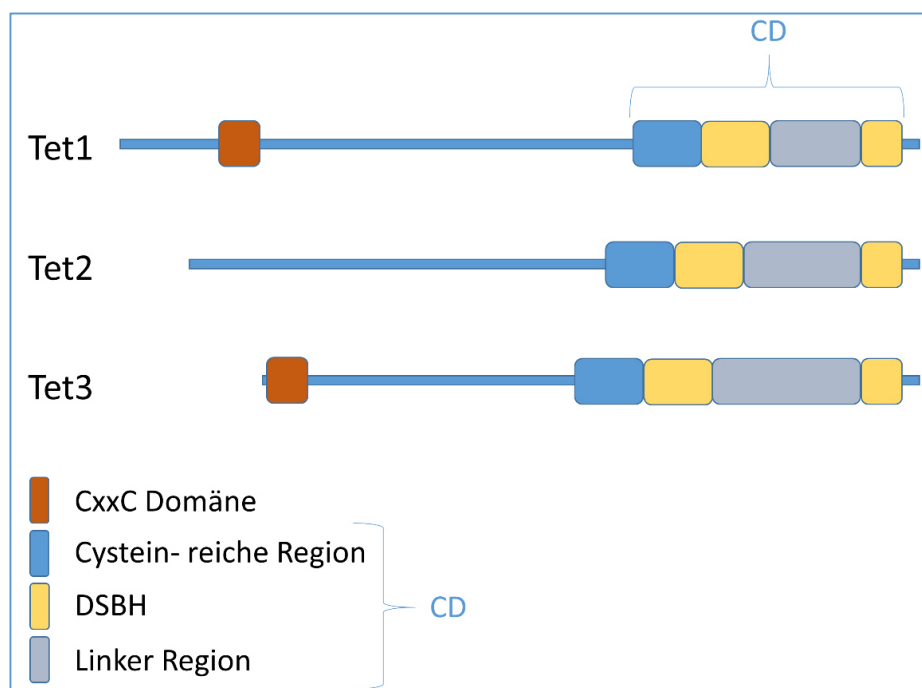


Abbildung 1.4 Aufbau der drei TET Proteine. Dargestellt ist der Aufbau der drei TET Enzyme. Die Enzyme sind in eine N-terminale regulative und eine C-terminale katalytische Region (CD) gegliedert. TET1 und TET3 besitzen eine CxxC-Domäne, die an unmethylierte CpGs bindet und somit die Aktivität zu bestimmten DNA-Regionen lenkt. TET2 hingegen wird durch ein CxxC kodierendes Protein rekrutiert. Die katalytische Domäne der TETs ist hochkonserviert und besteht aus einer Cystein-reichen Region und einer DSHB-Domäne, die durch eine Linker Region unterbrochen ist.

Die katalytische Domäne der TET Enzyme ist hoch konserviert und damit in allen drei TET Formen sehr ähnlich (Tahiliani et al. 2009). Sie ist sogar in Flagellaten (Ng-TET) strukturell (Cystein-reiche Domäne und DSBH) und mechanistisch ähnlich zu denen der Metazoen (Hashimoto et al. 2014; Pais et al. 2015). Die katalytische Domäne formt eine Tasche. Diese wird aus einer dopplesträngigen β - Helix Struktur (DSBH) und einer Cystein-reichen Region gebildet, die durch eine in ihrer Länge variierenden, nicht konservierten Linker- Region unterbrochen ist. Die DSBH besteht aus zwei antiparallel verlaufenden β - Faltblättern in deren Mitte die Kofaktoren Fe(II) und α - Ketoglutarat binden (Hu et al. 2013). Die Cystein- reiche Domäne bildet keine eigene Einheit, vielmehr ist sie um die DSBH gewunden und dient der Stabilisierung der DNA (Hu et al. 2015). Bei der Oxidation von 5mC (5hmC, 5fC) wird die Base aus der Helixstruktur der DNA in die aktive Tasche gedreht. Die Reaktion besteht aus vier Schritten, welche in Abbildung 1.6 dargestellt und erklärt sind. Die Schritte sind: 1. Decarboxylierung, 2. O–O Heterolyse 3. Wasserstoffabstraktion und 4. Rückführung der Hydroxylgruppe (für die Oxidation von 5mC zu 5hmC). Der Unterschied in der Substratpräferenz und der damit verbundenen Menge von gebildetem 5hmC, 5fC und 5caC liegt in der aufzuwendenden Energie in Schritt 3 (Substratabstraktion). Diese ist für 5mC am niedrigsten, für 5fC am höchsten (5fC>5hmC>5mC) (J. Lu et al. 2016), wodurch tendenziell mehr 5hmC und weniger 5caC gebildet wird.

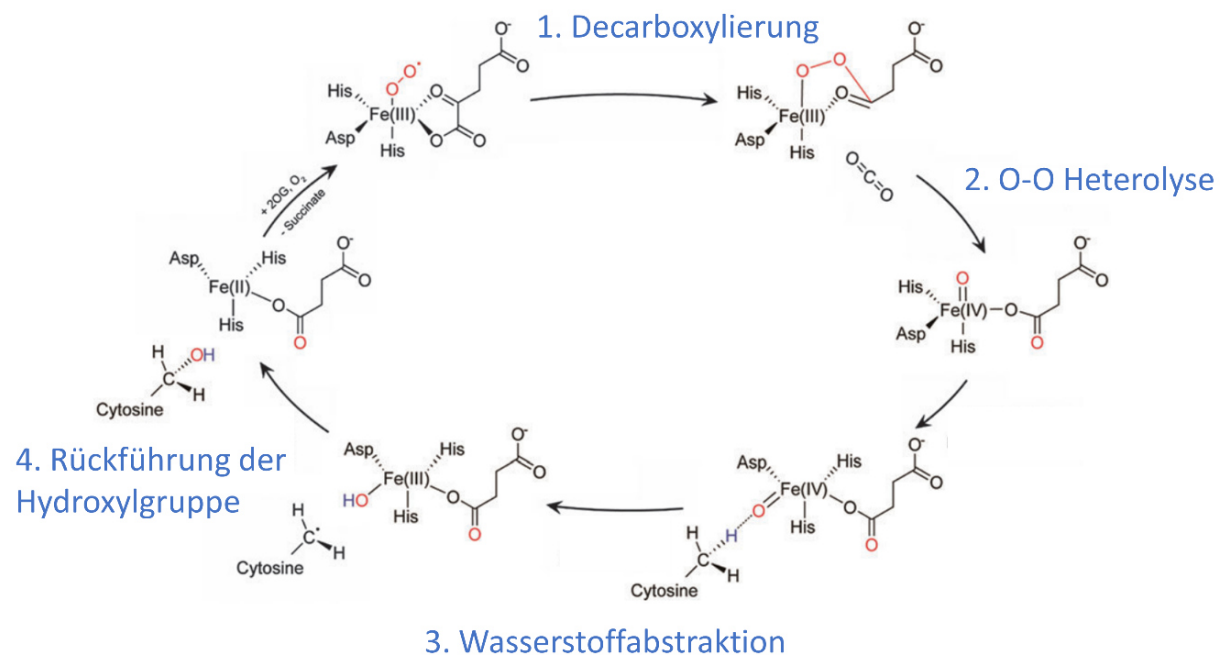


Abbildung 1.6 Reaktionsmechanismus der katalytischen Domäne der TET Enzyme (nach Lu et al. 2016)

Dargestellt ist der katalytische Mechanismus der Oxidation von 5mC zu 5hmC durch die TET Enzyme in vier Schritten. Die katalytische Domäne besteht aus der DSBH und der Cystein-reichen Region. In der DSBH sind Fe(II) und 2- Oxoglutarat als Kofaktoren gebunden. Der Fe- gebundene Sauerstoff (O_2) greift das C2 des α -Ketoglutarats an, sodass ein Fe(II)–OO–R Intermediat entsteht. Dabei wird CO_2 frei (**Decarboxylierung**). Die Elektronenbindung zwischen O–O wird dann gespalten und es entsteht eine sehr reaktive Fe(IV)- Sauerstoff- Spezies (**O–O-Heterolyse**). Das aktivierte Sauerstoff- Atom dieses Intermediats kann nun die C–H Bindung des Substrates aktivieren und eine **Wasserstoffabstraktion** hervorrufen. Zuletzt wird die am Fe gebundene Hydroxygruppe auf das Substrat zurückgeführt (**Rückführung der Hydroxylgruppe**) (J. Lu et al. 2016). Abbildung nach Lu et al. 2016 modifiziert.

Die TET Enzyme können nach einem distributiven oder prozessiven Mechanismus oxidieren. Der distributive Mechanismus beinhaltet, dass nach jedem Oxidationsschritt das Oxidationsprodukt entlassen wird und das TET Enzym von der DNA dissoziiert (Xu et al. 2014; Tamanaha et al. 2016). Beim prozessiven Mechanismus oxidieren die TET Enzyme 5mC zu 5caC, ohne die Intermediate zu entlassen (Crawford et al. 2016). Hierbei stellt sich natürlich die Frage, wie die in ESCs beobachtete Anreicherung von 5hmC und 5fC erfolgen kann (Kapitel 1.5.2). Welchem Mechanismus die TET- vermittelte Oxidation unterliegt, muss noch abschließend geklärt werden.

1.5.1 Expression und Funktion der TET Enzyme

So sehr sich die TET Enzyme in ihrem Aufbau und ihrem Oxidationsmechanismus gleichen, haben sie dennoch verschiedene Aufgaben und Funktionen und sind spezifisch in unterschiedlichen Geweben und Zellen exprimiert. Da in dieser Arbeit die pränimplantive Entwicklung im Fokus steht und hier vornehmlich TET3 und TET1 exprimiert werden, werden im Folgenden vor allem ihre Aufgabe beschrieben.

TET3

TET3 ist das TET Enzym, welches in der Oozyte und Zygote am stärksten exprimiert ist, wohingegen TET1 und TET2 dort kaum vorkommen (Wossidlo et al. 2011; Gu et al. 2011). In der Oozyte wurden sogar drei verschiedene Isoformen von TET3 detektiert: eine TET3 Volllängenform (engl. full length, TET3FL), eine kurze Form von TET3 (engl. short, TET3s) und eine oocytenpezifische Isoform (TET3o) (Jin et al. 2016). TET3s und TET3o fehlt jeweils die CxxC- Domäne. TET3o wird zudem von einem alternativen Promotor, 5'-wärts des TET3FL- Promotors, aus transkribiert und besitzt demnach ein anderes erstes Exon als TET3FL. Auch katalytisch unterscheiden sich die Isoformen, wobei TET3s die stärkste Oxidationskraft besitzt und TET3FL die geringste (TET3s >TET3o >TET3FL) (Jin et al. 2016). Die verschiedenen Aufgaben und Funktionen der Isoformen sind noch nicht geklärt.

In der Zygote ist TET3 verantwortlich für die Oxidation von 5mC in der väterlichen DNA, wohingegen die mütterliche DNA größtenteils geschützt ist. Die Oxidation führt in Kombination mit verschiedenen Mechanismen zur Reprogrammierung des paternalen Genoms (Kapitel 1.6 und 1.7) (Wossidlo et al. 2011; K Iqbal et al. 2011; Gu et al. 2011). TET3 ist auch in einigen anderen Geweben der Maus exprimiert und spielt vor allem in neuronalen Zellen eine regulative Rolle in Expression, Differenzierung und Plastizität (Li et al. 2014; J. Zhang et al. 2016; Jin et al. 2016). Der Knockout (KO) von *TET3* und die damit verbundene Reduktion von 5hmC, 5fC, 5caC hat pränimplantiv keine Auswirkung auf die Entwicklung. Er hat jedoch einen Einfluss auf die neonatale Entwicklung, wobei er Subletalität in neugeborenen Mäusen hervorruft (Tsukada et al. 2015; Inoue et al. 2015).

TET1

TET1 wird ab dem 2- Zellstadium im präimplantiven Embryo, vor allem aber in der inneren Zellmasse der Blastozyste (engl. inner cell mass; ICM), in ESCs und in primordialen Keimzellen (engl. primordial germ cells; PGCs) (ab E10.5) exprimiert (Wossidlo et al. 2011; Ito et al. 2010; Hackett et al. 2013). Demnach kommt es also verstärkt in pluripotenten Zellen vor, wobei seine Expression während der Differenzierung der Zellen deutlich abnimmt (Ito et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass TET1 zur Etablierung und Aufrechterhaltung des pluripotenten Status ein Netzwerk mit den Pluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog bildet, wobei sich die Expression der Gene gegenseitig bedingt (Olariu et al. 2016). So kann TET1 sogar OCT4 bei der Generierung von iPSCs ersetzen, da es dessen Reaktivierung durch Demethylierung herbeiführt (Gao et al. 2013). Die Rolle von TET1 für die Pluripotenz ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, da die bisher erzielten Ergebnisse von Knockdown (KD)- und Knockout (KO)-Experimenten nicht vollständig übereinstimmen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Zellen bei einem KO Zeit zur Kompensation durch erhöhte Expression oder Aktivierung der beiden anderen TET Varianten haben, die beim KD fehlt. Ito et al. postulieren die These, dass TET1 der Schlüsselfaktor der Pluripotenz ist. Sie zeigen, dass sein Knockdown im präimplantiven Embryo und ESCs zu einer Entwicklungsverschiebung hin zu Trophektoderm führt, die Expression des Pluripotenzfaktors NANOG reduziert und die Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wird (Ito et al. 2010). Auch andere Studien zeigen, dass TET1 KD ESCs zur Differenzierung zu Trophoblasten, Endoderm/Mesoderm und auch Neuroektoderm neigen (Koh et al. 2011; Ficiz et al. 2011). KO- Experimente deuten jedoch darauf hin, dass die Pluripotenz unabhängig von TET1 und seinen oxidierten Produkten ist (Dawlaty et al. 2011). Der KO führt in ESCs lediglich zu einer Reduktion der Hydroxymethylierung von ca. 35%. Dies hat auf die spätere Mausentwicklung keinen Einfluss und $TET1^{-/-}$ Mäuse sind lebensfähig und fertil. Dies beruht möglicherweise auf der Kompensation der Funktion von TET1 durch TET2 (Dawlaty et al. 2011). Denn TET1 und TET2 agieren in der Regulation der Pluripotenz von ESCs und auch der primordialen Keimzellen zusammen, haben jedoch unterschiedliche Aufgaben und Zielsequenzen (Huang et al. 2014). Der Doppel- Knockout (DKO) von *TET1* und *TET2* führt in der Maus zu einer Hypermethylierung des Genoms und zeigt nur milde Auswirkung auf die Entwicklung, was TET3 eine mögliche Kompensation der Aktivität zuschreibt (Dawlaty et al. 2013). Der DKO von *TET1* und *TET3* wirkt sich hingegen schon präimplantiv durch variable Methylierungs- und Expressionsmuster aus und ist spätestens E10.5 letal (Kang et al. 2015). Dies weist TET1 und TET3 die Hauptfunktion in der frühen embryonalen Entwicklung zu. Der Tripel- Knockout (TKO) lässt demnach keine embryonale Entwicklung zu und führt in ESCs zu deutlichen Differenzierungseinschränkungen (Dawlaty et al. 2014).

TET2

TET2 spielt vornehmlich eine Rolle im hematopoetischen System. Seine Mutation oder eingeschränkte Aktivität führt zu einer Entartung und Transformation der Zellen des blutbildenden Systems, was letztendlich zu Leukämien führt (Ward et al. 2010; Abdel-Wahab et al. 2009; Moran-Crusio et al. 2011; Ko et al. 2010).

Neben ihrer katalytischen Funktion haben die TET Enzyme aber auch nicht katalytische Aufgaben. Sie können über ihre N-terminale Domäne mit verschiedenen Proteinen interagieren und Proteinkomplexe bilden, wodurch sie den Chromatinstatus bzw. die Expression mitregulieren. Prominente Interaktionspartner sind O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase (Deplus et al. 2013; Chen et al. 2013; Ito et al. 2014), Nanog (Costa et al. 2013) und die Thymin DNA Glykosylase (TDG) (Müller et al. 2014; Weber et al. 2016).

1.5.2 5hmC, 5fC und 5caC und ihre Aufgaben

5hmC, 5fC und 5caC wurden ursprünglich als Intermediate der Demethylierung während epigenetischer Reprogrammierungsereignisse angesehen (Kapitel 1.6 und 1.7). Die intensive Forschung dieser Modifikationen zeigt jedoch, dass sie auch stabil vorkommen und regulative Funktion besitzen (Bachman et al. 2014; Bachman et al. 2015; Su et al. 2016), die im Folgenden beschrieben sind.

5hmC

Die Verteilung und Funktion von 5hmC variiert von Zelltyp zu Zelltyp. In Purkinje Zellen sind beispielsweise 40% aller methylierten Cytosine hydroxymethyliert, während es in ESCs 5% (0,13% aller Cytosine) und in Immunzellen 1% sind (Wu & Zhang 2015). Die hier am intensivsten untersuchten Zellen sind die ESCs, in welchen 5hmC verstärkt im Euchromatin und dort in Gen-reichen Regionen vertreten ist (Wu, Ana C D'Alessio, et al. 2011). Es kommt vor allem in CpG Inseln mit mittlerer oder hoher CpG- Dichte vor. Dies und das nicht Überschneiden von 5mC- und 5hmC- Positionen legt die Vermutung nahe, dass durch Oxidation die 5mC- Level niedriggehalten werden und ein Gleichgewicht zwischen 5mC und 5hmC hergestellt wird (Williams et al. 2011). Es konnte auch gezeigt werden, dass 5hmC stabil im Genom vorhanden ist (Bachman et al. 2014). Dadurch kann es die Expression regulieren, wobei es sowohl aktivieren als auch reprimieren kann (Dawlaty et al. 2011). Ist 5hmC in Promotoren oder der TSS von ESCs vertreten, sind die betroffenen Gene weniger stark exprimiert. Eine Anreicherung in Genkörpern korreliert hingegen mit einer aktiven Transkription (Wu, Ana C D'Alessio, et al. 2011; Pastor et al. 2011; Williams et al. 2011; Ficiz et al. 2011; Robertson et al. 2011). Zudem ist 5hmC mit aktiven Enhancern (H3K4me1 und H3K27ac) assoziiert (Sérandour et al. 2012). Wie auch 5mC kann 5hmC durch Bindeproteine gelesen werden, interessanterweise gibt es im Vergleich zu 5mC, 5fC und 5caC jedoch nur wenige 5hmC- Bindeproteine (Spruijt et al. 2013). Beispielsweise kann 5hmC in CpG Inseln die Rekrutierung des PCR2 (engl. polycomp repressive complex) bedingen und somit zu einer Repression führen (Wu, A C D'Alessio, et al. 2011; Williams et al. 2011).

5fC & 5caC

5fC und 5caC sind deutlich weniger im Genom vertreten, als 5hmC. So sind in ESCs 0,002% aller Cytosine formyliert und 0,0003% carboxyliert (Ito et al. 2011). Da KO Experimente der Thymin DNA Glykosylase (TDG) (Kapitel 1.6.2) in ESCs eine Anreicherung von 5fC/5caC in vorher demethylierten Bereichen zeigten, wurden 5fC/5caC zunächst als reine Intermediate der aktiven Demethylierung

angesehen (Neri et al. 2015; Shen et al. 2013). Dabei sind 5fC und 5caC nach dem KO von TDG vornehmlich in TSS, mSat, aktiven Enhancern und in Pluripotenzfaktor- Bindestellen angereichert und sind somit insgesamt stark in aktiven Elementen vertreten. 5fC- und 5caC- Positionen befinden sich auch in intragenetischen Regionen, wobei die Positionen jeweils nicht überlappen. 5fC ist dabei mehr in Exons vorhanden, während 5caC stärker in Introns vorkommt (Lu et al. 2015). Es kristallisiert sich nun immer weiter heraus, dass 5fC auch stabil im Säugergenom vorkommt, vornehmlich im Gehirn, und regulative Aufgaben besitzt (Bachman et al. 2015). Auch konnte gezeigt werden, dass 5fC im postimplantativen Embryo an gewebespezifischen aktiven Enhancern angereichert ist, womit ihm eine Funktion in der gewebespezifischen Regulation von Genen zugeordnet wurde (Iurlaro et al. 2016). Zudem bleiben in ESCs bis zu 50% der 5fC- Positionen von TDG unberührt, was ebenfalls auf eine regulative Rolle hindeutet (Su et al. 2016). 5fC ist wahrscheinlich mit aktiver Transkription verbunden, da es an poised enhancern vorzufinden ist (H3K4me1, nicht H3K27ac) und an Promotoren angereichert ist, was zum Binden von Transkriptionsfaktoren und Chromatinremodeller beitragen kann. Zudem sind auch an RNA Polymerasell- Bindestellen die 5fC- Level erhöht (Iurlaro et al. 2013; Neri et al. 2015; Song et al. 2013; Spruijt et al. 2013; Raiber et al. 2012). Die Rolle von 5caC ist noch nicht so weit aufgeklärt, es ist jedoch klar, dass es ähnlich wie 5fC in aktiven regulatorischen Elementen wiederzufinden ist und viele Bindeproteine besitzt (Lu et al. 2015; Spruijt et al. 2013).

1.6 Mechanismen der DNA Demethylierung

DNA- Methylierungsmuster werden durch die *de novo* DNA- Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b) gesetzt und durch die Erhaltungsmethyltransferase (DNMT1) bei jedem Replikationszyklus aufrechterhalten (Abbildung 1.3). Diese DNA- Methylierungsmuster sind jedoch reversibel, was für die zelluläre Plastizität und die embryonale Entwicklung essentiell wichtig ist (Kapitel 1.2). Während der Entwicklung von einigen Säugern ereignen sich genomweite DNA- Demethylierungsprozesse. Einer findet nach der Befruchtung in der Zygote statt (Kapitel 1.7), ein weiterer erfolgt während der Entwicklung der PGCs (Kapitel 1.7.3). Solche Prozesse vollziehen sich im Menschen, in der Maus, aber auch in Kaninchen, Rindern und Schweinen (Lepikhov et al. 2008; Fulka et al. 2006; Oestrup et al. 2009; Fulka et al. 2004; Jung et al. 2007; Guo et al. 2015; Seisenberger et al. 2012) und auch beim somatischen Zellkerntransfer wird das Genom der somatischen Zelle demethyliert (Dean et al. 2003). Die molekularen Mechanismen, die die DNA- Demethylierung herbeiführen, sind seit über 20 Jahren Gegenstand der Forschung. Es gibt verschiedene Annahmen, Modelle und theoretisch mögliche Abläufe. Ein genereller Mechanismus konnte bis heute nicht gefunden werden. Es wurden jedoch zwei allgemeine Mechanismen identifiziert, die eine zentrale Rolle übernehmen. Die passive, replikationsabhängige Demethylierung (Kapitel 1.6.1) und die aktive Demethylierung (Kapitel 1.6.2).

1.6.1 Passive, replikationsabhängige Demethylierung

Die passive Demethylierung geht immer einher mit einem Replikationsereignis. Damit die DNA auf diese Weise Methylierung verliert, muss während der Replikation die Erhaltungsmethylierung durch DNMT1 unterbunden werden. Dadurch kann das Methylierungsmuster des Mutterstrangs nicht mehr korrekt auf den Tochterstrang übertragen werden und es kommt mit jeder Replikation zu einer Verdünnung der Methylierung. Wie dies erfolgt, konnte lange nicht auf molekularer Ebene erklärt werden. Eine Idee war, dass die passive Demethylierung durch den Ausschluss von DNMT1 aus dem Nucleus erfolgt. Im präimplantiven Embryo beispielsweise ist die Menge von DNMT1s/o in den (Pro-)Nuklei gering (Dean et al. 2001; M Cecilia Cirio et al. 2008; Dean 2008) (Abbildung 1.7, passive Demethylierung- oben). Eine weitere Theorie ist, dass 5hmC, 5fC und 5caC zu einer verminderten Aktivität von DNMT1 führen. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Erhaltungsmethylierungsaktivität an dem Cytosin, welches sich gegenüber einer 5hmCpG Position befindet, um das 60-fache reduziert ist (Hashimoto et al. 2012; Ji et al. 2014; Valinluck & Sowers 2007). 5fC und 5caC führen zu einer noch stärkeren Verminderung der DNMT1- Aktivität. Durch sie sind sogar benachbarte CpG- Positionen betroffen, wodurch der Verlust der Methylierung sich ausbreitet (Ji et al. 2014). Zudem konnte durch hochauflösende Immunfluoreszenzanalysen von mitotischen Chromosomen im präimplantiven Embryo gezeigt werden, dass sowohl 5hmC als auch 5fC und 5caC mittels der Replikation verloren gehen und mit jedem Zellzyklus verdünnt werden (Inoue & Zhang 2011; Inoue et al. 2011). In ESCs konnte für spezielle Genomregionen basengenau der reduzierende Einfluss von 5hmC auf die Erhaltungsmethylierung nachgewiesen werden (Giehr et al. 2016) (Abbildung 1.7, passive Demethylierung- unten).

Weitere Studien in ESCs zeigen, dass H3K9me2 einen wichtigen Faktor in der passiven Demethylierung darstellt, wobei es das Binden von UHRF1 an die DNA verhindert. UHRF1 ist ein Kofaktor von DNMT1, der ihr Binden an die Replikationsgabel vermittelt. Kann UHRF1 nicht an die DNA binden, kann auch DNMT1 keine Aktivität ausüben, und mit jedem Replikationszyklus geht Methylierung verloren (von Meyenn, Berrens, et al. 2016; von Meyenn, Iurlaro, et al. 2016) (Abbildung 1.7, passive Demethylierung- Mitte). So ist der Prozess der passiven Demethylierung noch nicht abschließend aufgeklärt und ist möglicherweise eine Kombination aus mehreren Mechanismen und/oder sequenzspezifisch reguliert.

1.6.2 Aktive, reparaturabhängige Demethylierung – Basenexzisionsreparatur und die Thymin DNA Glykosylase (TDG)

Neben der passiven Demethylierung kann auch eine aktive Form der Demethylierung von statten gehen, welche unabhängig von der Replikation ist (Abbildung 1.7). Diese Form der Demethylierung konnte in einigen Zelltypen lokusspezifisch und auch genomweit beobachtet werden (Métivier et al. 2008; Klug et al. 2010; Wallner et al. 2016; Martinowich et al. 2003). Ein sehr prominentes Beispiel der aktiven Demethylierung findet in der Zygote statt. Hier wird das väterliche Genom noch vor Beginn der Replikation zu einem deutlichen Teil demethyliert (Oswald et al. 2000; Wossidlo et al. 2010; Amouroux et al. 2016) (Kapitel 1.7).

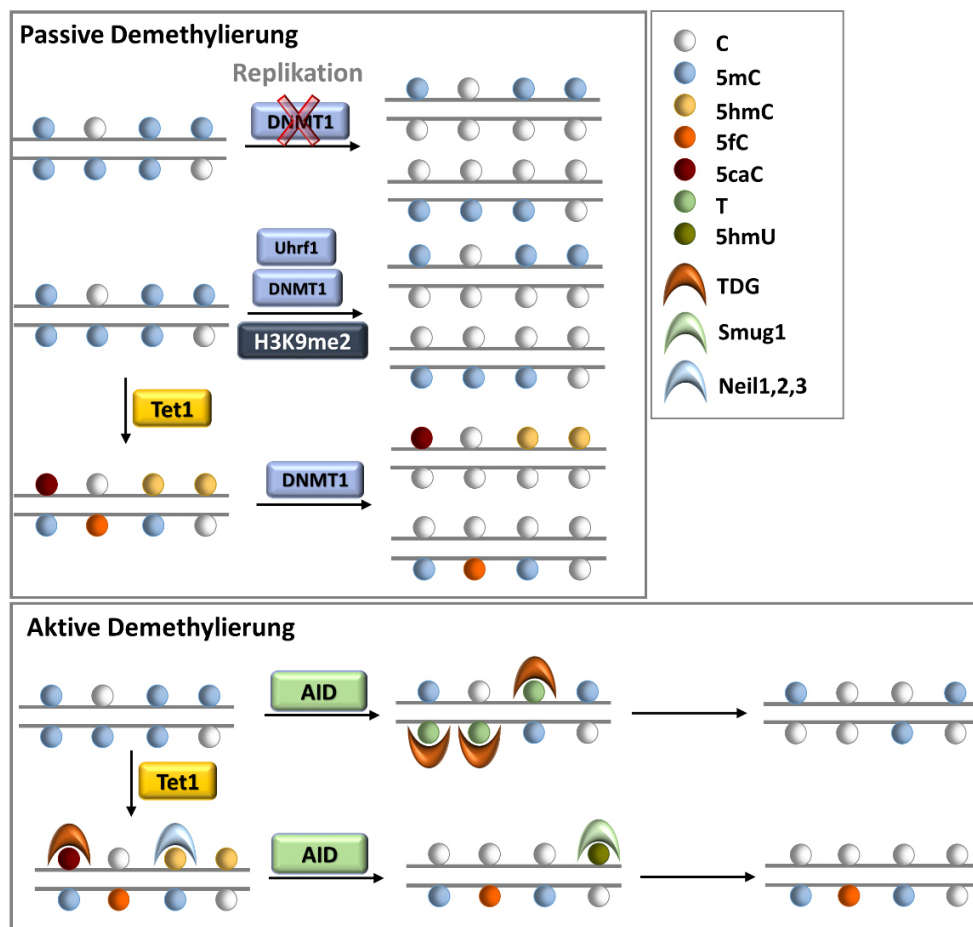


Abbildung 1.7 Mechanismen der passiven und aktiven Demethylierung. Dargestellt sind die Mechanismen der aktiven und passiven Demethylierung. Die passive Demethylierung vollzieht sich immer abhängig von der Replikation, in Zusammenhang mit einer Störung der Erhaltungsmethylierungsaktivität. Die aktive Demethylierung basiert auf einem Reparatur- abhängigen Prozess, welcher bis heute nichtvollständig geklärt ist. Alle Mechanismen sind im detailliert im Text beschrieben.

Die Mechanismen, die für die aktive Demethylierung verantwortlich sind, sind zum heutigen Tag noch nicht aufgeklärt. Alle Theorien beinhalten jedoch einen auf DNA- Reparatur basierenden Mechanismus (Abbildung 1.7). Welcher Reparaturweg jedoch eingeschlagen wird, welche Enzyme involviert sind, oder ob eine Kombination aus verschiedenen DNA- Reparaturwegen zur Demethylierung führt, muss noch weiter untersucht werden. In Abbildung 1.8 sind die möglichen Reparatur- basierten Demodifizierungswege dargestellt. Dabei kann zwischen einer direkten Demodifikation, bei der nur die

entsprechende Modifikation entfernt wird (1) und einem indirekten Mechanismus, bei dem die ganze Base mittels Reparatur aus der DNA entfernt wird (2-6), unterschieden werden (Morgan et al. 2005).

1) Bei dem direkten Demodifikationsprozess (Hydrolyse) wird die Modifikation über eine hydrolytische Abspaltung von der Base entfernt (Abbildung 1.8 (1)). Dabei muss eine sehr stabile C-C- Bindung gespalten werden, wodurch die Spaltung energetisch unvorteilhaft ist (Morgan et al. 2005). Bisher wurde kein Enzym gefunden, welches eine solche Reaktion *in vivo* durchführen könnte. Es gab Hinweise darauf, dass MBD2 eine solche Aufgabe übernehmen kann, jedoch waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar (Bhattacharya et al. 1999). *In vitro* Experimente zeigen allerdings, dass die Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b unter definierten Konditionen die Hydroxylgruppe von 5hmC und die Carboxylgruppe von 5caC abspalten können, während die Formylgruppe des 5fCs gegenüber dieser Reaktion inert ist (P. Zhang et al. 2012; Liutkevičiūtė et al. 2014). Für eine solche Reaktion ist die Abwesenheit von SAM unbedingt notwendig. In allen bekannten Zellsystemen ist SAM allerdings als wichtiger Kofaktor vieler biochemischer Methylierungsreaktionen vorhanden (Bottiglieri 2002). Dies lässt darauf schließen, dass DNMT3a/b *in vivo* keine Dehydroxyierungs- oder Decarboxylierungsreaktion katalysieren können (Liutkevičiūtė et al. 2014).

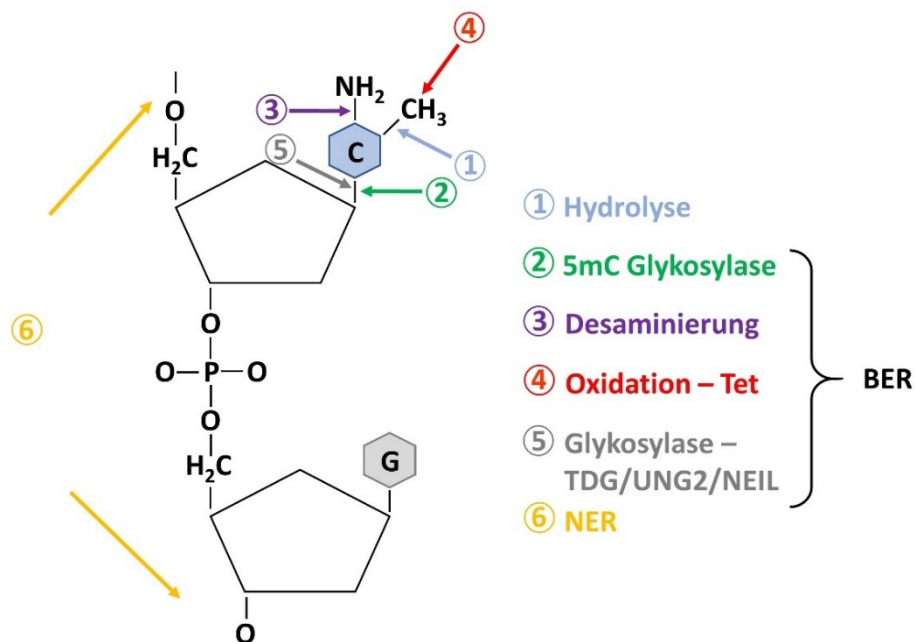


Abbildung 1.8 5- Methylcytosin und seine möglichen Angriffspunkte der aktiven Demethylierung. Dargestellt ist die Strukturformel von 5- Methylcytosin und seine verschiedenen chemischen Bindungen, die durch unterschiedliche Mechanismen gespalten werden können und damit zu einer aktiven Demethylierung führen.

Im Gegensatz zur direkten Demodifikation gibt es auf die Involvierung indirekter Demethylierungsmechanismen *in vivo* konkretere Hinweise. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Basen Exzisionsreparatur (engl. Base excision repair; BER) eine zentrale Bedeutung während Reprogrammierungsereignissen in ESCs, PGCs und in der Zygote besitzt (Abbildung 1.8, BER: 2-6) (Zhu 2009; Hajkova et al. 2010; Wossidlo et al. 2010; Shen et al. 2013). Hierbei wird die komplette Base aus der DNA entfernt. Die BER besteht aus fünf verschiedenen Schritten (Abbildung 1.9): 1. Finden und Ausschneiden der beschädigten Base durch eine Glykosylase; 2. Das Vollziehen eines Schnitts im

Rückgrat; 3. Das „Reinigen“ des 3' bzw. 5' Endes; 4. Füllen der Lücke durch die Polymerase; 5. Schließen des Rückgrats mittels einer Ligase. Im ersten Schritt wird die zu reparierende Base von einer der 11 spezifischen Glykosylase detektiert. Die entsprechende Base wird aus der helikalen Struktur der DNA gedreht (engl. „base- flipping“) und aus der DNA geschnitten (Friedman & Stivers 2010; Roberts & Cheng 1998; Huffman et al. 2005; Vallur et al. 2002). Es werden mono- und bifunktionale Glykosylasen unterschieden. Die monofunktionalen Glykosylasen hinterlassen eine AP- Stelle (engl. apurinic/apyrininic site), die daraufhin von der AP- Endonuklease (APE1) prozessiert wird, es entstehen ein 3'OH und ein 5'Deoxyribosephosphat (2) (Jacobs & Schär 2012; Wilson & Barsky 2001).

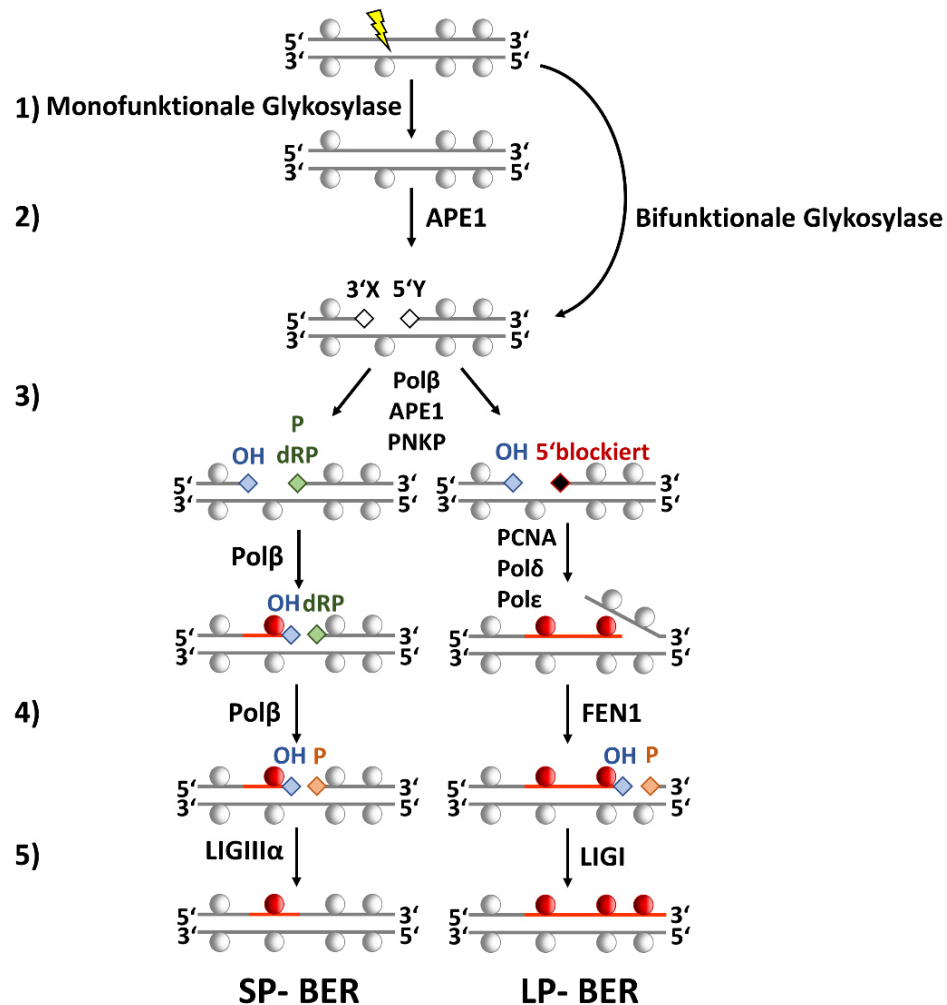


Abbildung 1.9 Basen Exzisions Reparatur (BER). Abgebildet ist eine schematische und vereinfachte Darstellung der BER. Diese besteht aus 5 Schritten. 1. Finden und Ausschneiden der beschädigten Base durch eine Glykosylase (mono- oder bifunktional); 2. Das Vollziehen eines Schnitts im Rückgrat (APE1 oder bifunktionale Glykosylase); 3. Das „Reinigen“ des 3' bzw. 5' Endes (Polβ, APE1, PNKP); 4. Füllen der Lücke durch eine Polymerase; 5. Schließen des Rückgrats (Ligase). Bei der Blockade des 5'- Endes wird die long- patch BER eingeschlagen, bei der 2-8nt des DNA Strangs ersetzt werden; OH= 3'Hydroxylgruppe, dRP= 5'Deoxyribosephosphat, P= 5'Phosphat, 3'X=verschiedene 3'Reste je nach Glykosylase, 5'Y= dRP, P oder blockiertes Ende.

Bifunktionale Glykosylasen besitzen eine intrinsische AP- Lyase Aktivität und fügen beim Ausbau der Base einen Schnitt ins DNA Rückgrat, wodurch verschiedene 3'- Reste und ein 5'Phosphat entstehen können (2) (Jacobs & Schär 2012; Svilar et al. 2011). Da die entstandenen Strangbrüche durch unterschiedliche 5'- und 3'- Enden charakterisiert sind, müssen sie weiterprozessiert werden, um die

Inkorporation eines Nukleotids durch die Polymerase zu ermöglichen (3). Dafür sind die DNA Polymerase β (Pol β), APE1 oder die Polynukleotid Kinase/Phosphatase (PNKP) verantwortlich (Sobol et al. 2000; Matsumoto & Kim 1995; Muralidhar L Hegde et al. 2008; Bernstein et al. 2005). Kann am entstandenen Rest des 5' Endes der DNA die Pol β ein Nukleotid einbauen, wird der short-patch Reparaturweg (SP- BER) eingeschlagen, bei dem nur die eine fehlgepaarte Base ausgetauscht wird (4) (Robertson et al. 2009; Muralidhar L Hegde et al. 2008). Ist das 5'- Ende blockiert und die Lyaseaktivität von Pol β nicht ausreichend (beispielsweise wenn 5'dRP oxidiert oder reduziert ist) wird der long- patch Reparaturweg (LP- BER) eingeschlagen (Piersen et al. 1996; Frosina et al. 1996). Bei diesem werden 2-8 nt am 5' Ende ersetzt. Dazu werden PCNA und die Polymerasen δ und ϵ benötigt, welche die Synthese eines neuen Strangs vollziehen, bei dem der alte Strang verdrängt und weggeklappt wird (4). Dieser Überhang wird mittels der Flap Endonuklease-1 (FEN1) geschnitten (Kim et al. 1998; Svilar et al. 2011; Klungland & Lindahl 1997). Zuletzt wird die Lücke im DNA- Rückgrat mittels einer Ligase geschlossen (5) (short- und long- patch) (Wei et al. 1995; Kubota et al. 1996).

Thymin DNA Glykosylase (TDG)

TDG ist eine Glykosylase des BERs und stellt gleichzeitig eine wichtige Komponente der epigenetischen Regulation dar. Sie hat eine Spezifität gegenüber 5fC und 5caC und ist in ESCs für deren Gleichgewicht verantwortlich (Maiti & Drohat 2011; He et al. 2011). Aufgrund ihrer Spezifität wurde sie in dieser Arbeit zum Modulieren der Level von 5fC/5caC im präimplantiven Embryo verwendet und wird deshalb im Folgenden näher beschrieben.

TDG ist eine Glykosylase, die ursprünglich dafür bekannt war spezifisch die Fehlpaarung T:G im CpG Kontext zu erkennen und Thymin auszuschneiden. Solche Fehlpaarungen entstehen durch die Deaminierung von 5mC zu Thymin (Wiebauer & Jiricny 1990; Wiebauer & Jiricny 1989). Durch das Erkennen von fehlgepaartem Thymin kann TDG Mutationen, die durch spontane Deaminierung entstehen, entgegenwirken. Bei einer fehlerhaften TDG- Funktion können diese Mutationen zur Kanzerogenese führen (Vasovcak et al. 2012; Broderick et al. 2006). TDG ist Mitglied der Gruppe der Mismatch Uracil Glykosylasen (MUG), die zu der monofunktionalen Uracil DNA Glycosylase Superfamilie gehören (Aravind & Koonin 2000). Die Enzyme dieser Familie besitzen eine hochkonservierte, zentrale katalytische Domäne (Aravind & Koonin 2000). Diese Domäne ist durch N- und C- terminale Sequenzen flankiert, welche modifiziert (acetyliert, phosphoryliert) werden können und somit zur Substratspezifität und Regulation der Aktivität nötig sind (Smet-Nocca et al. 2008; Tini et al. 2002; Hardeland et al. 2002; Mohan et al. 2009; Madabushi et al. 2013). Zudem kann TDG mittels dieser Sequenzen mit Proteinen, wie zum Beispiel mit DNMT3a/b, der HAT p300 oder TET1 interagieren (Li et al. 2007; Boland & Christman 2008; Tini et al. 2002; Cortellino et al. 2011).

Das Modell des Mechanismus', nach dem TDG die Reparatur katalysiert, sieht laut Buechner et al. 2015 folgendermaßen aus: Um die DNA möglichst effektiv und energetisch sparsam nach Schäden bzw. Fehlpaarung abzusuchen, begibt sich TDG in einen Suchkomplex (engl. search complex; SC), wobei TDG locker an die DNA bindet. Dieser Komplex bewegt sich entlang der DNA und sucht nach intrinsisch

flexiblen oder gebeugten DNA- Positionen. Diese Positionen sind z.B. durch G:T oder G:U charakterisiert, welche kinetisch weniger stabil sind (Imhof & Zahran 2013). Im Gegensatz dazu wird die DNA des Homoduplexes, der eine exakt komplementäre Basenpaarung besitzt aktiv durch TDG gebeugt. Die dazu benötigte, größere Energie dient womöglich als Sensor und gibt Schadenfreiheit an. Vom SC geht TDG dann in einen prüfenden Komplex über (engl. interrogation complex; IC), wobei TDG fest an die DNA bindet und diese weiter beugt, was schließlich zu dem Rausdrehen der Base aus der helikalen DNA Struktur führt („base flipping“). Fehlgepaarte Basen werden in der katalytischen Tasche von TDG identifiziert und das Enzym geht in den Exzisionskomplex (engl. excision complex; EC) über, wodurch die hydrolytische Spaltung beginnt (Buechner et al. 2015). Nachdem TDG die Base ausgeschnitten hat, wird sie freigelassen (Malik et al. 2015).

Mit der Entdeckung von 5fC und 5caC wurde auch schnell die Spezifität von TDG gegenüber diesen modifizierten Basen bekannt. So besitzt TDG eine hohe Bindungsaffinität und Exzisionsaktivität gegenüber 5fC und 5caC (L. Zhang et al. 2012). TDG initiiert die BER und führt zum short- patch Reparaturweg, welcher mit dem Einbau eines unmodifizierten Cytosins endet. Wurde 5mC zu 5fC oder 5caC oxidiert, können sie durch TDG erkannt und repariert werden, womit dies einen Mechanismus der aktiven Demethylierung darstellt (He et al. 2011) (Abbildung 1.7 aktive Demethylierung- unten; Abbildung 1.8 (4)). Das Zusammenspiel von TET und TDG in der aktiven Demethylierung konnte *in vitro* und in ESCs gezeigt werden (Weber et al. 2016; Müller et al. 2014). Der KO von TDG hat jedoch keine morphologischen oder zellcharakteristischen Auswirkungen in ESCs (Cortázar et al. 2011). Die Existenz und die mögliche Funktion von TDG in der Zygote ist noch unklar (Hajkova et al. 2010). Der konditionelle KO in Oozyten hat jedenfalls keine Auswirkungen auf aktiv demethylierte Sequenzen in der Zygote (F. Guo et al. 2014). Allerdings führt er, als einziger aller Glykosylasen, postimplantativ zu erhöhten Methylierungslevel und zur embryonalen Letalität an E11.5 (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011).

2) Die einfachste Möglichkeit der Demethylierung via der BER wäre das Ausscheiden von 5mC mittels einer Glykosylase mit darauffolgender Reparatur. Eine Glykosylase, die das Potenzial besitzt, 5mC direkt zu reparieren, wurde jedoch bisher nur in *Arabidopsis thaliana* detektiert (Choi et al. 2002; Agius et al. 2006) (Abbildung 1.8 (2)).

3) Eine weitere Möglichkeit der BER- basierten Demethylierung erfolgt über die Deaminierung (Abbildung 1.8 (3)). Hierbei wird 5mC deaminiert, wodurch Thymin entsteht. Durch die C→ T Transition entsteht eine Fehlpaarung (T:G), die durch die Thymin DNA Glykosylase (TDG) repariert werden kann (Wiebauer & Jiricny 1989; Wiebauer & Jiricny 1990) (siehe Abschnitt TDG, S.18). Diese Deaminierungsreaktionen können spontan oder Enzym- vermittelt auftreten, wobei die Größenordnung der spontanen Deaminierung 5-6-fach geringer ist als die der enzymatischen (Morgan et al. 2004). Durch spontane Deaminierung kann demnach nicht die genomweite, gerichtete Demethylierung erklärt werden. Für die enzymvermittelte Deaminierung sind verschiedene Cytidin Deaminasen verantwortlich (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1,

(APOBEC) und activation induced deaminase (AID) Abbildung 1.7). Diese Enzyme haben die Fähigkeit, 5mC in einzelsträngiger DNA zu deaminieren (Morgan et al. 2004; Bransteitter et al. 2003; Petersen-Mahrt et al. 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt herrscht eine Debatte darüber wie stark AID in die Reprogrammierung involviert ist. Da AID vor allem auf einzelsträngige DNA agiert, ist seine Rolle in einer genomweiten Demethylierung eher fraglich. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass AID in murinen PGCs eine Rolle spielt, da der *Aid* KO hier zu einer verminderten genomweiten Demethylierung führt (Popp et al. 2010).

Interessanterweise können die Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b *in vitro*, unter Ausschluss von SAM, Cytosin und 5mC zu Uracil bzw. Thymin deaminieren (Métivier et al. 2008). Dies führt zu Fehlpaarungen (U:G oder T:G), woraufhin die BER den letzten Schritt der zu einer Demethylierung führt übernimmt. *In vivo* liegt in jedem bekannten zellulären System SAM als essentieller Kofaktor vieler biochemischer Methylierungsreaktionen vor (Bottiglieri 2002). Dies lässt die Methyltransferasen in ihrer Rolle als Deaminase für nahezu unmöglich erscheinen.

4) und 5) Der wohl wahrscheinlichste Mechanismus der aktiven Demethylierung erfolgt nach dem heutigen Stand der Forschung über die TET- vermittelte Oxidation von 5mC zu 5hmC, 5fC oder 5caC und darauffolgender BER (Abbildung 1.7, aktive Demethylierung links unten; Abbildung 1.8 (4&5)).

Oxidierete Basen können spezifisch von den Proteinen der NEIL Familie (nei endonuclease VIII-like family) erkannt und repariert werden (Hazra et al. 2002). So können die NEIL Proteine mit 5hmC, 5fC und 5caC interagieren (Spruijt et al. 2013). *In vitro* Analysen zeigen, dass sie TDG in ihrer Aktivität ersetzen können (Müller et al. 2014). Im Gegensatz dazu stehen *in vitro* Analysen die zeigen, dass Neil1 oder Neil2 keine Aktivität gegenüber 5fC oder 5caC besitzen. Eine Funktion in der aktiven Demethylierung konnte ihnen allerdings in *Xenopus laevis* Embryonen zugeschrieben werden (Schomacher et al. 2016) (siehe unten).

Das Enzym welches 5fC und 5caC sehr spezifisch bindet und schneidet ist TDG (S.18) (Maiti & Drohat 2011; He et al. 2011). Fehlt TDG führt dies zu einer Akkumulation von 5fC und 5caC in bestimmten Sequenzen von ESCs und in embryonalen Geweben (He et al. 2011; Gu et al. 2011; Hu et al. 2014; Shen et al. 2013; Iurlaro et al. 2016) (Kapitel 1.5.2). Ob TDG während der Demethylierung in der frühen Mausentwicklung eine Rolle innehat ist ungewiss, denn ihr KO ist erst an E11.5 embryonal letal. Der KO führt allerdings zu einer verminderten Demethylierung im postimplantiven Embryo (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011). In der Mauseizygote konnte TDG bisher jedoch keine Aufgabe in der Reprogrammierung zugewiesen werden (Hajkova et al. 2010). Ein Knockout zeigt weder in Immunfluoreszenz- Analysen noch auf basengenaue Ebene Veränderungen der 5fC/5caC- Level (F. Guo et al. 2014). In *Xenopus laevis* Embryonen findet ein Zusammenspiel von TDG und NEIL2 statt, wobei TDG die Glykosylaseaktivität ausübt und dann von Neil2 an der DNA ersetzt wird, welches mittels seiner AP- Lyaseaktivität diese Position prozessiert (Schomacher et al. 2016).

Neben TDG kann auch UNG2 (Uracil DNA Glykosylase) 5fC und 5caC spezifisch schneiden. So führt die Überexpression von UNG2 in Kombination mit TET2 in HEK293T Zellen zu einer Demodifizierung eines

methylierten Reporterplasmids und genomischen DNA- Sequenzen (Xue et al. 2016). In der Zygote führt der Knockout von *Ung2* zu erhöhten 5mC Leveln in aktiv demethylierten Loci (*Nanog*, *Line1*, *Dnmt3a* und *Zbtb32*) (Xue et al. 2016).

Ein weiterer denkbarer Weg der BER wäre die Deaminierung von 5hmC durch AID zu 5hmU. 5hmU könnte dann mit Hilfe von TDG oder SMUG1 (Single- strand selective Uracil glycosylase) durch ein Cytosin ersetzt werden (Guo et al. 2011; Cortellino et al. 2011). Auch wurde über eine AID- UNG2- long-patch- BER vermittelte Demethylierung in der Zygote spekuliert. Hier würde die LP- BER die Fehlbase reparieren und benachbarte 5mCs ersetzen (Santos et al. 2013) (Abbildung 1.9). Ein solcher Weg konnte jedoch bisher *in vivo* nicht direkt nachgewiesen werden. Dies mag daran liegen, dass AID/APOBEC (*in vitro*) nicht aktiv gegenüber 5hmC sind (Nabel et al. 2012). Zudem stellt UNG2 eine monofunktionale Glykosylase dar, die vorwiegend die SP-BER initiiert und nur postreplikativ eine LP-BER aktiviert (Krokan & Bjørås 2013).

6) Neben der BER stellt auch die Nukleotidexzisions Reparatur (engl. nucleotide excision repair, NER) einen möglichen indirekten Mechanismus der aktiven Demethylierung dar (Abbildung 1.8 (6)). Die NER ist im Gegensatz zur BER verantwortlich für „größere“ DNA- Schäden, wie zum Beispiel Pyrimidin-Pyrimidin- Dimere, die durch UV- Strahlen entstehen und das Rückgrat der DNA verzerren, was während der Replikation zu starken Mutationen führt (Marteijn et al. 2014). Der Schaden wird von einem Sensorprotein erkannt und mittels eines Proteinkomplexes 22-30 nt ausgeschnitten. Diese Lücke wird mit Hilfe von PCNA, DNA Pol δ , ϵ , κ und einer Ligase (1 oder 3) geschlossen. Dieser Mechanismus der aktiven Demethylierung konnte in *Xenopus laevis* detektiert werden. Hier wurde gezeigt, dass ein Protein der NER, Gadd45a (growth arrest and DNA-damage-inducible protein), für eine sequenzspezifische Demethylierung verantwortlich ist (Barreto et al. 2007). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht reproduziert werden (Jin et al. 2008). In Mäusen hat der KO von Gadd45a keinerlei Auswirkungen auf die Methylierung (Engel et al. 2009). Es konnte jedoch kürzlich in ESCs gezeigt werden, dass Gadd45a mit TDG interagiert und eine sequenzspezifische Demethylierung vermittelt, indem es die Rekrutierung von TDG in den Demethylierungskomplex koordiniert (Li et al. 2015). Ob und welche Funktion Gadd45a in der aktiven Demethylierung während der Säugerentwicklung besitzt, ist jedoch offen.

1.7 Reprogrammierung in der Mausentwicklung

Das erste Ereignis in der Entwicklung eines Säugetiers ist die Fusion von zwei Gameten, Spermium und Eizelle, wodurch eine Zygote entsteht (Abbildung 1.10, Abbildung 8.1). Nun durchläuft der präimplantive Embryo viele Teilungen, bis das Blastozystenstadium erreicht ist (ca. 100 Zellen). Die Blastozyste ist morphologisch aus der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm aufgebaut. Die Zellen der ICM sind pluripotent (siehe auch ESCs 1.7.2.1) und bilden den späteren Embryo. Das Trophektoderm formt die extraembryonalen Gewebe (Plazenta). Die Blastozyste nistet sich dann in die Gebärmutter ein (Implantation) und bildet einen Epiblasten (Abbildung 1.10). In Mäusen beginnt an

E7.5 eine Zellkolonie des proximalen Epiblasten die Entwicklung von PGCs (Kapitel 1.7.3), aus welchen dann wiederum die reifen Gameten entstehen (Abbildung 1.10).

Im Entwicklungszyklus der Maus finden zwei Reprogrammierungsereignisse statt. Diese beinhalten starke epigenetische Umstrukturierungen des Genoms, was bedeutet, dass die DNA genomweite demethyliert wird und die Histonmodifikationsmuster stark umgestaltet werden. Eines dieser Ereignisse findet während der Entwicklung der PGCs statt (Kapitel 1.7.3), das andere im präimplantiven Embryo (Abbildung 1.10 und Kapitel 1.7.1). Dieser verliert während seiner Entwicklung deutlich an Methylierung, wobei das niedrigste Methylierungslevel in der ICM (E3.5/4.0) erreicht ist. Danach steigt die Methylierung kontinuierlich bis E7.5 (Abbildung 1.10).

Spermien

Eine Besonderheit des Spermien- Chromatins ist das Vorkommen von Protaminen. Sie sind ein essentieller Bestandteil, deren Haploinsuffizienz zu Infertilität führt (Cho et al. 2001). Protamine sind stark basische Proteine, die mit einer hohen Affinität an die DNA binden. Dadurch wird die DNA 20-fach stärker kondensiert als die DNA somatischer Zellen, so dass ihr Packen in den kleinen Spermienkopf ermöglicht wird (Balhorn 2007; Wyrobek et al. 1976). Obwohl es während der Reifung der Spermien zu einem genomweiten Austausch der Histone durch Protamine kommt, bleiben an bestimmten Positionen Nukleosome erhalten. Diese sind vor allem in Regionen, die für die Spermatogenese und frühe Entwicklung wichtig sind, vorhanden (imprintete Gene, *HOX* Gencluster, micro RNA cluster, Promotoren von Transkriptionsfaktoren) (Gatewood et al. 1987; Hammoud et al. 2009). Die betroffenen Gene werden durch die Histonmodifikationen H3K4me2 und H3K27me3 reguliert (Hammoud et al. 2009; Brykczynska et al. 2010).

Die durchschnittliche Methylierung vieler genomischer Elemente ähnelt stark der, der Embryonen an E7.5 (ausgenommen CGIs) und ist demnach vergleichsweise hoch (Wang et al. 2014). Dennoch, und trotz der hohen Spezialisierung, ist das Methylolevel der Promotoren schon programmiert und dem der ESCs sehr ähnlich (Farthing et al. 2008). Eine Ausnahme bilden jedoch die Pluripotenzgene (*Nanog*), die in Spermien methyliert vorliegen, und nach der Befruchtung aktiv demethyliert werden (Farthing et al. 2008). Gleiches gilt für Line1 (Arand et al. 2015; Smith et al. 2012; Howlett & Reik 1991). Im Vergleich zur DNA von Oozyten ist die Spermien- DNA hypermethyliert (Smith et al. 2012). Die Anzahl der methylierten CGIs ist jedoch in Spermien deutlich geringer als in Oozyten (ca. 1600 vollmethylierte CGIs in Oozyten, 185 in Spermien) (Smallwood et al. 2011).

Oozyten

Die reife Oozyte befindet sich vor der Befruchtung in der Metaphase II der Meiose. Die Meiose wird erst nach der Befruchtung abgeschlossen, indem der zweite Chromosomensatz als Polkörper extrudiert. In der MII Oozyte sind viele Proteine gespeichert, die für den ersten Zellzyklus und die epigenetische Reprogrammierung von essentieller Bedeutung sind (Wang et al. 2010; Gurdon & Wilmut 2011). Anders als das Spermium besitzen Oozyten eine den somatischen Zellen ähnliche

Chromatinstruktur, jedoch sind einige oozytenspezifische Histonvarianten für die Oozytenreifung notwendig (Tanaka et al. 2001; Tanaka et al. 2003; Furuya et al. 2007).

Während der Reifung der Oozyte steigt die Methylierung stetig an. So sind an Tag 5 erst 0,5% der CpGs hoch methyliert (>80% Methylierung), in der MII Oozyte dagegen 15,3% (24,6% der CpGs in Spermien sind hoch methyliert) (Smallwood et al. 2011). Die durchschnittliche DNA- Methylierung der reifen MII Oozyte liegt bei 32%/40%, die der Spermien bei 83%/90% (RRBS/WGBS) (Smith et al. 2012; Kobayashi et al. 2012). Wie oben beschrieben sind in der Oozyte jedoch bedeutend mehr CGIs kontextunabhängig stark methyliert als im Spermium (Smallwood et al. 2011; Smith et al. 2012; Kobayashi et al. 2012). Interessanterweise kommt in Oozyten auffällig viel Nicht- CpG- Methylierung vor, welche graduell bis hin zum Blastozystenstadium verschwindet (Tomizawa et al. 2011; Wang et al. 2014). Solche Nicht- CpG- Methylierung kann auch in ESCs gefunden werden. Ob dies ein Artefakt ist oder eine funktionelle Bedeutung hat ist bisher nicht geklärt.

Befruchtung

Bei der Befruchtung verschmelzen zwei hoch differenzierte, epigenetisch sehr verschiedene Zellen, das Spermium und die Eizelle, miteinander. Um nun ein komplettes Individuum zu formen müssen beide Genome, die zunächst noch in separaten Vorkernen lokalisiert sind, sich epigenetisch und transkriptionell aneinander annähern (Hemberger et al. 2009). Dazu durchlaufen beide Genome, zunächst unter dem Einfluss von maternalen Faktoren, unabhängig voneinander Chromatinumstrukturierungen. In diesem Stadium betreffen diese das paternale Genom stärker als das maternale. So findet unmittelbar nach der Befruchtung im paternalen Genom zunächst der Protamin- Histaustausch statt, bei dem die Protamine der Spermien- DNA gegen Histone ausgetauscht werden, die von der Eizelle bereit gestellt sind (Adenot et al. 1997). Diese Histone sind prä- acetyliert und erlauben dadurch, nach ihrem Einbau in das paternale Chromatin, eine Dekondensation (Santos et al. 2002) (siehe Tabelle 1.1). Diese ist durch die Expansion des Pronukleus gekennzeichnet (Abbildung 8.1, großer paternaler PN). Dadurch ist die DNA besser zugänglich für Proteine und Enzyme und führt in der Regel zur Aktivierung der Expression. So wird im späten Zygotenstadium als erstes MuERV1 vom paternalen Genom transkribiert (Aoki et al. 1997). Neben der Acetylierung erhält das paternale Genom über das Zygotenstadium hinweg weitere Histonmodifikationen, die zunächst ausschließlich Monomethylierung darstellen und erst nach der Replikation Di- und Trimethylierung mit einschließen (Lepikhov & Walter 2004; Lepikhov et al. 2008; Santos et al. 2005). Das maternale Genom hingegen besitzt schon vor der Befruchtung di- und trimethylierte Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K27me2/3, H3K9me2/3), wodurch sich eine Asymmetrie im Chromatinstatus ausbildet (Lepikhov & Walter 2004; Lepikhov et al. 2008; Santos et al. 2005).

1.7.1 Dynamik der DNA- Methylierung in der Mauszygote

Eine Asymmetrie der beiden parental Genome kann auch auf der Ebene der DNA- Methylierung beobachtet werden. Mittels Antikörperfärbungen wurde gezeigt, dass das Signal im maternalen Pronukleus zunächst konstant bleibt und erst während der Replikation mild abfällt (passive Demethylierung, Abbildung 1.7). Im väterlichen Genom beginnt unmittelbar nach der Befruchtung das 5mC- Signal deutlich zu sinken (Mayer et al. 2000; Santos et al. 2002; Wossidlo et al. 2010). Da dieser Methylierungsverlust präreplikativ, innerhalb der ersten acht Stunden nach der Befruchtung (8hpf, engl hours post fertilization), zu detektieren ist und somit Replikations-unabhängig abläuft, wurde dieses Ereignis als aktive Demethylierung titulierte (Oswald et al. 2000; Mayer et al. 2000) (Abbildung 1.7, Abbildung 1.10). Dies, die präreplikative Akkumulation des Strangbruchmarkers γ H2A.X im paternalen Genom und das Vorhandensein einiger BER- Proteine in der Zygote führten zu der Annahme, dass die DNA- Demethylierung genomweit und reparaturbasiert abläuft (Wossidlo et al. 2010; Hajkova et al. 2010). Erst mit der Entdeckung der TET Proteine und deren vermittelter 5mC- Oxidation konnten die Mechanismen und Dynamiken der aktiven Demethylierung in der Zygote weiter aufgeklärt werden. So war eine essentielle Entdeckung, dass TET3 im paternalen Pronukleus der Zygote 5mC zu 5hmC oxidiert, wodurch das 5mC-Signal reduziert wird (Wossidlo et al. 2011; K Iqbal et al. 2011; Gu et al. 2011). 5hmC wird daraufhin zunächst im paternalen Genom zu 5fC (Anstieg ab 4hpf) und dann zu 5caC oxidiert (Anstieg ab 6hpf) (Inoue et al. 2011) (Abbildung 1.10). 5fC und 5caC stellen Zielbasen für die BER dar (Kapitel 1.6.2), sodass die Vermutung einer TET- initiierten Reparatur-abhängigen Demodifikation nahe liegt. Ein direkter Nachweis, dass dieser Mechanismus am Methylierungsverlust des väterlichen Genoms essentiell einbezogen ist, konnte bisher noch nicht erbracht werden. Das maternale Genom ist hingegeben durch das Protein PGC7/Stella vor der aktiven Demethylierung geschützt. PGC7/Stella ist in beiden Pronuklei vorhanden, bindet aber in Abhängigkeit von H3K9me2 spezifisch an die maternale DNA. Dadurch schützt es diese DNA vor der Oxidation, indem es sterisch das Binden von TET3 verhindert und zudem seine Aktivität hemmt (Nakamura et al. 2006; Nakamura et al. 2012; Bian & Yu 2014).

Erste Bisulfitanalysen zeigten eine sequenzspezifische Demethylierung in der Zygote. So werden bestimmte Sequenzen demethyliert (Line1 Elemente, *Nanog*, *Oct4*), wohingegen andere resistent sind (IAP, imprintete Gene) (Kim et al. 2004; Lane et al. 2003). Weitere Bisulfitanalysen relativieren sogar das auf Immunfluoreszenz- Analysen basierende schwarz-weiß- Bild der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms und der passiven Demethylierung des maternalen. Sie zeigen, dass L1 seine Methylierung im paternalen Genom hauptsächlich replikationsabhängig verliert, die Methylierungslevel im maternalen sich hingegen nicht ändern (Hairpin- Bisulfit- Analysen) (Arand et al. 2015; F. Guo et al. 2014). Mit der Entwicklung neuer Sequenzierungstechnologien konnten größere Anteile des Genoms analysiert werden (RRBS oder WGBS). Diese Bisulfitanalysen zeigen, wie auch die Immunfluoreszenz- Analysen, dass das paternale Genom stärker demethyliert wird als das maternale (F. Guo et al. 2014; Peat et al. 2014; L. Shen et al. 2014; Wang et al. 2014). So verliert das paternale

Genom in seiner Entwicklung vom Spermium zur späten Zygote ca. 40-45% seiner Methylierung, wobei das maternale lediglich ca. 2%-5% verliert (Wang et al. 2014; Peat et al. 2014). Ein signifikanter Anteil der demethylierten CpGs überlappt in beiden Genomen, was ähnliche Demethylierungsmechanismen für beide vermuten lässt (F. Guo et al. 2014). So ist für den Methylierungsverlust beider Genome die Replikation essentiell wichtig. Abhängig von ihr verlieren die Genome den Hauptanteil der Methylierung (F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014). Zudem spielt TET3 eine wichtige Rolle. Dieses Enzym ist für die Oxidation beider parental Genome verantwortlich, wobei die Oxidation der paternalen DNA stärker erfolgt (Peat et al. 2014; F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014). So ist auch das paternale Genom stärker von einem KO von *TET3* betroffen. Insgesamt zeigt der KO allerdings nur einen milden Einfluss auf die Demethylierung beider Genome, denn eine große Anzahl von Loci wird auch TET3- unabhängig demethyliert (Peat et al. 2014; F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014). Den größten Einfluss hat TET3 in Kombination mit der Replikation, wobei TET3 hier die Demethylierung nur erleichtert, nicht aber essentiell ist (F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014). Diese Ergebnisse zeigen also, dass TET3 alleine keine wesentliche Rolle in der genomweiten Demethylierung spielt. Es scheint jedoch gebraucht zu werden, um Promotor CGIs vor *de novo* Methylierung zu schützen (Peat et al. 2014; Amouroux et al. 2016). Aktive Demethylierung findet TET3- abhängig, aber nur sequenzspezifisch an definierten Loci statt. Auch davon sind beide Genome betroffen, wobei paternal beispielsweise *Nanog* und *Oct4* und maternal *Dnmt3b* aktiv demethyliert werden (F. Guo et al. 2014). Dabei stellen 5fC und 5caC transiente Produkte dar, denn in der später Zygote liegen *Nanog* und *Dnmt3* tatsächlich unmodifiziert vor (MAB- Sequenzierung) (F. Guo et al. 2014). Der oozytenspezifische, konditionelle KO von *Tdg* hat dabei keinerlei Auswirkungen auf die Demodifizierung (F. Guo et al. 2014). Die Demethylierung der Gene im Zygotenstadium ist direkt mit einer Aktivierung der Transkription im 2- Zellembryo assoziiert und lässt eine transkriptionelle Vorbereitung in der Zygote vermuten (Peat et al. 2014; L. Shen et al. 2014).

Zusammenfassend zeigen diese Hochdurchsatzsequenzierungs- Studien (Peat et al. 2014; L. Shen et al. 2014; F. Guo et al. 2014), dass eine Kombination aus genomweiter replikationsabhängiger Demethylierung mit geringer TET3- Beteiligung und sequenzspezifischer aktiver, TET3- vermittelter Demethylierung beider Genome stattfindet. Dabei scheinen die Demethylierungsmechanismen in beiden Genomen also dieselben zu sein, der jeweilige Anteil, den sie pro Genom ausmachen, ist jedoch unterschiedlich. Zudem hat TET3 im paternalen Genom insgesamt einen deutlicheren Einfluss auf die Demethylierung. Welche Mechanismen der TET3- vermittelten Oxidation in der Zygote nachgeschaltet sind, ist noch nicht bekannt. Bezüglich der aktiven Demethylierung in der Zygote gibt es Hinweise auf Reparaturmechanismen, die für das Ausschneiden von 5hmC, 5fC, 5caC verantwortlich sind (Xue et al. 2016).

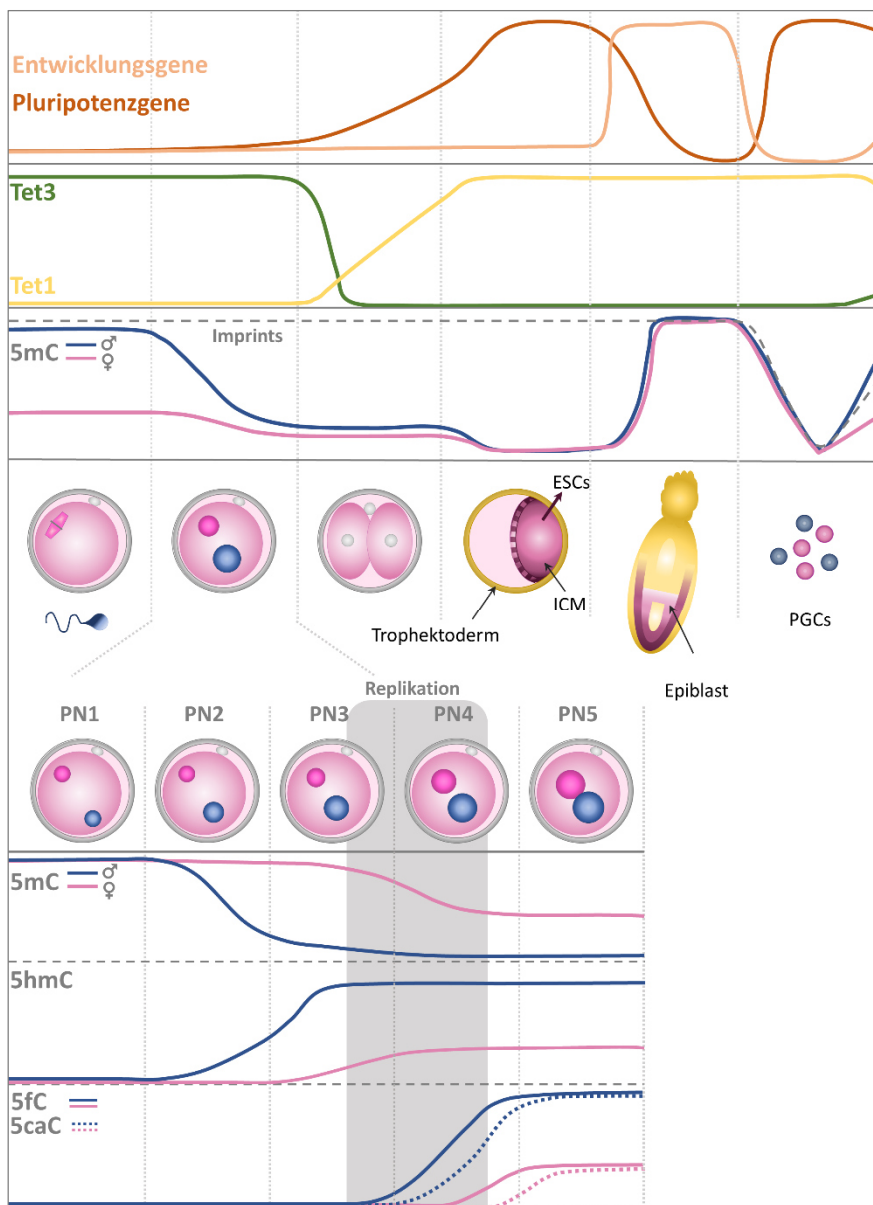


Abbildung 1.10 Die Dynamik der DNA- Modifikationen im Lebenszyklus der Maus. Dargestellt sind die Dynamiken der DNA- Modifikationen während der embryonalen Entwicklung der Maus. Die Dynamik von 5mC (Zygote→PGCs) basiert dabei auf RRBS- Analysen. Die dargestellten Dynamiken in den pronukleären Stadien (PN) der Zygote beruhen ausschließlich auf Immunfluoreszenz- Analysen. Von der Zygote bis zur Blastozyste geht die DNA- Methylierung beider parentalen Genome zu großen Teilen verloren. Erst nach der Implantation des Embryos steigt sie wieder an, wobei in den PGCs ein Methylierungsverlust stattfindet. In der Zygote wird das paternale Genom schnell und intensiv demethyliert, während die Demethylierung im maternalen Genom nur mild ist. Der Methylierungsverlust geht einher mit dem Anstieg von 5hmC, 5fC und 5caC. Während der Reprogrammierungsereignisse im präimplantiven Embryo und den PGCs kommt es zur starken Expression von Pluripotenzgenen, während Entwicklungsgene reprimiert sind.

Die Involvierung der oxidierten Basen in die passive Demethylierung in der Zygote konnte mittels hochauflösender Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden, wobei eine Verdünnung von 5hmC, 5fC und 5caC durch die Replikation erfolgt (Inoue & Zhang 2011; Inoue et al. 2011). Mit der basengenauen Analyse der genomischen Verteilung der oxidierten Basen und mit der Aufklärung ihrer Funktion sind jedoch weitere Klärungsansätze in nicht allzu ferner Zukunft zu erwarten. Der Mechanismus der

hauptsächlich zu einem TET- unabhängigen Verlust der Methylierung während der Replikation führt, konnte bisher in hESCs (2i) und hPGCLC (engl. PGC- like cells) aufgedeckt werden, wobei H3K9me2 und UHRF1 entscheidend beteiligt sind (Abbildung 1.7). UHRF1 ist ein Kofaktor von DNMT1 und bindet an H3K9me2. Fehlt einer dieser beiden Faktoren, geht auch die Erhaltungsmethylierungsaktivität verloren (von Meyenn, Iurlaro, et al. 2016; von Meyenn, Berrens, et al. 2016). Da im väterlichen Genom zunächst kein H3K9me2 vorhanden ist (detektierbar erst postreplikativ), liegt die Vermutung nahe, dass dieser Mechanismus auch in der Zygote von Bedeutung sein könnte.

Die Diskrepanz in den Ergebnissen zwischen Immunfluoreszenz- und Sequenzierungsanalysen beruhen darauf, dass die Immunfluoreszenz- Analyse ausschließlich auf der Sensitivität des verwendeten Antikörpers beruht und damit keine quantitative Methode darstellt. Ein weiterer Grund könnte auch die nicht- Unterscheidbarkeit von 5mC/5hmC und C/5fC/5caC mittels Bisulfidsequenzierung darstellen. Zwei weitere Studien entwerfen ein Modell der genomweiten aktiven Demethylierung beider parental Genome (Wang et al. 2014; Amouroux et al. 2016). Wang et al. verwenden dazu allerdings 2- Zellembryonen, deren Replikation sehr früh startet und somit der Zeitpunkt des Sammelns schwierig zu treffen und zu determinieren ist. Möglicherweise sind die analysierten Embryonen schon in der zweiten Replikationsphase, was das Ergebnis verzerren würde. Amouroux et al. 2016 gehen basierend auf ihren Beobachtungen (Immunfluoreszenz- Analysen) von einem TET3- und replikationsunabhängigen, aber aktiven Demethylierungsmechanismus aus. Das Blocken von TET3 führt in ihren Experimenten zwar zu verminderter 5hmC- Produktion, aber nicht zu einem verminderten präreplikativen 5mC- Verlust. Demnach sind nach ihrer Theorie der Verlust von 5mC und der Anstieg von 5hmC zeitlich und mechanistisch nicht gekoppelt. Somit scheint laut ihren Ergebnissen die genomweite präreplikative Demethylierung unabhängig von TET3 und 5hmC zu erfolgen. Sie ordnen TET3 jedoch eine große Rolle im Schutz vor Hypermethylierung zu.

Neben der Demethylierung finden auch Remethylierungsereignisse in der Zygote statt (Arand et al. 2015). Sowohl DNMT1, als auch DNMT3a sind verantwortlich dafür, aktiv die Methylierung zu erhalten bzw. die DNA via *de novo* Methylierungsaktivität zu methylieren (Amouroux et al. 2016).

Die Methylierungsdynamik in der Zygote unterliegt also komplexen sequenzspezifischen Prozessen aus aktiver und replikationsabhängiger Demethylierung, die TET3- abhängig und TET3- unabhängig erfolgen können. Die genomweiten Methylierungsmuster werden zudem durch Remethylierung via DNMT1 und DNMT3a definiert.

1.7.2 DNA- Methylierungsdynamik vom 2-Zellembryo bis zur Blastozyste

Es gibt drei entscheidende Phasen der Methylierungsänderung in der frühen embryonalen Entwicklung (Abbildung 1.10). Die erste erfolgt vom Spermium zur (späten) Zygote und ist mit einem deutlichen Verlust von 5mC verbunden. Dahingegen spiegelt die Oozyte schon den Methylierungszustand der Zygote bzw. des präimplantiven Embryos wider (Smith et al. 2012). In den darauffolgenden Entwicklungsstadien bleiben die DNA- Methylierungslevel weitestgehend konstant. Die HPBS- Analyse

von einigen repetitiven Elementen (mSat, Line1 und IAP) deuten dennoch darauf hin, dass diese einer Dynamik aus ständiger De- und Remethylierung in dieser Phase unterliegen. Die zweite Phase der Methylierungsänderung erfolgt beim Übergang von Morula zu Blastozyste, bei dem abermals ein deutlicher Methylierungsverlust stattfindet (Arand et al. 2015). Die dritte Phase der Änderung findet während der Implantation statt. Zu diesem Zeitpunkt werden die neuen DNA- Methylierungsmuster etabliert und das embryonale Genom gewinnt stark an Methylierung dazu (Smith et al. 2012) (Abbildung 1.10).

2- Zellembryo

Auf dem Weg von der Zygote zum 2- Zellembryo kommt es zu einer Umstellung von maternaler zu embryonaler (Genom)Kontrolle (engl. maternal to embryonic transition). Hierbei wird die maternale mRNA degradiert und die embryonale Transkription aktiviert. Zunächst werden in der späten Zygote einige wenige Gene vom paternalen Genom transkribiert (Aoki et al. 1997). Die Anzahl der exprimierten Gene steigert sich dann aber stark im 2- Zellembryo (Latham et al. 1991). Hier wird zum Beispiel TET3 degradiert und die Expression von TET1 und TET2 beginnt (Wossidlo et al. 2011). Um diese Genomaktivierung zu ermöglichen müssen methylierte Promotoren während der Reprogrammierung demethyliert werden. Viele zygotisch aktiv demethylierte Loci korrelieren mit den im 2- Zellembryo exprimierten Genen (Peat et al. 2014; F. Guo et al. 2014).

Die Mechanismen der Demethylierungs- und Remethylierungsprozesse ab dem 2- Zellembryo sind noch nicht abschließend erforscht. Alle bisherigen Experimente legen jedoch einen passiven Demethylierungsmechanismus bis hin zur Blastozyste nahe. Ein Indiz dafür ist, dass die Oozyten-spezifische Form von DNMT1 (DNMT1o) ausschließlich im 8- Zellembryo in den Kernen der Nuklei lokalisiert ist und vermutlich dort die Aufrechterhaltung der Imprints verantwortet (Carlson et al. 1992; Ratnam et al. 2002). Detaillierte Analysen von DNMT1s zeigen ab dem 2- Zellstadium nur einen geringen Anteil in den Nuklei, was auch beim Aufrechterhalten der Imprints eine Rolle spielt und die Hypothese des passiven Demethylierungsmechanismus unterstützt (M Cecilia Cirio et al. 2008). Zudem tragen die oxidierten 5mC- Derivate zur replikationsabhängigen Demodifizierung durch Verdünnung im präimplantiven Embryo bei (Inoue & Zhang 2011; Inoue et al. 2011). Eine neuere Studie, basierend auf RRBS- Daten, zeigt jedoch auch die Möglichkeit einer aktiven Demethylierung beider parentalen Genome von Zygote bis 4- Zellembryo auf (Wang et al. 2014). Da es zu keiner vollständigen Demethylierung bis hin zu Blastozyste kommt (Rest ca. 20%), sind aller Wahrscheinlichkeit auch Remethylierungsmechanismen im präimplantiven Embryo vorhanden (Smith et al. 2012). Für eine Erhaltungsmethylierungsaktivität bzw. *de novo* Methylierung sprechen auch maternal methylierte CGIs, die in der Blastozyste höhere Methylierungslevel besitzen, als nach der passiven Demethylierung zu erwarten wäre. Zudem sind einige CGIs methyliert, die in den Gameten unmethyliert vorliegen (Smallwood et al. 2011).

Blastozyste

Die Blastozyste besteht morphologisch aus der inneren Zellmasse, welche den Embryo bildet, und dem Trophektoderm, welches die extraembryonalen Gewebe formt (Abbildung 8.1). Hierbei ist die ICM durch die Expression von NANOG und OCT4 charakterisiert, wobei diese und weitere Pluripotenzfaktoren zur Formation und Aufrechterhaltung der Pluripotenz notwendig sind (Mitsui et al. 2003; Nichols et al. 1998). Das Trophektoderm exprimiert charakteristischerweise CDX2 (Dietrich & Hiiragi 2007; Strumpf et al. 2005). Die Muster für das spätere Zellidentitätsschicksal werden schon im 4-Zellstadium durch epigenetische Faktoren (PRDM14, CARM1, H3R26me₂) vorbestimmt (Fujimori et al. 2003; Piotrowska-Nitsche & Zernicka-Goetz 2005; Tabansky et al. 2013).

Das epigenetische Profil der Blastozyste sieht folgendermaßen aus: In der ICM erreicht die Methylierung das niedrigste Level der gesamten präimplantiven Entwicklung (Smith et al. 2012). Sogar in IAPs ist zu diesem Zeitpunkt die Methylierung deutlich reduziert (Arand et al. 2015). Im Blastozystenstadium haben nun beide parentalen Genome das gleiche Methylierungslevel (20% verglichen zu den Gameten) und sehr ähnliche Methylierungsmuster erlangt (Wang et al. 2014). Über die Rolle von 5hmC, 5fC und 5caC in der ICM ist bisher nichts bekannt und es kann basierend auf Analysen von ESCs vorerst nur spekuliert werden (Kapitel 1.5.1). Die DNA der Zellen des Trophektoderms ist verglichen zur DNA der ICM hypomethyliert, was wahrscheinlich auf der Kurzlebigkeit der extraembryonalen Gewebe beruht (Santos et al. 2002; Dean et al. 2003). Während der Implantation beginnen die Methylierungslevel in den embryonalen Geweben wieder DNMT3a/b-abhängig zu steigen, während die extraembryonalen Zellen einen hypomethylierten Zustand beibehalten (Ng et al. 2008; Oda et al. 2013; Santos et al. 2002).

1.7.2.1 ICM/ESCs

Embryonale Stammzellen werden aus der ICM der Säuger-Blastozyste gewonnen und können *in vitro* unter speziellen Bedingungen kultiviert werden (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981). Die Besonderheit der Stammzellen ist ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit und die Fähigkeit sich, abhängig von definierten Stimuli, in alle Zellen der drei Keimblätter zu entwickeln (Itskovitz-Eldor et al. 2000; Kramer et al. 2000; Stavridis & Smith 2003). Dies schließt jedoch extraembryonale Gewebe aus. Ihre Pluripotenz wird durch verschiedene (Transkriptions)Faktoren gebildet und aufrechterhalten (OCT4, SOX2, NANOG) (Nichols et al. 1998; Mitsui et al. 2003; Masui et al. 2007). ESCs sind im Vergleich zu ICM-Zellen relativ stark methyliert und spiegeln somit eher den DNA-Methylierungszustand des Epiblasten wider (H G Leitch et al. 2013). Werden ESCs jedoch in einem speziellen Medium (2i) kultiviert, erlangen sie einen hypomethylierten Zustand, der dem der ICM-Zellen sehr ähnelt (Harry G Leitch et al. 2013; Habibi et al. 2013). Neben 5mC ist in ESCs auch 5hmC, 5fC und 5caC vertreten (Raiber et al. 2012; Song et al. 2013; Maiti & Drohat 2011). Dadurch kann sowohl die Lokalisation als auch die Funktion dieser Basen für die Pluripotenz im ESC-Modell erforscht werden (Kapitel 1.5). Des Weiteren sind ESCs vor allem in der Grundlagenforschung ein gutes Modell zur epigenetischen und physiologischen Analyse der Differenzierung verschiedener Zelltypen. Aber auch in der medizinischen

Forschung und regenerativen Medizin spielen sie eine große Rolle. Hier wurden sie jedoch mittlerweile von den induzierten pluripotenten Stammzellen abgelöst (Kapitel 1.2).

1.7.3 Epigenetische Reprogrammierung in primordialen Keimzellen

In PGCs findet das andere große Reprogrammierungsereignis in der Entwicklung der Maus (und dem Menschen) statt. Hierbei kommt es, ähnlich wie in der Zygote, zur starker DNA- Demethylierung und Chromatinstrukturierung (Hajkova et al. 2002; Morgan et al. 2005; Seki et al. 2007). Die Reprogrammierung zu diesem Zeitpunkt ist essentiell, um mögliche Epimutationen zu löschen, damit diese nicht an die Nachkommen weitergegeben werden können. Zudem müssen die Imprints aufgehoben und geschlechtsspezifisch wieder etabliert werden (Hajkova et al. 2002).

Nach der Implantation des Mausembryos in die Gebärmutter differenzieren sich die PGCs ab E7.5 aus dem proximalen Epiblast zu einer kleinen Kolonie aus ca. 40 Zellen (Lawson & Hage 1994). Diese Spezifizierung erfolgt als Antwort auf Signalkaskaden von angrenzenden Zellen (Ohinata et al. 2005; Ohinata et al. 2009; Lawson et al. 1999). Während sich die restlichen Epiblastenzellen zu somatischen Zellen differenzieren, entsteht in den PGCs ein spezielles Transkriptionsnetzwerk. Dieses ist dafür verantwortlich, das somatische Zellprogramm zu reprimieren und die epigenetische Reprogrammierung zu initiieren (Yamaji et al. 2008). Dabei ist die Expression der Pluripotenzgene *Nanog*, *Sox2* und *Oct4* charakteristisch (Yeom et al. 1996; Leitch & Smith 2013). Während des Prozesses der Reprogrammierung wandern die PGCs ab E7.75 in die Genitalleiste, wo sie an E11.5 akkumulieren und bis E13.5 proliferieren, wobei sie hier ihr niedrigstes Methylierungsniveau erreichen (Molyneaux et al. 2001; Anderson et al. 2000; Seisenberger et al. 2012). Männliche Keimzellen arretieren dann in der Mitose und das geschlechtsspezifische Methylierungsmuster wird ab E16.5 etabliert. Die weiblichen PGCs bleiben in der Meiose und erhalten ihre definitive Methylierung erst nach der Geburt (Smallwood et al. 2011).

Als Folge der *de novo* Methylierungsereignisse nach der Implantation liegen die Methylierungslevel im Epiblast bei 70%, vergleichbar denen der ESCs (Seisenberger et al. 2012). Auch PGCs zeigen an E8.0 ähnlich hohe Level von 5mC, die in den folgenden Tagen gelöscht werden (Seki et al. 2005; Guibert et al. 2012). Genomweite Bisulfitanalysen zeigen, dass der Verlust der Methylierung in zwei Wellen erfolgt. Eine vor E9.5, bei der ein genomweites Löschen von 5mC erfolgt. Die zweite Welle erfolgt zwischen E11.5-E13.5, bei der vor allem sequenzspezifische Methylierung gelöscht wird, wie zum Beispiel Imprints (Hackett et al. 2013; Vincent et al. 2013). Ab E9.5 findet ca. alle 12.5h ein Replikationsereignis statt, wodurch ab diesem Zeitpunkt die Vermutung eines passiven Demethylierungsmechanismus' nahe liegt (Seisenberger et al. 2012; Kagiwada et al. 2013). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Herunterregulation von DNMT3a/b. Zwar ist DNMT1 exprimiert, UHRF1 fehlt hingegen, wodurch die Erhaltung der Methylierung unmöglich ist (Kagiwada et al. 2013). TET1 und TET2 sind ab E9.5-E11.5 zu hohen Leveln in PGCs exprimiert, wohingegen die benachbarten Zellen wenig Expression zeigen (Hackett et al. 2013). Die TET Enzyme besitzen in PGCs lokusspezifische Demethylierungsfunktionen (Vincent et al. 2013). Dabei sind sie essentiell im Löschen der

Methylierung in imprinteten Regionen (Yamaguchi et al. 2013; Hackett et al. 2013). Das Vorkommen und die Funktion von 5fC und 5caC sind in PGCs noch wenig erforscht.

Zusätzlich zu der Vermutung, dass in PGCs eine passive Demethylierung erfolgt, gibt es auch Hinweise auf einen aktiven, Reparatur- vermittelten Mechanismus, der vor allem auf der starken Expression einiger BER- Enzyme basiert (Hajkova et al. 2010; Popp et al. 2010; Kagiwada et al. 2013).

Neben der extensiven DNA- Demethylierung kommt es ab E8.0 zu Chromatinumstrukturierungen, die den Verlust von H3K9me2 und den Anstieg von H3K27me2 beinhalten, wobei ab E10.5 auch die Level von H3K4me und H3K9ac ansteigen (Seki et al. 2005; Seki et al. 2007; Hajkova et al. 2008).

1.8 Zielsetzung

In der präimplantiven Entwicklung der Maus findet ein epigenetisches Reprogrammierungsereignis statt, welches die DNA- Demethylierung und die Neuorganisation der Histonmodifikationen und der Chromatinstruktur beinhalten. Dies geschieht zum Zwecke der Aktivierung und Regulation der Expression und der damit verbundenen Zellidentität und Entwicklung. Während der epigenetischen Reprogrammierung spielen die TET Enzyme und die durch sie katalysierten oxidierten Basen (5hmC, 5fC, 5caC) eine Rolle. Welche das genau ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. Auch die Funktion von 5hmC, 5fC und 5caC in der präimplantiven Entwicklung ist noch weitestgehend ungeklärt. In dieser Arbeit sollte zur Beantwortung dieser beiden Fragen beigetragen werden.

Zunächst sollte die Rolle der TET Enzyme und der durch sie katalysierten oxidierten Basen in der präimplantiven Entwicklung analysiert werden. Zu diesem Zwecke sollten die für diese Stadien entscheidenden Enzyme TET3 und TET1 (TET3FL, TET1FL) und ihre katalytischen Domänen (TET3CD, TET1CD) durch Mikromanipulation in der Zygote überrepräsentiert werden. Die Auswirkungen sollten auf der Ebene des Entwicklungspotenzials von der Zygote bis zur Blastozyste beobachtet und analysiert werden. Um mögliche Entwicklungseffekte auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen, sollten die Mengen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC nach der Überexpression mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht werden. Damit sollte eine Aussage über den Zusammenhang der Mengen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC und dem Entwicklungspotenzial gemacht werden können. Da oxidierte Basen Ziel der DNA- Reparatur sind, sollte eine potentielle TET- vermittelte DNA- Reparaturinitiierung und die dadurch hervorgerufene aktive Demethylierung untersucht werden. TET3 und die von ihm katalysierten oxidierten Basen haben in der Mauszygote während der Reprogrammierung des paternalen Genoms eine zentrale Funktion. Um diese Funktion der TET Enzyme und der oxidierten Basen auf die DNA- Methylierungsdynamik zu spezifizieren, war es eine weitere wichtige Aufgabe die DNA der Zygoten nach der Überexpression basengenau zu analysieren.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit der Fokus auf die Funktion von 5fC und 5caC in der präimplantiven Entwicklung gelegt werden und diese beiden Modifikationen detailliert untersucht werden. Da TDG eine hohe Spezifität gegenüber 5fC/5caC besitzt, sollte es durch Überrepräsentation in der Zygote als Werkzeug verwendet werden, um die Mengen der beiden Basen zu beeinflussen. Die Auswirkung auf die Entwicklung im präimplantiven Embryo sollte dann, auch im Vergleich zur Überexpression von TET, analysiert werden. Es sollte wiederum ein globales Profil der epigenetischen DNA- Modifikationen nach der Überexpression generiert werden, so dass der Zusammenhang zwischen den Mengen der DNA- Modifikationen und dem präimplantiven Entwicklungspotenzial weiter vervollständigt werden könnte. In diesem Teil der Arbeit sollten zudem 5fC/5caC in der Zygote basengenau analysiert werden. Des Weiteren sollten die durch die Überexpression erzielten Auswirkungen auf die DNA- Modifikationsdynamiken während der Reprogrammierung in der Zygote untersucht werden und somit die Rolle von 5fC und 5caC während dieser transparenter gemacht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper Aufgelistet sind die verwendeten Antikörper, ihre Klonalität und Spezies, die für Immunfluoreszenz- Analysen verwendete Konzentration, Konditionen und Inkubationszeiten und ihre Bezugsquelle

Antigen	Klonalität/Spezies	Konz. IF	Konditionen	Bezugsquelle
5mC	Monoklonal, Maus, Klon 33D3	x2000	2h-ÜN	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
5hmC	Polyklonal, Kaninchen, KatNr. 39769	x1000	3h-ÜN	Active Motif, La Hulpe, Belgien
5fC	Polyklonal, Kaninchen, KatNr.61224	x2000	3h-ÜN	Active Motif, La Hulpe, Belgien
5caC	Polyklonal, Kaninchen, KatNr. 61226	x2000	3h-ÜN	Active Motif, La Hulpe, Belgien
γH2A.X	Polyklonal, Kaninchen, LotNr. L6022404	x200	4h-ÜN	USBiological, Hamburg, Deutschland
	Monoklonal, Maus, LotNr. 33332, KatNr. 16-202A	x250	Blocken mit 5%BSA; ÜN	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
H3K9me2	Monoklonal Maus, ab1220	x500	ÜN	Abcam, Cambridge, UK
H3K9me3	Polyklonal, Kaninchen, KatNr. 07-442	x200	ÜN	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
H3K27me2	Polyklonal, Kaninchen, KatNr. 07-449	x200	ÜN	Upstate, Temecula, USA
H3K4me2	Polyklonal, Kaninchen	x500	ÜN	Upstate, Temecula, USA
Nanog	Polyklonal, Kaninchen, ab80892	x200	fixieren 30min!, Inkubation ÜN	Abcam, Cambridge, UK
PGC7/Stella	Polyklonal, Kaninchen, ab19878	x200	ÜN	Abcam, Cambridge, UK
anti- Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor®488	(10 µg/ml)	2h-4h	Invitrogen, Karlsruhe, Dtlid.
anti- Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor® 647	x200	ÜN	Invitrogen, Karlsruhe, Dtlid.
anti- Kaninchen IgG (H+L)	Rhodamine Red-X konj.	(15 µg/ml)	2h-4h	Jackson ImmunoResearch
anti- Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor® 555, ab150062	x500	2h-4h	Abcam, Cambridge, UK

2.1.2 Chemikalien

(±)-6- Hydroxy-2,5,7,8- tetra- methylchromane-2-carboxylic acid (Radikalfänger)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5- Ethynyl-uridin (EU)

Jena Bioscience, Jena, Deutschland

5-Ethynyl-2'-Deoxycytidintri- phosphat, EdCTP

Prof. Michal Hocek, Academy of Sciences of

5-Ethynyl-2'-Deoxyuridintri- phosphat, EdUTP

the Czech Republic, Tschechische Republik

Acidic Tyrode's Lösung

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Agar

Oxoid, Wesel, Deutschland

Agarose

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Ampicillin

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua bidest. (ddH ₂ O)	hauseigene Millipore-Anlage
ATP	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
B romphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA, Embryo getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
C alciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	VWR, Darmstadt, Deutschland
Chromschwefelsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D API	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Solis BioDyne, Tarta, Estonia
Dextran, TETramethylrhodamin conj.	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dioxan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
E thanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylen-diamin-tetra-essigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
F BS, ESC Stanard	Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland
Fluorinert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Flusssäure, 48 wt. %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
G lukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
h CG (Ovogest)	Interved, Unterschleißheim, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
K aliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
M ineralöl, Embryo getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium Vectashield	Vector Labs, Loerrach, Deutschland
N atriumhydroxid	Grüssing, Filsum, Deutschland

Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
® Pefabloc SC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Phenol- Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PMSG (Interogan)	Interved, Unterschleißheim, Deutschland
Polyvinylpyrrolidone (PVP), Embryo getestet	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Quecksilber	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TAMRA- Peg3- Azid	baseclick GmbH, Neuried, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylen-Cyanol	Chroma, Stuttgart, Deutschland
<u>DNA Größenmarker/ DNA</u>	
100 bp DNA Leiter	Solis BioDyne, Tartu, Estonia
1 kb DNA Leiter	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Lachsspermien DNA	SABiosciences (Qiagen), Hilden, Deutschland
Lambda DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.3 Enzyme/Proteine

BsaWI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DdeI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Eco47I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
HotFire DNA Polymerase	Solis BioDyne, Tartu, Estland
HotStarTaq DNA Polymerase	Quiagen, Hilden, Deutschland
HotStart-IT® Binding Protein	Affymetrix/USB, Santa Clara, CA, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Klenow Fragment	Thermoscientific, Schwerte, Deutschland
M.SssI	Thermoscientific, Schwerte, Deutschland
NcoI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
NdeI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
NotI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

Pfu DNA Polymerase	laboreigene Herstellung
Phusion® DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Proteinase K	Zymo Research Europe, Germany
Swal	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
T4 DNA ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
	Promega, Madison, USA
Taq Polymerase	laboreigene Herstellung
XhoI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

2.1.4 Geräte

Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Borosilikat-Glasröhrchen (GC100TF-10)	Harvard Apparatus, UK
Borosilikat-Glasröhrchen (GC100T-15)	Harvard Apparatus, USA
CellTram Air®	Eppendorf, Deutschland
CellTram Vario®	Eppendorf, Deutschland
CO2-Inkubator, „InCu Safe“	Sanyo, Wood Dale, USA
Femtojet	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf PiezoXpert®	Eppendorf, Deutschland
Glaskapillaren (Ringcaps 50 µl)	Hirschmann, Deutschland
IVF-Schalen	BD-Biosciences, Deutschland
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NanoDrop 2000c	ThermoScientific, Darmstadt, Deutschland
NanoSep 30K Omega	Pall life science, Crailsheim, Deutschland
Nikon Eclipse Ti (inverses Mikroskop)	Nikon, Japan
Microloader™ Pipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland
Mikromanipulator Transferman NK2	Eppendorf, Deutschland
Mikromanipulator TransferMan®4r	Eppendorf, Deutschland
Mikroschmiede, De Fonbrune Typ	Technical Products International
Micropipette- Puller, Model P-87	Sutter, Novato, USA
Objektträger mit Vertiefung	Menzel, Deutschland
PCR-Cycler	Eppendorf, Deutschland
	Applied Biosystems, CA, USA
Piezo-Drill, PMAS-CT 150	Prime Tech, Japan
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Qubit®Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SMZ 800 Stereomikroskop	Nikon, Deutschland
Waagen	Sartorius, Bradford, USA

2.1.5 Kulturmedien

EmbryoMax® FHM

Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland

EmbryoMax® KSOM

Millipore, Schwalbach-Ts, Deutschland

Für die IVF wurden dem KSOM BSA (3 mg/ml) und Glukose (Endkonzentration 5.56 mM) zugegeben. Für die Kapazitation wurde der BSA- Gehalt auf 30mg/ml erhöht. Die behandelten Kulturmedien wurden sterilfiltriert.

M2 eigene Herstellung nach Nagy 2003

NaCl 94,6 mM, KCl 4,78mM, KH₂PO₄ 1,19mM, MgSO₄ 1,19mM, Na Lactat 23,28mM, NaHCO₃ 4,15mM, Na- Pyruvat 0,33mM, CaCl₂ 1,71mM, HEPES 20,85mM, Penicillin/Streptomycin
pH 7,2-7,5

optional +BSA 1mg/ml +Phenolrot

LB- Medium (1L, pH 7,5)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

autoklavieren, dann Zugabe von Antibiotikum Ampicillin 100µg/ml, Kanamycin 25µg/ml.

LB- Agar

LB- Medium, 1,5% Agar

autoklavieren, dann Zugabe von Antibiotikum.

SOC-Medium (1 L, pH 7.0)

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl

autoklavieren, dann Zugabe von 5 ml 2M MgCl₂ und 20 ml 1M Glukose.

2.1.6 Lösungen und Puffer

Blockierungslösung

1% BSA, 0.1% TritonX-100, 0,05% NaN₃ in 1xPBS

Lyse Puffer

10mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA

PBS (10x, 1L, pH7.4)

2g KCl, 2,7g KH₂PO₄, 80g NaCl, 14,4g Na₂HPO₄

1L Aqua bidest.

Permeabilisierungslösung

0,2% TritonX-100, 0,05% NaN₃ in 1xPBS

Probenpuffer (6x)

0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylen- Cyanol, 40% Saccharose

Taq-Puffer (10x)

2mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl (pH8,8), , 0,1% Tween 20

TAE-Puffer (50x)

0,05 M EDTA, 1 M Essigsäure, 2 M TRIS, pH 8.3

TE-Puffer (10x)

100mM Tris-Cl (pH 8,0) 100mM EDTA (pH 8,0), Lösung autoklavieren

2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland oder Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland bezogen.

2.1.7.1 Oligonukleotide zum Klonieren

In Tabelle 2.2 sind die Sequenzen der Oligonukleotide aufgelistet, die zum Klonieren der eGFP-Fusionsproteine, zum Sequenzieren der Klonierungsstellen und zum Herstellen des Templats für die *in vitro* Transkription (IVT) verwendet wurden. AT= Anlagerungstemperatur, RE= Restriktionsendonuklease mit dem PCR- Produkt/Plasmid geschnitten wurde. Die entsprechenden Schnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen. Um eine effiziente Restriktion zu gewährleisten wurden an einigen Sequenzen 3 nt 5'-wärts der Schnittstelle hinzugefügt.

Tabelle 2.2 Oligonukleotide zum Klonieren

Name	Sequenz	AT	RE/Zweck
TET1CD- F	5'- <u>CCATGG</u> ACTTACTTAGCAAGCCTGCAAA-3'	54°C	NcoI
TET1CD- R	5'- AAC <u>CGCGGCCGC</u> GACCCAACGATTGTAGGGTC-3'	54°C	NotI
TET1FL-F	5'- GCT <u>CATATG</u> TCTCGGTCCC GCCCCGCAA -3'	59°C	NdeI
TET1FL-R	5'-AAC <u>GCGGCCGC</u> GACCCAACGATTGTAGGGTC-3'	53°C	NotI
TET3CD-F	5'- ATT <u>CATATG</u> GGACAGGAGGCCACGCCAC-3'	54°C	NdeI
TET3CD-R	5'- ATT <u>GCGGCCGC</u> GATCCAGCGGCTGTAGG-3'	52°C	NotI
TET3FL-F	5'- AGCCAGTTTCAGGTGCCCTTG-3'	56°C	blunt end; Vektor wird mit NcoI geschnitten
TET3FL-R	5'- ATTGCGGCCGCGATCCAGCGGCTGTAGG-3'	52°C	NotI
TDGwt- F	5'- ATA <u>CCATGG</u> ACGCAGAGGCCGCGCA	67°C	NcoI
TDGwt- R	5'- TGC <u>CTCGAG</u> AGCGTGGTCTCTTCTTCT	63°C	XhoI
TDGmut- F	5'-Pho- ATCATTGGCATT <u>GCCCCGGG</u> GATTAA-3'	53°C	Muta-
TDGmut- R	5'-Pho- CACAATATCCAGATTGAAGGTCAAAA-3'	54°C	genese
TDGmut-SEQ- F	5'- TGGTCATCCATGTGATTCAGCTG-3'	50°C	Seq
TDGmut-SEQ- R	5'- CCGGCAAGTCTACAAAATCAAAGG-3'	50°C	Seq
T7 upstream	5'- TGCGTCCGGCGTAGAGGATCG-3'	50°C	Seq, IVT
T7 terminator	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	50°C	Seq, IVT
eGFP1	5'- GACACGCTGAACTTGTGGC-3'	50°C	Seq
eGFP2	5'- CGATCACATGGTCCTGCT	50°C	Seq
NLS upper I	5'- <u>AGCTT</u> ATGGACCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTGGACCCAAAAAAG- 3'		HindIII
NLS lower I	5'- Pho- TGGGTCCACCTTTCTTCTTTTTGGGTCCATA -3'		

NLS upperII	5'- Pho- AAGGTGGACCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTGc -3'		
NLS lower II	5'- <u>TCGAG</u> CACCTTTCTCTCTTTTTGGGTCCACCTTTCTCTCTTTTT-3'		XhoI

2.1.7.2 Oligonukleotide zur Generierung der Amplikons von (MAB-) Hairpin- Bisulfit- DNA

In Tabelle 2.3 sind die Sequenzen der Oligonukleotide zur Generierung der Amplikons von (MAB-) Hairpinbisulfit- DNA aufgelistet.

Tabelle 2.3 Verwendete Oligonukleotide für die (MAB-) Hairpin- Bisulfitsequenzierung. In der Tabelle sind die für die Hairpin- Bisulfitsequenzierung verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Lambda3 stellt dabei das Kontroll- Amplikon in der MAB- Hairpin- Bisulfitsequenzierung zur Kontrolle der Effizienz der M.SssI- Behandlung dar.

Name	Sequenz	Temperatur
mSat-F	5'-GGAAAATTTAGAAATGTTTAATGTAG-3'	56°C
mSat-R	5'-AACAAAAAACTAAAAATCATAAAAA-3'	
Line1-F	5'-TGGTAGTTTTTAGGTGGTATAGAT-3'	55°C
Line1-R	5'-TCAAACACTATATTACTTTAACAATTCCCA-3'	
IAP-F	5'-TTTTTTTTTTAGGAGAGTTATATTT-3'	51°C
IAP-R	5'-ATCACTCCCTAATTAACAACAAC-3'	
Lambda3- F	5'-TGTATGGTGTATTGTTTATATT-3'	55°C
Lambda3- R	5'-ACCCAACATACATACCTT-3'	

2.1.7.3 Hairpin- Bisulfit Linkeroligonukleotid

In Tabelle 2.4 sind die Sequenzen der Linkeroligonukleotide aufgelistet, die für die Hairpin- Bisulfitsequenzierung verwendet wurden (2.2.27). d steht hier für eine variable Position und kann Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T) oder Adenin (A) sein. Somit ist die Möglichkeit auf die Selektion nach Klonalität gegeben. Die Hairpinstruktur der Linkeroligonukleotide (100 pmol/μl) wurde jeweils in 30μl 1xNEB2 Puffer gebildet. Dieser Ansatz wird im PCR Cyclyer bei 95°C für 5min denaturiert und dann mit der langsamsten Rate abgekühlt.

Tabelle 2.4 Verwendete Linkeroligonukleotide der (MAB-) Hairpin- Bisulfitsequenzierung. In der Tabelle sind die für die (MAB-) Hairpin- Bisulfitsequenzierung verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Hierbei steht w für A oder T, n für A, T, C oder G. d ist eine variable Position die durch C, G, T oder A eingenommen werden kann.

mSat (Eco47I)	5'- Pho- gwcgggCccatdddddddatgggCcc -3'
Line1 (BsaWI)	5'- Pho- ccggagggCccatdddddddatgggCcct -3'
IAP (Ddel)	5'- Pho- tnagggCccatdddddddatgggCcc -3'

2.1.8 Reaktionskits

Click-it Edu Alexa fluor [®] 488 Imaging Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo research, Freiburg, Deutschland
EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit	Zymo research, Freiburg, Deutschland
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	GeneAid, New Taipei, Taiwan
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	SigmaAldrich, Taufkirchen, Deutschland
MessageMAX T7 ARCA-Capped Message Transcription Kit	Biozym, Oldendorf, Deutschland
mMessage mMachine [®] T7 Ultra Transcription kit	Ambion, Kaufungen, Deutschland

MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)

Illumina, San Diego, USA

RNA Clean & Concentrator™-25 Kit

Zymo research, Freiburg, Deutschland

Für die click-it Reaktion wurde an Stelle des grünen Farbstoffes der rote Farbstoff TAMRA verwendet.

2.1.9 Mäuse

Für alle Experimente wurden Mäuse der F1- Generation der Kreuzung der Inzuchtstämme C57BL/6J♀ und DBA/N♂ (F1(C57BL/6xDBA)) verwendet. Beide Mausstämme stammen ursprünglich von Janvier, wurden jedoch im hauseigenen Mausstall weiter gezüchtet.

2.1.10 Prokaryotische Zellen

Für die Klonierungsarbeiten wurden tetracyclinresistente *Echerichia coli* Top10F'- Zellen verwendet (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

2.1.11 cDNA

Die cDNA von TDG wurde von Source Bioscience (Nottingham, UK) bezogen. Die Bezeichnung des erworbenen Klons lautet IRAVp96F04160D.

Die cDNA der murinen TET Enzyme (TET1 und TET3) war ein Geschenk Prof. Dr. Wolf Reik (Cambridge University) und wurde im Vektor p2Lox übergeben (pLox2eGFP-mmUTET).

2.1.12 Plasmid

In dieser Arbeit wurde ein modifizierter pET28b(+) Vektor (Adgene, Cambridge, USA) zur Klonierung der eGFP- Fusionsgene verwendet. Dieser besitzt die typischen Komponenten wie Ori, Antibiotikumresistenzgen (hier Kanamycin) und eine multiple Klonierungsstelle mit einzigartigen Restriktionsschnittstellen, einem His- tag auch einen T7 Promotor und T7 Terminator für die in vitro Transkription mittels T7 RNA Polymerase. Zudem wurde von Dr. Konstantin Lepikhov das Plasmid modifiziert, indem die kodierende Sequenz von eGFP zum Detektieren des Fusionsproteins im Embryo und ein Poly(A)- Schwanz (83x A) für die optimale Translation der mRNA im Embryo inkloniert wurde (Yamagata et al. 2005)) (siehe auch 2.2.1 und Abbildung 2.2).

2.1.13 Software

AxioVision Rel 4.8

Zeiss, Jena, Deutschland

BiQAnalyzerHT

<http://biq-analyzer-ht.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>

ClustalW

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

FinchTV

<http://finchtv.software.informer.com/1.4/>

Galaxy

<http://internal.genetik.uni-sb.de/galaxy>

HairpinAnalyzer

laborintern

ImageJ

<https://imagej.nih.gov/ij/>

Microsoft Office 2010/2016

Microsoft

2.2 Methoden

In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der durchgeführten Experimente dargestellt. Die einzelnen Methoden werden im Folgenden beschrieben. Zum Zwecke der Lokalisation des überrepräsentierten Proteins im Embryo, wurde die kodierende Sequenz (engl. coding sequence; CDS) als eGFP- Fusionsprotein kloniert (2.2.1) (siehe (Yamagata et al. 2005)). Da in der Zygote keine Transkription stattfindet, wurde die mRNA, die das jeweilige Fusionsprotein kodiert, mittels *in vitro* Transkription generiert.

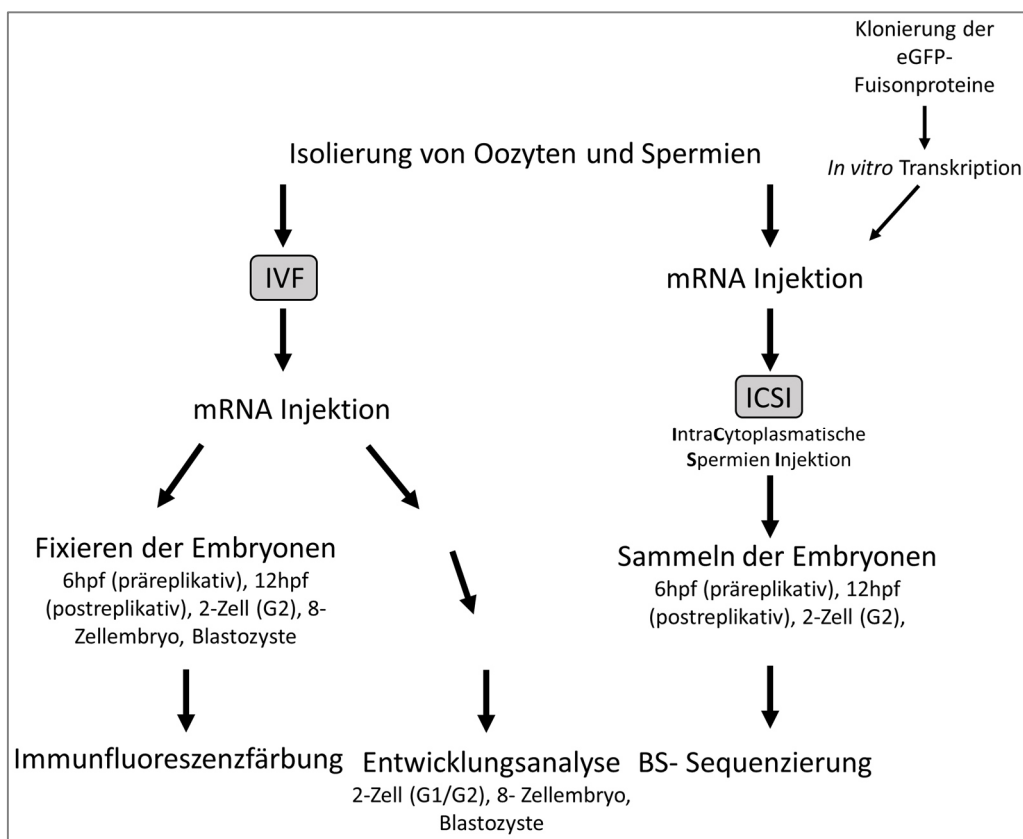


Abbildung 2.1 Der schematische, zeitliche Ablauf der Experimente. Dargestellt ist der Ablauf der verschiedenen Experimente. Erklärungen sind im Text gegeben.

Nach der Isolation von Oozyten und Spermien (Kapitel 2.2.13 und 2.2.14) wurde entweder eine IVF durchgeführt (Kapitel 2.2.15) und die mRNA in die Zygote (2-3hpf) injiziert (Kapitel 2.2.16), oder die mRNA in die Oozyten injiziert und diese dann, aufgrund der dadurch verlorenen Befruchtbarkeit, manuell per ICSI befruchtet (Kapitel 2.2.17). Die ICSI wurde immer dann angewendet, wenn das Protein schon bei der Befruchtung, in sehr frühen PN- Stadien vorhanden sein musste. Dies war bei allen Sequenzierungsanalysen (prä- und postreplikativ) der Fall. Zu definierten Zeitpunkten wurden die durch IVF gewonnenen Embryonen zu Immunfluoreszenzanalysen gesammelt (Kapitel 2.2.18), die

Entwicklung beobachtet oder die durch ICSI gewonnenen Zygoten für die Bisulfit- Sequenzierung präpariert (Kapitel 2.2.24).

2.2.1 Klonieren der eGFP- Fusionsproteine

Zum Klonieren der CDS der jeweiligen eGFP- Fusionsproteine wurde ein modifiziertes pET28b(+) Plasmid verwendet (2.1.12 und Abbildung 2.2). Dieses pET28b(+) Plasmid enthält einen T7 Promotor, welcher essentiell für die *in vitro* Transkription mittels der T7 RNA Polymerase ist. Zudem sind eine multiple Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site, MCS), ein Kanamycinresistenzgen und für mögliche Aufreinigungen von exprimierten Proteinen ein His- tag vorhanden. In dieses Plasmid, wurde die CDS von eGFP kloniert (durchgeführt von Dr. K. Lepikhov). Diese wurde in zwei Variationen eingefügt, einmal 3'-wärts der MCS (pEGUP1), sodass sich eGFP C- terminal des später einklonierten Proteins befindet, und einmal 5'-wärts der MCS, sodass sich eGFP N- terminal befindet (pEGUP2) (Abbildung 2.2). Bei den in dieser Arbeit klonierten CDS von TET3FL, TET1FL, TET1CD, TDGwt und TDGmut befindet sich eGFP C- terminal. Im Konstrukt mit TET3CD befindet sich eGFP N-terminal. Das Klonieren von TET3FL und TET3CD in pEGUP1 bzw. pEGUP2 wurde von Dr. K. Lepikhov durchgeführt. Zudem wurde eine 83bp Poly(A)- Sequenz 3'-wärts des offenen Leserahmens kloniert, die eine effiziente Translation der mRNA in der Zygote ermöglicht (Yamagata et al. 2005).

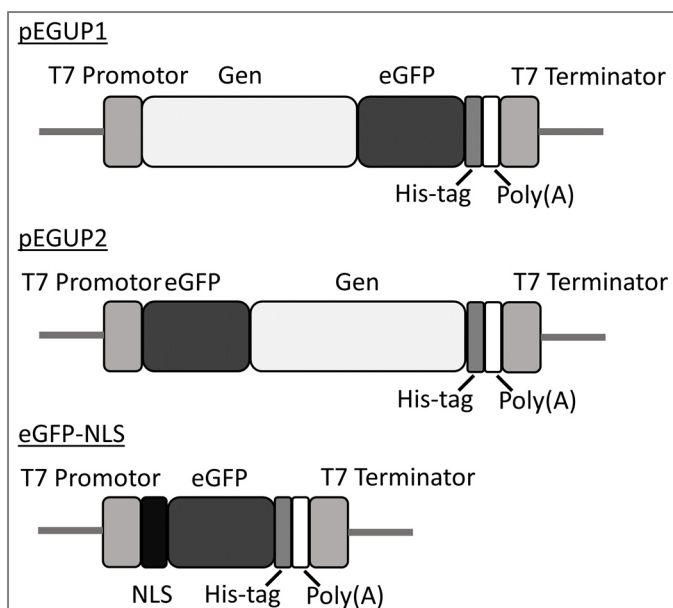


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der verwendeten Plasmid- Konstrukte. Dargestellt sind die verschiedenen Versionen des verwendeten Plasmids. Alle besitzen einen T7-Promotor/- Terminator und das eGFP- Gen. In pEGUP1 ist eGFP C- terminal des klonierten Gens lokalisiert, in pEGUP2 N- terminal. eGFP-NLS wurde zum Zwecke der Kontrolle hergestellt und besitzt die NLS von SV40, N-terminal des eGFPs.

Die CDS von TET1CD, TET1FL, TET3CD, und TDGwt wurden mittels PCR amplifiziert (Tabelle 2.2), das PCR- Produkt und das Plasmid durch die entsprechenden Endonukleasen geschnitten und die beiden Fragmente ligiert, transformiert, selektiert und vervielfältigt. Die CDS von TET3FL wurde mittels einer Ligation von glatten Enden am 5'- Ende des PCR- Produkts durchgeführt. Das Plasmid wurde mit NcoI geschnitten und die einzelsträngigen Enden mittels Klenow- Fragment gefüllt. Danach wurde das Plasmid und das PCR- Produkt mit NotI geschnitten. Plasmid und PCR- Produkt wurden dann ligiert. Damit eGFP, wie die anderen Proteine, in den Zellkern transportiert wurde, wurde eine Kernlokalisationssequenz (engl. nuclear localisation sequenz; NLS) in den Vektor (pEGUP1) eingefügt

(Abbildung 2.2). Hierbei handelt es sich um die NLS des Simian Virus T40 large Antigene (Sequenz aus dem Vektor Clontec pEYFP-Nuc). Dazu wurden Oligonukleotide beider Stränge dieser Sequenz inklusive Endonuklease- Schnittstelle entworfen (beide Stränge, Tabelle 2.2), diese hybridisiert (NLS upperI+ NLS lowerI und NLS upperII+ NLS lowerII) und in pEGUP1 kloniert.

2.2.2 Plasmidisolation

Die Vervielfältigung von Plasmiden wurde in Bakterien (Top10F') vorgenommen. Dazu wurden die entsprechenden Bakterienklone in 3ml LB- Medium vermehrt. Die Plasmide wurden mittels GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (SigmaAldrich) gemäß Herstellerprotokoll isoliert.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)

Zum Amplifizieren der CDS (Phusion- Polymerase) und des Templats für die *in vitro* Transkription (Pfu- Polymerase) und zum Überprüfen der Insertion des PCR- Produkts (Kolonie- PCR, Taq- Polymerase) wurde die PCR benutzt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

PCR

Reaktionsansatz	PCR- Programm
0,05-5 ng DNA	95°C – 5min
3µl Puffer (10x Puffer III)	95°C – 30 sek
3µl dNTPs (2.5mM jedes)	X°C – 30 sek
0,8µl Primer vorwärts	72°C – Y
0,8µl Primer Rückwärts	72°C – 10min
0,8µl Taq:Pfu- Polymerase 1:10	
ad 30µl Aqua bidest.	

X gibt die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide an (Tabelle 2.2). Y ist die Elongationszeit, abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA- Sequenz (Taq: 1kb/min).

Kolonie PCR

Die Kolonie- PCR ist eine Form der PCR, die das schnelle Testen auf die Anwesenheit des inserierten DNA- Fragments nach der Transformation ermöglicht. Dazu wird der Reaktionsansatz hergestellt und mit Hilfe eines Zahnstochers ein Bakterienklon in diesen Ansatz übertragen. Reaktionsansatz (ohne DNA) und PCR- Programm siehe PCR.

Mutagenese PCR

Die Mutagenese- PCR wurde angewendet, um in eine Sequenz (TDG), an einer bestimmten Position eine Punktmutation einzuführen (Abbildung 2.3). Im Vorwärtsprimer befand sich an Position 13/14nt anstatt AA, GC (Stern in Abbildung 2.3, Tabelle 2.2). Das 5'- Ende des Rückwärtsprimer schließt direkt an das 5'- Ende des Vorwärtsprimers an. Für eine spätere Ligation wurden die Primer am 5'- Ende phosphoryliert. Mit der Phusion- Polymerase (sehr hohe Genauigkeit/große Elongationsfähigkeit),

wurde die PCR des ganzen Plasmids durchgeführt. Abschließend wurde 1µl PCR- Ansatz in die Ligation eingesetzt.

Reaktionsansatz

10µl Phusion HF- Puffer (5x)
1µl dNTPs (10µM jedes)
2,5µl Primer vorwärts
2,5µl Primer rückwärts
0,5µl Phusion® Hot star II DNA Polymerase
ad 50µl Aqua bidest.

PCR- Programm

98°C – 30sec
98°C – 10sec
53°C – 30sec
72°C – 2min30sec
72°C - - 10min

} x30

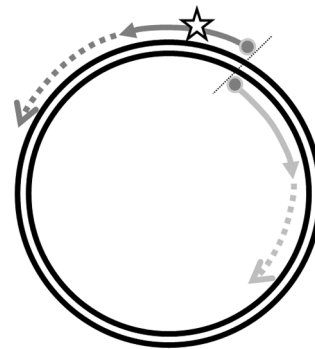


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Mutagenese- PCR. Die Primer sind als Pfeile dargestellt, die Amplifikationsrichtung durch gestrichelte Pfeile. Der Stern symbolisiert die Mutation und die Kreise die Phosphorylierung am 5'- Ende.

2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA oder *in vitro* transkribierter mRNA

Die Auftrennung der DNA/mRNA nach ihrer Größe erfolgte mittels Gelelektrophorese. Danach wurde die DNA/mRNA mittels Ethidiumbromid angefärbt und nach Bedarf die gewünschten DNA- Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.2.5).

2.2.5 DNA Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR- oder Vektor- DNA aus dem Agarosegel oder aus dem Ansatz wurde das Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit von Genaid (früher Avegene) verwendet. Dies wurde gemäß Herstellerprotokoll angewendet.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von aufgereinigter DNA und RNA sowie PCR- Produkten wurde mittels photometrischer Messung mit Hilfe des NanoDrops 2000c bestimmt. Konzentrationen von PCR- Produkten, die für die Sequenzierung mittels MiSeq generiert wurden, wurden nach der Aufreinigung mittels Qubit™ Fluorometer bestimmt. Dazu wurde das Quant-iT™ dsDNA assay kit (high sensitivity) verwendet.

2.2.7 Schneiden der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde mittels der entsprechenden Endonukleasen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen gerschnitten.

2.2.8 Ligation

Um die geschnittene PCR- und Vektor- DNA zu ligieren, wurde die T4 DNA Ligase (Promega) gemäß des Herstellerprotokolls verwendet.

2.2.9 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch- kompetente Top 10F' *E. coli*- Zellen verwendet. 5µl des Ligationsansatzes wurden mit 50µl *E. coli*- Zellen gemischt (30 min, auf Eis). Daraufhin wurde der Hitzeschock durchgeführt (90 sec, 42°C), 500µl eiskaltes SOC- Medium hinzugefügt (2 min, Eis) und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurde dieser auf eine LB- Agarplatte (+ Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Trockenschrank inkubiert.

2.2.10 Kontrolle der Klonierungsstellen

Um die Klonierungsstellen oder mutierte Position in TDGmut auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurden die entsprechenden Positionen mittels Sangersequenzierung analysiert (Oligonukleotide Tabelle 2.2). Dazu wurden aufgereinigte PCR- Produkte an GATC Biotech geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit Hilfe von FinchTV ausgewertet.

2.2.11 *In vitro* Transkription

Die für die Überexpression benötigte mRNA wurde mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionskits generiert. Dafür wurde das mMessage mMachine[®]T7 ultra Transcription Kit von Ambion (TETCD und TETFL) oder das MessageMAX T7 ARCA-Capped Message Transcription Kit von Biozym (GFP- NLS, TDGwt, TDGmut) verwendet. Das benötigte DNA- Templat wurde folgendermaßen hergestellt: Die entsprechende DNA- Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert (T7 upstream, T7 terminator, Tabelle 2.2). Um das optimale 3'- Ende (endend mit dem Poly(A)- Schwanz) zu generieren, musste das PCR- Produkt nach seiner Aufreinigung (2.2.5) mit der Endonuklease SwaI gespalten werden. Daraufhin wurde der Ansatz für 2h mit Proteinase K (20µg/ml) inkubiert. Das Templat wurde mit Hilfe der Phenol- Chloroform- Behandlung mit anschließender Ethanol-fällung aufgereinigt und in 35-45µl Aqua bidest. eluiert. Danach wurde die *in vitro* Transkription gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Aufreinigung der mRNA wurde das RNA Clean & Concentrator™ Kit (Zymo Research) verwendet und laut Hersteller angewendet. Daraufhin wurde die Konzentration der mRNA gemessen (Kapitel 2.2.6) und der Erfolg im Agarosegel geprüft (Kapitel 2.2.4).

2.2.12 Experimentelles Arbeiten mit Mäusen und Mausembryonen

Die Experimente mit Mäusen wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für die Arbeiten wurde eine Ausnahmeerlaubnis nach §9 Abs. 1 Satz 4 gemäß Tierschutzgesetz vom 25.05.1998 für die intraperitoneale Injektion und die Tötung durch zervikale Dislokation erlangt.

In dieser Arbeit wurden in der Zygote verschiedene Enzyme überrepräsentiert und der Einfluss dieser zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der epigenetischen Modifikationen (Immunfluoreszenz-Analysen und Bisulft/MAB- Sequenzierung) oder des Entwicklungspotenzials analysiert. Die verwendeten Zygoten wurden durch *in vitro* Fertilisation (IVF) (Kapitel 2.2.15) oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (Kapitel 2.2.17) gewonnen. Die ICSI wurde immer dann angewendet, wenn das überrepräsentierte Protein schon in frühen PN- Stadien vorhanden sein sollte (Sequenzierungsanalysen). Dazu wurde mRNA in Oozyten mikroinjiziert (Abbildung 2.4). Dadurch verloren diese ihre Fähigkeit, durch IVF befruchtet zu werden, wodurch dies manuell via ICSI geschehen musste. Für alle anderen Experimente (Immunfluoreszenz- oder Entwicklungsanalysen) wurde in frühe, durch IVF gewonnene Zygoten mRNA mikroinjiziert und die Embryonen entsprechend analysiert.

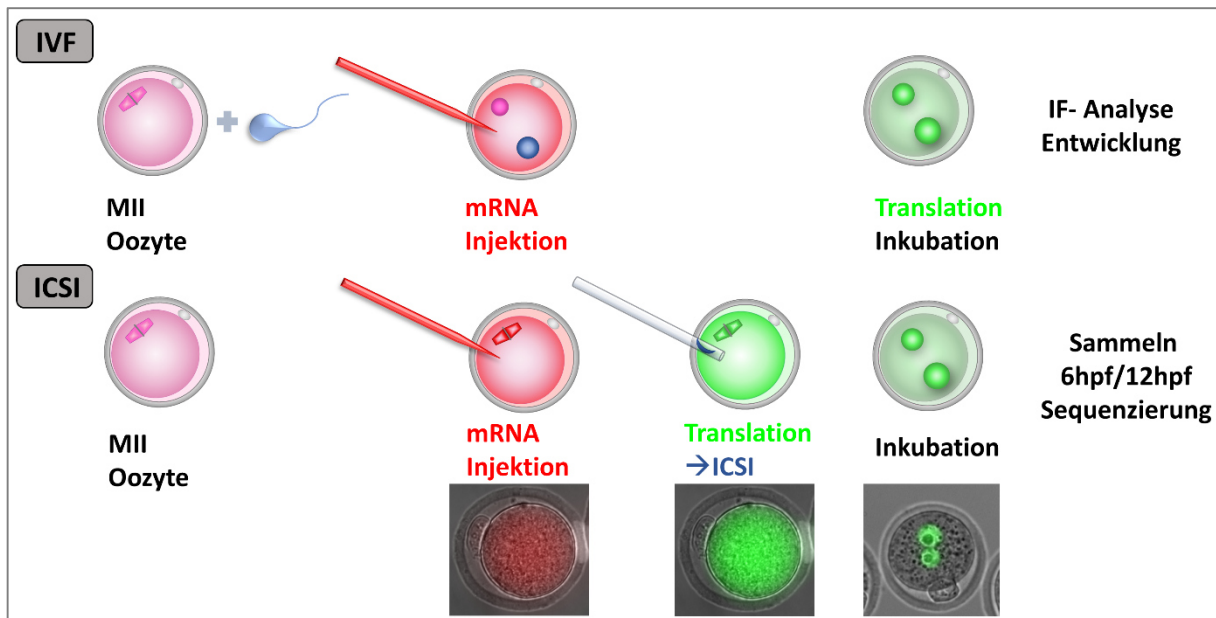


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente mit Embryonen.

IVF: Oozyten und Spermien wurden zusammen inkubiert, wodurch es zur Befruchtung kam. In die entstandenen Zygoten wurden 2-3hpf mRNA mikroinjiziert. Dann wurden die Zygoten inkubiert und zum definierten Zeitpunkt fixiert oder die Entwicklung beobachtet.

ICSI: Oozyten wurden isoliert und mit mRNA injiziert, woraufhin sie inkubiert wurden, sodass die Translation der mRNA beginnen kann. Daraufhin folgt die manuelle Befruchtung mittel ICSI. Die Zygoten wurden dann inkubiert und 6hpf/12hpf für die Bisulfitsequenzierung gesammelt.

2.2.13 Gewinnung von Spermien

Bevor die Oozyten präpariert wurden, mussten die Spermien isoliert werden. Dazu wurden zunächst 450µl KSOM+BSA (30mg/ml) über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5,5% CO₂ äquilibriert, damit sich der richtige pH- Wert einstellen kann. Morgens (2h vor der geplanten IVF) wurden männliche Mäuse im Alter von 3-8 Monaten getötet und der komplette *Cauda epididymidis* (Nebenhoden) und ein Teil des *Vas deferens* (Samenleiter) präpariert, in welchem sich die reifen Spermien befinden. Dies wurde dann in KSOM+BSA gelegt, punktiert und für 1.5-2h inkubiert (37°C; 5,5% CO₂), wodurch die Spermien ausschwammen und kapazitierten. Die Spermienkapazitation beinhaltet eine biochemische und

physiologische Reifung der Spermien, ohne die die Penetration der Zone pellucida und damit die Befruchtung der Eizelle nicht möglich ist.

Für die ICSI wurden vergleichsweise wenige und nicht mehr schwimmfähige Spermien benötigt. Dazu wurden die Spermien, wie oben beschrieben isoliert, und für 15min in 450µl KSOM+BSA ausschwimmen gelassen. Dieses Gemisch wurde dann zentrifugiert (4000 rpm) und das entstandene Spermienpellet in 400µl M2 gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.14 Gewinnung von Oozyten

Um möglichst viele MII Oozyten für die *in vitro* Fertilisation (IVF) oder intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) zu erhalten, wurden weibliche Mäuse F1(C57BL/6xDBA) superovuliert. Dazu wurden, je nach Experiment, 3-6 Mäuse (ICSI immer 3) hormonell stimuliert. Das bedeutet, dass die Mäuse zwischen 18:30-21:00 eine intraperitoneale Injektion von 5IU PMSG (engl. pregnant mare serum gonadotrophin) zur Stimulation der Reifung vieler Eizellen erhalten haben. Mit der zweiten Injektion, 5IU hCG (engl. human chorionic gonadotrophin), die 46-49h später erfolgt, wurde der Eisprung stimuliert. 15-16h später konnten die Eizellen präpariert werden. Hierzu wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, das Ovidukt präpariert und in M2- Medium überführt, in welchem dann die folgenden Schritte ablaufen. Zum Zeitpunkt der Präparation befanden sich die MII Oozyten in der *Ampulla*. Diese war dadurch geschwollen und gut unter dem Bionokular erkennbar. Die *Ampulla* wurde vorsichtig mit einer Kanüle geöffnet und der Kumulus- Oozyten- Komplex freigelegt. Dieser Komplex wurde dann direkt in die IVF eingesetzt (2.2.15).

Für die ICSI wurden hingegen Kumuluszellen- freie Oozyten benötigt. Dazu wurden die Komplexe aus Kumuluszellen und Oozyten für 10 min mit Hyaluronidase (300µg/ml in M2) inkubiert. Dadurch löste sich der Komplex auf, und die Oozyten konnten gesammelt und in M2- Medium gewaschen werden, bis möglichst alle Kumuluszellen entfernt sind. Die Oozyten (und alle Embryonen anderer Stadien) wurden dabei und in allen experimentellen Schritten durch Mundpipettieren mit Hilfe von Glaskapillaren bewegt/transferiert.

2.2.15 *In vitro* Fertilisation

Nachdem die Spermien kapazitiert und die Eizellen isoliert waren, wurden die Eizellen- Kumulus- Komplexe und 8µl Spermien des KSOM+BSA- Gemischs in den IVF- Tropfen (KSOM, ÜN bei 37°C, 5,5% CO₂ äquilibriert) gegeben. Somit konnten durchschnittliche Befruchtungsquoten von 70-80% erreicht werden. Die Zygoten wurden zum gewünschten Zeitpunkt (2-3hpf) für die Mikroinjektionen gesammelt und mehrmals in M2- Medium gewaschen.

2.2.16 Mikroinjektion von Zygoten und Oozyten

Die Mikroinjektion der mRNA erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M. Dazu wurden Injektionsnadeln benötigt. Diese wurden aus Borosilikat-Glasröhrchen (GC100TF-10) im Micropipette-Puller (Sutter Model P-87) mit Hilfe eines Kastenfilaments nach dem folgenden Programm angefertigt:

Temperatur: Ramp+5, Zugkraft: 80, Geschwindigkeit: 80, Zeit: 180, Druck: 120-180.

Um einen geraden Einstichwinkel bei der Injektion zu erlangen, wodurch die Zygoten/Oozyten wenig geschädigt werden, wurde die Spitze der Injektionsnadel mit Hilfe der Mikroschmiede um 30°C gebogen. Die mRNA wurde mit Rhodamin- Dextran (Polysaccharid ohne Einfluss auf die Zelle) versetzt, welches im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann (Abbildung 2.4 und Abbildung 2.5 mittlere Reihe). So konnte kontrolliert und reguliert werden, ob und wie viel mRNA in die Zygoten injiziert wurde. Die Injektionsnadel wurde mit 1,5µl mRNA- Rhodamin- Dextran mittels einer Microloader Pipettenspitze (Eppendorf) befüllt und am Mikromanipulator (verbunden mit Femtojet, Eppendorf) befestigt und justiert. Zudem wurde eine Haltekapillare benötigt. Diese wurde durch das Abbrechen einer Injektionsnadel (Durchmesser der Öffnung 40-60µM) und das vorsichtige Schmelzen und Glätten der Kanten hergestellt. Auch die Haltekapillare wurde um 30°C gebogen. Diese wurde dann am Mikromanipulator TransferMan NK2 (verbunden mit CellTram Air®- Mikroinjektor (Eppendorf)) gegenüber der Injektionsnadel befestigt und so justiert, dass die beiden eine Linie ergaben (Abbildung 2.5).

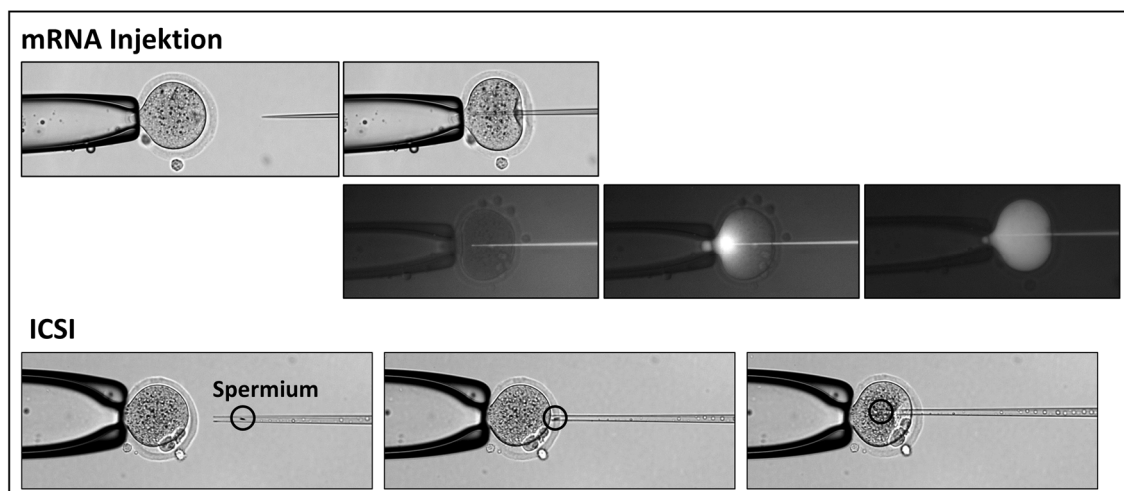


Abbildung 2.5 Aufnahmen während mRNA Mikroinjektion und ICSI.

mRNA Injektion

Oben: Durchlichtaufnahmen kurz vor (links) und während der Injektion (rechts) von mRNA. Links: Zu sehen ist die Haltekapillare, mit der eine Zygote fixiert wurde. Rechts: Die Injektionsnadel wurde in die Zygote eingeführt.

Unten: Fluoreszenzaufnahmen während der Mikroinjektion. Links: entspricht dem rechten Durchlichtfoto. Die Injektionsnadel wurde eingeführt, das Rhodamin- Dextran fluoresziert. Die Membran ist noch intakt. Mitte: die Membran wurde durch einen Piezo- Impuls gebrochen und mRNA- Rhodamin- Dextran- Gemisch über Druck injiziert. Rechts: mRNA- Rhodamin- Dextran hat sich schnell in der Zygote verteilt, die Nadel wurde danach vorsichtig herausgezogen und die Injektion war beendet.

ICSI

Links: Eine Oozyte wurde fixiert und ein Spermium in die ICSI- Kapillare aufgenommen. Mitte: Die *Zona pellucida* wurde durchdrungen, indem ein kleines Loch gemacht wurde. Rechts: Das Oolemma wurde an der Eintrittsstelle der Kapillare gebrochen und das Spermium in das Zytoplasma entlassen.

Die Zygoten/Oozyten wurden gesammelt (2hpf), in M2- Medium überführt und mehrmals gewaschen, sodass möglichst keine Kumuluszellen mehr vorhanden waren. Dann wurden sie in einem Mineralöl überschichteten (Verdunstungsschutz) KSOM- Tropfen (100µl) im Inkubator aufbewahrt. Die Mikroinjektion wurde in einem M2- Tropfen (200µl), der mit Mineralöl überlagert war, vorgenommen.

Dies geschah auf folgendem Weg: Vor und während der Injektion wurde die Zygote/Oozyte leicht mit der Haltekapillare angesaugt und damit fixiert. Daraufhin wurde die Nadel in die Zygote/Oozyte eingeführt (Abbildung 2.5 oben, zweites Bild). Durch einen leichten Piezo- Impuls (Piezo-Drill, PMAS-CT 150, Prime Tech) wurde die *Zona pellucida* und die Membran gebrochen. Die Injektion erfolgte dann mit Hilfe des Femtojets (Eppendorf) über Druck (Abbildung 2.5 Mitte, zweites und drittes Bild). Somit war die genaue Menge der injizierten mRNA nicht messbar, sondern über ihre Konzentration und die Intensität des Rhodamin- Dextran- Signals verhältnismäßig einschätzbar. Es wurden immer 15-20 Zygoten/Oozyten in den Tropfen überführt, möglichst zügig injiziert und wieder in den KSOM- Tropfen im Inkubator übertragen. Die Zygoten konnten dann zum gewünschten Zeitpunkt fixiert, oder bezüglich ihrer Entwicklung beobachtet werden. Die Oozyten wurden nach 1-2h Inkubation mittels ICSI befruchtet (Kapitel 2.2.17)

2.2.17 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (engl. Intracytoplasmatic sperm injection; ICSI)

Für die Bisulfitsequenzierungsanalysen präreplikativer Zygoten (6hpf) war es wichtig, dass das überrepräsentierte Protein schon sehr früh in der Zygote vorlag, um die größtmögliche Wirkungszeitspanne zur Beeinflussung des epigenetischen Status' zu erlangen. Hierzu wurde in Oozyten die jeweilige mRNA injiziert (2.2.16) und diese für ca. 2h inkubiert (37°C, 5,5% CO₂), sodass die mRNA translatiert werden konnte und ein (leichtes) grün- fluoreszierendes Signal sichtbar war. Nach der Mikroinjektion sind Oozyten nicht mehr via IVF befruchtbar, sodass in diesem Falle die Befruchtung manuell per ICSI erfolgen musste.

Während der Inkubation der Oozyten, wurden die Spermien für die ICSI vorbereitet. Dazu wurde ein Aliquot der eingefrorenen Spermien (2.2.13) im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Daraufhin wurde 100µl M2- Medium (ohne BSA) oder FHM hinzugegeben. Zur besseren Handhabung, wurden die Spermienköpfe vom -Schwanz getrennt. Dies geschah mittels Scherkräfte durch Auf- und Abpipettieren des Gemischs mit einer Spritze, deren Nadelöffnung verkleinert wurde. Danach wurden weitere 300µl M2(ohne BSA)/FHM hinzugegeben und der Ansatz bei 4000rpm für 3min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Spermienpellet in 100µl M2(ohne BSA)/FHM +0,1% PVP gelöst. Das PVP führte zu einer verminderten Adhäsion der Spermien am Petrischalenboden oder der ICSI- Kapillare. Die ICSI- Kapillare wurde aus Glaskapillaren (GC100T-15) mit folgendem Programm im Puller hergestellt: Temperatur: Ramp+45, Zugkraft: 80, Geschwindigkeit: 80, Zeit: 180, Druck: 120-180. Die Kapillare wurde dann in der Mikroschmiede gebrochen, sodass ihre Öffnung einen Durchmesser von 5-6 µm besaß und dann um 30°C gebogen. Um die Kanten der Öffnung zu „schärfen“ und ein leichteres Brechen der *Zona pellucida* und der Membran zu ermöglichen, wurde die Kapillare mit Flusssäure (48%) gewaschen, wodurch das Glas an der Öffnung dünner und damit schärfer wurde. Daraufhin wurde die Kapillare mit Isopropanol und Aqua bidest. gewaschen und mit Quecksilber oder Fluorinert befüllt, sodass ca. 1cm der Länge der Kapillare abgedeckt waren.

Zur Durchführung der ICSI wurde das Mikroskop Eclipse 2Ti (Nikon) verwendet. Die ICSI- Kapillare wurde am Mikromanipulator befestigt (TransferMan®4r verbunden mit CellTram® Vario (Eppendorf), mit Aqua bidest. befüllt). Dann wurde sie mit 10% PVP gespült, um die Adhäsion der Spermien zu verringern. Dieser Schritt wurde während des Experiments bei Bedarf wiederholt. Zudem wurde eine Haltkapillare am gegenüberliegenden Mikromanipulator (TransferMan®4r verbunden mit CellTram Air®- Mikroinjektor (Eppendorf)) befestigt und justiert.

Die ICSI erfolgte dann in einem M2(ohne BSA)/FHM +0,1% PVP- Tropfen (100µl), der mit Mineralöl überschichtet war. In der Petrischale befand sich zudem ein Tropfen des Spermienmischs. Aus diesem wurden mit der ICSI- Kapillare 20 Spermienköpfe gesammelt und in den ICSI- Tropfen überführt. Dann wurden jeweils 10 mRNA- injizierte Oozyten (2.2.16) in dem Tropfen platziert und zügig befruchtet. Dazu wurden die Oozyten mit der Haltekapillare angesaugt und fixiert (Abbildung 2.5). Mit der ICSI- Kapillare wurde die *Zona pellucida* vorsichtig berührt und ein Piezo-Impuls ausgeübt (PiezoXpert®, Eppendorf; Intensität 5-7, Geschwindigkeit 1-3). Dadurch wurde ein kleines Loch in die *Zona pellucida* „gebohrt“ (Abbildung 2.5 ICSI, mittleres Bild). Nun wurde die Kapillare tiefer in die Oozyte geführt und ein sehr milder Piezo- Impuls gegeben (Intensität 1-3, Geschwindigkeit 1-2), wodurch die Membran durchbrochen wurde und der Spermienkopf ins Ooplasma entlassen werden konnte (Abbildung 2.5 ICSI, rechtes Bild). Die befruchteten Eizellen wurden dann in M2+1%FCS übertragen und ruhten für 10 min bei RT, bevor sie im Inkubator (KSOM) bis zum gewünschten Zeitpunkt inkubiert wurden.

2.2.18 Immunfluoreszenzanalyse

Analyse von Proteinen

Zur Detektion bestimmter Proteine im präimplantiven Embryo wurde die Immunfluoreszenzanalyse angewendet. Dazu wurden die Embryonen zum gewünschten Zeitpunkt in einen Tropfen (100µl) von Acidic Tyrode's Lösung überführt. Darin wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unter ständiger Beobachtung die *Zona pellucida* aufgelöst. Nach diesem Schritt fanden alle Inkubationen in einer feuchten Kammer statt. Die Embryonen wurden für 30min in 3,7% PFA bei RT fixiert. Daraufhin musste die Membran permeabilisiert werden, damit die Antikörper den Nukleus erreichen können (RT, 20min in 0.2% Triton X-100 in PBS). Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern, wurden die Embryonen für mindestens 2h (RT) oder über Nacht (4°C) in Blockierungslösung inkubiert (1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS). Danach wurden die Embryonen mit dem primären Antikörper inkubiert (verdünnt in Blockierungslösung; Verdünnungen und Konditionen in Tabelle 2.1). Nach dreimaligem 15-minütigem Waschen in Blockierungslösung (100µl) bei RT folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (2-4h, RT; verdünnt in Blockierungslösung, Konditionen in Tabelle 2.1). Daraufhin wurden die Embryonen abermals mindestens drei Mal für 30 min in Blockierungslösung gewaschen. Danach wurden die Embryonen in 10µl Mounting- Lösung (+0,5mg/ml DAPI) für 15 min äquilibriert, woraufhin sie in einen 2µl- Tropfen Mounting- Medium auf einem sauberen Objektträger transferiert wurden. Es wurde ein Deckglas aufgebracht und nach 10 min mit Nagellack luftdicht

verschlossen. Schließlich konnten die Embryonen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert werden (siehe 2.2.20).

Analyse von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC

Um die DNA- Modifikationen 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC mittels Antikörper detektieren zu können, muss die DNA einzelsträngig vorliegen, damit die primären Antikörper diese Antigene bestmöglich erkennen. Dazu wurde nach der Permeabilisierung (siehe oben) ein DNA- Denaturierungsschritt vorgenommen. Dazu wurden die Embryonen bei RT für 15min in 50µl 4M HCL inkubiert. Zur Neutralisation wurden vorsichtig 100µl Neutralisationslösung (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) hinzugegeben und direkt in einen neuen Tropfen (100µl) dieser Neutralisationslösung überführt. Danach wurden die Embryonen mehrmals für 15min bei RT gewaschen. Zunächst in Permeabilisierungslösung, dann in 3,7% PFA (zweite Fixierung, 15min), danach wieder in Permeabilisierungslösung und letztendlich in Blockierungslösung inkubiert (RT, mind 2h; 4°C ÜN). Die Antikörperfärbungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Da in dieser Anwendung, die DNA denaturiert wurde, war das Färben der DNA mittels DAPI nicht mehr möglich. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden dann mittels des Fluoreszenzmikroskops analysiert (2.2.20).

2.2.19 Analyse neu synthetisierter DNA oder RNA

In dieser Arbeit wurde auch die Synthese neuer DNA analysiert. Dazu wurden die Zygoten 2h vor der Fixierung mit 50µM EdU/EdC (5- Ethynyl-2'Deoxyctidin/5- Ethynyl-2'Deoxyuridin) (in KSOM) inkubiert. Sowohl EdU als auch EdC sind Ethynyl- markierte Basenanaloga und werden von der DNA- Polymerase bei der Replikation in die DNA eingebaut. Der Einbau dieser Basen wurde durch eine spezifische click-it Reaktion sichtbar gemacht. Dabei reagiert das Alkin von EdU/EdC mit dem Azid- markierten Fluoreszenzfarbstoff, wodurch ein stabiles Triazol Konjugat entsteht. Die click- it Reaktion wurde nach Herstellerprotokoll (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit; Invitrogen) durchgeführt, wobei jedoch 2,5µM des rot- fluoreszierenden Farbstoffs TETramethylrhodamin (TAMRA) anstatt des grün- fluoreszierenden Farbstoffs Alexa Fluor 488 verwendet wurde, da sein Signal mit dem des eGFPs überlappt. Nach mehrmaligem Waschen in Blockierungslösung und Mounten wurden die Embryonen im Mikroskop analysiert (Kapitel 2.2.18).

Die Detektion neu synthetisierter RNA in 2- Zellembryonen erfolgte über die Inkorporation von EU (5- Ethynyl- Uridin) in die RNA. Zum Zeitpunkt 29hpf wurden die Embryonen für 1,5h bei 2,5mM EU in KSOM inkubiert. Da beobachtet werden konnte, dass EU nicht *Zona pellucida*- gängig ist, wurde diese vor der Inkubation mittels Acidic Tyrode's Lösung entfernt. Als Kontrolle, dass EU auch wirklich und ausschließlich in die neu synthetisierte RNA eingebaut wurde, wurde eine Gruppe von Embryonen als Kontrolle ab 5hpf mit dem RNA- Polymerase II- Hemmer α - Amanitin (24ng/µl) inkubiert. Auch EU kann durch die click-it Reaktion detektierbar gemacht werden. Dies wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.20 Analyse der Immunfluoreszenzaufnahmen

Mit einer schwarz/weiß Kamera des Zeiss Axiovert 200M oder Axio Observer Z1 wurden Aufnahmen der Embryonen gemacht, gegebenenfalls Z- Stapel (Dicke 0,4 μ M, 10-15 Stück), und diese dann mit Hilfe der AxioVision Software (Release 4.8.1) oder Zen2 bearbeitet, pseudokoloriert und/oder die Z- Stapel verrechnet. Die Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Dabei wurden die mittleren Grauwerte (mean grey value) der Antikörper- Signalintensitäten der (einzelnen Pro-) Nuklei ermittelt. Manche Antikörper bildeten ein deutliches Hintergrundsignal, sodass für jede Aufnahme das Hintergrundsignal subtrahiert wurde (ImageJ, subtract background: 200-400). Bei Antikörperfärbungen, bei welchen eine DAPI- Färbung möglich war, wurden die Antikörpersignale gegen das DAPI- Signal normalisiert. Die ermittelten Werte der behandelten Embryonen wurden dann in ein prozentuales Verhältnis mit denen der Kontroll- Embryonen (GFP- NLS überexprimierende Embryonen) gebracht, wobei die Werte der Kontrolle auf 100% gesetzt wurden. Die errechneten Werte stellen demnach keine absoluten Werte, sondern Relationen dar.

2.2.21 Blockieren der Replikation in Zygoten

Für einige Experimente war es notwendig, die Replikation der DNA zu blockieren. Dazu wurde Aphidicolin verwendet, welches kein Basenanalogen ist, aber die gleiche Position wie dCTP in der DNA- Polymerase einnimmt und diese durch eine kovalente Bindung blockiert. Die Zygoten wurden ab 4hpf bis zum Zeitpunkt der Fixierung bzw. des Sammelns mit 3 μ g/ml Aphidicolin in KSOM inkubiert.

2.2.22 Induktion von Strangbrüchen in Zygoten mittels Methylmethansulfonat

In dieser Arbeit wurden Strangbrüche in Zygoten mittels Antikörperfärbungen des Strangbruchmarkers γ H2A.X analysiert. Dazu war eine Positivkontrolle notwendig, um sicher zu gehen, dass es sich im Experiment wirklich um Strangbrüche handelt. Dazu wurde das alkylierende Reagenz Methylmethansulfonat (MMS) verwendet, welches die BER aktiviert und SSBs induziert. Die Zygoten wurden 1h vor der Fixierung mit 5mM MMS in KSOM inkubiert und mittels γ H2A.X- Antikörper angefärbt und analysiert.

2.2.23 Analyse der Entwicklung der Embryonen

Von den Embryonen, in welche mRNA mikroinjiziert wurde, wurde zu definierten Zeitpunkten (12hpf, 28hpf, 48hpf, 96hpf) Aufnahmen gemacht. Dann wurde pro Zeitpunkt die Anzahl der Embryonen in den verschiedenen präimplantiven Stadien gezählt. Die Anzahl der Embryonen in dem jeweiligen Stadium wurde dann ins prozentuale Verhältnis zur Anzahl der befruchteten Oozyten (=100%) gesetzt.

2.2.24 Selektion und Präparation der Embryonen zum Sequenzieren

Für die Sequenzierung mussten die Zygoten (ICSI) nach verschiedenen Kriterien selektiert werden. Es musste sichergestellt werden, dass die Zygoten zwei Pronuklei korrekt ausgebildet haben. Dies wurde entweder mittels Hoechst33342 (5 μ g/ml, in M2), welches DNA färbt, kontrolliert oder mittels des

eGFP- Signals oder durch beide Signale. Außerdem war es wichtig, dass keine Kumuluszellen an den Zygoten hafteten, da diese ungewünschte DNA in das Experiment eingebracht hätten. Dies wurde schon die Präparation der Eizellen mittels Hyaluronidase mit mehrmaligem Waschen (Kapitel 2.2.14) und weiterhin durch das Auflösen der *Zona pellucida* und folgendem mehrmaligem Waschen in M2 gesichert. Daraufhin mussten die beiden Polkörper entfernt werden. Dies erfolgte durch eine scharfe, in der Mikroschmiede gebrochene Kapillare (Öffnung 60-80µM) mittels Mundpipettieren. Dabei wurden die Zygoten so lange auf- und abpipettiert, bis sich beide Polkörper gelöst hatten oder die Zygote zerstört war, sodass beide Pronuklei gesammelt werden konnten. Die Zygoten/Pronuklei wurden dann in 2µl M2 in 0,5ml Reaktionsgefäße überführt und direkt weiterbehandelt oder bei -20°C eingefroren.

2.2.25 Bisulfitsequenzierung

Die Bisulfitsequenzierung wurde angewendet, um Cytosin- Methylierung (5- Methylcytosin) im Genom oder Genomabschnitten zu analysieren.

2.2.26 Bisulfitbehandlung

Für die Bisulfitbehandlung wurden verschiedene Ansätze gewählt, die jeweils unterschiedliche Konvertierungsraten für 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC besitzen. Diese Konvertierungsraten wurden laborintern von Dr. S. Tierling durch Amplikon- Sequenzierung ermittelt und sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Für die Sequenzierung von PCR- Amplikons der TET- Überexpressionsexperimente wurde das EZ DNA Methylation Gold™ Kit (Zymo Research) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Für den Versuch der genomweiten Sequenzierung von Zygoten, in welchen TDGwt überexprimiert wurde, wurde das EZ DNA Methylation Lightning™ Kit (Zymo Research) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Für die MA- HPBS-Seq- Analysen wurde das laboreigene Protokoll angewendet.

Das laboreigene Protokoll wurde wie folgt durchgeführt, wobei vor Beginn der Behandlung die folgenden Lösungen angesetzt wurden:

3M NaOH

Natrium- Bisulfit – 1,9 Na- Bisulfit gelöst in 2,54 ml Aqua bidest. und 710µl 3M NaOH

Radikalfänger – 98,6mg gelöst in 2,5ml Dioxan

Zur jeder Probe wurden 100µl Natrium Bisulfit- Lösung und 50µl Radikalfänger hinzugegeben und mit dem folgenden Programm im PCR- Cyclus behandelt.

99°C – 15min

50°C – 30C

99°C – 5min
50°C – 60min } x3

Danach wurde zu jedem Ansatz 340µl Aqua bidest. gegeben und dann auf eine NanoSep30K- Zentrifugationseinheit geladen. Diese wurde für 12min bei 5000g zentrifugiert und der Durchfluss

verworfen. Zum Waschen der DNA wurden 450µl Aqua bidest. auf die Membran gegeben. Daraufhin wurden 450µl 0,3M NaOH zum Zwecke der Desulfonierung auf die Membran gegeben und für 10min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Zentrifugationseinheit zentrifugiert (10 min, 5000g), der Durchfluss verworfen und auf die Membran ein weiteres Mal 450µl Aqua bidest. gegeben und zentrifugiert. Zum Schluss wurden 15µl Aqua bidest. auf die Membran gegeben und mittels Auf- und Abpipettieren die DNA von dieser gespült. Diese 15µl wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C gelagert.

2.2.27 Hairpin- Bisulfit

Um Methylierungsdynamiken in der Zygote analysieren zu können, war es wichtig, beide komplementären CpG- Positionen eines DNA- Moleküls gleichzeitig zu detektieren. Dazu wurde die Hairpin- Bisulfit- Analyse (HPBS) angewendet (Arand et al. 2015). Hierbei wurde die DNA je nach analysiertem repetitiven Element mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten (Tabelle 2.5) und das entsprechende Hairpin-Linkeroligonukleotid an die Schnittstelle ligiert. Dann folgte die Bisulfitbehandlung, woraufhin die DNA für die PCR genutzt wurde.

Tabelle 2.5 Endonukleasen für die Restriktion der verschiedenen repetitiven Elemente bei der Hairpin-Bisulfitbehandlung

	Endonuklease	Temperatur
mSat	Eco47I	37°C
Line1	BsaWI	60°C
IAP	DdeI	37°C

Die gesammelten Zygoten (2.2.24) wurden zunächst lysiert. Zu den 2µl Medium+ Zygoten wurde 100ng Lachsspermien- DNA, als Träger- DNA, 1µl Lysepuffer und 1µl Proteinase K (1mg/ml) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 3-4h bei 55°C inkubiert. Daraufhin wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 0,7 µl Pefabloc® SC gestoppt (8,14 mM, 1h, RT). Danach wurde zum Zwecke der Restriktion 1/10 Volumen CutSmart Restriktionspuffer (10x, NEB), 1µl MgAcetat (5mM) und 5-10U der entsprechenden Restriktionsendonuklease (Tabelle 2.5) hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei den jeweiligen Temperaturen (Tabelle 2.5) für 3h inkubiert, woraufhin die Enzyme bei 80°C für 20min deaktiviert wurden. Für die Ligation mit dem entsprechenden Linkeroligonukleotid wurden 1µl ATP (10mM), 0,5µl Linkeroligonukleotid und 0,5µl T4 Ligase (400U/µl, NEB) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 4h bei 16°C inkubiert. Daraufhin wurde die DNA in die Bisulfitbehandlung eingesetzt (2.2.26).

2.2.28 M.SssI assisted hairpin-bisulfite sequencing – MA-HPBS- Sequenzierung

Da durch die herkömmliche Bisulfitsequenzierung die verschiedenen oxidierten 5mC- Derivate nicht unterscheidbar (5mC/5hmC und C/5fC/5caC) sind, wurde in dieser Arbeit die M.SssI basierte Bisulfitsequenzierung (engl. M.SssI assisted bisulfite sequencing; MAB- Seq) in Kombination mit der Hairpin- Bisulfitsequenzierung angewendet.

Auch bei dieser Methode war der erste Schritt die Lyse der Zygoten (siehe oben). Anstatt der Lachsspermien- DNA wurde jedoch 1µl gescherte Lambda- DNA (1ng) in die Proben gegeben. Nach dem Blocken durch Pefablock wird jede Probe auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und eine für BS, die andere für MAB verwendet. Nun wurde zu jeder Probe (2,5µl) 1µl Lachsspermien- DNA (100ng) und 2,3µl Aqua bidest. gegeben. Die BS- Probe wurde, solange die Methylierungsreaktion der MAB- Probe ablief, bei 4°C gelagert. Für die Methylierungsreaktion wurden zu dem MAB- Ansatz 1µl CutSmart® Restriktionspuffer (10x, NEB), 1µl MgAcetat (5mM), 0,2µl SAM (32mM) 0,5µl *M.SssI* (4U/µl, NEB) und 3,3µl Aqua bidest. gegeben. Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert, woraufhin 0,3µl *M.SssI* und 0,2µl SAM hinzugegeben wurden und der Ansatz für weitere 30min bei 37°C inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte die Restriktion der BS- und MAB- Probe.

BS	MAB
5µl DNA	10,5µl DNA
1,5µl CutSmart® Restriktionspuffer (10x, NEB)	0,5µl CutSmart® Restriktionspuffer (10x, NEB)
1µl MgAcetat	---
1µl Endonuklease	1µl Endonuklease
ad 15µl Aqua bidest.	ad 15µl Aqua bidest.

Die Ansätze wurden bei entsprechender Temperatur für 3h-ÜN inkubiert (Tabelle 2.5) und danach für 20min bei 80°C inaktiviert. Dann erfolgte die Ligation des Linkeroligonukleotids durch Zugabe von 1µl Linkeroligonukleotid, 2µl ATP (10mM) und 1µl T4 Ligase 4h-ÜN bei 16°C.

2.2.29 Bisulfit- PCR

Nach der Bisulfitbehandlung wurde je nach Anzahl der Zygoten und nach repetitivem Element 2-4µl des Eluats in die PCR eingesetzt. mSats und IAPs wurden mit der Hot FirePol® DNA Polymerase (Solis Biodyne) amplifiziert, L1 hingegen mit der HotStarTaq Polymerase (Qiagen).

Hot FirePol	HotStarTaq
3µl Puffer B (10x)	3µl HotStarTaq Puffer
3µl MgCl ₂ (25mM)	1,2µl MgCl ₂ (25mM)
2,4µl dNTPs (2,5mM jedes)	2,4µl dNTPs (2,5mM jedes)
0,5µl Primer F	0,5µl Primer F
0,5µl Primer R	0,5µl Primer R
0,5µl Hot FirePol	0,5µl HotStarTaq
0,3µl HotStart IT Binding Protein (optional)	0,3µl HotStart IT Binding Protein (optional)
ad 30µl Aqua bidest.	ad 30µl Aqua bidest.

PCR Programm

97°C – 15min
95°C – 1min
X°C – Ymin
72°C – Zmin
72°C – 10min

} x Zyklen

	X°C	Ymin	Zmin	Zyklen
mSat	56°C	2min	1min	40x
L1	55°C	1min	1min30sec	45x
IAP	51°C	1min30sec	1min30sec	40x
Lambda	50°C	2min	1min	30x

Die PCR- DNA wurde daraufhin mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 2.2.4) und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Dann wurde die DNA aufgereinigt (Kapitel 2.2.5) und die Konzentration im Qubit (Kapitel 2.2.6) gemessen. Lagen diese zwischen 0,5ng/µl-10ng/µl konnten die Proben mittels MiSeq sequenziert werden (Kapitel 2.2.30).

2.2.30 MiSeq

Die Hochdurchsatz- Sequenzierung mittels des MiSeqs (Illumina) ermöglicht eine relativ einfache und kostengünstige Analyse von vielen Sequenzen. Diese Methode basiert auf der Sequenzierung während der Synthese (engl. sequencing by synthesis; SBS) und ist eine der prominentesten Technologien im Next Generation Sequencing (NGS).

Die generierten PCR- Amplikons wurden von Jasmin Kirch, Christina Lo Porto, Katharina Faber und Tabea Trampert verdünnt und sequenziert. Dazu wurde das MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) (Illumina) verwendet. Die entstandenen Daten wurden dann von Pavlo Lutsik, Karl Nordström und Abdulrahman Salhab extrahiert, auf ihrer Qualität geprüft und sortiert. Diese konnten über Galaxy gefiltert und heruntergeladen werden.

2.2.31 Auswertung der Hairpin- Sequenzierungsdaten

Die erhaltenen Daten wurden zunächst mit Hilfe des BiQAnalyzerHT analysiert (Lutsik et al. 2011), wodurch sowohl die Methylierung der CpG- Positionen, als auch die Konvertierungsraten bestimmt werden konnten. Dabei wurde für jedes repetitive Element unterschiedliche Parameter angewendet. Als Sequenzidentität wurde für mSat 90% verwendet, für L1 75%-85% und für IAP 65%-75%. Die maximale Anzahl der nicht-erkannten CpGs wurde für mSat auf 0%, für L1 auf 10% und für IAP auf 10%-20% eingestellt. Die mit Hilfe des BiQAnalyzerHT generierten Daten wurden dann mittels eines laborinternen Skripts, dem Hairpinanalyzer, auf Methylierung gegenüberliegender CpG- Positionen analysiert.

2.2.32 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Excel (2010 und 2016) durchgeführt.

Für die Immunfluoreszenz- Analyse und EU Inkorporationsexperimente wurden mittels ImageJ die mittleren Grauwerte der jeweiligen parentalen Pronuklei oder Nuklei (2-Zellembryo) ermittelt. Aus diesen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zweier Proben (immer Experimental- im Vergleich zur Kontrollgruppe) wurde mit Hilfe

des zweiseitigen t- Tests ermittelt. Da die ermittelten mittleren Grauwerte der jeweiligen Experimente aufgrund der fehlenden Normalisierung gegen ein DNA- Signal nicht zusammengefasst werden konnten, wurden die Signifikanzen jedes einzelnen Experiments errechnet. In den Abbildungen ist das niedrigste ermittelte Signifikanzniveau dargestellt. Die p- Werte des t-Tests sind folgendermaßen dargestellt: *=p-Wert<0.05, **= p-Wert<0.01, ***= p- Wert<0.001.

3 Ergebnisse

Um Antworten auf die Fragen nach den Aufgaben und Funktionen von 5hmC, 5fC, 5caC in der präimplantiven Entwicklung und der epigenetischen Reprogrammierung zu finden, wurden in dieser Arbeit modifizierende Enzyme dieser epigenetischen DNA-Modifikationen überrepräsentiert (TET und TDG). Es wurden dann die Auswirkungen auf die Entwicklung, der Effekt auf das epigenetische Gleichgewicht und die Auswirkungen auf den Reprogrammierungsprozess in der Zygote analysiert.

3.1 Überexpression verschiedener TET Varianten im präimplantiven Embryo

TET3 und TET1 stellen die für die präimplantive Entwicklung wichtigsten TET Enzyme dar. TET3 ist stark und fast ausschließlich in der Oozyte/Zygote exprimiert, während TET1 ab dem 2- Zellstadium vorhanden ist (Wossidlo et al. 2011). Um Einblicke in die Rolle der Enzyme und der von ihnen oxidierten Basen zu erlangen, wurden verschiedene Varianten dieser beiden Enzyme in der Zygote überrepräsentiert. Dabei sollten die unterschiedlichen und spezifischen Funktionen dieser Enzyme erforscht werden, die Auswirkung der Veränderung der Zusammensetzung der epigenetischen Modifikationen auf die Entwicklung beobachtet und der Effekt der erhöhten Level von oxidierten Basen auf den Demethylierungsprozess basengenau analysiert werden (HPBS-Sequenzierungsanalyse). Zudem wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen die Auswirkungen der Überexpression auf die Mengen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC verschiedener präimplantiver Stadien analysiert (Zygoten: prä- (frühes PN3, 6hpf) oder postreplikativ (PN4, 12hpf); 2- Zellembryonen, Blastozysten). Es wurden sowohl die Vollängenformen (im Weiteren TET3FL und TET1FL genannt) von TET3 und TET1, als auch deren katalytischen Domänen (im Folgenden TET3CD und TET1CD genannt) in der frühen Zygote überrepräsentiert (Mikroinjektion Kapitel 2.2.16, Abbildung 2.4) und die Effekte mittels Immunfluoreszenz und Bisulfitsequenzierung detektiert (Aufbau TET Proteine Abbildung 1.4). Die Überexpressionen der TET Vollängenformen stellen in diesem System die natürlichste Variante dar, da sie endogen exprimiert werden und somit die Enzyme lediglich erhöht vorliegen (Kapitel 1.5). TET3FL ist in der Zygote exprimiert und wird im 2- Zellstadium degradiert, so auch das überrepräsentierte Protein. TET1FL hingegen ist in Zygoten nur leicht exprimiert, wodurch seine Überexpression hier ein künstliches System kreiert. Es ist in den weiteren präimplantiven Stadien endogen vorhanden und liegt somit hier lediglich erhöht vor. Das exogene TET1FL wird ab dem 2- Zellstadium degradiert (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der katalytischen Domänen, ohne regulatorische N- terminalen Teil, stellen das künstlichste der generierten Systeme dar.

Um die Expression und die Lokalisation der TET Enzyme verfolgen zu können, wurde jeweils ein Fusionsprotein mit eGFP hergestellt. Als Kontrolle wurde in dieser Arbeit die Überexpression von eGFP angewendet. Damit eGFP, wie auch die verwendeten Enzyme, in den Vorkern transportiert wurde und damit eine korrekte Kontrolle darstellte, wurde eGFP eine Kernlokalisationssequenz (NLS) zugefügt (im Folgenden wird eGFP-NLS durch GFP abgekürzt). Somit konnte in den Experimenten ein Effekt von eGFP, der Injektion und dem Überladen des Zellsystems mit mRNA auf epigenetische und zelluläre Mechanismen ausgeschlossen werden.

In Abbildung 3.1 sind postreplikative Zygoten (12hpf) dargestellt, welche je eine TET Variante überexprimieren. Es ist zu erkennen, dass es bei gleicher Belichtungszeit zu Unterschieden in der Verteilung zwischen TET1CD und TET3CD kommt. Während das Signale von TET1CD- eGFP komplett in beiden Pronuklei lokalisiert ist und im maternalen und paternalen Vorkern gleich stark ist, wird TET3CD- eGFP zu gewissen Teilen im Zytoplasma zurückgehalten. Die Signalstärke ist auch hier in beiden Vorkernen gleich stark. Das Signal von TET1FL und TET3FL ist bei siebenfacher Belichtungszeit sehr schwach, was auf die schwache Translation der Proteine aufgrund ihrer Größe zurückzuführen ist. In den Zygoten, welche TET1FL überexprimieren sieht es so aus als sei Protein im Zytoplasma zurückgehalten, das leichte Signal ist jedoch auf die hohe Belichtungszeit und auf die damit verbundene Autofluoreszenz zurückzuführen. TET3FL wird hingegen komplett in die Pronuklei transportiert.

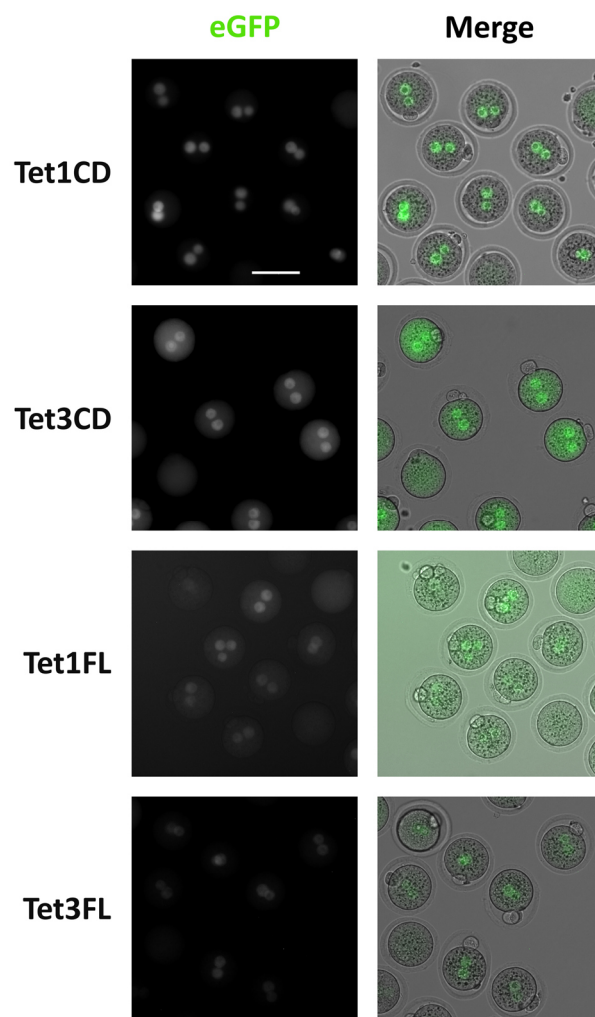


Abbildung 3.1 Verteilung der TET- eGFP- Fusionsproteine in der Zygote 12hpf. Zygoten, welche durch IVF gewonnen wurden, wurden 3hpf mit der entsprechen mRNA injiziert und 12hpf mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops auf das eGFP- Signal untersucht. Die Belichtungszeit für TETCD beträgt zwei Sekunden, während die für TETFL 14 Sekunden beträgt. TETCD wird stark translatiert, während TETFL aufgrund seiner Größe nur schwach vorhanden ist. TET1CD wird komplett in die Pronuklei transportiert, wohingegen ein deutlicher Anteil an TET3CD im Zytoplasma verweilt. Zwischen TET3FL und TET1FL gibt es keine auffälligen Unterschiede in der Verteilung. TET1FL zeigt jedoch eine geringere Translationseffizienz. Maßstabsbalken=100µM

3.1.1 Entwicklungspotenzial der Embryonen, welche zygotisch TET Varianten überexprimieren

Bisher wurde keine Arbeit veröffentlicht, in der TET Enzyme in präimplantiven Stadien überexprimiert werden, stattdessen gibt es jedoch zahlreiche Knockout oder Knockdown Studien der TET Enzyme. Der KO/KD von TET3 führt zu einer Reduktion der oxidierten Derivate von 5mC, sowie zu einem Anstieg von 5mC in der Zygote (Wossidlo et al. 2011; Gu et al. 2011; Khursheed Iqbal et al. 2011). Das Fehlen eines einzelnen TET Enzyms hat trotz der Veränderung der Komposition der modifizieren Basen keine Auswirkungen auf die präimplantive Entwicklung, sondern zeigt postnatale Entwicklungseffekte (Gu et al. 2011; Inoue et al. 2015; Dawlaty et al. 2011; Dawlaty et al. 2013). Erst das parallele Ausschalten von TET3 und TET1 führt zu Einschränkungen in der präimplantiven Entwicklung (Kang et al. 2015). Um nun die Rolle der TET Enzyme und der Produkte ihrer katalytischen Aktivität in der Zygote und der präimplantiven Entwicklung besser zu verstehen, wurden die TET Varianten in der Zygote überrepräsentiert und die Effekte auf das Entwicklungspotenzial beobachtet. Dazu wurde in frühe Zygoten (2-3hpf) die jeweilige mRNA (TET3FL, TET1FL, TET3CD oder TET1CD) injiziert, diese inkubiert und die Anzahl der korrekt entwickelten Embryonen in den entsprechen Stadien gezählt (Methode in Abbildung 2.4). Dann wurden die korrekt entwickelten Embryonen in Relation zu den befruchteten Eizellen gesetzt und die Ergebnisse prozentual dargestellt (Tabelle 3.1). Dieses Experiment wurde zwei bis vier Mal wiederholt, um eine repräsentative Anzahl von analysierten Embryonen zu erhalten (Tabelle 8.1). Zunächst wurde die erste Zellteilung nach der Überexpression der Vollängenformen analysiert, wobei die Überexpression von TET3FL nur ein Mehr an endogenem Protein darstellt, wohingegen TET1FL hier stadiumsfremd exprimiert ist. Die Überexpression der beiden Enzyme hat auf die erste Zellteilung nur geringe Auswirkungen. Während sich die Kontrollembryonen (Überexpression GFP) zu 100% zum 2- Zellembryo entwickeln, entwickeln sich Zygoten, welche TET3FL überexprimieren, zu 84% und Zygoten, welche TET1FL überexprimieren, zu 93% zum 2- Zellembryo. Um den Effekt auf die Entwicklung der nicht-regulierten TET Enzyme zu analysieren, wurden schließlich die katalytischen Domänen von TET3 und TET1 (TET3CD, TET1CD) überexprimiert (Tabelle 3.1). Die Teilungsrate der Zygote wird nicht durch die Überexpression von TET3CD beeinflusst, wohingegen die Überexpression von TET1CD eine starke Einschränkung der ersten Zellteilung hervorruft und nur 39% der befruchteten Eizellen das 2-Zellstadium erreichen. Es muss erwähnt werden, dass die Entwicklung der Zygoten, die TET1CD überexprimieren, stark abhängig von der injizierten Menge der mRNA war, wobei die Zellteilung umgekehrt proportional der injizierten mRNA- Menge ist. Damit 2-Zellembryonen analysiert werden konnten, wurden vergleichsweise geringe Mengen der TET1CD kodierenden mRNA in die Zygote injiziert. Da 86% der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, vor der ersten Zellteilung arretierten, wurde überprüft, ob sie die Replikation starten. Dazu wurden sie während der gesamten Zeit der Replikation (von 5hpf-13hpf) mit einer Mischung aus zwei Basenanaloga (EdU/EdC) inkubiert und fixiert. Mittels einer Click-it Reaktion wurde der Einbau von EdU/EdC in die DNA sichtbar gemacht. Diese Analyse zeigt gleich starke Signalintensitäten für EdU/EdC zwischen den Zygoten der Kontrolle

und der TET1CD überexprimierenden (Abbildung 8.3) Um zu analysieren, ob die Embryonen zum Replikationsstart- Zeitpunkt (8hpf (Wossidlo et al. 2010)) mit der Replikation beginnen, wurden sie für eine Stunde mit EdU/EdC inkubiert (von 7.5hpf- 8.5hpf). Die Zygoten, die TET1CD überexprimieren, haben zum Zeitpunkt 8.5hpf alle mit der Replikation begonnen mit minimalen Unterschieden in der EdU/EdC- Signalintensität (Abbildung 8.5). Auffällig bei Zygoten, die TET1CD überexprimierten, war die vermehrte Bildung von nur einem Vorkern (8,7%, Abbildung 8.2) oder zusätzlichen Vorkernen in den Embryonen, die nach 24hpf keine Zellteilung durchlaufen haben (2,8% drei PN; manchmal auch mehr als drei PN, Abbildung 8.2). Die zusätzlichen Vorkerne kommen in keinen anderen überexprimierenden Embryonen vor.

Während der Entwicklung zur Blastozyste verloren alle Embryonen, die TET überexprimieren, an Entwicklungspotenzial (Tabelle 3.1). Die Kontrollgruppe bildet zu 89% Blastozysten. Die Überexpression von TET3FL, TET1FL und TET3CD führt zu einem Verlust des Entwicklungspotenzials, verglichen zur ersten Zellteilung. Hierbei führen alle drei Varianten zu ähnlich starken Effekten, wobei nur 35%-47% das Blastozystenstadium erreichen. Die Überexpression von TET1CD hingegen führt zu einem fast gänzlichen Verlust der Möglichkeit der Blastozystenentwicklung.

Tabelle 3.1 Das Entwicklungspotenzial von Embryonen, die eine der TET Varianten überexprimieren. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert und ihre Entwicklung in verschiedenen Stadien erfasst. Dazu wurde die Anzahl der Embryonen, die sich im 2-Zell- oder Blastozystenstadium befanden, gezählt und die Anzahl in Relation zu der Anzahl der befruchteten Eizellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Werte dargestellt. Die Anzahl der Embryonen ist in Tabelle 8.1 aufgelistet. Den größten Effekt auf die erste Zellteilung zeigt TET1CD, die anderen TET Varianten haben nur einen milden Einfluss. Erst in späteren Stadien führt auch ihre Überexpression zu einer eingeschränkten Entwicklung.

ÜE	28hpf	E4.0
	% 2- Zellembryonen	% Blastozysten
GFP	100	89
TET3FL	84	35
TET1FL	93	47
TET3CD	98	39
TET1CD	14	7

3.1.2 Immunfluoreszenzanalyse von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in Zygoten, welche TET Varianten überexprimieren

Die Überexpression der verschiedenen TET Varianten hat einen starken Einfluss auf die Entwicklung, wobei besonders das Erreichen des Blastozystenstadiums betroffen ist (Tabelle 3.1). Deshalb sollte der Einfluss der Überexpression auf DNA- Modifikationen untersucht werden. Daraus sollten dann Rückschlüsse auf die Rolle der verschiedenen Modifikationen in der präimplantiven Entwicklung gezogen werden. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzanalysen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in Zygoten, die jeweils die TET Varianten überexprimieren, durchgeführt. In die Zygoten (IVF) wurden 3hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert (Kapitel 2.2.16), 12hpf fixiert und 5mC, 5hmC, 5fC, 5caC mittels Antikörper angefärbt (Tabelle 2.1, Kapitel 2.2.18). Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz- Analysen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC und die Darstellung der Ergebnisse sind

für alle in dieser Arbeit analysierten Embryonen gleich: Die Antikörpersignale der (Pro)Nuklei wurden quantifiziert und die mittleren Grauwerte bestimmt (Kapitel 2.2.20). Die ermittelten Werte der Kontrollgruppe wurden auf 100% und die Werte der überexprimierenden Zygoten dazu in das prozentuale Verhältnis gesetzt (=relative Werte). Die im Folgenden dargestellten Mittelwerte sind aus der Summe der relativen Werte der jeweiligen Experimente berechnet. Die Standardabweichung bezieht sich auf diese jeweiligen relativen Mittelwerte. Die Signifikanzen wurden allerdings mittels der absoluten Werte (mittlere Grauwerte) berechnet (Kapitel 2.2.32). Die Signifikanz der Unterschiede zweier Proben bezieht sich dabei immer auf die Experimental- im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da die mittleren Grauwerte der verschiedenen Experimente nicht zusammengefügt werden konnten, wurden die Signifikanzen für jedes Experiment einzeln berechnet. In den Abbildungen ist das niedrigste ermittelte Signifikanzniveau angegeben (damit sind auch höhere Signifikanzen impliziert). Die ermittelten Grauwerte (Mittelwert, Standardabweichung, Signifikanzen) aller Experimente sind in Tabelle 8.13 und Tabelle 8.14 zu finden. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse basieren auf Antikörper- Signalintensitäten, die optimaler Weise gegen ein DNA- Signal normalisiert werden würden. In dieser Arbeit war dies aus technischen Gründen nicht möglich. Deswegen sind die angegebenen prozentualen Werte als Tendenzen zu betrachten. Bei den Antikörpern gegen 5hmC, 5fC und 5caC kann, basierend auf den Informationen des Herstellers (active motif), von einer linearen Abhängigkeit von Antikörperbindenkinetik und Epitopmenge ausgegangen werden. Dies erlaubt einen relativen Vergleich, der durch die Überexpression bedingten, veränderten Signalintensitäten miteinander. Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen sind im Anhang zu finden (Abbildung 8.6, Abbildung 8.7, Abbildung 8.8).

3.1.2.1 Die Überexpression von TET3FL und TET1FL

In Abbildung 3.2 sind die prozentualen Werte der Signalintensitäten relativ zu denen der Kontrolle (=100%) dargestellt. Die Überexpression der beiden Varianten führt zu einer Erhöhung der Signalintensitäten aller analysierten Modifikationen, wobei die Überexpression von TET3FL einen insgesamt stärkeren Effekt erzielt als die von TET1FL. Auffällig ist, dass das maternale Genom vor allem durch die Überexpression von TET3FL etwas stärker von der Oxidation betroffen ist als das väterliche Genom, TET1FL zeigt insgesamt mildere Effekte. Die deutliche Oxidation des maternalen Genoms stellt einen Unterschied zum natürlichen Zustand dar, in dem das maternale Genom während der ersten 12hpf nur geringfügig oxidiert wird (Wossidlo et al. 2011; Inoue et al. 2011). Es ändern sich also sowohl die Gesamtlevel der Modifikationen als auch die Relationen der Level zwischen maternalem und paternalem Genom. Betrachtet man nun die Modifikationen im Einzelnen ist zu sagen, dass die TET überexprimierenden Zygoten einen Anstieg der Signalintensitäten von 5mC in beiden Vorkernen aufweisen (TET3FL mat +54%, pat +45%; TET1FL mat +20%, pat +24%). Die Überexpression von TET3FL führt zu einem deutlichen Anstieg der Signalintensitäten von 5hmC des maternalen Genoms, wobei die Überexpression von TET1FL zu einem milderem Effekt führt (TET3FL mat +167%, pat +27%; TET1FL mat +91%, pat +28%). Der Anstieg der Signalintensität von 5fC nach der Überexpression ist ähnlich

zwischen TET3FL und TET1FL, wobei der Anstieg hier insgesamt niedriger ausfällt als für 5hmC (TET3FL mat +42%, pat +12%; TET1FL mat +31%, pat +18%). Die Level von 5caC steigen in den Zygoten, die TET3FL überexprimieren, deutlicher als in denen, die TET1FL überexprimieren, und auch der Anstieg im maternalen Genom ist hier stärker als im Paternalen (TET3FL mat +97%, pat +45%; TET1FL mat +31%, pat +10%).

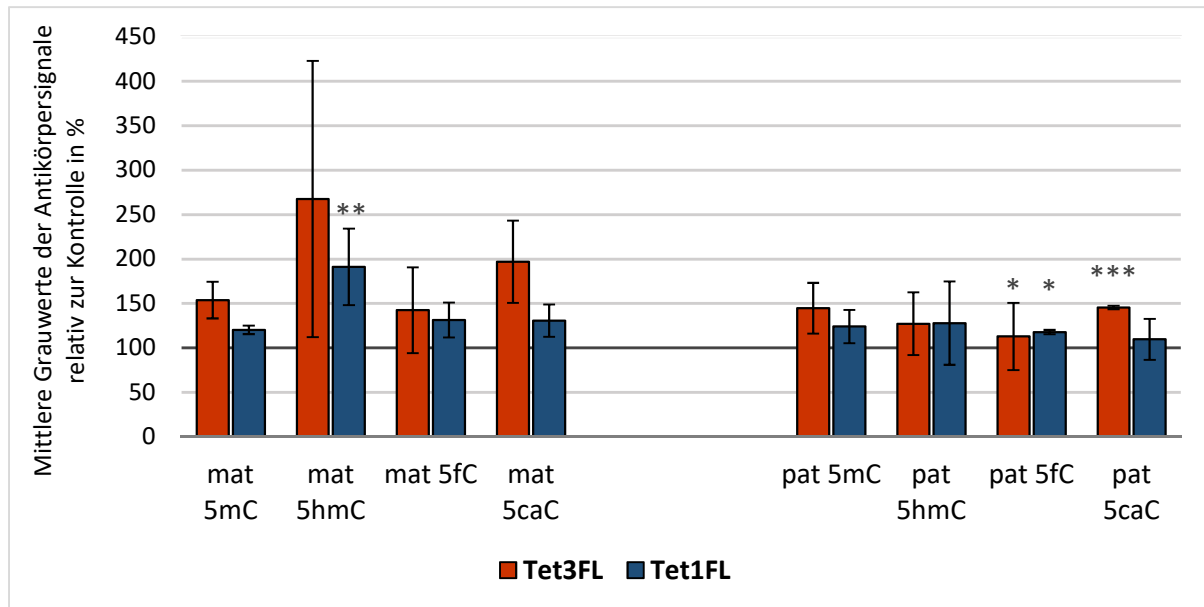


Abbildung 3.2 Der Einfluss der Überexpression von TET3FL und TET1FL auf die epigenetischen Modifikationen in der postreplikativen Zygote. Dargestellt sind die relativen mittleren Grauwerte nach der Quantifizierung der Signale der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die TET3FL oder TET1FL überexprimieren. Die mittleren Grauwerte der Analyse der jeweiligen Modifikationen der Kontrollzygoten wurden auf 100% gesetzt (schwarze Linie) und die Werte der überexprimierenden Zygoten dazu in das prozentuale Verhältnis. Tendenziell sind die Modifikationslevel nach der Überexpression in beiden Vorkernen gleich, jedoch sind sie maternal höher. Die Überexpression beider TET Enzyme führt zu einem leichten Anstieg von 5mC und deutlichen Anstiegen von 5hmC, 5fC und 5caC. Das natürlich in der Zygote exprimierte TET3FL erzielt durch Überexpression höhere Level. Die Anzahl der analysierten Embryonen ist in Tabelle 8.3 aufgelistet. p-Wert (T-test) * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001

3.1.2.2 Die Überexpression von TET3CD und TET1CD

Die Überexpression von TET1CD führt zu sehr starken Einschränkungen der gesamten präimplantiven Entwicklung, auch schon im Zygotenstadium (Tabelle 3.1). Eine Einschränkung durch die Überexpression von TET3CD erfolgt erst 48hpf (Tabelle 8.2). Immunfluoreszenz-Analysen zeigen, dass die Effekte der Überexpression der katalytischen Domänen von TET3 und TET1 im maternalen und paternalen Genom stärker ausgeprägt sind als die der Vollängenvarianten (Abbildung 3.3). Die Überexpression beider TETCD Varianten bewirken eine ähnliche Verschiebung des Gleichgewichts der DNA-Modifikationen. Hierbei ist der Effekt der Überrepräsentation von TET1CD auf die DNA-Modifikationen im maternalen Genom stärker ausgeprägt, als der von TET3CD. Nach der Überexpression kommt es zu einem Verlust der Signalintensität von 5mC, der durch TET3CD mild, durch TET1CD hingegen sehr stark ist (TET3CD -17%; TET1CD -75%). Auch der Anstieg des Signals von 5hmC ist in den Zygoten, die TET1CD überexprimieren, etwas stärker ausgeprägt (TET3CD +273%; TET1CD +360%). Der Anstieg von 5fC ist jedoch für beide Varianten gleich (TET3CD +146%; TET1CD

+145%). Außerdem ist ein starker Anstieg der 5caC- Level zu detektieren, der für die TET1CD Überexpression fast doppelt so hoch ausfällt wie für TET3CD (TET3CD +365%; TET1CD +637%).

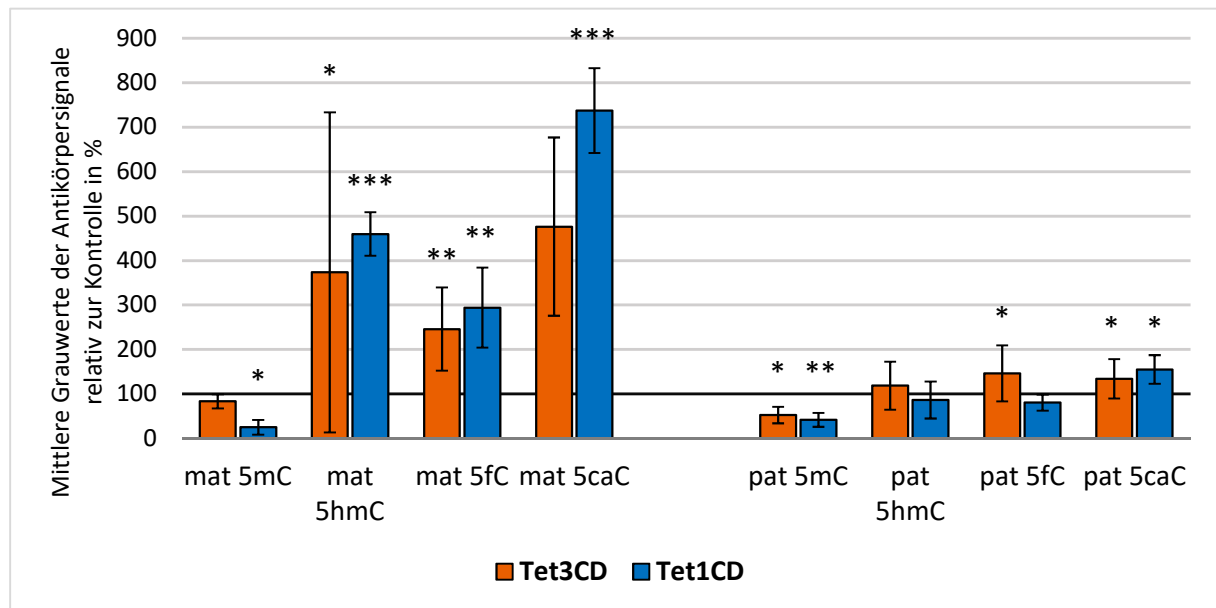


Abbildung 3.3 Der Einfluss der Überexpression von TET3CD und TET1CD auf die epigenetischen Modifikationen in der postreplikativen Zygote. Dargestellt sind die relativen mittleren Grauwerte nach der Quantifizierung der Signale der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die TET3CD oder TET1CD überexprimieren. Die mittleren Grauwerte der Analyse der jeweiligen Modifikationen von Zygoten der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (schwarze Linie) und die Werte der überexprimierenden Zygoten dazu in das prozentuale Verhältnis. Tendenziell sind die Modifikationslevel nach der Überexpression in beiden Vorkernen gleich, jedoch sind sie maternal insgesamt höher. Die Überexpression beider TETCD Enzyme führt in beiden Genomen zu einem Verlust von 5mC, der für TET1CD deutlich stärker ausfällt. Maternal kommt es zudem zu einem deutlichen Anstieg aller oxidierten Derivate, wobei TET1CD den stärkeren Effekt verursacht. Paternal werden die Level der oxidierten Basen durch TET3CD leicht erhöht, TET1CD führt zu einem Verlust dieser, außer 5caC, welches steigt. Die Anzahl der analysierten Embryonen ist in Tabelle 8.3 aufgelistet. p-Wert (T-test) *<0.05, **<0,01, ***<0,001

Im paternalen Vorkern sind die Effekte im Vergleich zum maternalen sehr mild (Erklärung siehe Kapitel 3.1.2.1) und fallen für die beiden Varianten unterschiedlich aus. Die Effekte der Überexpressionen von TET3CD und TET1CD auf die Signale von 5hmC und 5fC sind gegensätzlich, auf die von 5mC und 5caC sind jedoch ähnlich. Die Überexpression von TET3CD führt zu einem leichten Anstieg aller oxidierten 5mC Derivate (5hmC +19%, 5fC +54%, 5caC +34%), einhergehend mit dem Verlust von 5mC (-48%). Dieser 5mC Verlust ist im Vergleich zum mütterlichen Vorkern etwas stärker ausgeprägt. Während die Überexpression von TET1CD im mütterlichen Vorkern zum Anstieg der oxidierten Basen führt, kommt es im väterlichen Vorkern zu einem milden Verlust von 5hmC (-14%) und 5fC (-30%), wohingegen 5caC etwas ansteigt (+55%). Das 5mC- Level nimmt wie auch im mütterlichen Genom stark ab (-58%).

Im abschließenden Vergleich der Überexpression von TET3FL/TET1FL und TET3CD/TET1CD in der Zygote kann folgendes festgehalten werden: In allen Gruppen, die TET überexprimieren, kommt es im maternalen Genom zu einem Anstieg der Signalintensitäten von 5hmC, 5fC und 5caC. Dieser Anstieg ist für die regulierten TETFL Enzyme viel milder, verglichen zu den TETCD Enzymen, welchen die regulative Domäne fehlt. Der Anstieg der Signalintensitäten von 5caC hingegen ist im paternalen Genom sehr ähnlich zwischen TETFL und TETCD, wobei die Überexpression von TET1FL den kleinsten

Anstieg zeigt. Die Überexpression von TETCD führt zu einem deutlichen Verlust von 5mC, der durch die Oxidation zu 5hmC, 5fC und 5caC entsteht. Interessanterweise führt die Überexpression von TETFL in beiden Vorkernen zu einem leichten Anstieg von 5mC.

3.1.3 Analyse des Oxidations- und Demethylierungsschutz des maternalen Genoms in der Zygote

Das maternale Genom ist vor der Oxidation durch die TET Enzyme geschützt. Dieser Schutz basiert auf einer Interaktion der Histonmodifikation H3K9me2 und dem Protein PGC7/Stella. Durch diese Interaktion wird das Binden von TET3 sterisch verhindert. Zusätzlich reduziert PGC7/Stella die Aktivität von TET3 reduziert, wodurch die Oxidation von 5mC weitestgehend verhindert wird (Nakamura et al. 2006; Nakatani et al. 2015; Nakamura et al. 2012). H3K9me2 ist bis zu späten Zygotenstadien (PN4/PN5) nur im maternalen Genom angereichert, was zu dessen Schutz führt und die Oxidation des paternalen Genoms erlaubt (Lepikhov et al. 2008; Ma et al. 2015; Nakamura et al. 2006; Nakamura et al. 2012). Da durch die Überexpression der TET Varianten auch das maternale Genom sehr deutlich oxidiert wurde, sollte analysiert werden, wie diese Oxidation trotz des Schutzes durch H3K9me2/PGC7/Stella möglich war. Da DNA- Methylierung und Histonmodifikationen einander beeinflussen/bestimmen (Ooi et al. 2007; Jia et al. 2007; Hata et al. 2002; Cedar & Bergman 2009), lag die Vermutung nahe, dass die enormen Mengen der exogenen TET Enzyme einen Einfluss auf die Histonmodifikationen haben können. Denkbar wäre, dass eine Oxidation des maternalen Genoms an H3K9me2/PGC7/Stella- freien Sequenzen erfolgt, was einen Einfluss auf benachbarte H3K9me2- Positionen haben könnte. Dadurch könnte wiederum die Oxidation durch die TET Enzyme erlaubt werden, was wie in einem Kreislauf, wieder zu Veränderungen der H3K9m2- Level führen würde. Durch die Veränderungen der H3K9me2- Level würde auch das Binden von und der Schutz durch PGC7/Stella beeinflusst. Um diese Hypothese zu testen, wurden Zygoten, welche die TET Varianten überexprimieren, mittels Antikörperfärbungen gegen H3K9me2 angefärbt. Die Signalintensitäten von H3K9me2 wurden gegen das DAPI- Signal normalisiert und das prozentuale Verhältnis relativ zu den normalisierten Signalintensitäten der Kontrollzygoten (=100%) errechnet. In Tabelle 3.2 sind die Differenzen der prozentualen Werte zur Kontrolle dargestellt. Diese Werte zeigen, dass nach der Überexpression weder maternal noch paternal Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und allen überexprimierenden Zygoten vorhanden sind. Für PGC7/Stella wurden ausschließlich Zygoten analysiert, die TET1CD überexprimieren, da diese den größten Oxidationseffekt und Methylierungsverlust zeigen (Abbildung 8.9). Auch hier sind keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der TET1CD überexprimierenden Zygoten zu erkennen.

Tabelle 3.2 Effekt der Überexpression der TET Varianten auf H3K9me2 in postreplikativen Zygoten. In frühe Zygoten wurden mit die jeweilige mRNA injiziert, die Zygoten 12 hpf fixiert und mittels Antikörper angefärbt. Die Signalintensitäten von H3K9me2 wurden gegen die Signalintensitäten von DAPI normalisiert und relativ zur Kontrolle die Differenz errechnet (Kontrolle= 100%). Es sind keine Effekte der Überexpression auf die H3K9me2-Level zu erkennen; n= GFP: 13; TET3FL: 9; TET1FL: 10, TET3CD: 10; TET1CD: 10.

	mat	pat
TET3FL	0,2	-1,0
TET1FL	-1,9	-2,6
TET3CD	-0,3	-2,9
TET1CD	0,1	0,1

3.1.4 TET Überexpression und γ H2A.X- Signale

Wie Immunfluoreszenz- Analysen zeigen, führt die Überexpression der TETCD Enzymvarianten zu erhöhten Leveln der oxidierten 5mC Derivate, was mit einem starken Methylierungsverlust einhergeht (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). In ESCs kann sowohl 5fC als auch 5caC von TDG erkannt und ausgeschnitten und durch ein unmodifiziertes Cytosin ersetzt werden (He et al. 2011). So stellt dieser Mechanismus die aktive Demethylierung in vitro und in ESCs dar (Müller et al. 2014; Kohli & Zhang 2013; Hu et al. 2014; Weber et al. 2016). Neben TDG, welches in der Zygote nicht exprimiert ist, können auch andere für oxidierte Basen spezifische Reparaturenzyme, wie zum Beispiel die NEIL Enzyme oder UNG2, eine Rolle in der aktiven Demethylierung spielen (Müller et al. 2014; Schomacher et al. 2016; Xue et al. 2016). Um eine mögliche Initiierung der Reparatur durch TET im Zygotenstadium zu analysieren, wurden Zygoten, welche TET überexprimieren, auf den Strangbruchmarker γ H2A.X hin analysiert. γ H2A.X ist die H2A- Histonvariante H2A.X, welche am Serin 139 phosphoryliert vorliegt (Rogakou et al. 1998). Diese Variante markiert sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche der DNA und zeigt somit Reparaturmechanismen an (Marti et al. 2006; Kinner et al. 2008; Rogakou et al. 1998). Die Analyse von γ H2A.X erfolgte vor oder nach der Replikation, da durch die Replikation temporäre Strangbrüche entstehen, die bei einer Analyse während der S- Phase den Effekt der Überexpression verzerren könnten. Für den präreplikativen Zeitpunkt wurden aus technischen Gründen ausschließlich Zygoten analysiert, welche TET1CD überexprimieren. Neben Antikörperfärbungen von γ H2A.X wurden auch Antikörperfärbungen 5hmC und 5caC vorgenommen (Abbildung 8.10, Abbildung 8.4). Die Analysen zeigen schon zu diesem frühen Zeitpunkt einen starken Anstieg der Signalintensitäten von 5hmC und 5caC, verbunden mit einem Signalverlust von 5mC (Abbildung 8.4). Der Anstieg des 5hmC-Signals ist im väterlichen Pronukleus stärker als im mütterlichen. Die 5caC- Signale sind in Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, stark erhöht, auch hier ist das Signal paternal stärker erhöht. In der Kontrolle ist hingegen zu diesem Zeitpunkt kein 5caC- Signal zu detektieren, da 5caC erst 8hpf steigt (Inoue et al. 2011). Bei der Analyse von γ H2A.X dienten Zygoten, welche GFP überexprimieren, als Negativkontrolle (Abbildung 8.10). Sie zeigen keine γ H2A.X- Foci. Als Positivkontrolle dienten nicht-injizierte Zygoten, die mit Methyl Methansulfonat (MMS) behandelt wurden. MMS ist ein alkylierendes Reagenz, welches Guanine zu 7- Methylguanine und Adenine zu 7-Methyladenin modifiziert, wodurch

es zu Basenfehlpaarungen kommt (Beranek 1990). Diese Schäden werden vorwiegend via BER repariert, wobei Einzelstrangbrüche entstehen (Lindahl & Wood 1999). Im Vergleich zur Kontrolle zeigen MMS behandelte Zygoten eine enorme Anzahl von γ H2A.X- Foci (Abbildung 8.10). Die Intensität und die Anzahl der γ H2A.X- Foci ist in beiden parental Vorkernen gleich. In Zygoten, die TET1CD überexprimieren, ist eine sehr starke Akkumulation von γ H2A.X- Signalen vor der Replikation (5-6hpf) zu detektieren (Abbildung 8.10). Diese Anhäufung ist im väterlichen Vorkern stärker als im Mütterlichen. Die Signalintensitäten sind in Zygoten, die TET1CD überexprimieren, ähnlich zu denen der MMS- Kontrolle. Die Beobachtungen legen einen mechanistischen Zusammenhang des Anstiegs von 5hmC/5caC und der Akkumulation von γ H2A.X nahe.

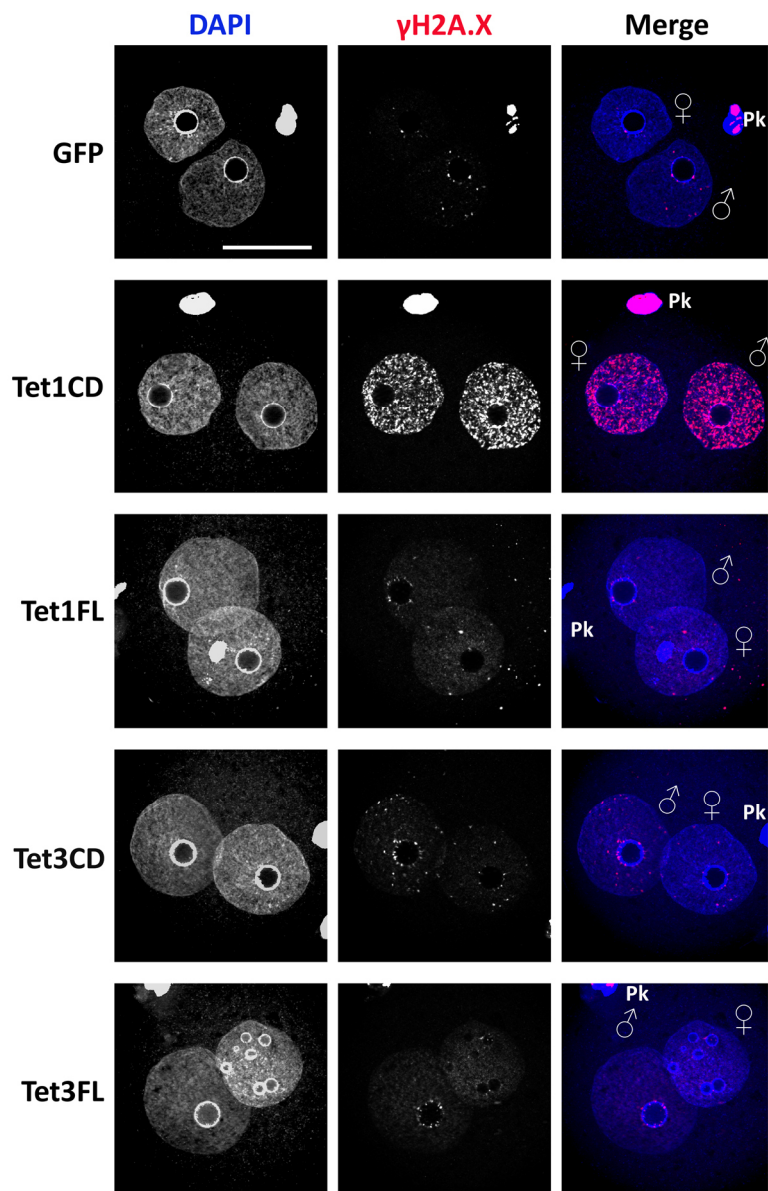


Abbildung 3.4 γ H2A.X Signale in der postreplikativen Mauszygote. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz- Analysen von γ H2A.X in postreplikativen Zygoten, welche eine der TET Varianten überexprimieren. Dazu wurden Zygoten (IVF) 3hpf mit der entsprechenden mRNA mikroinjiziert, 12hpf fixiert und mit γ H2A.X Antikörpern indirekt angefärbt. Die DNA wurde mittels DAPI angefärbt. Zygoten, die TET1CD überexprimieren, zeigen im Vergleich zu den anderen Gruppen eine sehr starke Akkumulation von γ H2A.X in beiden Pronuklei. ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabballen=20 μ M; Die Aufnahmen wurde mit der Mikroskop Axiovert ZI gemacht.

Für die Überexpression der Vollängenvarianten konnten ausschließlich postreplikative Zygoten analysiert werden, da die Translation der 7kb großen TETFL- GFP- kodierenden mRNA einige Stunden dauerte und erst 10hpf leichte GFP- Signale detektierbar waren, wodurch die Überexpression in frühen Stadien nicht garantiert gewesen wäre. In Abbildung 3.4 sind Immunfärbungen von γ H2A.X in TET überexprimierenden postreplikativen Zygoten dargestellt. In der Kontrollgruppe sind vereinzelt γ H2A.X- Foci im perizentromerischen Bereich des paternalen Vorkerns zu erkennen. Das gleiche Bild ergibt sich für Zygoten, welche TET3FL oder TET1FL überexprimieren. In Zygoten, die TET3CD überexprimieren, kann man eine leichte Anhäufung von γ H2A.X- Foci verstärkt im paternalen Vorkern erkennen. Diese konzentriert sich abermals auf den perizentromerischen Bereich. Die einzelnen γ H2A.X- Foci in TET3FL, TET1FL und TET3CD überexprimierenden Zygoten sind aller Wahrscheinlichkeit nach Überreste von Strangbrüchen der Replikation. Zygoten, die TET1CD überexprimieren, zeigen hingegen eine enorme Ansammlung von γ H2A.X- Foci, gleich stark in beiden Vorkernen.

3.1.5 Der Einfluss der TET Überexpression auf spätere Stadien der präimplantiven Entwicklung

3.1.5.1 5hmC, 5fC und 5caC in 2- Zellembryonen, die zygotisch verschiedene TET Varianten überexprimieren

Die Überexpression der verschiedenen TET Varianten haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen. Das Potenzial der Blastozystenentwicklung ist durch die Überexpression von TET1CD sehr stark reduziert, aber auch durch TET3FL, TET1FL und TET3CD deutlich vermindert (Tabelle 3.1). Die analysierten epigenetischen Modifikationen weisen in der Zygote durch die Überexpression aller TET Varianten deutliche Effekte auf (Kapitel 3.1.2). Um zu überprüfen, ob diese Modifikationsänderungen bis in spätere Stadien persistieren und um damit eine mögliche Verbindung zwischen dem veränderten epigenetischen Gleichgewicht und der eingeschränkten Entwicklung zu finden, wurden die DNA- Modifikationen in 2- Zellembryonen und in der Blastozyste analysiert. Dazu wurden frühe Zygoten (3-4hpf) mit der entsprechenden mRNA injiziert, die Embryonen inkubiert und zum Zeitpunkt 29-31hpf (G2- Phase des 2-Zellembryos) oder E4.0 (Blastozyste) fixiert. Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz- Analysen der 2- Zellembryonen sind im Anhang zu finden (Abbildung 8.11, Abbildung 8.13, Abbildung 8.12). Da die Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, nur in geringer Anzahl das 2-Zellstadium erreichen, wurden zusätzlich Daten aus den TDG/TET- Überexpressionsexperimenten verwendet.

TET3FL und TET1FL

Für die Überexpression von TETFL mit darauffolgender Analyse von 2- Zellembryonen ergibt sich das folgende Bild (Abbildung 3.5). Die Effekte der Überexpression der beiden Vollängen TET Enzyme weisen untereinander große Ähnlichkeiten auf und die Mengen der DNA- Modifikationen verändern sich in den Gruppen der beiden überrepräsentierten TETFL Varianten parallel. Durch die Überexpression kommt es zu einem Anstieg der Signalintensitäten von 5mC, der für die TET3FL

überexprimierenden Embryonen etwas stärker ausfällt (TET3FL +43%; TET1FL +22%). Die 5hmC-Signale steigen in beiden Embryonen- Gruppen ähnlich stark an (TET3FL +178%; TET1FL +165%). Auch die Signalintensitäten von 5fC steigen in beiden Gruppen zum gleichen Prozentsatz, jedoch mild, an (TET3FL +40%; TET1FL+39%). Die 5caC- Signale nehmen nach der Überexpression von TET3FL und TET1FL in ähnlichem Ausmaß ab (TET3FL -33%; TET1FL-46%). Bis auf die Signalintensitäten von 5caC sind die Veränderungen durch die Überexpression, sogar im Ausmaß ihrer Stärke, vergleichbar zu denen des maternalen Vorkerns (Abbildung 3.2).

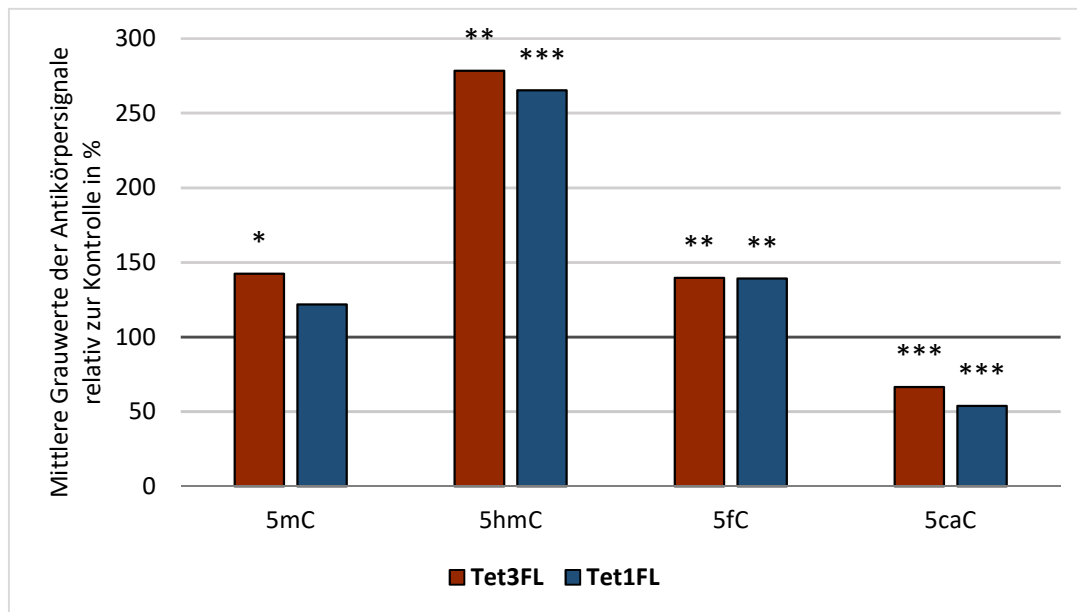


Abbildung 3.5 Der Einfluss der Überexpression von TET3FL und TET1FL auf die epigenetischen Modifikationen im 2-Zellembryo. Dargestellt sind die relativen mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2- Zellembryonen, die zygotisch TET3FL und TET1FL überexprimieren. Die mittleren Grauwerte der Zygoten der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (schwarze Linie) und die der überexprimierenden Zygoten dazu in das prozentuale Verhältnis. Die Überexpression beider TETFL Enzyme führt zu einem Anstieg der 5hmC- und 5fC- Signale. Die Signalintensitäten von 5caC sinken. Die Anzahl der analysierten Embryonen ist in Tabelle 8.4 aufgelistet. p-Wert (T-test) *<0,05, **<0,01, ***<0,001

TET3CD und TET1CD

Die Überexpression von TET3CD und TET1CD in 2-Zellembryonen führt zu einem Anstieg der Signalintensitäten aller oxidierten DNA- Modifikationen und geht mit dem Verlust des 5mC- Signals einher (Abbildung 3.6). Dieser ist jedoch in Embryonen, die TET1CD überexprimieren, deutlich stärker ausgeprägt (TET1CD-64%; TET3CD -14%). Die Signalintensitäten von 5hmC steigen, wobei der Anstieg für Embryonen, die TET3CD überexprimieren, im Vergleich zu TET1CD sehr stark ausfällt (TET3CD +450%; TET1FL +70%). Hierzu muss erwähnt werden, dass die Teilung der Zygoten, die TET1CD überexprimieren, stark abhängig von der jeweilig injizierten mRNA Menge ist. Um 2- Zellembryonen zu erhalten, wurde vergleichsweise wenig mRNA injiziert, wodurch auch der Oxidationseffekt betroffen sein könnte. Die 5fC- Signale steigen für beide Gruppen ähnlich stark und deutlich an (TET3CD +48%; TET1FL +61%). Die Signalintensitäten von 5caC steigen hingegen nur mild in 2- Zellembryonen, die TET3CD überexprimieren, und stärker in TET1CD überexprimierenden 2- Zellembryonen an (TET3CD +9,7%; TET1CD +46%). Es lässt sich also festhalten, dass die relativen,

prozentualen Signalintensitäten zwischen TET1CD und TET3CD in überexprimierten 2-Zellembryonen sehr ähnlich sind, ausgenommen 5hmC, und es in beiden Gruppen sowohl zu einem Verlust des Signals von 5mC, als auch zu einem Anstieg der Signalintensitäten von 5hmC, 5fC und 5caC kommt.

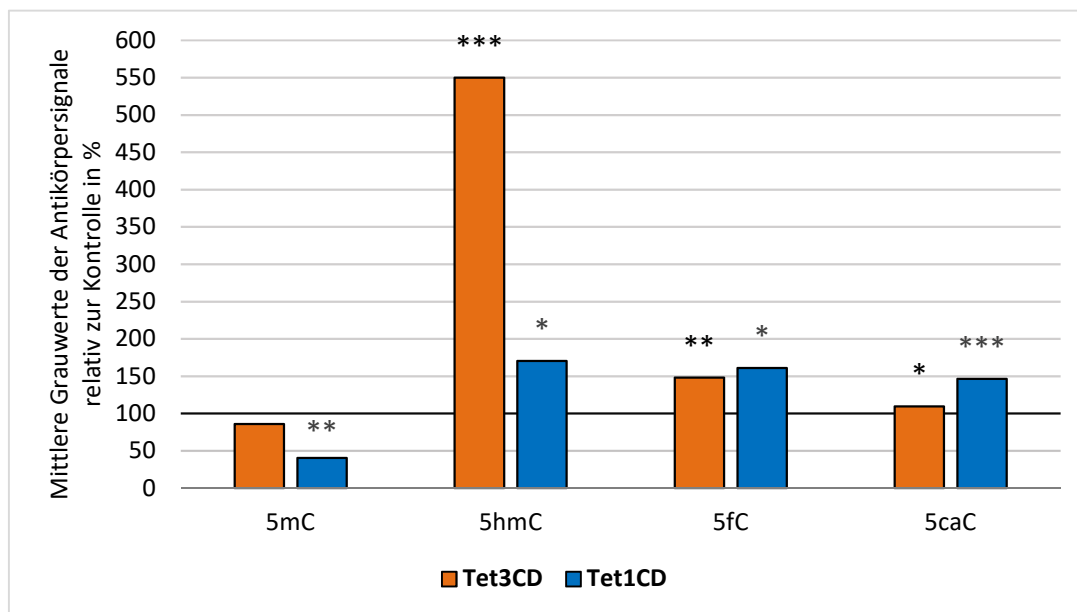


Abbildung 3.6 Der Effekt der Überexpression von TET3CD und TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC im 2-Zellembryo. Dargestellt sind die mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2-Zellembryonen, die zygotisch TET3CD und TET1CD überexprimieren. Die mittleren Grauwerte der Zygoten der Kontrolle wurden auf 100% gesetzt (schwarze Linie) und die der überexprimierenden Zygoten dazu in das prozentuale Verhältnis. Dazu wurden frühe Zygoten (IVF) mit mRNA injiziert, 30hpf fixiert, mittels Antikörper angefärbt und die Signale quantifiziert. Die Überexpression beider TETCD Enzyme führt zu einem Verlust von 5mC, der für TET1CD verstärkt ausfällt. Zudem kommt es zu einem Anstieg oxidierter 5mC-Derivate. Dieser ist vor allem von TET3CD für 5hmC sehr deutlich. Die Anzahl der analysierten Embryonen ist in Tabelle 8.4 aufgelistet. p-Wert (T-test) * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$

Vergleicht man nun die Effekte der Überexpression in 2-Zellembryonen mit den Analysen des maternalen Genoms in der Zygote nach der Überexpression (Abbildung 3.3), kann man einige Übereinstimmungen in den Veränderungen der Signalintensitäten der epigenetischen Modifikationen erkennen. So führt die Überexpression von TET1CD zu einem starken und im Vergleich zu TET3CD einem stärkeren Verlust der Signale von 5mC. In beiden Stadien ist ein Anstieg der 5hmC-Signale zu erkennen, anders als in Zygoten ist dieser jedoch in 2-Zellembryonen, welche zygotisch TET3CD überexprimieren, viel stärker ausgeprägt. Die Signalintensitäten von 5fC steigen, sowohl in Zygoten als auch 2-Zellembryonen nach der Überexpression beider TETCD Enzyme in ihrer Stärke fast identisch an. Die 5caC-Signale steigen in der Zygote deutlich stärker durch die Überexpression von TETCD als im 2-Zellembryo, sind jedoch in 2-Zellembryonen, die TET1CD überexprimieren, stärker als in solchen, die TET3CD überexprimieren. Die Effekte der Überexpression im maternalen Genom der Zygote können fast identisch im 2-Zellembryo wiedergefunden werden.

3.1.5.2 5mC- und 5hmC- Signale nach der Überexpression von TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD in der Blastozyste

Die Immunfluoreszenz- Analysen von Zygoten und 2- Zellembryonen zeigen einen deutlichen Effekt der Überexpression auf die Signalintensitäten der analysierten epigenetischen Modifikationen der Embryonen (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3, Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Im folgenden Versuch wurde daher untersucht, ob diese epigenetischen Effekte auch über das 2- Zellstadium hinaus bestehen und darin eine mögliche Ursache für die Reduktion des Entwicklungspotenzials zu finden ist. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende mRNA in frühe Zygoten injiziert und bis zu Tag vier nach der Befruchtung (E4.0) inkubiert. Die Embryonen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen 5mC und 5hmC angefärbt. Während des Zeitraums der Entwicklung sind die jeweiligen mRNAs und TET Proteine auf Grund ihrer Instabilität und des aktiven Abbaus verschwunden (nicht mehr detektierbar anhand des GFP- Signals). Endogenes TET3 wird im 2-Zellstadium degradiert (Wossidlo et al. 2011), so auch die exogenen TET3 Varianten. Für die TET1 Varianten ist ab dem 4-8 Zellstadium kein GFP-Signal mehr erkennbar.

Eine Blastozyste besitzt eine definierte Morphologie aus innerer Zellmasse (gekennzeichnet durch NANOG und OCT4 Expression) und Trophektoderm (exprimiert CDX2) (Abbildung 8.1). 5hmC akkumuliert in der ICM, wohingegen es nur vermindert in trophektodermalen Zellen vorkommt. Für die Level von 5mC sind keine sehr deutlichen Unterschiede zwischen ICM und TE zu detektieren (Ruzov et al. 2011). Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz- Analysen von 5mC und 5hmC in Blastozysten sind in Abbildung 3.7 zu sehen, wobei aus technischen Gründen Embryonen, welche zygotisch TET3FL überexprimieren, fehlen. Die zum Zeitpunkt E4.0 analysierten Kontroll-Embryonen entwickelten sich zu normalen Blastozysten mit ICM und TE und der typischen 5mC- und 5hmC- Verteilung (Abbildung 3.7). Die analysierten TET überexprimierenden Embryonen aller Gruppen zeigen weder die typische Blastozystenmorphologie, noch besitzen sie die typische Anzahl an Zellen (100-160). Auf ihrem Weg zur „Blastozyste“ haben sich die Zellen also nicht effektiv geteilt oder/und sind teilweise in Apoptose gegangen. In Embryonen, welche zygotisch TET1FL überexprimieren, ist das Grundsignal von 5hmC vergleichbar zu dem der Kontroll- Embryonen. Das 5mC- Signal ist jedoch deutlich erhöht. Zudem kommt es zu einer Akkumulation von 5hmC in einigen Zellen eines Bereichs der Blastozyste, was als Andeutung einer ICM gesehen werden könnte (Abbildung 3.7). Die Embryonen, welche zygotisch TET3CD überexprimieren, zeigen ein erhöhtes 5hmC- Grundsignal und auch eine leichte Akkumulation von 5hmC in einem definierten Bereich (angedeutete ICM). Außerdem haben sich in einigen Zellen 5hmC- Hotspots gebildet. Das 5mC- Signal ist vergleichbar zu dem der Kontroll- Embryonen. Den stärksten Effekt zeigen die E4.0- Embryonen, die zygotisch TET1CD überexprimieren, welche mit 7% auch das schlechteste Entwicklungspotenzial aufweisen. Das 5mC- Signal ist in diesen Embryonen sehr niedrig und fast nur noch als Hintergrundsignal zu deuten. Das 5hmC- Grundsignal hingegen ist ähnlich zu dem der Kontroll- Embryonen. Bereiche in einzelnen Zellen zeigen eine starke Akkumulation des 5hmC- Signals. Die hier beschriebenen Signale der epigenetischen Modifikationen ähneln sehr denen

der Zygote und dem 2- Zellembryo nach der TET Überexpression (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3, Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Das in der Zygote durch die TET Überexpression veränderte epigenetische Muster bleibt also über das 2- Zellstadium hinaus, bis hin zum Blastozystenstadium erhalten.

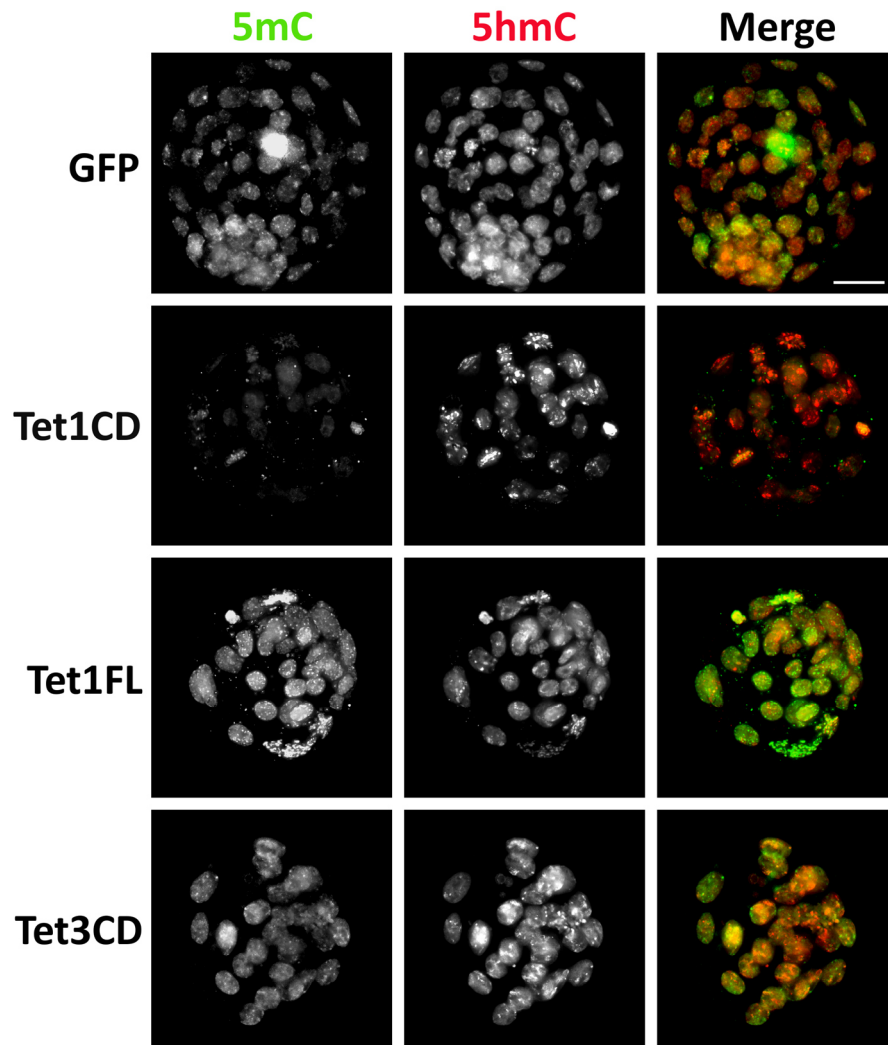


Abbildung 3.7 5mC- und 5hmC- Signale in Blastozysten, welche zygotisch TET Varianten überexprimieren. Exemplarisch dargestellt sind 5mC-/5hmC- Antikörperfärbungen von E4.0 Embryonen. In Zygoten (IVF) wurde die entsprechende mRNA injiziert, zum Zeitpunkt E4.0 fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5hmC angefärbt. Die Embryonen, welche TET überexprimieren, bilden keine morphologisch korrekten Blastozysten, und auch die Anzahl der Zellen der Blastozyste ist reduziert. Die in der Zygote etablierten Modifikationsmuster werden bis E4.0 beibehalten N>5; Maßstabballen 20µM

3.1.6 Der Einfluss der TET Überexpression auf die Methylierungsdynamik während der epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote

Methylierungsanalyse mittels Hairpinbisulfit

Nach dem heutigen Stand der Forschung erfolgt die epigenetische Reprogrammierung in der Zygote mittels unterschiedlicher, sequenzspezifischer Mechanismen. Es findet ein Zusammenspiel von De- und Remethylierungsprozessen zur Etablierung von definierten Methylierungs- und DNA-Modifikationsmustern statt. Zu den Demethylierungsmechanismen gehört die replikationsabhängige Demethylierung, die auf der Verminderung der Erhaltungsmethylierung basiert. Diese kann beispielsweise durch Oxidation von 5mC und dem Nichterkennen der oxidierten Basen durch DNMT1 erfolgen. Einen weiteren Mechanismus stellt die aktive Demethylierung via DNA-Reparatur dar. Dabei können 5hmC, 5fC und 5caC von spezifischen Glykosylasen erkannt und ausgeschnitten werden, woraufhin mittels BER ein unmethyliertes Cytosin in die DNA eingebaut wird (detaillierte Darstellung in den Kapiteln 1.6 und 1.7.1). Welche Mechanismen an welchen Sequenzen zur Reprogrammierung führen und in welchem Ausmaß die TET-basierte Oxidation eine Rolle spielt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Wie Immunfluoreszenz-Analysen, die einen globalen Überblick über das gesamte Genom geben, zeigen, führt die TET Überexpression zu einer starken Oxidation (TETCD und TETFL), die für TETCD mit einem Methylierungsverlust einhergeht, für TETFL hingegen von einem Methylierungsanstieg begleitet wird (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Durch die basengenaue Analyse von prä- und postreplikativen Zygoten, welche TET überexprimieren, sollten die Auswirkungen der TET-basierten Oxidation auf die Reprogrammierung analysiert werden. Dabei sollten mögliche Unterschiede in den Zielsequenzen und in den Modifizierungsstärken der Enzymvarianten in der Zygote geklärt werden. Zum anderen sollte der Einfluss der erhöhten 5hmC-, 5fC- und 5caC- Level auf die (aktiven) Demethylierungsprozesse und die Erhaltung der Methylierung während der Replikation analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Hairpinbisulfit-Sequenzierungsmethode angewendet. Das Besondere an dieser Methode ist, dass sich, anders als bei den herkömmlichen Bisulfit-Protokollen, Daten von beiden Strängen gleichzeitig erstellen lassen (Laird et al. 2004). Prinzipiell können CpG Positionen auf beiden Strängen methyliert vorliegen (vollmethyliert), Cytosine ausschließlich auf einem Strang methyliert (hemimethyliert) oder auf beiden Strängen nicht methyliert (unmethyliert) sein. Diese Informationen sind essentiell wichtig, wenn es, wie in dieser Arbeit, um die Aufklärung von Methylierungsdynamiken geht. Der experimentelle Ablauf der Hairpinbisulfitanalyse ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Für die Hairpinbisulfitanalyse wird die DNA an bestimmten Positionen durch eine speziell ausgewählte Endonuklease geschnitten, woraufhin ein Linkeroligonukleotid an diese Schnittstelle ligiert wird. So bleiben während der Bisulfitreaktion, die einen Denaturierungsschritt beinhaltet, beide Stränge über das Linkeroligonukleotid als ein großes Molekül miteinander verbunden. Dadurch ist es möglich, Methylierungsinformationen von beiden Strängen gleichzeitig zu erlangen und Mechanismen und Dynamiken der Demethylierung aufzudecken. Zur Analyse repetitiver Elemente (mSat, Line1 und IAP) ist diese Methode auch für eine geringe Anzahl von

Zellen anwendbar, da diese Elemente in tausendfacher Ausführung im Säuger genom vorkommen und somit genug DNA zur Amplifikation zur Verfügung steht (Tabelle 3.3). Die analysierten repetitiven Elemente stellen zwar spezielle DNA- Sequenzen dar, sind aber über das ganze Genom verteilt und decken damit viele Bereiche ab, sodass ein globalerer Überblick über die Methylierung gegeben werden kann. Analysiert wurden, wie in Arand et al. 2015, major Satellites (mSat), eine UTR von Line1 (L1_Tf (vgl. (Goodier et al. 2001; Naas et al. 1998); L1)), welche in der Zygote deutlich demethyliert wird und ein Long terminal repeat, IAP, welcher gegen Demethylierung resistent ist.

Tabelle 3.3 Die zur Analyse der DNA- Methylierung ausgewählten repetitiven Elemente.

Name	Klasse	Kopienzahl (Giehr et al. 2016)	Kürzel
Major Satellites	Satelliten	ca./mind. 100000	mSat
L1Md_Tf	LINEs	ca./mind. 1635	L1
IAP (IAPLTR1a_mM)	LTR Transposons	ca./mind. 2784	IAP

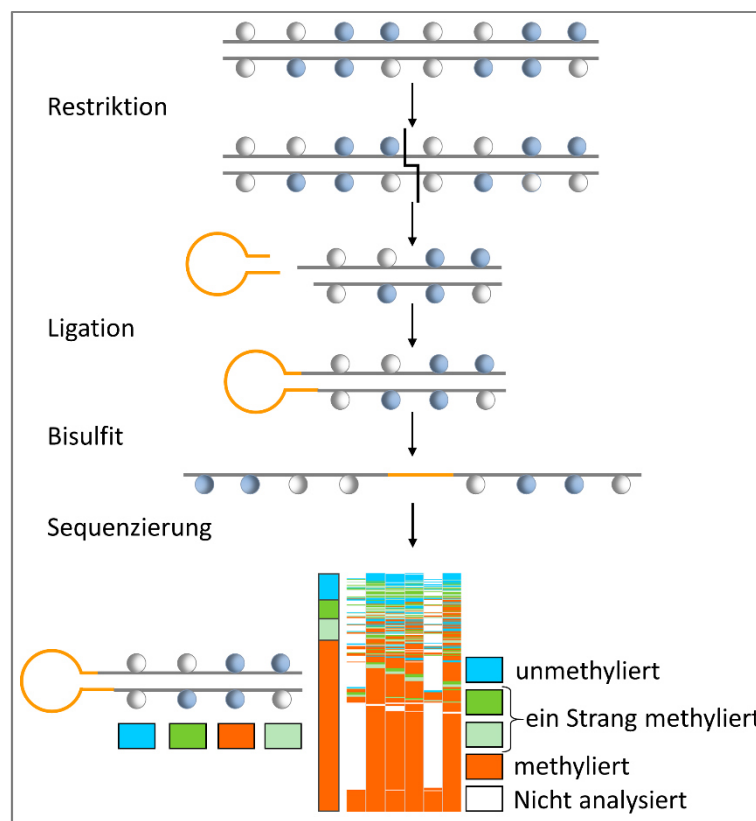


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung des Ablaufs der Hairpin- Bisulfitbehandlung. Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Hairpin- Bisulfitbehandlung. Zunächst wird die genomische DNA mit einer spezifischen Endonuklease an definierten Positionen geschnitten. Daraufhin wird eine Linkeroligonukleotid an die jeweiligen Fragmente ligiert, die die beiden DNA-Stränge zusammenhält. Die DNA wird dann einer Bisulfitbehandlung unterzogen, Amplikons mittels PCR generiert und diese dann sequenziert. Die erhaltenen Methylierungsinformationen sind unten dargestellt und der Farbcode erklärt.

Die Bisulfitbehandlung weniger Zellen wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Walter von Julia Arand etabliert und optimiert. Durch Amplikongenerierung und Hochdurchsatzsequenzierung konnten in dieser Arbeit qualitativ wertvolle Daten erzeugt werden.

Sind die Proben, wie in diesem Experiment, mit dem gängigen Bisulfitprotokoll (EZ DNA Methylation Gold™) behandelt, erscheinen 5mC und 5hmC als Cytosin, während 5fC und 5caC als Thymin dargestellt sind (Tabelle 3.6), wodurch eine definierte Analyse der oxidierten Basen unmöglich ist. Es gibt allerdings Methoden, die diese Unterscheidung zulassen bzw. fokussieren (Oxidatives Bisulfit, fCab, caCab). Diese Methoden sind jedoch sehr material- und/oder kostenintensiv. Um dennoch einen Einblick in die Unterschiede der Funktionsweise der verschiedenen TET Varianten und den Einfluss erhöhter Mengen oxidierteter Basen auf die Methylierungsdynamiken in Zygoten zu bekommen, wurden Zygoten zu entsprechenden Zeitpunkten (präreplikativ=6hpf, postreplikativ=12hpf) gesammelt und mit der HPBS- Methode behandelt (Kapitel 2.2.25). Dazu wurde in Oozyten zunächst die entsprechende mRNA injiziert. Dann wurden diese für ca. eine Stunde inkubiert, damit in dieser Zeit die Translation beginnen kann und somit schon vor der Befruchtung die TET Proteine im Überschuss vorhanden sind (Kapitel 2.2.16). Dies war wichtig, damit schon präreplikativ mögliche Oxidationsprozesse von statten gehen und die Methylierungsdynamiken während der Replikationsphase analysiert werden konnte. Danach wurden die Oozyten mittels ICSI befruchtet und die Embryonen für 6 oder 12 Stunden inkubiert (Kapitel 2.2.17). Vor dem Sammeln musste selektiert werden, welche Zygoten für die Analyse brauchbar sind, also zwei normal entwickelte Pronuklei hatten. Dazu wurde die DNA der Zygoten entweder mit Hoechst33342 angefärbt oder bei einem starken grünen Signal der TET-GFP-Fusionsproteine basierend auf diesem die korrekte Pronukleiformation überprüft. In Abbildung 3.9 sind exemplarisch die für das Sequenzieren sortierten Zygoten zu sehen.

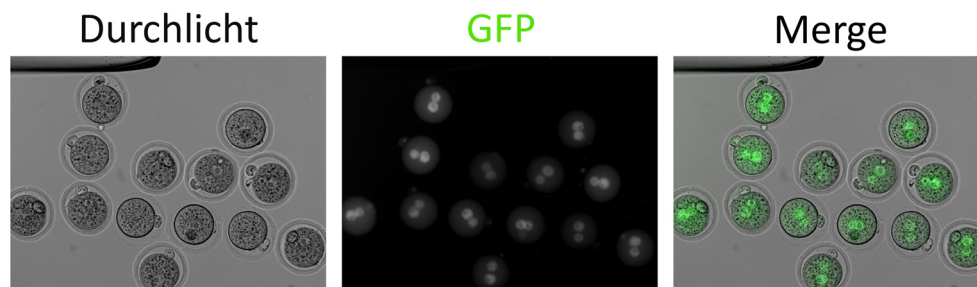


Abbildung 3.9 Zum Sequenzieren sortierte Zygoten, welche TET3FL überexprimieren. Dargestellt sind exemplarisch die für das Sequenzieren sortierten Zygoten. Oozyten wurden mit mRNA injiziert, 2h inkubiert und daraufhin mittels ICSI befruchtet. Die Zygoten wurden nach 12hpf sortiert und gesammelt.

3.1.6.1 Methylierungsanalyse von CpGs in TETFL überexprimierten prä- und postreplikativen Zygoten

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der HPBS- Analysen dargestellt. Die Abbildungen zeigen immer die prozentualen Werte relativ zu den Werten der Kontrolle, wobei diese auf 100% gesetzt wurde (a). Die absoluten Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang zu finden (Tabelle 8.9, Tabelle 8.10, Tabelle 8.11). Zudem zeigen die Abbildungen die Methylierungsmuster der Hairpinbisulfitanalyse (b). Zum Verständnis dieser ist Folgendes zu beachten. Die Spalten stellen die einzelnen CpG-Positionen dar, während die Zeilen je ein sequenziertes DNA- Molekül zeigen. Rot zeigt vollmethylierte Positionen an, grün hemimethylierte Positionen und blau unmethylierte CpGs. Die durchschnittliche

Methylierung über sämtliche CpG- Positionen wird im abgesetzten linken Balken neben dem Methylierungsmuster dargestellt. Angaben zur Anzahl der analysierten Zellen und der generierten Sequenzen befinden sich im Anhang (Tabelle 8.7).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der basengenauen Analysen der Überexpression von TET3FL und TET1FL dargestellt.

mSat

Für mSats lässt sich sagen, dass die Gesamtmethylierung in den Kontroll- Zygoten mit 22,4% relativ niedrig ist (Abbildung 3.10). Vor der Replikation (6hpf) ist der größte Teil der Methylierung als vollmethylierte CpG- Positionen vorhanden (19,2%). Nur ein kleiner Teil liegt hemimethyliert vor (3,2%). Über die Replikation bleibt die Gesamtmethylierung in den Kontrollzygoten fast konstant, mit einer geringen Abnahme (18,9%). Es ändert sich das Verhältnis von Voll- und Hemimethylierung. So kommt es zu einem Verlust von Vollmethylierung (11,9%) in Kombination mit einem Anstieg von hemimethylierten Positionen (7,0%).

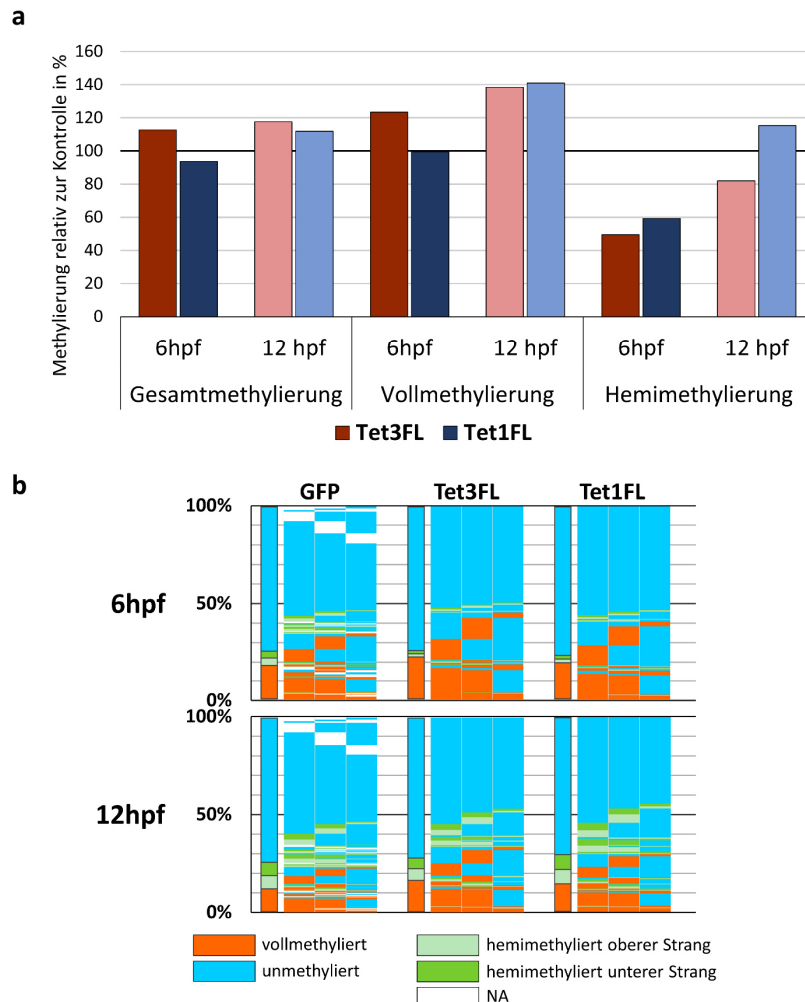


Abbildung 3.10 DNA- Methylierung von mSat in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten, welche TETFL überexprimieren (ICSI) wurden zu den Zeitpunkten 6hpf und 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3FL und TET1FL zeigen einen relativen Einfluss auf die Methylierung. Bei Betrachtung der Methylierungsmuster wird deutlich, dass der absolute Effekt nicht sehr stark ausfällt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Zygoten, welche TET3FL/TET1FL überexprimieren (**Abbildung 3.10**). Betrachtet man die relativen Werte der Gesamtmethylierung der Zygoten, die TET3FL überexprimieren, ist ein leichter Anstieg der Gesamtmethylierung prä- und postreplikativ zu erkennen (präreplikativ +12,8%; postreplikativ +17,6%) (Abbildung 3.10a). Dieser ist gekennzeichnet durch einen deutlichen Anstieg der Vollmethylierung (präreplikativ +23,5%; postreplikativ +38,5%), der aber mit einem Verlust der Hemimethylierung einhergeht. Dieser Verlust ist präreplikativ sehr deutlich (-50,5%). Postreplikativ nimmt die Hemimethylierung wieder etwas zu (-18%).

Die Überexpression von TET1FL führt im relativen Vergleich zur Kontrolle zu einem leichten präreplikativen Verlust der Gesamtmethylierung (-6,7%), der auf dem deutlichen Verlust der Hemimethylierung beruht (-60,8%), während sich die Vollmethylierung nicht ändert. Postreplikativ kommt es zu einem Anstieg der Gesamt- (+11,9%), Voll- (+26,1%) und Hemimethylierung (12,2%).

Das Methylierungsmuster der Embryonen, welche TET1FL oder TET3FL überexprimieren, ist prä- und postreplikativ dem der Kontrolle sehr ähnlich (Abbildung 3.10b). Dabei wird deutlich, dass trotz der Unterschiede in den relativen prozentualen Werten, die Überexpression der TET Vollängenvarianten insbesondere postreplikativ nur einen geringen Einfluss auf die absolute Methylierung hat. Diese Divergenz basiert auf den geringen Methylierungsleveln der mSat.

L1

Die Analyse der Methylierungsanalyse der L1 Elemente wurde vorgenommen, da bekannt ist, dass diese während der Reprogrammierung in der Zygote demethyliert werden (Lane et al. 2003). Diese Demethylierung erfolgt weitestgehend replikationsabhängig, ist aber zu einem gewissen Teil auch aktiv (Arand et al. 2015). Aus technischen Gründen konnten keine präreplikativen Zeitpunkte analysiert werden, so sind in **Abbildung 3.11** ausschließlich Analysen postreplikativer Zygoten dargestellt. Die Kontroll- Zygoten zeigen eine Gesamtmethylierung von 41,3%, eine Vollmethylierung von 28,3% und eine Hemimethylierung von 12,0% (**Abbildung 3.11**).

Die prozentualen relativen Methylierungswerte zeigen, dass die Überexpression von TET3FL zu einem deutlichen Verlust an Gesamtmethylierung führt (-32,0%). Dieser beruht auf der Abnahme der Vollmethylierung (-40%), wohingegen die Hemimethylierung mild abnimmt(-12,2%). In Zygoten, die TET1FL überexprimieren kann eine Reduktion der Gesamtmethylierung detektiert werden, die aber mild ausfällt (-9,5%). Das Level an Vollmethylierung ist reduziert (-26,1%), wohingegen die Hemimethylierung zunimmt (+30,7). Diese deutlichen Veränderungen der Methylierung sind auch in der Methylierungsmusteranalyse zu erkennen (**Abbildung 3.11b**). Zudem zeigen die Zygoten, die TET3FL überexprimieren neben dem Verlust von Vollmethylierung einen Anstieg des mosaikalen Musters. In Zygoten, die TET1FL überexprimieren, ist ein deutlicher Zuwachs von strangspezifischer Methylierung in hemimethylierten Positionen zu erkennen (kontinuierliche Methylierung). Diese Analyse zeigt also verschiedene, deutliche Effekte der verschiedenen TETFL Formen auf die Methylierung der L1 Elemente.

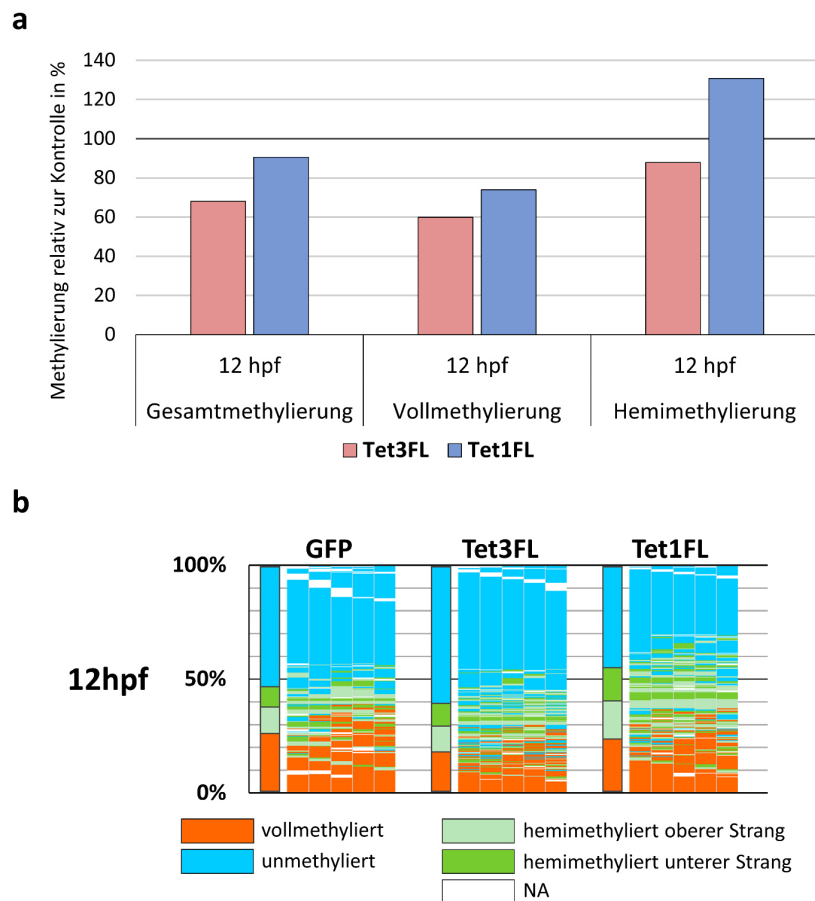


Abbildung 3.11 DNA- Methylierung von L1 in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETFL überexprimieren, wurden 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3FL und TET1FL haben einen deutlichen Einfluss auf die Methylierung, der sich sowohl durch die relativen Methylierungswerte als auch durch den Effekt auf die Methylierungsmuster zeigt. Auffällig ist die starke Anhäufung von hemimethylierten CpG- Positionen in TET1FL überexprimierenden Zygoten.

IAP

IAP wurden analysiert, da sie während der Reprogrammierungsphase in der Zygote keine Methylierung verlieren (Lane et al. 2003). Allerdings scheinen sie intensiven De- und Remethylierungsprozessen zu unterliegen, da ihr Methylierungsmuster mosaikaler wird (Arand et al. 2015). Die Mechanismen, die für Demethylierungsprozess verantwortlich sind, sind nicht bekannt. Es sollte also geprüft werden, ob die Methylierung der IAP durch die Überexpression der TET Enzyme beeinflusst.

Wie erwartet, kann in IAPs der Kontrollzygoten kein Methylierungsverlust während der Replikation beobachtet werden (Abbildung 3.12b). So steigt das Level an Gesamtmethylierung sogar minimal an (präreplikativ 78%, postreplikativ 80%). Über den Zeitraum der Replikation kommt es zu kaum merklichen Veränderungen der Relation von Voll- zu Hemimethylierung (präreplikativ Vollmethylierung 69,4%, Hemimethylierung 8,5%, postreplikativ Vollmethylierung 71,2, Hemimethylierung 9,6%). Zudem steigt das mosaikale Muster während der Replikation etwas an. Die Überexpression von TET3FL und TET1FL führt zu sehr milden präreplikativen Effekten und etwas betonteren postreplikativen Effekten (Abbildung 3.12a,b). Betrachtet man die relativen

Methylierungswerte, kann man erkennen, dass präreplikativ ein sehr leichter Verlust an Gesamtmethylierung erfolgt (TET3FL -4,5%, TET1FL -1,5%; **Abbildung 3.12a**). Dieser basiert vornehmlich auf dem Verlust an hemimethylierten Positionen (TET3FL -29,5%, TET1FL -40,5%), wohingegen sich die Vollmethylierung kaum ändert (TET3FL -1,4%, TET1FL +3,2%). Postreplikativ ergibt sich ein anderes Bild. Hier ist der Verlust an Gesamtmethylierung relativ zur Kontrolle größer (TET3FL -8,2%, TET1FL -5,7%), welcher auf den Verlust von vollmethylierten CpGs zurückzuführen ist (TET3FL -11,3%, TET1FL -7,2%), da die Hemimethylierung steigt (TET3FL +14,3%, TET1FL +5,5%). Dies zeigt, dass die Überexpression von TETFL einen Einfluss auf die Methylierung hat, wobei sich TET3FL und TET1FL in ihrer Aktivität ähnlich verhalten. Auch das Methylierungsmuster ist zwischen Kontrolle und Zygoten, die TET3FL und TET1FL überexprimieren, sehr ähnlich (Abbildung 3.12 b). Schon vor der Replikation kann man mosaikale Muster erkennen, welche nach der Replikation angestiegen sind.

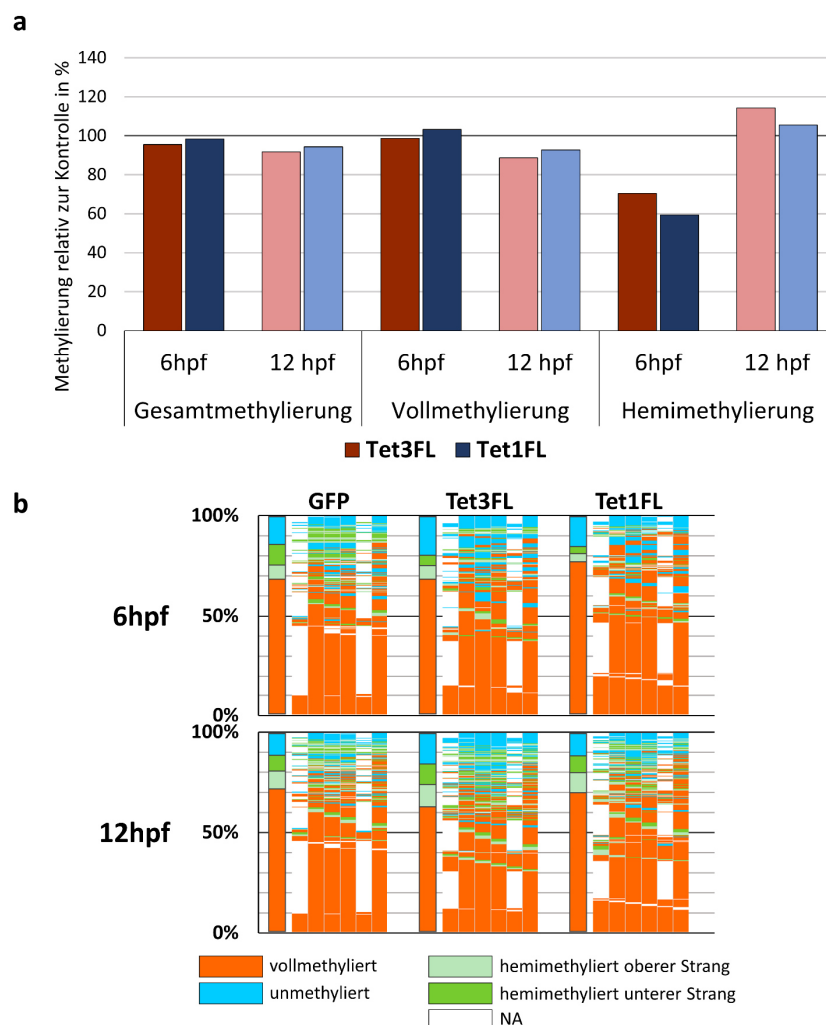


Abbildung 3.12 DNA- Methylierung von IAP in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETFL überexprimieren, wurden zu den Zeitpunkten 6hpf und 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3FL und TET1FL haben einen deutlichen Einfluss auf die Methylierung, der sich sowohl durch die relativen Methylierungswerte als auch durch den Effekt auf die Methylierungsmuster zeigt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mSats durch die Überexpression von TET3FL/TET1FL weder prä- noch postreplikativ stark betroffen sind. Auf L1 wirkt sich die Überexpression vorwiegend während der Replikation auf die Vollmethylierung aus. Dabei verlieren L1 Vollmethylierung, vor allem nach der Überexpression von TET3FL. In Zygoten, die TET1FL überexprimieren, steigt die Hemimethylierung deutlich, während TET3FL überexprimierende Zygoten Hemimethylierung verlieren. In IAPs ist vor und nach der Replikation ein Verlust der Gesamt- und Vollmethylierung zu beobachten, wobei sich die Hemimethylierung nur minimal ändert. Die verschiedenen repetitiven Elemente sind also unterschiedlich stark und auf unterschiedliche Art und Weise von der Überexpression der TETFL Varianten betroffen.

3.1.6.2 Methylierungsanalyse von CpGs in Zygoten, die TET3CD oder TET1CD überexprimieren

Immunfluoreszenz-Analysen der Überexpression von TETCD, insbesondere TET1CD, zeigen einen sehr starken Oxidationseffekt, der mit einem Methylierungsverlust einhergeht. Der beobachtete Effekt sollte auf molekularer Ebene analysiert werden, wobei durch die starken Oxidationsvorgänge mögliche Demethylierungsprozesse ausgelöst werden könnten. Dadurch könnte ein möglicher Aufschluss über die Demethylierungsmechanismen gegeben werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Hierbei ist die Kontrolle dieselbe wie die der Analysen der TETFL überexprimierten Zygoten und wird deswegen in diesem Abschnitt nicht nochmals im Detail erläutert.

mSat

In Abbildung 3.13 sind die prozentualen Werte der Methylierung relativ zur Kontrolle und die Methylierungsmuster der Zygoten, die TETCD überexprimieren, für mSat gezeigt.

Präreplikativ ist für die Überexpression von TET3CD nur ein milder Effekt erkennbar. Die Gesamt- und Vollmethylierung ändert sich gering (Gesamtmethylierung +8,7%, Vollmethylierung +13,3%). Die Hemimethylierung nimmt jedoch ab (-18,6%) (Abbildung 3.13a). Nach der Replikation ist die Gesamtmethylierung relativ zur Kontrolle etwas reduziert (-8,7%), was auf einer weiteren Reduktion der Hemimethylierung basiert (-13,7%). Die Vollmethylierung ist im Vergleich zur Kontrolle unverändert (+0,2%). Die Überexpression von TET1CD führt präreplikativ, im Unterschied zur Überexpression von TET3CD, zu keinem Effekt auf die Gesamt- (+1,4%) und Vollmethylierung (+0,5%), jedoch zu einem milden Anstieg der Hemimethylierung (+5,7%) (**Abbildung 3.13a**). Postreplikativ sind die Auswirkungen ähnlich denen der Überexpression von TET3CD. Die Gesamtmethylierung nimmt ab (-4,9%), was auf der Reduktion der Hemimethylierung basiert (-14,0%), während die Vollmethylierung sich nicht ändert (0,4%). Die Methylierungsmuster sind zwischen den Kontrollzygoten, den Zygoten, die TET3CD überexprimieren, und denen, die TET1CD überexprimieren, sehr ähnlich (**Abbildung 3.13b**). Der erzielte relative Effekt basiert demnach auch hier auf den geringen Methylierungsleveln der mSats (Kapitel 3.1.6.1 mSat). Es kann also für mSats kein deutlicher Effekt der Überexpression von TET3CD oder TET1CD beobachtet werden.

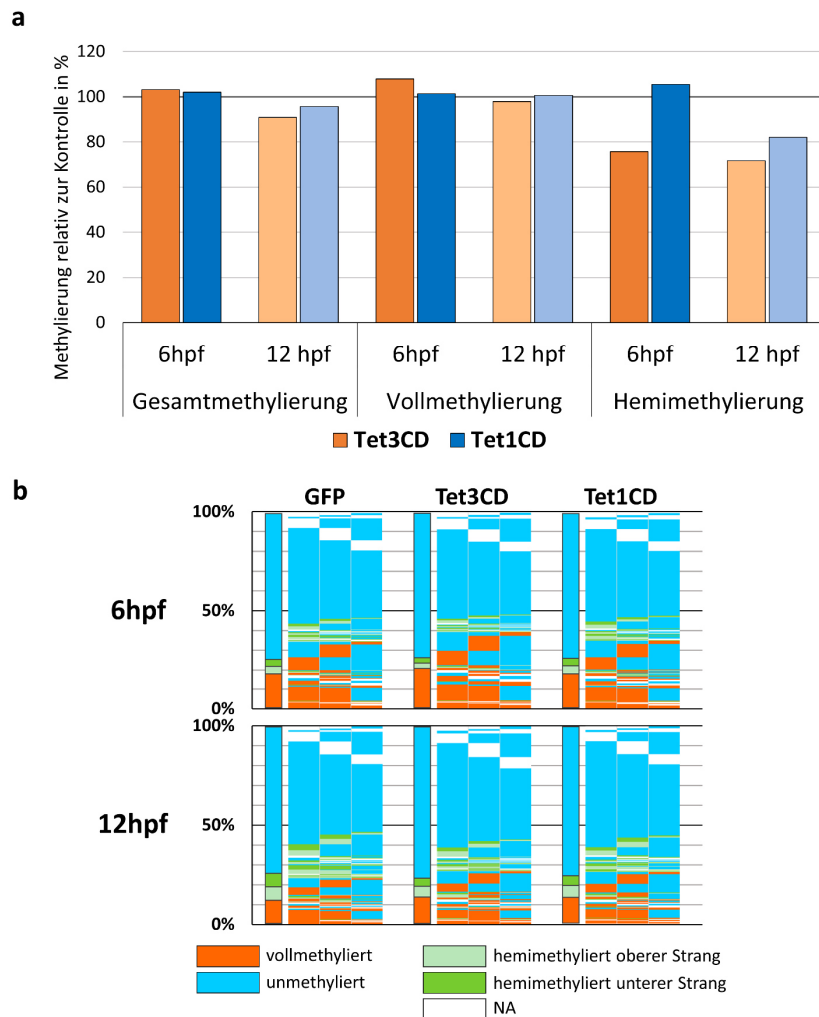


Abbildung 3.13 DNA- Methylierung von mSat in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETCD überexprimieren, wurden zu den Zeitpunkten 6hpf und 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3CD und TET1CD zeigen einen milden relativen Einfluss auf die Methylierung, insbesondere auf die Hemimethylierung. Bei Betrachtung der Methylierungsmuster wird deutlich, dass der absolute Effekt nicht sehr deutlich ausfällt.

L1

Es wurde auch der Effekt der Überexpression von TETCD auf L1 untersucht. Wie auch für TETFL war es leider nicht möglich, Daten präreplikativer Zygoten zu generieren. Die Daten für die Überexpression von TET3CD und TET1CD zeigen, dass erhöhte TETCD Level einen deutlichen Einfluss auf die Methylierung von L1 ausüben (Abbildung 3.14). So führt die Überexpression von TET3CD im relativen Vergleich zur Kontrolle, zu einem deutlichen Verlust der Gesamtmethylierung (-25,4%), welcher sich aus einem Verlust der Vollmethylierung (-20,5%) und einem Verlust an Hemimethylierung zusammensetzt (-37,1%) (Abbildung 3.14a). Die Überexpression von TET1CD zeigt einen ähnlichen Einfluss. Auch hier ist die Gesamtmethylierung reduziert, sogar etwas deutlicher als in TET3CD überexprimierten Zygoten (-38,5%). Dieser Verlust resultiert aus einer Reduktion der Vollmethylierung (29,8%) und Hemimethylierung (59,5%) (Abbildung 3.14a). Die Methylierungsmuster zwischen Kontrolle und TET3CD überexprimierenden Zygoten ähneln sich, mit der Ausnahme der Reduktion von

Voll- und Hemimethylierung (Abbildung 3.14b). In beiden Gruppen befinden sich die methylierten CpGs der hemimethylierten Positionen auf ein und dem selben Strang, sodass lange strangspezifische (un)methylierte Abschnitte entstehen (kontinuierliche Methylierung). Die Überexpression von TET1CD führt dazu, dass diese Abschnitte fehlen.

Diese Daten zeigen also, dass die Überexpression von TETCD einen Effekt auf die Methylierungslevel von L1 hat. Diese fallen jedoch für TET3CD anders und etwas milder aus als für TET1CD.

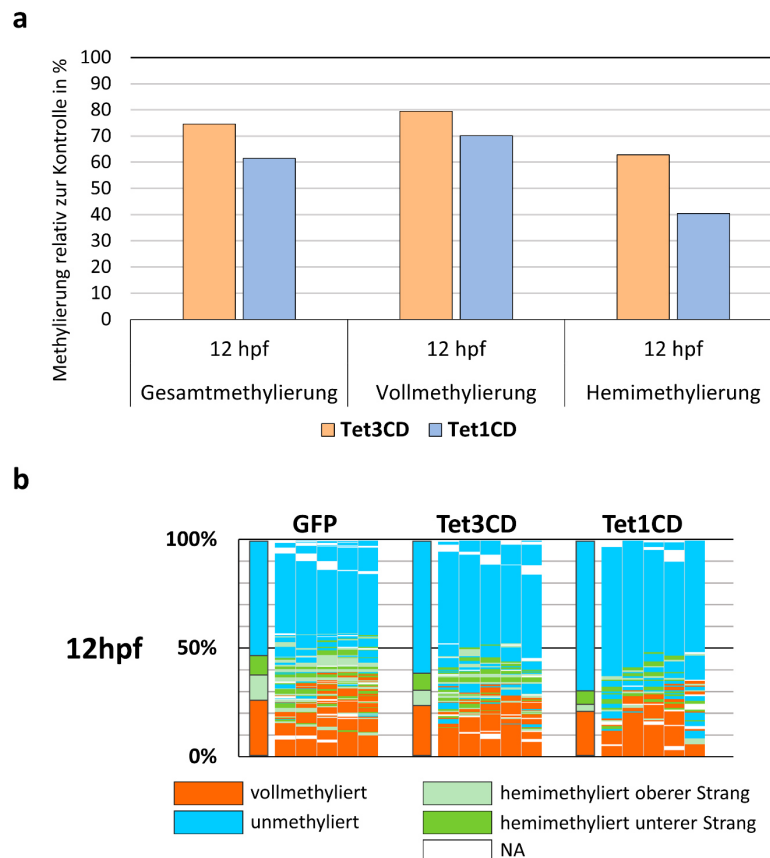


Abbildung 3.14 DNA- Methylierung von L1 in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETCD überexprimieren, wurden 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3CD und TET1CD führen zu einem Verlust der Methylierung. Es zeigen sich allerdings Unterschiede in der Stärke und dem Methylierungsmuster.

IAP

Wie auch für Zygoten, die TETFL überexprimieren, wurden die IAPs der Zygoten, die TETCD überexprimieren, mittels HPBS analysiert. Die Überexpression von TET3CD führt im relativen Vergleich mit der Kontrolle präreplikativ zu einem leichten Anstieg der Gesamtmethylierung (+5,6%), der auf einem Anstieg der Vollmethylierung (+11,3%) und einem Verlust von Hemimethylierung (-40,6%) basiert (Abbildung 3.15a). Die Überexpression von TET1CD führt hingegen präreplikativ zu einem leichten Verlust der Gesamtmethylierung (-1,6%), der auf dem Verlust von Vollmethylierung basiert (-2,3%). Die Hemimethylierung bleibt weitestgehend unbeeinträchtigt (+4,1%) (Abbildung 3.15a). Ein deutlicher Effekt der Überexpression der beiden TETCD Varianten wird postreplikativ sichtbar, wobei TET3CD und TET1CD die gleichen Auswirkungen in fast identischer Stärke zeigen. So führt die

Überexpression beider Varianten zu einem deutlichen Verlust an Gesamtmethylierung (TET3CD -17,2%; TET1CD -17,3%). Dieser Verlust basiert ausschließlich auf der Reduktion der vollmethylierten Positionen (TET3CD -22,0%; TET1CD -23,8%), da es parallel zu einem Anstieg der Hemimethylierung kommt (TET3CD +17,7%; TET1CD +30,5%) (Abbildung 3.15a).

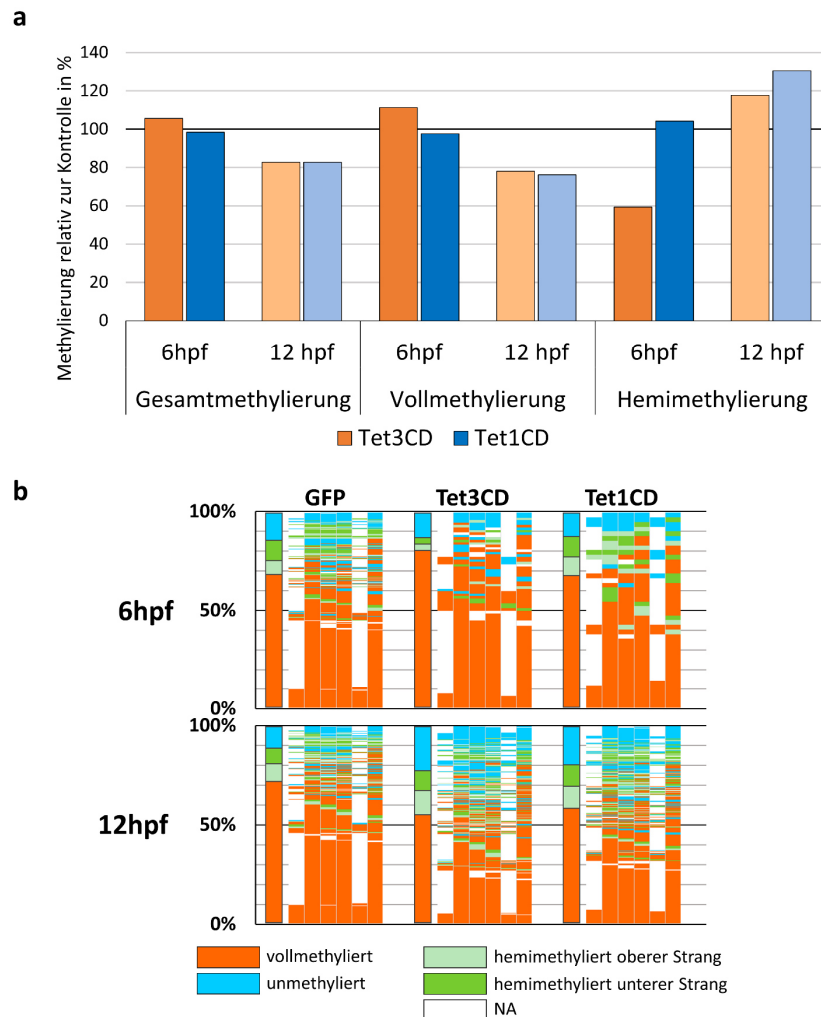


Abbildung 3.15 DNA- Methylierung von IAP in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren. a) Methylierung relativ zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien) b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETCD überexprimieren, wurden zu den Zeitpunkten 6hpf und 12hpf gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. Die Überexpressionen von TET3CD und TET1CD führen postreplikativ zu einem Verlust der Gesamtmethylierung und einem Anstieg der Hemimethylierung.

Neben der Veränderung der Methylierungslevel, führt die Überexpression von TET3CD und TET1CD zu deutlichen Veränderungen des Methylierungsmusters (Abbildung 3.15b). Schon präreplikativ ist ein milder Anstieg von mosaikalem Muster zu erkennen, welches gekennzeichnet ist von benachbarten vollmethylierten, hemimethylierten und unmethylierten CpGs auf einem DNA- Molekül. Der Anstieg von mosaikalem Muster geht einher mit einer Abnahme von kontinuierlicher Methylierung. Dieser Effekt wird durch die Betrachtung der prozentualen Berechnungen relativ zur Kontrolle noch deutlicher (Abbildung 3.16), dabei rufen beide TETCD Varianten sehr ähnlich starke Effekte hervor. Der Anstieg von mosaikalem Muster gegenüber der Kontrolle erfolgt schon präreplikativ (TET3CD +33,8, TET1CD +22,5%) und ist verbunden mit einem Verlust von kontinuierlicher Methylierung (TET3CD -

12,1%, TET1CD -7,5%). Nach der Replikation wird der Effekt noch deutlicher (mosaikal: TET3CD +38,8, TET1CD +42,5%; kontinuierlich: TET3CD +30,3, TET1CD +29,8%).

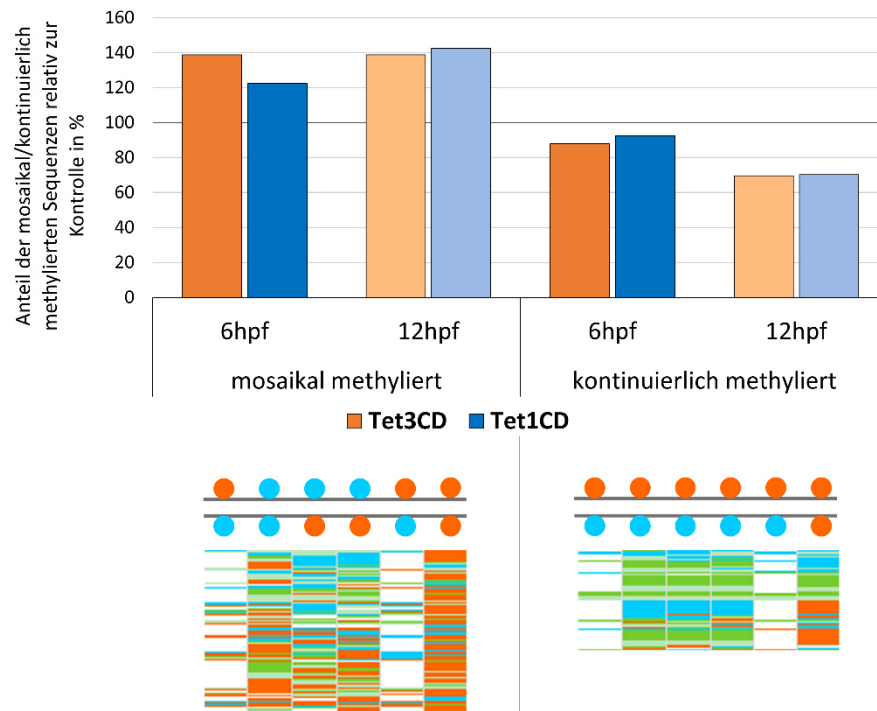


Abbildung 3.16 Anteil der mosaikal bzw. kontinuierlich methylierten Sequenzen in IAPs relativ zur Kontrolle. Dargestellt ist der Anteil der mosaikal bzw. kontinuierlich methylierten Sequenzen von IAPs relativ zur Kontrolle, nach der Überexpression von TET3CD oder TET1CD. Durch die Überexpression nimmt das mosaikale Muster zu, das kontinuierliche hingegen nimmt ab.

Diese Daten zeigen, dass die Überexpression von TET3CD und TET1CD die Methylierungslevel und -Muster von IAP deutlich beeinflussen. Neben einer Abnahme der Gesamt- und Vollmethylierung und einer Zunahme der Hemimethylierung kommt es zu einem Anstieg des mosaikalen Musters.

Um den Prozess der aktiven von der replikationsabhängigen Demethylierung zu trennen und damit die Effekte der Überexpression einem Mechanismus zugeordnet werden können, wurde im folgenden Versuch die Replikation geblockt (siehe 3.1.6.3).

3.1.6.3 Analyse der Methylierungsdynamiken in Zygoten, die TET1CD überexprimieren, nach dem Blocken der Replikation

Um die Effekte der Überexpression von TET entweder einem Oxidations- Reparatur- System oder der replikationsabhängigen Demethylierung zuzuordnen, wurde die Replikation durch Aphidicolin (Aph) geblockt. Aphidicolin ist ein dNTP Kompetitor, welcher in der aktiven Seite einiger DNA- Polymerase bindet und diese sehr spezifisch blockiert. Dabei handelt es sich um die replikativen DNA- Polymerasen der B- Familie Pol α , δ , ϵ (Brundret et al. 1972; Sheaff et al. 1991; Baranovskiy et al. 2014), wobei Pol δ und Pol ϵ auch eine Rolle in der DNA Reparatur spielen (Prindle & Loeb 2012; Henninger & Pursell 2014) (Abbildung 1.9). Da TET1CD basierend auf Immunfluoreszenz- Analysen einen sehr starken Oxidationseffekt hervorruft (Abbildung 3.3) und auch zu einem deutlichen Methylierungsverlust führt (Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.6.2), wurden für die Experimente Zygoten verwendet, die TET1CD

überexprimieren. Die Zygoten wurden, wie oben beschrieben generiert und ab 4hpf mit Aphidicolin behandelt (Kapitel 2.2.21). Die Blockade der Replikation wurde durch EdU/EdC- Analysen bestätigt (Abbildung 8.14). Aus technischen Gründen war das Generieren von Amplikons in diesem Experiment nur für mSats und IAPs möglich. Angaben zur Anzahl der analysierten Zellen und der generierten Sequenzen befinden sich im Anhang Tabelle 8.8.

In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse dieses Experiments dargestellt. Die Zygoten der Kontrolle zeigen präreplikativ ähnliche Methylierungslevel und -Muster wie die unbehandelten Kontrollzygoten (**Abbildung 3.13, Abbildung 3.15**). Unterschiede sind auf das nur einmalige Durchführen dieses Experiments zurückzuführen. Während der Phase von 6hpf bis 12hpf kommt es durch das Blocken der Replikation in mSat nicht zu dem charakteristischen replikationsabhängigen Methylierungsverlust, der einen Verlust der Vollmethylierung und den Anstieg der Hemimethylierung beinhaltet (Abbildung 3.17b). Stattdessen steigt die Gesamtmethylierung (+6,3%), was aus einer Zunahme der Vollmethylierung (+5,2%) und einer Abnahme der Hemimethylierung resultiert (-1,0%). Auch in IAP kommt es zu einem Gesamtmethylierungsanstieg (+11,5%). Dieser basiert auf einer Zunahme der Vollmethylierung (+15,2%) und auf einem Verlust von Hemimethylierung (-3,7%).

Betrachtet man nun die Methylierungswerte (relativ zur Kontrolle) der Aphidicolin- behandelten Zygoten, die TET1CD überexprimieren, fällt auf, dass sich schon 6hpf ein starker Verlust der Gesamt- und Vollmethylierung ereignet hat, wohingegen die Hemimethylierung gegenüber der Kontrolle deutlich gestiegen ist (Abbildung 3.17a). Dabei fallen die Effekte sowohl für mSat (Gesamt -48,1%, Voll -73,2%, Hemi +318%), als auch für IAP sehr deutlich aus (Gesamt -32,2%, Voll -48,7%, Hemi +252%). Dieser Effekt verstärkt sich mit der Zeit (12hpf) etwas für mSat (Gesamt -55,5%, Voll -69,8%, Hemi +165%) und deutlich für IAP (Gesamt -60,5%, Voll -75,1%, Hemi +543%)

Das Methylierungsmuster der mSat in Zygoten, die TET1CD überexprimieren und mit Aphidicolin behandelt wurden, ist im Vergleich zur Kontrolle etwas weniger mosaikal und auch weniger kontinuierlich, was an dem starken Methylierungsverlust liegt (Abbildung 3.17b). In IAP steigt das mosaikale Methylierungsmuster 6hpf im Vergleich zur Kontrolle deutlich (Abbildung 3.17). Über das Muster zum Zeitpunkt 12hpf kann nur schwer eine Aussage getroffen werden, da die Anzahl der Sequenzen recht niedrig ist (Tabelle 8.8). Die Überexpression von TET1CD in Kombination mit Aphidicolin führt also prä- und postreplikativ zu einen sehr starken Methylierungsverlust in mSat und IAP.

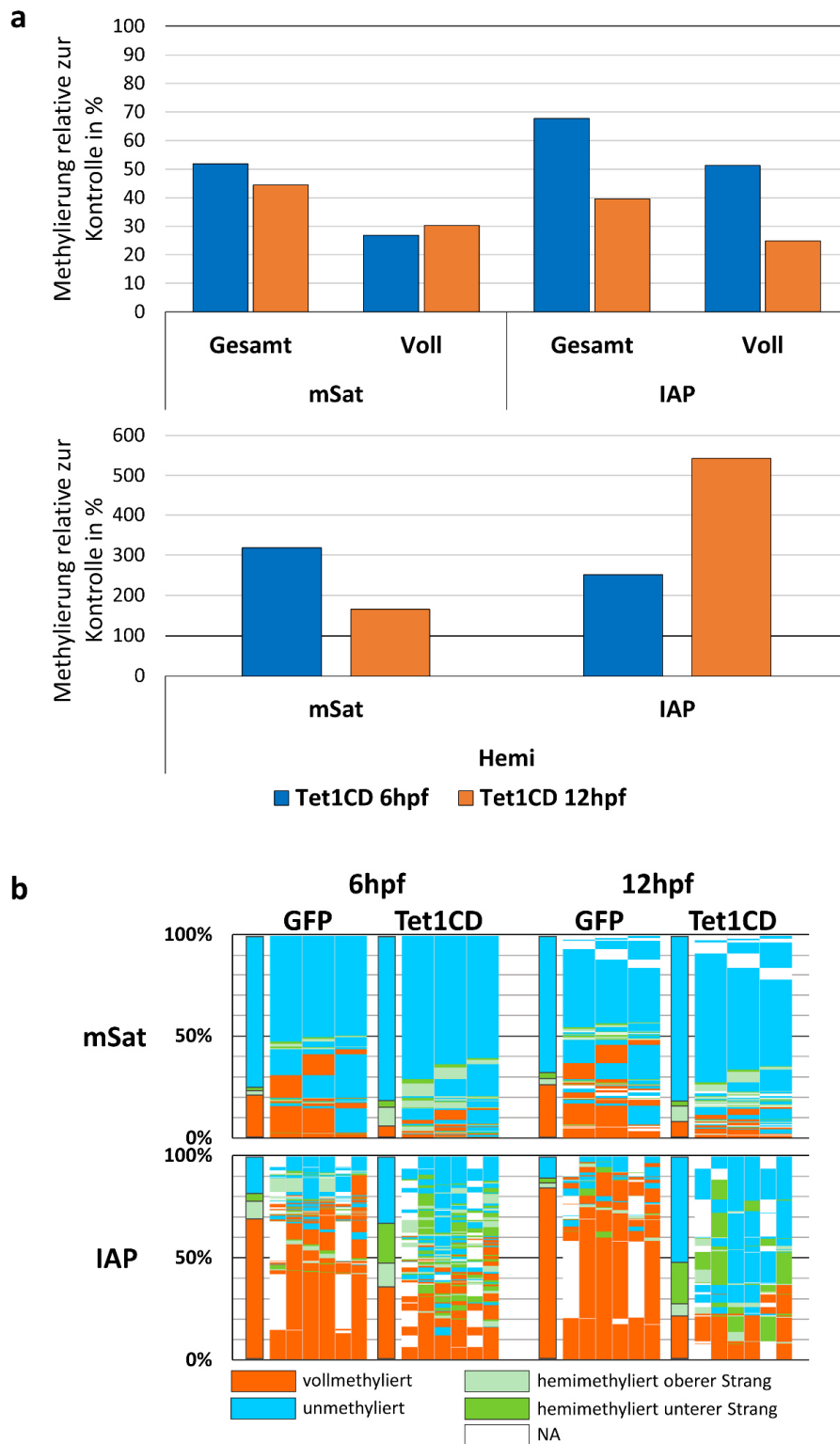


Abbildung 3.17 DNA- Methylierung von mSat und IAP in Zygoten, welche TET1CD überexprimieren und mit Aphidicolin behandelt wurden. a) Methylierung relative zur Kontrolle in % (Kontrolle=100%, schwarze Linien), oben Gesamt- und Vollmethylierung; unten Hemimethylierung b) Methylierungsmuster. Prä- (6hpf) und postreplikative (12hpf) Zygoten (ICSI), welche TETCD überexprimieren, wurden ab 4hpf zum Blocken der replikativen Polymerasen mit Aphidicolin behandelt. Sie wurden 6hpf und 12hpf gesammelt und mittels HPBS-Sequenzierung analysiert. Die Aphidicolinbehandlung der Zygoten, die TET1CD überexprimieren, führt prä- und postreplikativ zu einem deutlichen Verlust der Gesamt- und Vollmethylierung und einem Anstieg der Hemimethylierung. Angaben zu Anzahl und

3.2 Effekte der Überexpression der Thymin DNA Glykosylase im präimplantiven Embryo

TDG ist eine Glykosylase des BERs und spielt eine wichtige Rolle in der TET- BER- basierten Demethylierung in ESCs (Shen et al. 2013). So erkennt TDG das von den TET Enzymen generierte 5fC und 5caC und schneidet es aus der DNA, woraufhin diese Position wird durch weitere BER Enzyme mit einem unmodifizierten Cytosin ersetzt (He et al. 2011). In präimplantiven Stadien ist TDG nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Hajkova et al. 2010; Qian et al. 2015) und spielt keine Rolle in der präimplantiven Entwicklung, denn erst zum Zeitpunkt E11.5 ist der *Tdg* KO letal (Cortázar et al. 2011; Cortellino et al. 2011). Zudem führt der konditionale KO in der Zygote weder zu Änderungen der 5fC und 5caC Level (Immunfluoreszenz- Analysen), noch hat er einen Einfluss auf die aktive Demethylierung (MAB-Sequenzierung) (F. Guo et al. 2014).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch wenig über die Funktion von 5fC und 5caC in der präimplantiven Entwicklung bekannt, lediglich eine Aufgabe in der aktiven Demethylierung in der Zygote wird vermutet. Da TDG spezifisch 5fC und 5caC aus der DNA schneidet, wurde es in dieser Arbeit verwendet, um den gegenteiligen Effekt der Überexpression von TET zu erreichen. Während TET 5fC/5caC katalysiert und somit die Level bei Überexpression steigen, sollte durch die Überexpression von TDG die Menge von 5fC/5caC sinken. Durch die Effekte auf die Entwicklung und die Reprogrammierung sollten Rückschlüsse auf die Rolle und Funktion von 5fC und 5caC gezogen werden. Als Kontrolle wurde eine katalytisch inaktive Mutante (TDGmut) überrepräsentiert. TDGmut erwies sich jedoch als weiteres Werkzeug zur Veränderung der Mengen von 5fC und 5caC.

3.2.1 Das Entwicklungspotenzial von Embryonen, die zygotisch TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren

Präimplantiv hat der KO von *Tdg* keine Auswirkungen auf die Entwicklung. Erst in der postimplantiven Phase ist der Verlust von TDG letal. Dies bedeutet, dass TDG entweder keine entscheidende Rolle während der frühen embryonalen Stadien spielt oder eine andere Glykosylase die Aufgaben von TDG übernimmt. Überexpressionsstudien von TDG in GV Oozyten zeigen einen negativen Einfluss auf die Reifung der Eizellen (Ma et al. 2014).

Um den Effekt der Überexpression von TDGwt und TDGmut auf die präimplantive Entwicklung zu analysieren, wurde die jeweilige mRNA in frühe Zygoten (2-3hpf) injiziert, inkubiert und die Anzahl der korrekt entwickelten Embryonen in den entsprechen Stadien gezählt. Dann wurden die korrekt entwickelten Embryonen in Relation zu den befruchteten Eizellen gesetzt und die Ergebnisse prozentual dargestellt (Tabelle 3.4). Embryonen, die TET1CD überexprimieren, wurden nochmals analysiert, da die Modifikationskomposition bekannt war (Kapitel 3.1.1, Abbildung 3.3) und die Überexpression von TDGwt bezüglich der Dynamik von 5fC/5caC einen gegenteiligen Effekt erwarten ließ. Auch in diesem Experiment konnte ein Zusammenhang zwischen der injizierten mRNA- Menge und dem Entwicklungspotenzial beobachtet werden. Im Vergleich mit den vorherigen Experimenten

(Tabelle 3.1) wird dieses für TET1CD sehr deutlich (Tabelle 3.4). (Die Abhängigkeit des Potenzial von der mRNA Menge gilt auch für die Überexpression von TDGwt, TDGwt+TET1CD und TDGmut+TET1CD). Die Zygoten der Kontrolle (mit GFP kodierender mRNA injiziert) durchlaufen die erste Teilung zu 97,6% und auch die Zygoten, die TDGmut überexprimieren, haben ein uneingeschränktes Teilungspotenzial. Anders ist es jedoch bei Zygoten, die TDGwt überexprimieren; nur die Hälfte aller Zygoten durchlaufen die erste Zellteilung. Aufgrund dieses drastischen Effekts wurde der Start der Replikation mittels EdU/EdC Einbau detektiert (vergleiche Kapitel 3.1.1). EdU/EdC wurde 2 Stunden vor der Fixierung ins Medium gegeben und die Zygoten nach dem Start der Replikation (8hpf) fixiert. Alle analysierten Zygoten der Kontrolle und der Überexpression von TDGwt und TDGmut zeigen ein EdU/EdC- Signal und haben demnach zu diesem Zeitpunkt mit der Replikation begonnen (**Abbildung 8.18**). Um den Effekt von TDGwt auf die Entwicklung wieder aufzuheben, wurde TDGwt in Kombination mit TET1CD überrepräsentiert. Somit sollte der erwartete Verlust von 5fC/5caC durch die TET- vermittelte Oxidation ausgeglichen werden. Als Kontrolle wurde auch TDGmut in Kombination mit TET1CD überrepräsentiert. Für die erste Zellteilung sind leider keine Daten vorhanden.

Betrachtet man die Entwicklung der überexprimierenden Embryonen bis hin zum Blastozystenstadium, werden Entwicklungseinschränkungen deutlich. Zum Zeitpunkt 48hpf lag ein großer Teil der Embryonen, die zygotisch TDGwt überexprimieren, nicht im erwarteten 4- oder 8- Zellstadium vor, sondern im 2-Zellstadium (Tabelle 8.16). Der erwartete Rettungseffekt durch TET1CD blieb aus. Gleiches gilt für die Überexpression der Kombination TDGmut+TET1CD. Zum Zeitpunkt 48hpf sind zudem Auffälligkeiten in der Synchronität der Teilung der Blastomere zu beobachten, wobei die Überexpression von TDGwt, TDGw+TET1CD und TDGmut+TET1CD die größten Effekte zeigt. Zu diesem Zeitpunkt sind auffällig viele Embryonen mit ungerader Blastomer- Anzahl vorhanden was asynchrone Teilungen vermuten lässt (Tabelle 8.16).

Das Entwicklungspotenzial bis hin zur Blastozyste liegt in der Kontrollgruppe bei 92% (Tabelle 3.4). Nur 30% der Zygoten, die TDGwt überexprimieren, entwickeln sich zu Blastozysten und auch Embryonen, die zygotisch TDGmut überexprimieren, sind auf dem Weg bis zu diesem Stadium in ihrer Entwicklung eingeschränkt (51,7%) (Tabelle 3.4). Ähnlich wie im vorherigen TET- Überexpressionsexperiment ist die Blastozystenformation durch TET1CD stark eingeschränkt und nur 13,9% erreichen dieses Stadium (Tabelle 3.4, siehe auch Tabelle 3.1). Nach der Überexpression der Kombinationen von TET1CD und TDGwt oder TDGmut erreichen die Embryonen das Blastozystenstadium nicht. Diese Embryonen entwickelten sich, wenn überhaupt, nur bis zum 4- Zellstadium (Tabelle 8.16). Dies zeigt, dass TET1CD den Effekt von TDGwt nicht kompensieren kann, sondern ihn sogar verstärkt.

Das GFP- Signal der überrepräsentierten Fusionsproteine ist im 4-/8- Zellstadium nicht mehr detektierbar (Abbildung 8.28). Es scheint so, dass Effekte und Veränderungen, die in frühen Stadien stattfinden, auch Auswirkungen auf die Blastozystenformation haben.

Tabelle 3.4 Entwicklungspotenzial von TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimierten Embryonen. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert und ihre Entwicklung in verschiedenen Stadien erfasst. Dazu wurde die Anzahl der Embryonen, die sich wie die Kontrolle in den korrekten Stadien befanden, gezählt und in die prozentuale Relation zur Anzahl der befruchteten Oozyten gesetzt (Anzahl der analysierten Embryonen in Tabelle 8.12). Den größten Effekt auf die erste Zellteilung zeigt die Überexpression von TET1CD und TDGwt, während TDGmut keinen Einfluss hat. Erst in späteren Stadien zeit TDGmut eine Einschränkung. Die Entwicklung bis zur Blastozyste ist durch TDGwt deutlich gestört. TET1CD führt dazu, dass fast keine Blastozysten entstehen können. Die Überexpression der Kombination TET1CD +TDGwt oder +TDGmut schränkt die Blastozystenformation gänzlich ein.

	28hpf	E3.5/ E4.0
ÜE	% 2- Zellembryonen	% Blastozysten
GFP	97,6	91,7
TDGwt	54,3	30,1
TDGmut	96,7	51,7
TET1CD	57	13,9
TDGwt+TET1CD	NA	0
TDGmut+TET1CD	NA	0

3.2.2 Immunfluoreszenz- Analysen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote

Die Einschränkungen der Zygoten in ihrem Entwicklungspotential nach der Überexpression von TDGwt ist im ersten Zellzyklus sehr deutlich (Tabelle 3.4). Und auch die Überexpression von TDGmut führt zu Entwicklungseinschränkungen ab 48hpf (Tabelle 8.16). Um den Einfluss der Überexpression auf die Dynamiken von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC auf globaler Ebene zu betrachten, wurden Antikörperfärbungen dieser modifizierten Basen in überexprimierenden Zygoten (12hpf) durchgeführt (Kapitel 2.2.18). Die Analyse und Auswertung wurde wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die mittleren Grauwerte (Mittelwert, Standardabweichung, Signifikanzen) sind in Tabelle 8.27 und Tabelle 8.28 aufgeführt. Da es aus technischen Gründen nicht möglich war, die ermittelten Antikörpersignalintensitäten gegen ein DNA- Signal zu normalisieren, sind alle angegebenen Werte als Tendenzen anzusehen. Repräsentative Aufnahmen der Zygoten sind im Anhang zu finden (Abbildung 8.15, Abbildung 8.17, Abbildung 8.16).

In Abbildung 3.18 sind die relativen prozentualen Werte der Signalintensitäten der Immunfluoreszenz- Analysen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC von Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren, im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Immunfluoreszenz- Analysen von Zygoten, die TDGwt überexprimieren, zeigen, dass das 5mC- Signal sowohl im maternalen als auch im paternalen Vorkern abnimmt, wobei der Verlust im paternalen stärker ist (maternal -4,1%; paternal -25,9%). Das gleiche Bild ergibt sich bei der Überexpression von TDGmut (maternal -8,9%; paternal -28,5%). Diese Abnahme war nicht zu erwarten, da TDG keine Spezifität für 5mC besitzt. Die 5hmC- Signale steigen hingegen nach der Überexpression von TDGwt und TDGmut im mütterlichen Pronukleus etwas (wt+22,9%, mut+19,4%), wobei der väterliche nicht beeinflusst ist (wt+1,2%, mut-1,4%). Die Überexpression von TDGwt und TDGmut hat unterschiedliche Effekte auf die Signalintensitäten von 5fC und 5caC. Die Überexpression von TDGwt führt in beiden Vorkernen zu einem Verlust des 5fC- Signals, der im

väterlichen Vorkern stärker ausfällt als im mütterlichen (maternal -15,9%; paternal -81,1%). Das 5caC-Signal sinkt auch durch die Überexpression von TDGwt und auch hier ist der Effekt auf das väterliche Genom sehr viel stärker (maternal-2%, paternal-81,6%). Der Verlust von 5fC-/5caC- Signal war zu erwarten, da TDGwt spezifisch für 5fC und 5caC ist. Der größere Effekt auf den väterlichen Vorkern ist auf das geringe Grundlevel an 5fC/5caC im maternalen Vorkern zurückzuführen, welches durch die Überexpression nur noch geringfügig reduziert werden kann. Nach der Überexpression von TDGmut zeigt sich interessanterweise eine starke Akkumulation des 5fC- Signals in beiden Pronuklei (maternal +88,2%; paternal +68,8%), wohingegen das 5caC-Signal abnimmt (maternal-17,6%, paternal-65,3%). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von TDGmut in der Zygote nicht als (Negativ-) Kontrolle fungiert. So wurde TDGmut im Folgenden als Werkzeug der Manipulation der epigenetischen Modifikationen eingesetzt.

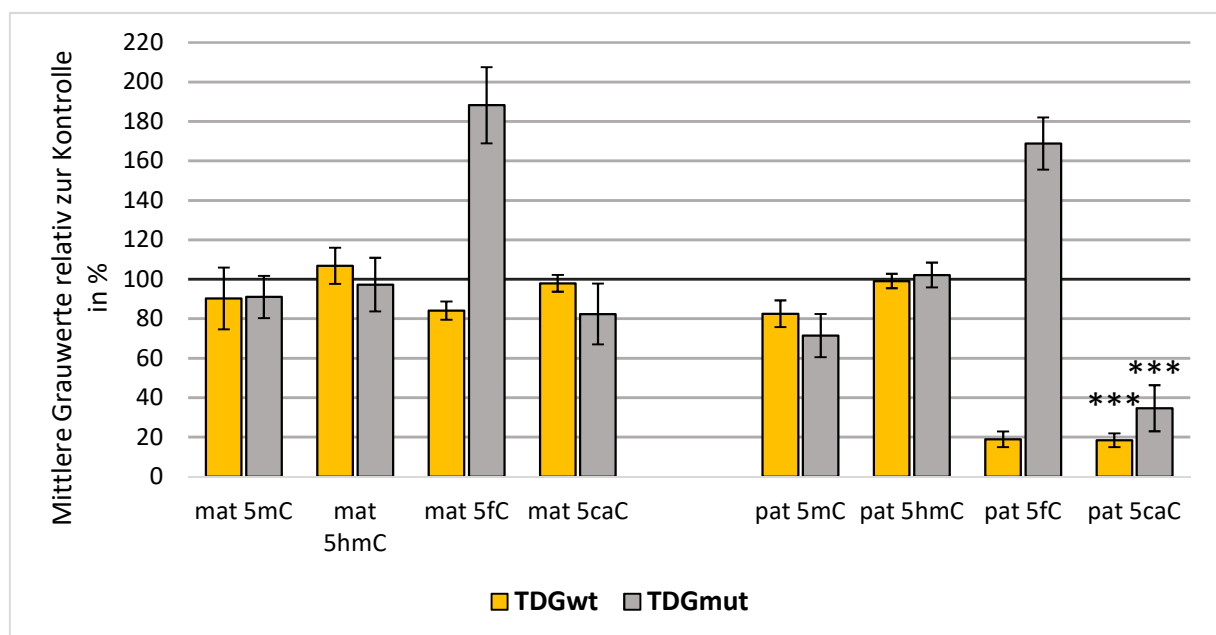


Abbildung 3.18 Der Einfluss der Überexpression von TDGwt und TDGmut auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote. Dargestellt sind die mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, welche TDGwt und TDGmut überexprimieren. Die mittlerer Grauwerte der Kontroll- Zygoten wurden auf 100% gesetzt (schwarze Linie) und die Werte von TDGwt und TDGmut dazu in das prozentuale Verhältnis. In frühe Zygoten (IVF) wurde mRNA mikroinjiziert, die Zygoten 12hpf fixiert und mittels Antikörper angefärbt. Der tendenzielle Einfluss auf die epigenetischen Modifikationen sind jeweils in beiden Vorkernen gleich, sind paternal aber stärker ausgeprägt. Die Überexpression von TDGwt führt zu einem Signalverlust von 5fC und 5caC. TDGmut erzielt einen Anstieg des 5fC-Signals und einen Verlust des 5caC- Signals. In beiden Gruppen kommt es zu einem Signalverlust von 5mC, während 5hmC weitestgehend unverändert bleibt. Die Anzahl der analysierten Embryonen sind in Tabelle 8.17 aufgelistet. p-Wert (T-test) ***<0,001

3.2.3 Basenexzisionsreparatur in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren

Neben dem Thymin bei einer T:G Fehlpaarung schneidet TDG spezifisch 5fC und 5caC aus der DNA. Immunfluoreszenz-Analysen von 5fC und 5caC in TDGwt überexprimierenden Zygoten zeigen die Reduktion dieser Basen. Erstaunlicherweise führt auch die Überexpression der inaktiven Mutante von TDG zu sehr deutlichen Effekten, nämlich zu einem Anstieg des 5fC- Signals mit gleichzeitigem Verlust des 5caC- Signals (Abbildung 3.18). Zur Überprüfung der Reparaturaktivität von TDGwt und der Inaktivität von TDGmut wurden Antikörperfärbungen des Strangbruchmarkers γ H2A.X durchgeführt. In Abbildung 3.19 sind repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz- Färbungen von postreplikativen TDGwt und TDGmut überexprimierten Zygoten zu sehen. In der Kontrollgruppe sind im mütterlichen und im väterlichen Pronukleus nur wenige γ H2A.X- Foci zu erkennen. Diese stammen noch von der Replikation. Betrachtet man hingegen die Zygoten, die TDGwt überexprimieren, ist eine starke Akkumulation von γ H2A.X- Foci im paternalen Genom zu erkennen. Diese Foci sind durch die TDGwt-vermittelte Reparatur entstanden. Die Beschränkung der Akkumulation der Foci auf das paternale Genom ist durch das vornehmliche Vorhandensein von 5fC und 5caC im paternalen Genom zu erklären, wodurch diese Basen auch nur dort repariert werden können. Die Überexpression von TDGmut zeigt wie die Kontrolle nur wenige replikationsbasierte γ H2A.X- Foci, was aufgrund der inaktiven katalytischen Domäne zu erwarten war. Das gleiche Bild zeigt sich auch schon präreplikativ (Abbildung 8.22).

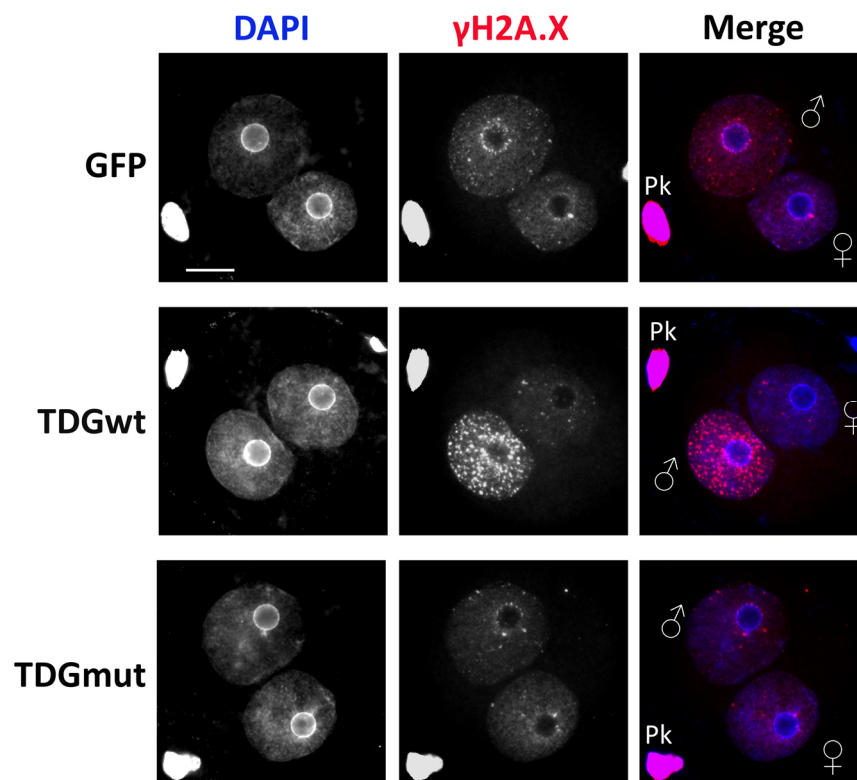


Abbildung 3.19 γ H2A.X Zygoten, die TDG überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von postreplikativen Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren, und mittels Antikörper gegen γ H2A.X angefärbt wurden. In Zygoten (IVF) wurde, im frühen Zygotenstadium (3hpf) mRNA mikroinjiziert, zum Zeitpunkt 12hpf fixiert und die Strangbrüche mittels Antikörperfärbungen gegen γ H2A.X (Millipore) sichtbar gemacht. Die Zygoten der Kontrolle und der Überexpression von TDGmut zeigen jeweils nur wenige γ H2A.X- Foci, wohingegen die Überexpression von TDGwt zu einer Akkumulation von γ H2A.X im väterlichen Vorkern führt. $n > 10$ pro Gruppe, Maßstabsbalken = 20 μ M.

3.2.4 Effekte der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf Histonmodifikationen und PGC7/Stella

Neben dem Effekt auf 5fC/5caC führen Veränderungen der TDG Level zu Effekten auf verschiedene Histonmodifikationen. Analysen haben gezeigt, dass die Überexpression von TDGwt in GV Oozyten zu einer Reduktion von H3K9me2/3 führt (Ma et al. 2014). Der KO von *Tdg* führt in MEFs (engl. mouse embryonic fibroblast) hingegen zu einem Anstieg von H3K9me3 und H3K27me3 mit einem gleichzeitigen Verlust von H3K4me2 (Cortázar et al. 2011). So sollte in dieser Arbeit der Effekt der Überexpression von TDGwt und TDGmut auf verschiedene Histonmodifikationen untersucht werden. Zudem wurden auch Zygoten analysiert, die TET1CD überexprimieren.

In Tabelle 3.5 sind die Differenzen der prozentualen Werte der Antikörperfärbungen verschiedener Histonmodifikationen in Zygoten, welche TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren, zur Kontrolle dargestellt. Diese Daten sind nur als Tendenzen zu sehen, da sie auf jeweils einem Experiment (n=3-6 Zygoten) beruhen. Es lässt sich sagen, dass weder die Überexpression von TDGwt und TDGmut noch die von TET1CD einen deutlichen Einfluss auf die Histonmodifikationen haben. Leichte Schwankungen, wie zum Beispiel für H3K9me3 in TDGwt überexprimierenden Zygoten oder H3K9me2 und H3K27me3 im paternalen Vorkern der TDGmut überexprimierenden Zygoten basieren wahrscheinlich auf der geringen Anzahl an analysierten Zygoten. Um eine noch eindeutigere Aussage über die Effekte der Überexpression auf die Histonmodifikationen machen zu können, müssten weitere Zygoten analysiert werden. Neben den Histonmodifikationen wurden auch die Level von PGC7/Stella nach der Überexpression analysiert. PGC7/Stella ist in der Zygote neben H3K9me2 mitverantwortlich für den Schutz des maternalen Genoms vor Oxidation und Demethylierung (Kang et al. 2012; Nakamura et al. 2006). Wie in Tabelle 3.5 zu sehen ist, gibt es keine Unterschiede zwischen TDGmut und TET1CD im Vergleich zur Kontrolle. Für TDGwt liegen aus technischen Gründen keine Daten vor. Diese Daten passen zu den nicht bzw. kaum beeinflussten Leveln an H3K9me2.

Tabelle 3.5 Analyse von Histonmodifikationen in Zygoten nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf mRNA mikroinjiziert, diese wurden 12hpf fixiert und mittels der entsprechenden Antikörper angefärbt. Die quantifizierten Signalintensitäten wurden gegen das DAPI- Signal normalisiert. Dargestellt ist die Differenz der relativen prozentualen Werte zur Kontrolle (Kontrolle=100%). Die Anzahl der analysierten Zygoten ist in Tabelle 8.19 aufgeführt. mat= maternal, pat= paternal, na=nicht analysiert. Keines der überrepräsentierten Enzyme hat einen deutlichen Einfluss auf die Histonmodifikationen. Abweichungen basieren auf der geringen Anzahl der analysierten Zygoten.

	H3K9me2		H3K9me3		H3K27me3		H3K4me2		PGC7/Stella	
	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat	mat	pat
TDGwt	+0,2	+2,2	+10,7	+10,5	+2,9	+4,5	na	na	na	na
TDGmut	+1,0	-8,2	-2,0	+0,7	-7,3	-12,4	-4,2	-3,0	+0,5	+0,2
TET1CD	+0,1	+0,1	1,4	-0,6	2,0	+0,8	-2,3	-3,0	+4,0	+4,4

3.2.5 Der Einfluss der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC, und 5caC während der Präimplantationsphase – vom 2-Zellembryo bis zur Blastozyste

Da sich die Effekte der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD in der Zygote auf die Entwicklung bis ins Blastozystenstadium auswirken, sollte überprüft werden, ob sich auch die in der Zygote detektierten epigenetischen Veränderungen in späteren Stadien wiederfinden. Dazu wurde in Zygoten mRNA mikroinjiziert und diese Embryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mittels Antikörper gegen 5mC, 5hmC, 5fC oder 5caC gefärbt. Die GFP- Signale der Fusionsproteine von TDGwt und TDGmut sind im 4- Zellstadium drastisch reduziert und spätestens im 8- Zellstadium komplett verschwunden (Abbildung 8.28). Alle beobachteten epigenetischen Effekte in Stadien ab 48hpf rühren also aus früheren Stadien her. Neben der Überexpression von TDGwt und TDGmut wurden auch Embryonen analysiert, die zusätzlich in Kombination TET1CD überexprimierten. Dieses Experiment war ursprünglich als so genanntes Rettungsexperiment geplant, um den Verlust von 5fC bzw. 5caC durch die Überexpression von TDGwt und TDGmut zu kompensieren (siehe auch Kapitel 3.2.1). Wie sich allerdings herausstellte führte die kombinierte Überexpression nicht zu einer Rettung, sondern zu einer Verstärkung der Entwicklungseinschränkung.

3.2.5.1 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC im 2-Zellembryo nach der zygotischen Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD

Zunächst wurde der Effekt der Überexpression von TDGwt und TDGmut in 2- Zellembryonen analysiert. (Durchführung Kapitel 3.1.2) Da auch hier die Normalisierung gegen ein DNA- Signal nicht möglich war, sind die Werte als Tendenzen zu sehen. Wie man in Abbildung 3.20 erkennen kann, sind die Veränderungen der Signalintensitäten nach der Überexpression beider TDG Varianten in ihrer Tendenz und ihrer Intensität im 2- Zellembryo jeweils sehr ähnlich zu denen in der Zygote, ausgenommen die 5hmC- Signale (Abbildung 3.18). Die Überexpression von TDGwt und TDGmut führt zu einem deutlichen Verlust des 5mC- Signals und einem milden Verlust des 5hmC- Signals. Wie erwartet, sinken die Signalintensitäten von 5fC und 5caC in 2-Zellembryonen, die TDGwt überexprimieren, wie in der Zygote, stark. Für die Überexpression von TDGmut ergibt sich in 2- Zellembryonen auch das gleiche Bild wie in der Zygote, nämlich ein deutlicher Anstieg der 5fC- Signale und ein Abfall der 5caC- Signale gegenüber der Kontrolle. Diese Daten zeigen, dass die Dynamiken der epigenetischen Effekte der Überexpression in der Zygote und dem 2-Zellembryo gleich sind, ausgenommen 5hmC.

Zudem wurden auch die Effekte der Überexpression von TDGwt und TDGmut in Kombination mit TET1CD auf epigenetischer Ebene analysiert. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz- Analysen sind Abbildung 3.20 dargestellt. Der Effekt der Überexpression von TET1CD ist hier der gleiche, der auch schon in vorherigen Experimenten beobachtet wurde, nämlich ein starker Anstieg der Signalintensitäten von 5hmC, 5fC und 5caC mit einem gleichzeitigen Verlust des 5mC- Signals (Kapitel 3.1.5.1, Abbildung 3.6). Die Überexpression von TDGwt+ TET1CD führt zu einem starken Verlust des Signals von 5mC, ähnlich dem von TET1CD allein. Zudem führt sie zu einem milden Anstieg des 5hmC-

Signals und einem deutlichen Verlust des 5fC- Signals. Für 5caC sind keine Daten vorhanden. Der Effekt durch TET1CD+TDGwt ist ähnlich dem der Überexpression von TDGwt, der Verlust des 5mC- Signals ist in Kombination mit TET1CD jedoch sehr viel stärker. Für die Überexpression der Kombination TDGmut und TET1CD ist auch ein deutlicher Verlust des 5mC- Signals zu erkennen, der jedoch etwas niedriger ausfällt, als der für TDGwt+TET1CD, wobei die Standardabweichung für TDGmut+TET1CD recht hoch ist. Die Signale von 5hmC und 5fC steigen deutlich, wohingegen das von 5caC nicht beeinflusst wird. Durch die Überexpression von TDGwt oder TDGmut in Kombination mit TET1CD erfolgt also auch auf der Ebene der epigenetischen Modifikation keine Rettung. Es entstehen vielmehr zwei weitere Varianten der Zusammensetzung der verschiedenen modifizierten Basen.

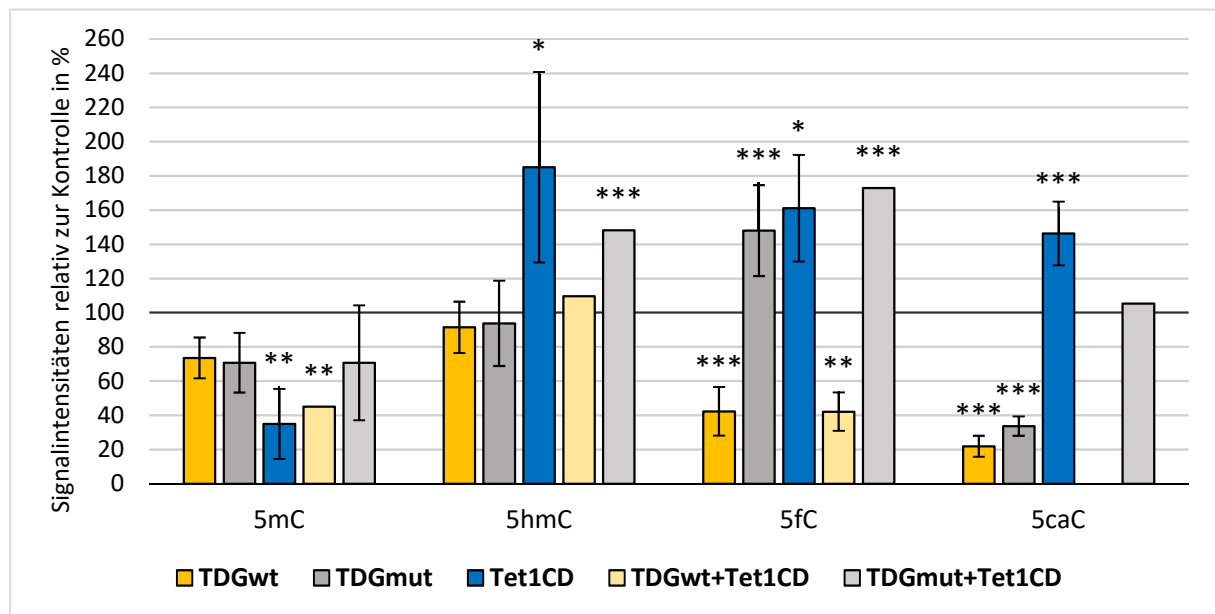


Abbildung 3.20 Der Effekt der Überexpression von TDGwt, TDGmut, TET1CD, TDGwt+TET1CD und TDGmut+TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC im 2- Zellembryo. Dargestellt sind die quantifizierten mittleren Grauwerte der Antikörperfärbungen der Kerne von überexprimierenden 2- Zellembryonen, prozentual in Relation zur Kontrolle (=100%, schwarze Linie). In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die jeweilige mRNA injiziert, und die Embryonen zum Zeitpunkt 28hpf fixiert. Diese wurden mittels Antikörper gegen 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC angefärbt. Alle Gruppen zeigen eine unterschiedliche Zusammensetzung der analysierten epigenetisch modifizierten Basen. 2-Zellembryonen, die zygotisch TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren, zeigen jeweils das gleiche Bild wie der paternale Vorkern der Zygote nach der Überexpression. In allen Gruppen kommt es zu einem Verlust des 5mC- Signals. Durch TDGwt werden die Signale von 5fC und 5caC reduziert. Durch TDGmut steigt das 5fC- Signal, das 5caC- Signal wird jedoch reduziert. Die Signale aller oxidierten 5mC- Derivate steigen in allen TET1CD überexprimierenden Gruppen an, außer in TDGwt+TET1CD, wo es zu einem Verlust des 5fC- Signals kommt. 5caC wurde nicht analysiert. Die Anzahl der analysierten Embryonen sind in Tabelle 8.18 aufgelistet. p-Wert (T-test) *<0.05, **<0,01, ***<0,001

3.2.5.2 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC der Blastozyste nach TDG Überexpression

Um zu analysieren, ob die Effekte der Überexpression auch über das 2- Zellstadium hinaus bestehen bleiben, wurden Embryonen zum Zeitpunkt 52hpf und E3.5/E4.0 fixiert und mittels Antikörper angefärbt. Aufnahmen der Embryonen 52hpf befinden sich im Anhang (Abbildung 8.29, Abbildung 8.30). Die Aufnahmen zur Analyse von Embryonen zum Zeitpunkt E4.0 sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Da die überexprimierenden Embryonen in ihrem Entwicklungspotenzial eingeschränkt sind

(Tabelle 3.4), haben sie nicht immer Blastozysten im klassischen Sinne entwickelt (mit der morphologischen Struktur Trophoblasten und ICM, Abbildung 8.1). Nach der Überexpression von TET1CD+TDGwt und TET1CD+TDGmut war keine Blastozystenbildung möglich (Tabelle 3.4).

Morphologisch sind die Embryonen, die eines der Enzyme überexprimierten, unterschiedlich zu der Blastozyste der Kontrolle. Während diese viele Zellen besitzt, groß ist und sich kurz vor dem so genannten hatching (Schlüpfem kurz vor der Einnistung *in vivo*) befindet, ist die Anzahl der Zellen in den zygotisch überexprimierenden Blastozysten reduziert. Die Blastozyste, die zygotisch TDGwt überexprimierte, ist mit einer angedeuteten ICM und in ihrer Größe der Kontrollblastozyste am ähnlichsten. Die Blastozyste, die zygotisch TDGmut überexprimierte, ist kleiner und kompakt. Auch hier ist eine angedeutete ICM zu erkennen. Dahingegen bildet der Embryo, der zygotisch TET1CD überexprimierte, nicht andeutungsweise eine blastozystenähnliche Struktur aus. Der Embryo besitzt auffallend wenige Zellen und bilden keine ICM.

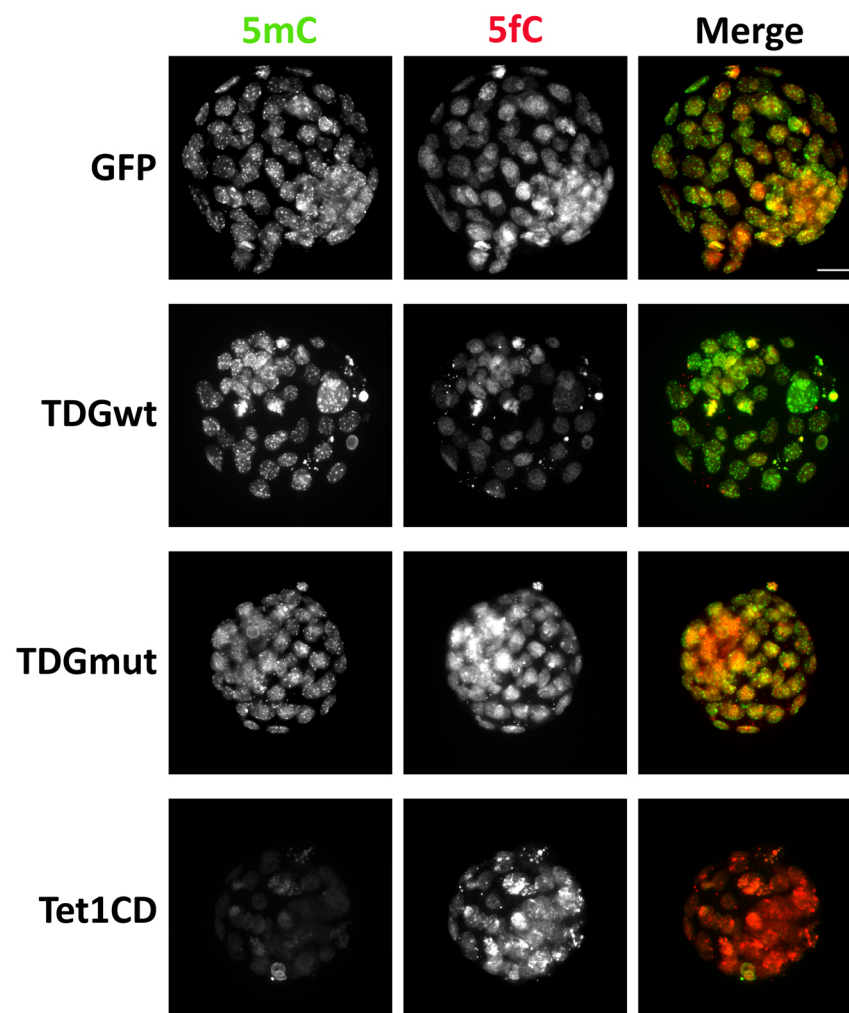


Abbildung 3.21 5fC in der Blastozyste nach der zygotischen Überexpression von TDGwt, TDGmut oder TET1CD. Dargestellt sind exemplarisch Aufnahmen von Blastozysten, die sich aus überexprimierenden Zygoten (IVF) entwickelt haben. Dazu wurde in die Zygoten 3hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert, diese zum Zeitpunkt E4.0 fixiert und mittels Antikörper gegen 5mC und 5fC angefärbt. Die Blastozysten zeigen die in der Zygote etablierten Modifikationslevel. Durch TDGwt kommt es zu einem Verlust des 5fC- Signals. TDGmut und TET1CD zeigen hingegen einen Signalanstieg von 5fC. Auch zeigen die Blastozysten Entwicklungseinschränkungen, die an ihrer Größe, der Anzahl der Zellen und dem Fehlen einer ICM deutlich werden. N>6; Maßstabsbalken= 20µM

In den Zellen der Kontrollembryonen ist ein Grundsignal von 5fC mit einer Akkumulation in der ICM zu erkennen. Das Muster in den einzelnen Zellen ist für 5fC flächig, ohne Akkumulationen (Hotspots). Das 5mC- Signal ist hingegen zwischen ICM und Trophektoderm gleich. Es sind allerdings punktuelle Akkumulationen in den Zellen erkennbar. In Embryonen, die zygotisch TDGwt überexprimierten, sind für das 5mC- Signal keine offensichtlichen Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen. Das 5fC- Signal ist reduziert. Die Effekte fallen insgesamt mild aus, wobei zudem eine Blastozystenähnliche Struktur erkennbar ist. Dies kann zwei Gründe haben. Entweder die injizierte Menge der mRNA war sehr gering, sodass auch der Effekt auf die epigenetischen Modifikationen klein war und sich dadurch überhaupt nur Blastozysten bilden konnten. Oder es kam zu einer Selektion, wobei sich nur die Embryonen zu Blastozysten entwickelten, in welchen der Effekt nicht so stark ausgeprägt war. In den Embryonen, welche zygotisch TDGmut überexprimierten, scheint das 5mC- Signal etwas höher als in der Kontrolle. Dies könnte jedoch aufgrund der Kompaktheit des Embryos nur so wirken. Das 5fC- Signal ist in den Embryonen, die TDGmut überexprimierten, gegenüber der Kontrolle stark erhöht. Das 5fC- Signal der einzelnen Zellen ist auch hier flächig. Die Embryonen, die zygotisch TET1CD überexprimierten, sind morphologisch sehr auffällig. Das Signal von 5mC ist sehr niedrig und die charakteristischen Hotspots fehlen hier komplett. Das 5fC Level hingegen ist stark erhöht. Es ist jedoch anders als bei TDGmut Embryonen nicht nur flächig erhöht, sondern akkumuliert in definierten Bereichen.

Für die Analyse von 5caC stehen nur Embryonen zur Verfügung, die zygotisch TDGwt überexprimierten (Abbildung 8.27). In der Kontrolle ist auffällig, dass eine sehr starke Anhäufung von 5caC- Signalen in definierten Bereichen in den einzelnen Zellen vorkommt. Diese Häufung ist nach der zygotischen Überexpression von TDGwt nicht mehr zu sehen.

Durch die Analyse des 8-Zellstadiums und des letzten präimplantiven Stadiums, der Blastozyste, wird deutlich, dass das in der Zygote etablierte Level der epigenetischen Modifikationen während der gesamten präimplantiven Entwicklung erhalten bleiben.

3.2.6 Analyse der globalen Expression im 2-Zellembryo, welcher TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimiert

Die Zygoten, welche TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren, sind in ihrer Entwicklung eingeschränkt. Dabei haben TDGwt und TET1CD schon einen sehr frühen Einfluss und vermindern die Fähigkeit der Zygoten, das 2-Zellstadium zu erreichen, wobei das Erreichen des Blastozystenstadiums noch stärker eingeschränkt ist (Tabelle 3.4). Während sich TDGmut überexprimierende Zygoten uneingeschränkt zum 2-Zellembryo entwickeln, haben sie auch ein stark vermindertes Potenzial, das Blastozystenstadium zu erreichen. In allen überexprimierenden Embryonen konnten durch Immunfluoreszenz- Analysen, im Vergleich zur Kontrolle, stark veränderte Level der DNA-Modifikationen festgestellt werden (Abbildung 3.18, Abbildung 3.20). Neben ihrer Aufgabe in der aktiven Demethylierung spielen 5hmC, 5fC und 5caC eine Rolle in der Regulation der Transkription (Kapitel 1.5.2). Die durch die Überexpression entstandene Veränderung der jeweiligen DNA-

Modifikationslevel in der Zygote und dem 2-Zellembryo könnte also auch zu qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Expression führen. Dies könnte sich wiederum auf die Entwicklung der Embryonen auswirken. Daher wurde der mögliche Effekt der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf die globale Expression von RNA untersucht. Hierzu wurde Ethynyl Uridin (EU) verwendet, welches ein modifiziertes Uracil ist und in neu synthetisierte RNA eingebaut wird. Nach einer Click-it Reaktion kann das EU- Signal im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden (Kapitel 2.2.19). Als Negativkontrolle wurden Embryonen analysiert, die mit dem RNA- PolymeraseII Inhibitor α -Amanitin behandelt wurden (ab 5hpf) (Abbildung 8.31). Dieser Inhibitor hat keine Auswirkungen auf die Entwicklung bis zum 2-Zellembryo (Schultz 2002; Braude et al. 1979). In Abbildung 3.22 sind die prozentual errechneten Immunfluoreszenz- Intensitäten von EU relativ zur Kontrolle (Kontrolle= 100%) im 2-Zellembryo dargestellt. Es ist zu sehen, dass die EU- Intensitäten und damit die globale Expression der überexprimierenden Embryonen gegenüber der Kontrolle unterschiedlich stark, aber deutlich erhöht ist. Der Anstieg der Expression in 2- Zellembryonen, die zygotisch TDGwt und TDGmut überexprimieren, ist fast gleich stark (wt+20%, mut+22%), während die Gesamtexpression von TET1CD überexprimierenden 2- Zellembryonen noch etwas stärker ist (+43%).

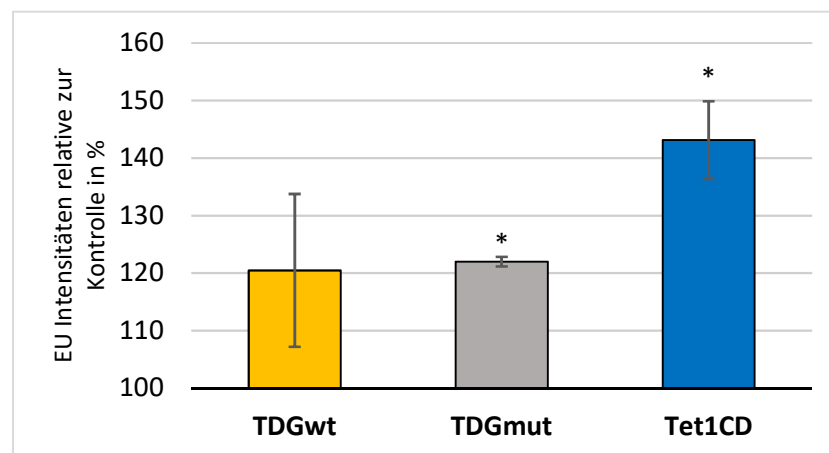


Abbildung 3.22 Expressionsanalyse von neu synthetisierter Gesamt- RNA in 2- Zellembryonen, die zygotische TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert. Nach dem Entfernen der Zona pellucida wurden die 2- Zellembryonen wurden 1,5h vor dem Fixieren mit EU (2,5mM) inkubiert, welches in die neu synthetisierte RNA eingebaut wird. EU wurde über eine click-it Reaktion sichtbar gemacht und das Signal quantifiziert. Die Signalintensitäten nach der Überexpressionen wurden relativ zu den Signalintensitäten der Kontrolle prozentual errechnet (Kontrolle=100%, schwarze Basislinie) und dargestellt. Zu erkennen ist eine erhöhte Gesamtexpression aller überexprimierenden Gruppen. Dabei führt Überexpression von TDGwt und TDGmut zur gleichen Erhöhung der Signalintensitäten, während TET1CD einen noch stärkeren Anstieg verursacht. GFP n=16, TDGwt n=18, TDGmut n=28, TET1CD n=22; p-Wert (T-test) *<0.05

3.2.7 Sequenzierungsanalyse von 5fC und 5caC von mSat, L1 und IAPs in Zygoten, die TDGwt überexprimieren

Wie die Immunfluoreszenz- Analysen zeigen, führt die Überexpression von TDGwt zu einem leichten Verlust des 5mC- Signals und auch zur Reduktion des 5fC- und 5caC- Signals in der Zygote (Kapitel 3.2.2). Neben den Immunfluoreszenz- Analysen sollten die Effekte der Überexpression von TDGwt auf 5mC- und 5fC/5caC basengenau detektiert werden. Bei einer herkömmlichen Bisulfitreaktion können 5fC und 5caC nicht von Cytosin unterschieden werden, da alle drei Basen nach der Bisulfitbehandlung als Uracil/Thymin dargestellt werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit für die Analyse von 5fC und 5caC die Methode der MAB- Sequenzierung (methylase- assisted bisulfite sequencing) angewendet (Wu et al. 2014). Bei dieser Methode wird die zu analysierende DNA vor der Bisulfitreaktion mit einer CpG Methyltransferase (*M.SssI*) behandelt. Dadurch werden alle nicht modifizierten Cytosine im CpG Kontext methyliert. Demzufolge liegen alle Cytosine, bis auf 5fC und 5caC, entweder methyliert oder hydroxymethyliert vor. Nach der Bisulfitbehandlung sind dann ausschließlich 5fC und 5caC Positionen zu Uracil konvertiert (Abbildung 3.23). Die Differenz aus 100% Methylierung und der ermittelten prozentualen Werte der MAB- Sequenzierung gibt die Menge von 5fC/5caC an. Zur Kontrolle der Effektivität der Methylierungsreaktion durch *M.SssI* wurde zu Beginn der Behandlung Lambda- DNA in die Ansätze geschleust und dann deren Methylierungslevel durch Amplikonsequenzierung analysiert.

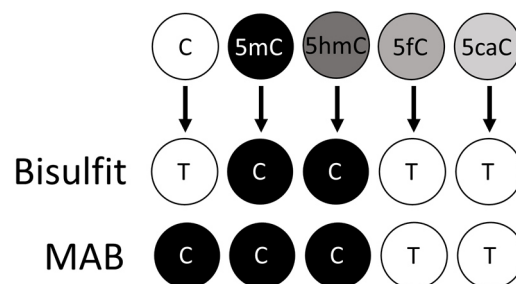


Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Detektion der verschiedenen Modifikationen nach der Behandlung mittels Bisulfit- Sequenzierung oder MAB- Sequenzierung

In dieser Arbeit wurde die MAB- Sequenzierung kombiniert mit der HPBS- Methode angewendet (MA-HPBS). Dazu wurden überexprimierende postreplikative Zygoten (ICSI) nach dem Sammeln (Kapitel 0) und der Lyse auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eine Probe wurde mit *M.SssI* behandelt, die andere nicht, woraufhin parallel mit beiden Ansätzen die HPBS- Methode durchgeführt wurde. Analysiert wurden auch hier die repetitiven Elemente mSat, L1 und IAP. Es wurden zwei Experimente mit verschiedenen Bisulfitbehandlungen vorgenommen, welche unterschiedliche Konvertierungsraten für 5fC besitzen (Beobachtung Dr. Sascha Tierling). Die Bisulfit- Behandlung des einen Experiment wurde mit Hilfe des EZ DNA Methylation Gold™ Kit durchgeführt, welches eine Konvertierungsrate von 5fC zu 60% hat (getestet von Dr. Sascha Tierling, Tabelle 3.6) (Abbildung 3.24). Das andere Experiment wurde mit einem laborinternen Bisulfitprotokoll durchgeführt, welches eine Konvertierung für 5fC von 95% zeigt (Abbildung 8.26).

Tabelle 3.6 Die nach der Bisulfitbehandlung noch in der DNA vorhandenen Modifikationen in %. Diese Tests wurden von Dr. Sascha Tierling mittels Amplikon- Sequenzierung durchgeführt, wobei die Amplikons ein modifiziertes Cytosin an einer definierten Position besaßen.

Name	Nach der Konvertierung					Anwendung
	C	5mC	5hmC	5fC	5caC	
Modifikationen						
EZ DNA Methylation Gold™	1%	98%	98%	38%	1%	BS- Amplikons TET&TDG, MAB- Amplikons TDG
EZ DNA Methylation Lightning™	23%	98%	98%	67%	8%	Genomweites BS TDGwt
Laboreigenes Protokoll	1%	94%	95%	6%	0%	BS-&MAB- Amplikons TDG, MAB- RRBS

In Abbildung 3.24 sind die Ergebnisse für HPBS- (BIS) und MA-HPBS- Sequenzierung (MAB) von postreplikativen Kontrollzygoten und Zygoten, die TDGwt überexprimieren, dargestellt. Hierzu wurde das EZ DNA Methylation Gold™ Kit verwendet. In a) ist 5mC/5hmC in % und in b) 5fC/5caC in % für mSat, L1 und IAP sowohl für die Kontrolle als auch nach der Überexpression prozentual dargestellt. In c) sind die Methylierungsmuster der analysierten Elemente für die beiden Gruppen gezeigt. Die MAB-Methylierungsmuster zeigen die stark aufmethylierten Sequenzen (rot). Alle CpGs, die unmethyliert oder hemimethyliert sind (blau oder grün), stehen für 5fCpG oder 5caCpG. Die Methylierungsdaten der Lambda- Kontroll- Amplikons befinden sich im Anhang (Tabelle 8.20). Die Methylierung beträgt zwischen 95-98% und stimmt für Kontrolle und TDGwt überexprimierte Zygoten für jedes Element jeweils überein. Einzig in den IAPs gibt es Unterschiede. Hier ist die Lambda- DNA, die in die Kontrolle eingeschleust wurde, weniger methyliert als die der TDGwt Zygoten und würde somit falsch- positive Werte angeben. Dadurch, dass 5fC/5caC nur zu sehr geringen Mengen im Genom vorkommt, verzerren geringe Abweichungen unter Umständen die Aussage über das Vorhandensein von 5fC/5caC. Die MA-HPBS- Daten sind also vorsichtig zu interpretieren. Die Dynamiken von 5mC/5hmC der Zygoten der Kontrolle wurden ausführlich in Kapitel 3.1.6 beschrieben und sind somit in diesem Teil nicht nochmals erklärt.

Die Überexpression von TDG führt in mSat zu einem sehr milden Anstieg von 5mC/5hmC (Abbildung 3.24). Dieser ist wohl auf die nur einmalige Durchführung des Experiments und einer damit verbundenen Variabilität zurückzuführen. 5fC/5caC ist in der Kontrolle zu 2,3% vorhanden. Durch die Überexpression von TDGwt kommt es zu einem Anstieg von 5fC/5caC, welcher nur auf einem technischen Fehler oder der einmaligen Durchführung des Experiments basieren kann. Die Daten, welche mit dem laborinternen Bisulfitprotokoll generiert wurden, zeigen keinen Einfluss von TDGwt auf die Level von 5fC/5caC in mSat (Abbildung 8.26). Das BS- Methylierungsmuster ändert sich durch die TDGwt Überexpression nur sehr leicht mit einer leichten Reduktion von hemimethylierten CpG-Positionen. Das MAB- Methylierungsmuster ist für die Kontrolle und Überexpression von TDGwt gleich.

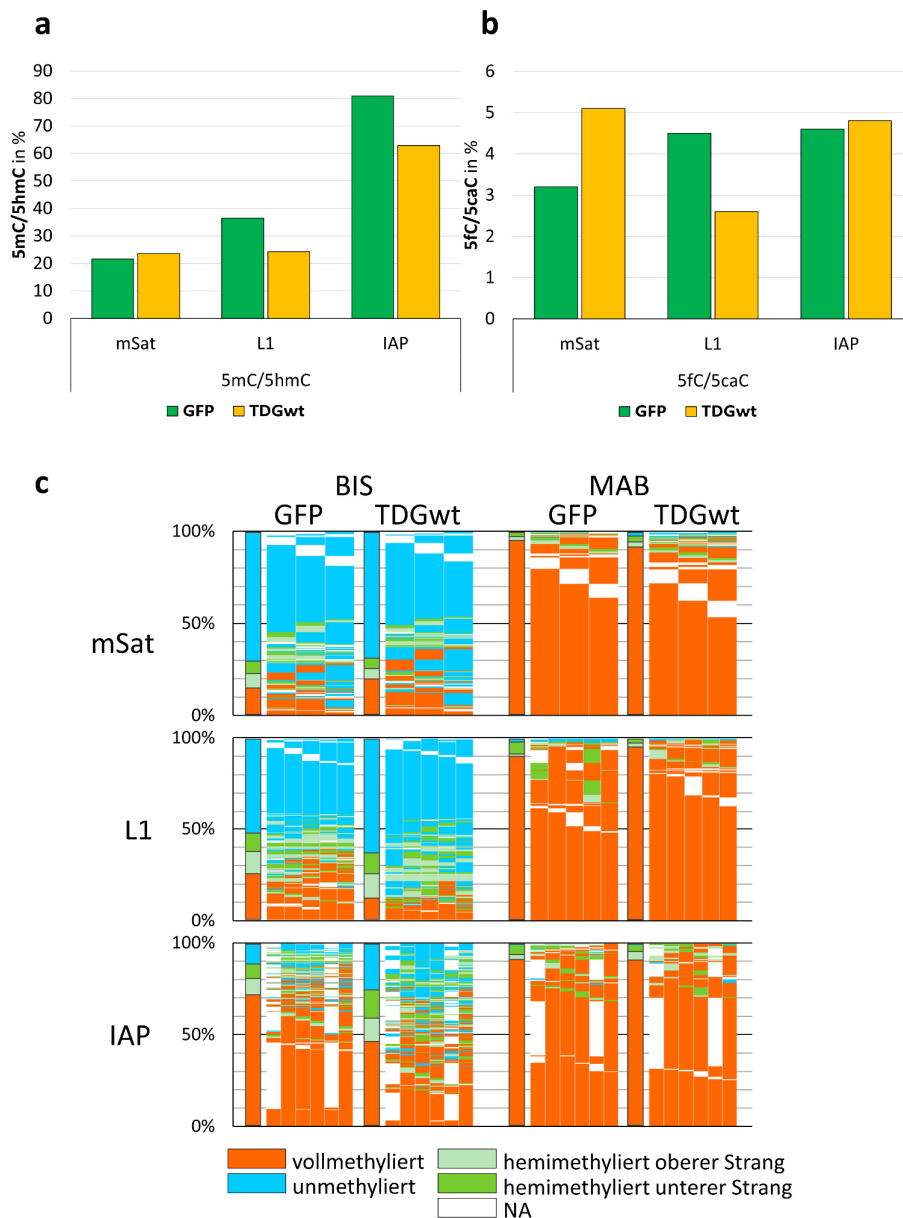


Abbildung 3.24 MA-HPBS- Sequenzierungsanalyse von mSat, L1 und IAP in postreplikativen Zygoten, die TDGwt überexprimieren. Es wurden postreplikative (12hpf) Zygoten, welche TDGwt überexprimieren (ICSI) gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. a: 5mC/5hmC in % b: 5fC/5caC in % c: Methylierungsmuster der BIS- und MAB- Analyse. Die Überexpression von TDGwt hat keinen Effekt auf 5mC/5hmC in mSat. Die Überexpression von TDGwt führt jedoch zu einer Abnahme der Gesamtmethylierung in L1 und IAP. Dabei nimmt die Vollmethylierung stark ab- und die Hemimethylierung mild zu. Zudem wird 5fC/5caC durch die Überexpression in mSat leicht erhöht, was möglicherweise auf einem technischen Fehler beruht, da das Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Die Überexpression von TDGwt führt in L1 zur Reduktion von 5fC/5caC, auf IAPs hat sie hingegen keinen Effekt.

In L1 ist in Zygoten, die TDGwt überexprimieren, ein sehr deutlicher Verlust von 5mC/5hmC (-12,2%) gegenüber der Kontrolle erkennbar (Abbildung 3.24). Die Kontrollzygoten zeigen einen niedrigen Anteil von 5fC/5caC (4,5%). Die TDGwt Überexpression führt zu einem Verlust dieser Basen (-2%). Dies lässt sich auch nach der Behandlung mit dem laborinternen Bisulfidprotokoll beobachten (Abbildung 8.26). Die BS- Methylierungsmuster sind zwischen Kontrolle und TDGwt überexprimierenden Zygoten ähnlich, sie enthalten nämlich beide einem großen Anteil an hemimethylierten CpGs (beide Gruppen 12%). Durch die Überexpression verändert sich das Verhältnis von voll- und hemimethylierten CpGs.

Während das Verhältnis in der Kontrolle bei 2:1 liegt, ist es in den überexprimierenden Zygoten 1:1 (Abbildung 3.24). In Zygoten, welche TDGwt überexprimieren, steigt, im Vergleich zur Kontrolle, zudem das mosaikale Muster mild (+3%), wobei das kontinuierliche abnimmt (-7%). Der Gesamtmethylierungsverlust erfolgt also eindeutig an vollmethylierten Positionen. Die MAB-Methylierungsmuster zwischen Kontrolle und TDGwt ähneln sich sehr. Jedoch können in der Kontrolle an CpG1 und CpG4 vermehrt hemimethylierte 5fC/5caC- Positionen (grün) gefunden werden. Das mosaikale als auch kontinuierliche Muster stimmen prozentual überein.

In IAPs führt die Überexpression von TDGwt, wie auch in L1, zu einem sehr deutlichen Verlust von 5mC/5hmC (-18%). Die Level von 5fC/5caC ändern sich hingegen kaum (Abbildung 3.24). Auch dies ist im Experiment mit der laborinternen Bisulfitbehandlung zu beobachten (Abbildung 8.26). Die BS-Methylierungsmuster der TDGwt Überexpression zeigen gegenüber der Kontrolle einen deutlichen Verlust an Vollmethylierung, gepaart mit einem Anstieg an Hemimethylierung. Zudem zeigen die überexprimierenden Zygoten einen deutlichen Anstieg des mosaikalen Musters (+24%), der einhergeht mit einem Verlust an Kontinuierlichem (-23%). Das MAB-Methylierungsmuster ist zwischen beiden Gruppen sehr ähnlich und die prozentualen Werte von mosaikalen und kontinuierlichen Mustern stimmen fast überein.

Es wurde zudem der Versuch unternommen genomweite Bisulfitsequenzierungsdaten von Zygoten, die TDGwt überexprimieren, zu generieren. Aus nicht bekannten technischen Gründen ergaben sich jedoch ausschließlich Daten für verschiedene repetitive Elemente (Tabelle 8.24). Auch sie zeigen einen sehr deutlichen Verlust von 5mC/5hmC für L1mdT (L1), L1mdA, Etn und IAPez.

4 Diskussion

Damit aus zwei differenzierten Zellen, der Eizelle und dem Spermium, ein kompletter Organismus entstehen kann, müssen die für diese Zellen charakteristischen epigenetischen Muster neu arrangiert werden. Zunächst werden dazu die keimzellspezifischen DNA- Methylierungsmuster gelöscht, woraufhin entwicklungspezifische Muster etabliert werden. Demnach ist dazu eine Kombination aus Demethylierung und Remethylierung nötig. Die genauen Mechanismen dieser beiden Prozesse sind im präimplantiven Embryo allerdings noch nicht ausreichend geklärt. Die Demethylierung kann auf aktivem und passivem Weg geschehen. Die passive Demethylierung erfolgt durch eine nicht vollständige Erhaltungsmethylierungsaktivität während der Replikation. Dadurch wird bei jedem Replikationsereignis die DNA- Methylierung reduziert. Die aktive Demethylierung erfolgt hingegen Replikations- unabhängig, mittels DNA- Reparatur. Dabei ist nach dem heutigen Stand der Forschung vor allem die Basenexzisionsreparatur (BER) von Bedeutung.

5mC kann durch die TET Enzyme zu 5hmC, 5fC und 5caC oxidiert werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle in den Mechanismen der Demethylierung. *In vitro* Analysen zeigen, dass sie die passive Demethylierung fördern können, indem sie das Binden von DNMT1 an hemimethylierte Positionen vermindern. Daneben stellen die oxidierten Basen auch Intermediate der aktiven Demethylierung dar. So können sie durch verschiedene Reparaturenzyme des BERs (TDG, NEIL1-3, UNG2) erkannt und ausgebaut werden. Welche Enzyme für den Ausbau dieser Basen während der Reprogrammierung in der Zygote verantwortlich sind, ist noch zu klären. Neben ihrer Rolle während der Demethylierung sind 5hmC, 5fC und 5caC auch für die Regulation der Transkription verantwortlich. Während 5mC generell eine repressive Wirkung auf die Expression besitzt, sind seine oxidierten Derivate weitestgehend aktivierend.

Bezüglich der Aufgabe und Funktion von 5hmC, 5fC und 5caC im präimplantiven Embryo sind noch viele Fragen offen: Zu welchem Ausmaß und in welchen genomischen Regionen sind 5hmC, 5fC und 5caC im präimplantiven Embryo vorhanden? Welche Rolle spielen sie in dessen Entwicklung? Welche regulativen Aufgaben bei der Transkription besitzen sie? Wie stark sind sie in die Mechanismen der Demethylierung involviert? Und welche genaue Funktion haben sie während der replikationsabhängigen oder Reparatur- bedingten Demethylierung? Die Aufklärung dieser molekularen Dynamiken und Mechanismen sind essentiell wichtig für das Verständnis der Entwicklung des präimplantiven Säugerembryos. Sie könnten darüber hinaus auch wichtige Informationen liefern, die sich auch die angewandte Forschung zu Nutzen machen kann (zum Beispiel die effektive Herstellung personalisierter iPSCs; Optimierung reproduktiver Technologien).

In dieser Arbeit sollten auf die oben genannten offenen Fragen mögliche Antworten gefunden werden. Durch die Überexpression von epigenetisch wirksamen Enzymen (TET und TDG) im präimplantiven Embryo wurden die Level der Basen 5mC, 5hmC, 5fC, 5caC beeinflusst. Somit wurden unterschiedliche Varianten eines epigenetischen Ungleichgewichts hergestellt, wodurch die Funktionen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC analysierbar gemacht werden sollten. Die Embryonen wurden während ihrer

Entwicklung beobachtet und die Effekte der überexprimierten Enzyme untersucht. Um globale Bilder der Überexpressionseffekte zu generieren, wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen der epigenetische Status analysiert. Dieser Status konnte dann wiederum in Beziehung zum Entwicklungspotenzial gesetzt werden und ein Zusammenhang zwischen Modifikationsänderungen und Entwicklung hergestellt werden und somit den Modifikationen bestimmte Funktionen zugeordnet werden. Um zudem die Effekte des veränderten epigenetischen Status' basengenau zu analysieren, wurden Bisulfitsequenzierungs- Analysen von Zygoten durchgeführt, in welchen verschiedene Enzyme überexprimiert wurden. Diese Analysen sollten auch Aufschluss über die Funktion der oxidierten Basen bezüglich der Demethylierungsdynamiken und -mechanismen geben.

4.1 Die Überexpression von verschiedenen TET Formen und die Auswirkung auf den frühen Mausembryo

Die TET Enzyme spielen eine zentrale Rolle in der Säugerentwicklung. Sie sind für die Oxidation von 5mC zu 5hmC, 5fC und 5caC verantwortlich, welche als Intermediat der Demethylierung dienen und eine Funktion in der Genregulation besitzen (Wossidlo et al. 2011; Gu et al. 2011; Raiber et al. 2012; Pastor et al. 2011; Wu, Ana C D'Alessio, et al. 2011) . Im präimplantiven Embryo sind vor allem zwei TET Enzyme, TET3 und TET1, exprimiert. TET3 ist in der MII Oozyte, Zygote und frühem 2- Zellembryo zu finden, wird dann jedoch degradiert. Parallel dazu wird die TET1 Expression erhöht, wobei TET1 bis über das Blastozystenstadium hinaus exprimiert wird und im postimplantiven Embryo, auch in Kombination mit TET2, wichtige Aufgaben übernimmt (Vincent et al. 2013; Yamaguchi et al. 2013; Zhang et al. 2013; Piccolo et al. 2013) Bisher sind einige Knockout- Studien der verschiedenen TET Enzyme bekannt, dabei ist kein Knockout eines TET Enzyms letal. Die KOs haben vielmehr nur geringe Auswirkungen auf die Entwicklung und auf die Level der oxidierten Basen (Dawlaty et al. 2011; Li et al. 2011). Lediglich der Doppel- Knockout der präimplantiv exprimierten TET3 und TET1 Enzyme führt zu Einschränkungen in der präimplantiven Entwicklung (Kang et al. 2015).

Es gibt auch Studien, die den gegenteiligen Ansatz, nämlich die TET- Überexpression, verfolgen. Diese Überexpressionsexperimente wurden in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt (HEK293 und ESCs) (Xu et al. 2016; Jin et al. 2014; Kong et al. 2016; Maeder et al. 2013). Es handelt sich, mit Ausnahme weniger Publikationen, um die Überexpression der katalytischen Domäne. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass das Klonieren der kodierenden Sequenz der Vollängenformen aufgrund ihrer Größe (6,5kb) schwierig ist, aber vor allem die Transfektion großer Vektoren Probleme verursacht. Die Überexpressionsstudien wurden mittels verschiedener Strategien durchgeführt (TET1-TALEN- Fusionsgene, TET im CRISPR- Cas- System), wodurch es möglich war, die Wirkungsweise der TET Enzyme genomweit oder an spezifischen Loci zu analysieren (Xu et al. 2016; Jin et al. 2014; Kong et al. 2016; Maeder et al. 2013). Der genomweite Überexpressionsansatz führt zu einer Oxidation von methylierten CpG- Positionen und einer milden Hypomethylierung. Zudem kommt es zu milden Änderungen der Expression (Grosser et al. 2015; Jin et al. 2014). Bisher sind solche TET- Überexpressions- Studien im präimplantiven Embryo nicht bekannt.

Um die Aufgaben und Funktionen von TET3 und TET1 und den von ihnen generierten oxidierten Basen (5hmC, 5fC und 5caC) in der präimplantiven Entwicklung und der Reprogrammierung zu analysieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene TET Varianten (Volllängenform oder katalytische Domäne) in der Zygote überexprimiert. TET3FL ist in der Zygote ein endogen exprimiertes Protein (Kapitel 1.5.1). Seine Überexpression stellt also insofern eine künstliche Situation her, als dass ein Mehr an Protein vorliegt. Ab dem 2-Zellstadium wird das endogene und auch das überrepräsentierte TET3FL Enzym degradiert und ist somit in den darauffolgenden Stadien nicht mehr vorhanden. TET1FL ist erst ab dem 2-Zellembryo exprimiert, wird also durch seine Überexpression in Zygoten zu einem künstlich vorhandenen Enzym (Kapitel 1.5.1). Die Überexpression der katalytischen Domänen von TET3 und TET1 stellen durch das Fehlen der regulatorischen N-terminalen Domäne artifizielle Enzyme in allen präimplantiven Stadien dar (Abbildung 1.4).

Eine Entdeckung dieser Arbeit ist, dass die Überexpression der vier verschiedenen TET Varianten, im Gegensatz zum Verlust einzelner TET Enzyme, zu einer Einschränkung der Entwicklung in präimplantiven Stadien führt. Um diese Einschränkung erklären zu können, wurden nach der Überexpression die Mengen der epigenetischen DNA-Modifikationen mittels Antikörperfärbungen auf Veränderungen hin untersucht (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2), Reparaturprozesse analysiert (Kapitel 4.1.3) und HPBS-Sequenzierungen zur Analyse von De- und Remethylierungsdynamiken in der Zygote angestellt (Kapitel 4.1.4).

4.1.1 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC nach der Überexpression von TETFL und TETCD

4.1.1.1 Die Aktivitätspräferenz der TET Varianten gegenüber 5mC, 5hmC, 5fC

Die TET Enzyme besitzen Aktivitätspräferenzen, die für die katalytische Domäne aller TET Enzyme gleich sind (Kapitel 1.5). Die Präferenzen basieren auf chemisch-physikalischen Merkmalen der einzelnen modifizierten Cytosine. *In vitro* Analysen haben gezeigt, dass die konservierten katalytischen Domänen von TET1 und TET2 die höchste Aktivität gegenüber 5mC besitzen, woraufhin 5hmC und 5fC folgen (5mC > 5hmC > 5fC) (Hu et al. 2015; J. Lu et al. 2016). Dafür verantwortlich ist die Konformation des modifizierten Cytosins in der aktiven Tasche des TET Enzyms. Der Unterschied liegt in den verschiedenen chemischen Gruppen an der C5-Position der Basen (Hu et al. 2015; J. Lu et al. 2016). Der entscheidende Schritt in der TET Oxidation und damit auch in der Aktivitätspräferenz ist die Energiebarriere der Wasserstoffabstraktion des Substrates (Kapitel 1.5 und Abbildung 1.6). Während 5mC durch die frei rotierbare C-CH₃-Bindung eine vorteilhafte Konformation einnimmt (H direkt an aktiviertem Eisenion von TET2), sind 5hmC und 5fC durch die relativ große Entfernung des Wasserstoffatoms zum Eisenion energetisch unvorteilhaft positioniert, wodurch die Reaktion längere Zeit in Anspruch nimmt (Hu et al. 2015; J. Lu et al. 2016).

Die Auswirkungen der Überexpression der TET Varianten wurden zunächst mittels Antikörperfärbungen analysiert. Bei den verwendeten Antikörpern gegen 5hmC, 5fC und 5caC kann, basierend auf den Informationen des Herstellers (active motif), von einer linearen Abhängigkeit von Antikörperbindenkinetik und Epitopmenge ausgegangen werden. Dies erlaubt einen relativen Vergleich der durch die Überexpression bedingten, veränderten Signalintensitäten. Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigen eine Übereinstimmung in der Dynamik, mit der alle überrepräsentierten TET Enzyme präferenziell die oxidierten Basen bilden (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Die Level von 5mC zeigen hingegen Unterschiede zwischen der Überexpression der Volllängenformen und der katalytischen Domänen. Die Überexpression der beiden Volllängenformen führt zu einer Zunahme von 5mC, die der katalytischen Domänen hingegen zu einer Abnahme (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Die Signalintensitäten von 5hmC sind im maternalen Pronukleus aller Zygoten, in welchen die TET Varianten überexprimiert wurden, gegenüber der Kontrolle sehr stark erhöht. Dadurch zeigt sich, dass die TET Enzyme eine große Aktivitätspräferenz gegenüber 5mC besitzen und somit hohe Level von 5hmC entstehen. Der große Anstieg von 5hmC im maternalen Pronukleus kommt zudem durch seine Akkumulation zu Stande. Dies basiert darauf, dass die TET Enzyme eine geringe Aktivitätspräferenz gegenüber 5hmC besitzen, sodass dieses zu einem geringeren Anteil zu 5fC oxidiert wird (Hu et al. 2015; J. Lu et al. 2016). Die hohen Level von 5hmC in Zygoten, die TET überexprimieren, deuten zudem auch auf eine stabile Modifikation hin, die neben dem Intermediat auf dem Weg zur Demethylierung auch eine regulative Rolle in der Expression spielen kann (Bachman et al. 2014; Iurlaro et al. 2013; Wu, Ana C D'Alessio, et al. 2011; Chen et al. 2013). Die Signalintensitäten für 5fC sind hingegen in allen Zygotengruppen, in welchen TET überexprimiert wurde, erhöht, jedoch weniger stark als die Signale von 5hmC (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Dies hängt mit der geringeren Präferenz und der damit verbundenen geringeren Oxidation zu 5fC zusammen. Die Veränderung der Level von 5hmC und 5fC im maternalen Pronukleus der Zygoten, in welchen die TET Varianten überexprimiert wurden, spiegeln also die bisher bekannten Aktivitätspräferenzen wider.

Die Überexpression von TET1CD weist einige Besonderheiten auf. Der Anstieg der 5hmC-Signalintensitäten im maternalen Genom der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, ist deutlich höher als in Zygoten, welche TET3CD überexprimieren. Durch diese vermutlich höhere Oxidationsaktivität wären auch erhöhte Signalintensitäten von 5fC durch TET1CD gegenüber TET3CD zu erwarten gewesen. Diese sind jedoch beiden Gruppen ähnlich. Dahingegen sind die Level von 5caC in Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, deutlich höher als in Zygoten, welche TET3CD überexprimieren (Abbildung 3.3). Möglicherweise basiert dies auf der deregulierten und damit erhöhten Oxidationsaktivität von TET1CD (siehe Kapitel 4.1.1.2), die dazu führt, dass 5fC effektiver oxidiert wird, wodurch 5caC stärker gebildet wird.

Die Dynamiken von 5hmC, 5fC und 5caC sind in Zygoten, welche TET3FL oder TET1FL überexprimieren, für den paternalen Vorkern gleich dem maternalen Vorkern (Abbildung 3.2). Die Level der oxidierten Basen sind im paternalen Genom durch die Überexpression jedoch weniger stark erhöht. Da hier

relative Werte abgebildet sind, ist dies dadurch zu erklären, dass im paternalen Genom der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt durch endogene TET Enzyme schon hohe Mengen von 5hmC, 5fC und 5caC vorhanden sind, welche auch durch erhöhte TET Mengen nicht deutlich erhöht werden können.

Die Dynamik der oxidierten Basen im paternalen Vorkern der Zygoten, welche TET3CD überexprimieren, zeigt ein etwas anderes Bild als die im maternalen. Hier sind zwar alle oxidierten Basen gegenüber der Kontrolle erhöht, allerdings zeigt hier 5fC den stärksten Anstieg (Abbildung 3.3). Dies ist nur mit einem Messfehler zu erklären, da die beiden durchgeführten Experimente sehr unterschiedliche Werte der Signalintensitäten für 5fC zeigen. Im paternalen Pronukleus der Zygoten, die TET1CD überexprimieren, ist neben dem deutlichen Verlust des 5mC- Signals auch ein Verlust des 5hmC- und 5fC- Signals gegenüber der Kontrolle zu detektieren, jedoch ein Anstieg von 5caC (Abbildung 3.3). Wie in präreplikativen Zygoten zu erkennen ist, wird 5mC im paternalen Vorkern in hohen Leveln zu 5hmC und 5caC oxidiert (5fC wurde nicht analysiert) (Abbildung 8.4). Dadurch, dass in postreplikativen Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, aufgrund der starken Oxidation, 5mC nun nicht mehr als Substrat verfügbar ist, werden 5hmC und 5fC vermehrt zu 5caC umgewandelt. Verglichen zur Kontrolle sinken die Level von 5hmC/5fC und 5caC steigt an. Dieser schnelle Umsatz von 5mC zu 5caC spiegelt sich auch in dem, verglichen zu TET3CD, sehr starken Verlust von 5mC wider. Da das paternale Genom auf Grund seiner Ausdehnung und wenigen Histonmodifikationen besser zugänglich ist für die TETCD Enzyme, scheint hier der Umsatz noch schneller und effektiver. Die Oxidationsaktivitäten und -dynamiken von TET1CD und TET3CD gegenüber den einzelnen Modifikationen in den jeweiligen Pronuklei sind schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Oxidationsdynamik von TET3FL und TET1FL entsprechen in Etwa der von TET3CD, 5mC liegt jedoch nach der Überexpression von TET3FL und TET1FL erhöht vor.

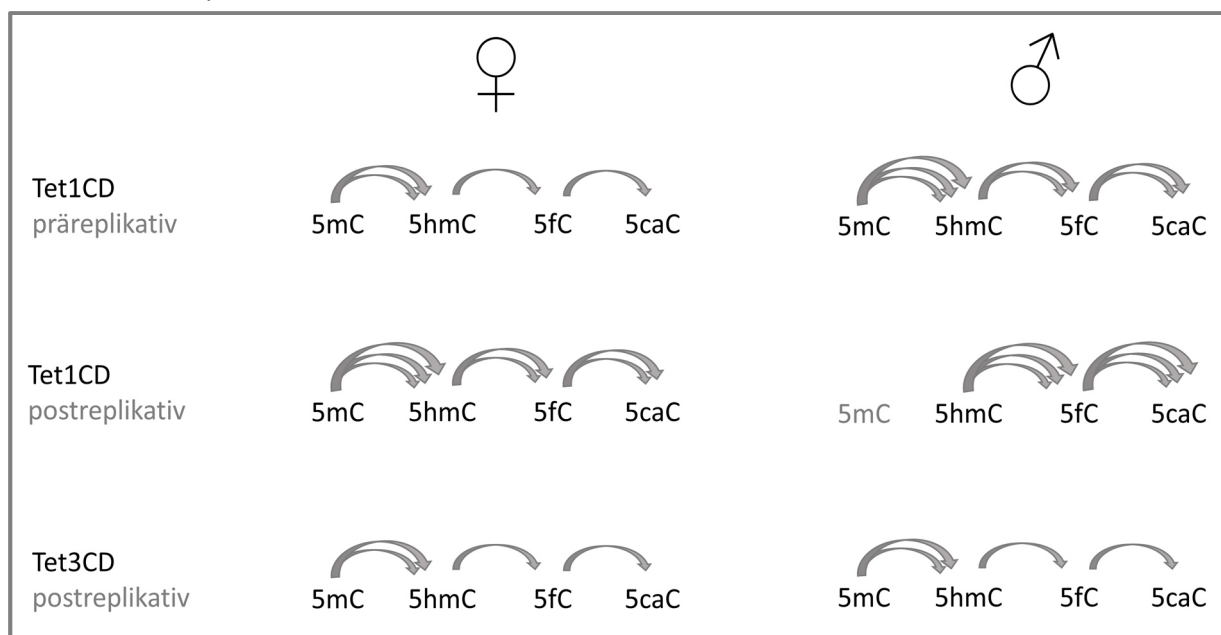


Abbildung 4.1 Die Präferenzen von TETCD in der prä- und postreplikativen Zygote. Schematische Darstellung der im Text beschriebenen Dynamiken nach der Überexpression von TET1CD und TET3CD im maternalen (♀) und paternalen (♂) Pronukleus. Die Anzahl der Pfeile stellt dabei die Aktivität der CD gegenüber den jeweiligen Basen dar, wobei drei Pfeile eine starke Oxidationsaktivität angeben.

Laut den oben beschriebenen Aktivitätspräferenzen der TET Enzyme sollte die Bildung von 5caC nur in geringem Maße geschehen. Im paternalen Genom aller Zygoten, die eine der TET Variante überexprimieren, ist jedoch ein deutlicher Anstieg der Signalintensitäten von 5caC zu erkennen, der sich noch stärker im maternalen Genom zeigt (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Dies ist damit zu erklären, dass die TET Enzyme 5fC zwar langsamer, aber stetig zu 5caC oxidieren. Durch die enormen Mengen der Enzyme, die durch die Überexpression vorliegen, kann verhältnismäßig viel 5caC gebildet werden. 5caC ist also das Endprodukt der Oxidationskette, und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Zygote die entsprechenden Enzyme fehlen (TDG, Decarboxylase) bzw. nicht in ausreichender Menge vorhanden sind, um diesen Überschuss abzubauen, wodurch 5caC letztendlich akkumuliert. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass bisher in Zygoten die Aktivität einer 5caC- spezifischen Glykosylase oder einer Decarboxylase noch nicht bewiesen werden konnte. TDG ist in Zygoten nur zu sehr geringen Leveln exprimiert, und ihr konditioneller Knockout in der Oozyte hat keinen Einfluss auf die 5fC- oder 5caC- Level und den Methylierungsstatus von aktiv demethylierten Sequenzen (paternal *Oct4*, maternal *Zbtb32*) (F. Guo et al. 2014; Santos et al. 2013). Zudem sind die 5caC- bindenden Glykosylasen NEIL1 und NEIL3 zwar in Oozyten und 2- Zellembryonen exprimiert (eigene RT-PCR- Ergebnisse), in *Xenopus laevis* konnte jedoch gezeigt werden, dass die NEIL Enzyme 5fC und 5caC nur mit Hilfe von TDG ausbauen können (Spruijt et al. 2013; Schomacher et al. 2016). Ihre Funktion und ihre Aufgabe in der murinen Zygote ist noch unklar. Eine potenzielle 5caC- Glykosylase in der Zygote stellt UNG2 dar (Santos et al. 2013; Xue et al. 2016). Genomweite Sequenzierungsstudien über den Einfluss der NEIL Enzyme und TDG oder UNG2 in der Mauszygote fehlen jedoch bisher.

Im 2-Zellembryo sind für alle TET Varianten die gleichen Oxidationsdynamiken wie im jeweiligen maternalen Vorkern der Zygote erkennbar (Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Hier weist jedoch die Überexpression von TET3CD die am deutlichsten ausgeprägten Veränderungen auf. Dies basiert darauf, dass ausschließlich Zygoten, in welchen die Mengen des exogenen TET1CD niedrig sind, das 2- Zellstadium erreichen. Dadurch fallen auch die Effekte der Oxidation milder aus bzw. erreichen nur Zygoten, die einem milden Effekte unterliegen, das 2- Zellstadium und können analysiert werden. Allerdings ist hier der Verlust von 5mC sehr stark, was wie im paternalen Pronukleus der Zygote auch für eine sehr effektive Oxidationsaktivität spricht. Im Gegensatz zur Zygote akkumuliert 5caC im 2- Zellembryo, welche zygotisch TET überexprimieren, nicht. Im Vergleich zur Kontrolle sinkt das 5caC- Level sogar in 2- Zellembryonen, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren (Abbildung 3.5). Anders als in der Zygote müssen also Mechanismen vorhanden sein, die zu einem Verlust von 5caC führen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Folgende: Die ZGA (zygotic genome activation; Zygotische Genom Aktivierung) beginnt im späten Zygotenstadium (minor ZGA, kleine ZGA) bzw. im frühen 2- Zellembryo (major ZGA, große ZGA) (Kapitel 1.7.2). Somit können im 2- Zellembryo auch Reparaturproteine exprimiert werden, die in der Oozyte/Zygote nicht oder nur zu geringen Mengen vorhanden sind (zum Beispiel TDG). Diese Expression führt schließlich zum Abbau von 5caC. Da jedoch das Level von 5caC in 2- Zellembryonen, in welchen zygotisch TET3FL/TET1FL überexprimiert wurde,

deutlich unter das der Kontrolle fällt, scheint es einen TETFL initiierten Mechanismus zu geben. Im Gehirn der Maus bindet TET3FL über eine CxxC Domäne an die TSS von Reparaturenzymen (u.a. TDG, APE1, PARP1) und trägt somit zur Aktivierung der Expression bei (S. G. Jin et al. 2015). Durch die aktivierte Expression von Reparaturenzymen ist ein verstärkter Ausbau von oxidierten Basen möglich. TET3FL reguliert damit also sein eigenes katalytisches Oxidationsprodukt und unterliegt somit einem feedforward Mechanismus für die aktive Demethylierung (S. G. Jin et al. 2015). Ein solcher Mechanismus wäre eine mögliche Erklärung für den verstärkten Verlust von 5caC in 2- Zellembryonen, in welchen TET3FL/TET1FL überexprimiert wurde. Die erhöhten Mengen von TET3FL würden also zu einer erhöhten Aktivierung der Expression von BER- Proteinen führen, wodurch die Level von 5caC deutlich unter die der Kontrolle sinken. Im 2- Zellembryo ist TET3 weitestgehend degradiert (Wossidlo et al. 2011). Ob ein solcher feedforward Mechanismus also im 2- Zellembryo, in welchem zygotisch TET3FL überexprimiert wurde, überhaupt ausgelöst werden kann, müsste mittels qRT- PCR für die BER- Proteine (APE1, Parp1 und TDG), an deren TSS TET3 bindet, getestet werden. Für TET1FL sind Studien über einen feedforward Mechanismus nicht vorhanden, und somit ist unklar, ob es ähnlichen Mechanismen wie TET3 unterliegt. Die CxxC- Domänen, die die Interaktion mit den entsprechenden TSS vermitteln, gehören jedenfalls zum gleichen Typ und weisen einige Übereinstimmungen, aber auch Unterschiede in ihrer Proteinsequenz auf (Long et al. 2013). Unterschiede in der Oxidationsaktivität zwischen TET3FL und TET1FL basieren wahrscheinlich auf der Bindungspräferenz der CxxC Domäne oder ihren Interaktionspartnern. Diese würden auf der globalen Ebene der Immunfluoreszenz- Analyse nicht sichtbar sein, da sie die Spezifität der gebundenen Sequenzen betreffen. Um diese Unterschiede genauer zu analysieren, sind basengenaue Sequenzierungsanalysen notwendig (Kapitel 4.1.1.1). Es wäre also interessant, den Methylierungsstatus von Promotoren, TSS und regulativen Elementen von BER- Enzymen in 2- Zellembryonen, in welchen TET3FL vs TET1FL überexprimiert wurden, zu analysieren.

Zusätzlich zu den chemisch- physikalischen Gegebenheiten der Interaktion der katalytischen Domäne von TET Enzym und Base besitzen die TET Vollängenformen regulative Elemente, die ihre Aktivität zu den entsprechenden Regionen leitet (CxxC Domäne, Kapitel 1.5, Abbildung 1.4). Dies ist im Folgenden für die überexprimierenden Embryonen diskutiert.

4.1.1.2 Der Effekt der Überexpression von TETFL und TETCD im Vergleich

Neben den Präferenzen der Aktivität gegenüber den verschiedenen modifizierten Basen besitzen die TET Enzyme N- terminal vermittelte Bindungspräferenzen. Dadurch sind die Unterschiede in den Stärken der Effekte durch TET3FL/TET1FL und TET3CD/TET1CD zu erklären.

Die Effekte der Vollängenformen für TET3FL und TET1FL sind sowohl in der Zygote als auch dem 2- Zellembryo sehr ähnlich, wobei der Effekt für TET1FL etwas niedriger für jede Oxidationsstufe ausfällt. Dies ist vermutlich auf die Translationseffizienz zurückzuführen die, basierend auf dem GFP- Signal, für TET1FL niedriger ausfällt. Bisher ist eine Studie bekannt, in der TET1 als Vollängenform in HEK293- Zellen überexprimiert wird. In dieser Studie wurde auch eine schwache Translation von TET1FL

beobachtet, diese aber durch längere Inkubationszeiten vor der Analyse etwas kompensiert. Dies wäre in Zygoten nicht möglich, da diese sich nach ca. 18hpf zum 2-Zellembryo entwickeln. Es ist jedoch zu erkennen, dass sich der Oxidationseffekt der Überexpression von TET1FL in der Zygote im 2-Zellembryo verstärkt (Abbildung 3.5). Die Überexpression der katalytischen Domänen zeigen deutlichere Unterschiede in ihrer Oxidationseffizienz. Die Überexpression von TET1CD führt in der Zygote in beiden Pronuklei zu einer drastischeren Oxidation als TET3CD, welche sich besonders durch den extremeren Verlust von 5mC und den stärkeren Anstieg von 5caC äußert. Dieser Unterschied ist zu detektieren, obwohl die Intensität der GFP-Signale von TET1CD und TET3CD gleich sind (Abbildung 3.1) und beruht darauf, dass TET1CD nicht reguliert oxidiert (siehe unten) (Jin et al. 2014; L. Hu et al. 2013). TET3CD scheint trotz fehlender N-terminaler Domäne einer gewissen Regulation zu unterliegen. Diese Regulation zeigt sich zudem dadurch, dass, im Vergleich zu TET1CD, größere Mengen von TET3CD im Cytoplasma der Zygoten zurückgehalten werden (Abbildung 3.1). Ein Effekt, der auf der Position des eGFPs im Fusionsprotein basiert, ist dabei nicht völlig auszuschließen, da eGFP sich N-terminal von TET3CD, aber C-terminal von TET1CD befindet.

Vergleicht man nun die Effekte der Überexpression von TETFL mit denen von TETCD, zeigen TETFL einen allgemein niedrigeren Oxidationseffekt. Wie auch in dieser Arbeit in Zygoten und 2-Zellembryonen gezeigt wurde, zeigen Jin et al. in differenzierten Zellen, dass der Effekt des globalen Methylierungsverlusts nach der Überexpression von TET1FL im Vergleich zu TET1CD gering ist. Während TET1CD ohne spezifische Vorlieben einen genomweiten Verlust von 5mC herbeiführt, ist in TET1FL überexprimierenden Zellen kein signifikanter Verlust von 5mC zu erkennen. Dies beruht auf der CxxC Domäne, die nur in der Vollängenform enthalten ist (Jin et al. 2014) (Abbildung 1.4). Die CxxC Domäne präferiert die Bindung an unmethylierte CpG-reiche Regionen (Promotoren und CpG Inseln) gegenüber methylierten CpGs (Xu et al. 2011). Bindet sie also an wenig oder unmethylierte Sequenzen, ist dort auch weniger bis kein Substrat zur Oxidation vorhanden, wodurch weniger Methylierung verloren geht. Im Gegensatz dazu unterscheidet die katalytische Domäne nicht zwischen 5mC und Cytosin und kann somit ungesteuert oxidieren (L. Hu et al. 2013). Der Unterschied in der Regulation zwischen TET1FL und TET1CD zeigt sich auch in der Verteilung von 5hmC (Jin et al. 2014). Während TET1FL definierte Oxidationspositionen zeigen (zwei Anreicherungspunkte (peaks), die die TSS flankieren; gezeigt durch hMeDIP) oxidiert TET1CD unkontrolliert (gleichmäßig um TSS verteilt, stärkere Anreicherung als durch TET1FL (höhere peaks)) (Jin et al. 2014). Somit sind also die unterschiedlich starken Effekte in Zygoten, in welchen TET1CD oder TET1FL überexprimiert wurde, auf den regulativen N-terminalen Teil des Enzyms zurückzuführen.

Die CxxC Domäne ist auch verantwortlich für die Unterschiede der Oxidationsaktivität von TET3FL und TET3CD (Xu et al. 2012; Liu et al. 2013; Ko et al. 2013). In Überexpressionsexperimenten in HEK293-Zellen konnte für TET3 mit CxxC-Domäne nur eine niedrige Aktivität detektiert werden (S. G. Jin et al. 2015). Durch die CxxC Domäne unterliegt TET3FL spezifischen regulativen Mechanismen (Bindungspräferenz: 5caCpG > 5mCpG > 5fCpG > 5hmCpG), wodurch sich keine globalen

Oxidationsprozesse abspielen. Die hohe Bindungspräferenz von TET3FL gegenüber 5caC hat auf die Oxidationsmechanismen keinen direkten Einfluss, da 5caC das Endprodukt dieser Oxidationskette darstellt. Mit dem Verlust der N-terminalen Domäne erhöht sich auch die oxidative Auswirkung, da TET3CD unabhängig von Modifikationen an die DNA bindet (S. G. Jin et al. 2015). TET3FL bindet wie auch TET1FL an den TSS (ChIP- Peaks, Chromatin- Immunopräzipitation) (Jin et al. 2014; S. G. Jin et al. 2015). Der mildere Effekt der Überexpression von TET3FL verglichen zu TET3CD in der Zygote und dem 2- Zellembryo ist demzufolge auf die CxxC- Domäne zurückzuführen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Überexpression der TET Varianten durch die chemisch- physikalischen Gegebenheiten der Basen spezifische Level der jeweiligen oxidierten Basen bildet. Dabei spiegelt sich die bisher bekannte Aktivitätspräferenz wider, nämlich $5mC > 5hmC > 5fC$. In der Zygote kommt es trotz geringer Aktivitätspräferenz von TET gegenüber 5fC zu einer starken Bildung und Akkumulation von 5caC. Diese beruht wahrscheinlich auf niedrigen Mengen von 5caC-spezifischen Reparaturenzymen in der Zygote. Im 2- Zellembryo hingegen werden solche Enzyme anscheinend exprimiert. TET3FL und TET1FL besitzen nahezu die gleiche Stärke der Oxidationsaktivität, während sich TET3CD und TET1CD voneinander unterscheiden. TET1CD oxidiert effektiver und unkontrollierter als TET3CD, woraus geschlossen werden kann, dass TET3CD eine bisher unbekannte regulative Komponente besitzt. Vergleicht man die Aktivität von TETFL und TETCD, wird deutlich, dass TETFL, basierend auf seiner CxxC- Domäne, einer stärkeren Aktivitätsregulation unterliegt. Dadurch fallen die Oxidationseffekte für TETFL vergleichsweise mild aus.

TET- assoziierter Methylierungsanstieg

In Zygoten wurde in den bisher veröffentlichten Arbeiten immer eine Korrelation von einem Anstieg der oxidierten Modifikationen und einem Methylierungsverlust gezeigt (Wossidlo et al. 2010; Gu et al. 2011; K Iqbal et al. 2011). Interessanterweise zeigen Immunfluoreszenzanalysen nach der Überexpression von TETFL sowohl einen Anstieg von oxidierten Basen als auch einen Anstieg von 5mC (Abbildung 3.2, Abbildung 3.5). Auch HPBS- Analysen der mSat von TETFL überexprimierenden Zygoten zeigen einen milden Anstieg der Gesamtmethylierung (Abbildung 3.10). Das bedeutet, dass nicht nur die Oxidation abhängig von den 5mC- Leveln ist (Amouroux et al. 2016), sondern auch die DNA-Methylierung von TETFL. Dies müsste auf einer direkten bzw. proteinvermittelten Interaktion zwischen TET und Methyltransferasen basieren. TET1/2/3 besitzen viele Interaktionspartner und haben somit neben ihrer oxidativen Funktion auch regulative Aufgaben des Chromatinstatus' und der Transkription (Deplus et al. 2013; Vella et al. 2013; Neri et al. 2013). Eine direkte Interaktion von TET und DNMT ist bisher nicht bekannt. Eine indirekte Interaktion kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch bekannt, dass hemi- 5fCpG- Positionen die DNMT3a Aktivität am gegenüberliegenden C erhöhen (Ji et al. 2014). Dies könnte zumindest den gleichzeitigen Anstieg von 5fC und 5mC in TETFL überexprimierenden Zygoten/2-Zellembryonen erklären und ist ein Indiz für *de novo* Methylierungsaktivität in diesen Stadien.

4.1.2 Das Überwinden des Schutzes des maternalen Genoms vor Oxidation und Demethylierung

Obwohl beide parentalen Genome nach der Befruchtung in der gleichen Zelle (Zygote) vorliegen, wird im Gegensatz zum paternalen Genom, das maternale Genom während der Reprogrammierungsphase nur geringfügig und sequenzspezifisch oxidiert und demethyliert (Mayer et al. 2000; Santos et al. 2002; F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014; Inoue & Zhang 2011; Wossidlo et al. 2011; K Iqbal et al. 2011). Der Grund dafür muss auf der unterschiedlichen Organisation des Chromatins der beiden parentalen Genome basieren. Die beiden parentalen Genome zeigen nicht nur bezüglich ihres Methylierungs- und Oxidationsstatus, sondern auch bezüglich ihrer Histonmodifikationen eine starke Asymmetrie. Während das paternale Genom nur monomethylierte Histone aufweist (Monomethylierung von H3K4, H3K9, H3K27 und H4K20), kommen im maternalen Genom fast alle di- und tri-Methylierungsmodifikationen vor (H3K4me_{2/3}, H3K9me_{2/3}, H3K27me_{2/3} und H4K20me₃) (Lepikhov & Walter 2004; Lepikhov et al. 2008; Van Der Heijden et al. 2005; Santos et al. 2005). Die größte Rolle im Schutz des maternalen Genoms vor Oxidation und Demethylierung spielt H3K9me₂. Dieses ist im maternalen Genom unmittelbar nach der Befruchtung vorhanden, wohingegen im paternalen Genom erst in PN4-PN5 leichte Immunfluoreszenz-Signale zu detektieren sind (Ma et al. 2015; Lepikhov & Walter 2004). An H3K9me₂ kann das Protein PGC7/Stella binden, welches sich in beiden Pronuklei befindet. Dadurch vermindert PGC7/Stella sterisch das Binden der TET Enzyme und kann zudem mit TET3 und TET2, nicht jedoch mit TET1, interagieren und deren Aktivität vermindern (Nakamura et al. 2006; Nakamura et al. 2012; Bian & Yu 2014). Durch diese Kombination ist das maternale Genom und einige H3K9me₂ markierte imprintete Loci des paternalen Genoms vor Oxidation und Demethylierung geschützt (Nakamura et al. 2012). Durch künstliches Eingreifen in die Generierung von H3K9me₂ oder durch den KO von Stella kann die Oxidation und Demethylierung des maternalen Genoms erzielt werden (Nakamura et al. 2012).

Immunfluoreszenz-Analysen dieser Arbeit zeigen, dass durch der Überexpression aller TET Varianten auch das maternale Genom stark oxidiert wird, wobei die TETCD-Überexpression zudem zu einem Methylierungsverlust führt (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Weder das globale Level von H3K9me₂ noch das von PGC7/Stella in den Pronuklei ändert sich jedoch (Tabelle 3.2, Abbildung 8.9). Der vorhandene Schutz durch H3K9me₂ und PGC7/Stella wird also global übergangen. Bisulfitanalysen zeigen, dass PGC7/Stella sequenzspezifisch schützt (Nakamura et al. 2006). Dabei sind IAPs, die während der Reprogrammierung nicht demethyliert werden, geschützt, wohingegen die L1 Elemente von PGC7/Stella unabhängig sind (Nakamura et al. 2006). In dieser Arbeit wurden mittels HPBS-Sequenzierung L1 und IAP in Embryonen, in welchen TET3FL/TET1FL und TET3CD/TET1CD überexprimiert wurden, analysiert. Für beide Elemente konnte ein Methylierungsverlust nach der Überexpression beobachtet werden (**Abbildung 3.11**, **Abbildung 3.12**, **Abbildung 3.14**, **Abbildung 3.15**). Damit wäre nochmals ein Hinweis gegeben, dass PGC7/Stella nicht qualitativ schützt, sondern durch erhöhte TET-Level übergangen werden kann. Es deutet also alles darauf hin, dass für eine gesteuerte

Oxidation/Demethylierung ein Gleichgewicht zwischen H3K9me2, PGC7/Stella und den TET Enzymen herrschen muss. Um weitere Einblicke in die Art und Weise der Protektion zu bekommen, müssten Bisulfitanalysen bekannter H3K9me2- PGC7/Stella- geschützter Regionen (zum Beispiel als positive-Kontrolle: *Magea2*, *Wfdc15a*, *H19*, *Rasgrf1*; als negativ- Kontrolle: *Oct4* (Nakamura et al. 2012)) von Zygoten, in welchen TET überexprimiert wurde, generiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass insbesondere TETCD die Demethylierungsgrenzen des maternalen Blocks übergehen kann und für die (aktive) Demethylierung eine wichtige Rolle spielt. Ein denkbares Szenario für das Übergehen des maternalen Schutzes könnte ein dynamischer Binde- und Dissoziierungs - Prozess von PGC7/Stella sein, der bei erhöhten TET Leveln die Wahrscheinlichkeit eines Zugangs zur DNA erhöht und damit eine Oxidation erlaubt.

4.1.3 TET1CD als Initiator von Reparaturmechanismen und aktiver Demethylierung

Die Reprogrammierung in der Zygote ist ein komplexer Prozess aus De- und Remethylierung. Die Demethylierung erfolgt dabei sequenzspezifisch, replikationsabhängig oder -unabhängig, in Kombination mit TET3 und auch ohne Involvierung der TET Enzyme (Wossidlo et al. 2010; Amouroux et al. 2016; Arand et al. 2015; Peat et al. 2014; F. Guo et al. 2014; L. Shen et al. 2014). In den letzten Jahren ist als dominierender genomweiter Demethylierungsmechanismus beider parental Genome die replikationsabhängige Demethylierung in den Fokus gerückt. Diese basiert möglicherweise auf einer durch oxidierte Basen verursachten Inhibition der Erhaltungsmethylierung während der Replikation (Arand et al. 2015; Ji et al. 2014). Mittels hochauflösender Immunfluoreszenz- Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass auch 5hmC, 5fC und 5caC replikationsabhängig aus der DNA verdünnt werden (Inoue et al. 2011; Inoue & Zhang 2011). Es gibt jedoch auch eindeutige Hinweise darauf, dass an bestimmten DNA- Sequenzen aktive Demethylierungsmechanismen zum Methylierungsverlust führen. Dieser aktive Mechanismus erfolgt wahrscheinlich über einen reparaturvermittelten Weg, wobei noch nicht geklärt ist, welche Glykosylasen dabei involviert sind (Hajkova et al. 2010; Amouroux et al. 2016; Wossidlo et al. 2010; Wang et al. 2014; Popp et al. 2010; Santos et al. 2013). In ESCs konnte gezeigt werden, dass die TET Enzyme 5mC zu 5fC und 5caC oxidieren, welche von TDG erkannt und ausgeschnitten werden und durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt werden (He et al. 2011; Wu et al. 2014; Shen et al. 2013) Diese Theorie konnte allerdings nicht auf Zygoten übertragen werden, da die Expression von TDG in Oozyten oder Zygoten fraglich ist (H. Guo et al. 2014; Hajkova et al. 2010; Qian et al. 2015). Zudem zeigt der konditionelle knockout (Oozyten) von *Tdg* keine Auswirkung auf die globalen Level von 5fC/5caC (Immunfluoreszenz- Analysen) oder auf aktiv demethylierte Sequenzen (MAB- Sequenzierungsanalysen von paternal *Oct4*, maternal *Zbtb32*) (F. Guo et al. 2014). Einige Studien vermuten die Involvierung von UNG2, welches eine Spezifität gegenüber 5caC hat und an der aktiven Demethylierung bestimmter Sequenzen beteiligt ist (*L1*, *Nanog*, *DNMT3b*, *Zbtb32*) (Xue et al. 2016). Eine weitere Rolle können auch die NEIL Enzyme spielen, die in der Zygote exprimiert sind (eigene RT-PCR Daten) und die spezifisch 5hmC, 5fC und 5caC binden (Spruijt et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte durch die Überexpression der katalytischen Domäne von TET1 ein drastischer Methylierungsverlust beider parental Genome innerhalb von wenigen Stunden erzielt werden (Abbildung 3.3). Dieser Methylierungsverlust kann sowohl auf reiner Oxidation als auch auf Oxidation in Kombination mit Reparaturprozessen basieren. Um dies zu analysieren, wurde der Strangbruchmarker γ H2A.X mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Die Analysen zeigen, dass TET1CD präreplikativ, sowohl im maternalen als auch paternalen Genom, einen sehr starken Anstieg von γ H2A.X-Foci verursacht, welcher zeitlich mit dem Verlust von 5mC und dem Anstieg von 5hmC, 5fC und 5caC gekoppelt ist (Abbildung 8.4, Abbildung 8.10). Analysen in HEK293T Zellen, die zusätzlich TET1CD exprimieren, zeigen ein ähnliches Bild, nämlich einen starken Methylierungsverlust in Kombination mit einer Akkumulation von γ H2A.X-Foci (C. Jin et al. 2015). Auch Knockout-Studien von PGC7/Stella zeigen in Zygoten, dass der Anstieg von γ H2A.X mit dem fehlenden Schutz vor Oxidation und dem damit verbundenen Anstieg an 5hmC verbunden ist (Nakatani et al. 2015). Basierend auf den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen liegt also die Vermutung nahe, dass die Überexpression und der damit verbundene Anstieg von oxidierten Basen in Zygoten zur aktiven Demethylierung durch Reparatur führt.

In dieser Arbeit zeigen alle postreplikativ analysierten Zygoten, in welchen TET Varianten überexprimiert wurden, einen deutlichen Anstieg von 5hmC und auch 5fC und 5caC (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3). Allerdings zeigen ausschließlich Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, deutliche γ H2A.X-Signale in beiden Pronuklei (Abbildung 3.4). Der Unterschied im Überexpressionseffekt der verschiedenen TET Varianten liegt vor allem in den Mengen von 5mC und 5caC. Durch den fast gänzlichen Verlust von 5mC und dem enormen Anstieg von 5caC in beiden parental Genomen zeigt TET1CD eine unkontrollierte, effektive und schnelle Oxidationsaktivität. Da in der Zygote keine Transkription stattfindet, ist möglicherweise der Gehalt von maternaler mRNA und Proteinen der Glykosylasen zum Ausschneiden der oxidierten Basen gering. Somit kann nur eine definierte Menge ausgeschnitten werden, wodurch hohe Level 5hmC, 5fC und 5caC bestehen bleiben. Auch die Mengen der BER-Enzyme zur Reparatur der AP-Positionen und Einzel- und Doppelstrangbrüchen (SSBs/DSBs) sind mit aller Wahrscheinlichkeit nicht ausreichend, was zu einer Akkumulation dieser führt und durch die Akkumulation von γ H2A.X gekennzeichnet wird. Zygoten, in welchen TET3FL, TET1FL oder TET3CD überexprimiert wurde, zeigen keinen Anstieg der γ H2A.X-Foci. Dies könnte darauf basieren, dass der beobachtete geringere Anstieg der oxidierten Basen tolerierbar ist, sodass sie nicht verstärkt repariert werden und/oder die Reparatur nur bedingt verstärkt ist, γ H2A.X-Foci jedoch nicht akkumulieren. Um möglicherweise verstärkte (BER-) Reparaturmechanismen zu untersuchen, müssten Immunfluoreszenz-Analysen von Reparaturenzymen wie zum Beispiel APE1, Parp1, Lig3 oder XRCC1 (Wossidlo et al. 2010; Hajkova et al. 2010) vorgenommen werden und somit ihre Menge und ihre Lokalisation untersucht werden.

Eine weitere Theorie, neben der Toleranzschwelle gegenüber oxidierten Basen, könnte eine positionsbedingte Oxidation und Reparatur sein (Abbildung 4.2). So konnte in dieser Arbeit mittels

HPBS- Analysen gezeigt werden, dass nicht alle analysierten Sequenzen gleich stark von der Oxidation betroffen sind (Kapitel 4.1.4). Nur definierte Bereiche des Genoms sind Ziel der TET Enzyme, wobei TET1CD durch seine nicht regulierte Aktivität viele Bereiche, stark oxidieren kann (Kapitel 4.1.1 und 4.1.4) So konnten beispielsweise mittels Immunfluoreszenz- Analysen im 8- Zellembryo solche definierten Bereiche gefunden werden, welche 5fC und 5caC anhäufen (Abbildung 8.29, Abbildung 8.30). Möglicherweise werden auch Reparaturenzyme nur an definierte Sequenzen rekrutiert. Wenn diese Sequenzen überlappen, führt dies zur Oxidation mit darauffolgender Reparatur (TET1CD). Überschneiden sich die Sequenzen nicht, erfolgt auf erhöhte Oxidation keine Reparatur (TET3FL, TET1FL und TET3CD) (Abbildung 4.2).

Die Akkumulation der Strangbrüche führt zu einem Teilungsstopp der Zygoten (Tabelle 3.1 und Kapitel 4.1.5) und sie verweilen in der G2- Phase. In vielen in der G2- Phase arretierten 1-Zellembryonen sind 24 Stunden nach der Befruchtung die γ H2A.X- Foci fast komplett verschwunden, obwohl die 5caC- Level enorm bleiben (Abbildung 8.23, Abbildung 8.24). Dies zeigt einerseits, dass eine längere Wirkungszeit der Reparaturenzyme die DNA- Schäden beheben kann. Andererseits zeigt es, wie für die Überexpression von TET3FL, TET1FL und TET3CD, dass möglicherweise nach einer Reduktion der 5hmC-, 5fC- und 5caC- Level, die Zygoten gegenüber bestimmten Mengen tolerant sind und die Reparaturmechanismen reduziert werden. Die Reduktion der γ H2A.X- Foci nach 28hpf könnte auch darauf hindeuten, dass die Sequenzen, die für Oxidation und Reparatur zugänglich sind bzw. sich überlappen (Abbildung 4.1) sich wieder in ihrem epigenetischen Grundzustand befinden. Somit wird die Reparatur, trotz erhöhter Mengen von 5caC- in Sequenzen, die nicht für Reparatur zugänglich sind- reduziert.

Es lässt sich also festhalten, dass die beobachtete TET1CD- vermittelte starke Oxidation und der Methyierungsverlust in beiden parental Genomen der präreplikativen Zygote mit stark erhöhter Reparatur einhergehen, angezeigt durch γ H2A.X- Foci. Dies bedeutet, dass die Überexpression von TET1CD die aktive Demethylierung initiiert. Die Akkumulation der Strangbrüche in der Zygote (prä- und postreplikativ) basiert wahrscheinlich auf einer nicht ausreichenden Reparatur durch zu hohe Level von 5hmC, 5fC und 5caC und zu niedrigen Mengen von BER- Reparaturenzymen. Die Initiierung der Reparatur ist dabei wahrscheinlich abhängig von der Stärke der Oxidation und der Toleranz der Zygote gegenüber den erhöhten Mengen der oxidierten Basen. Zudem scheint die Oxidation mit darauffolgender Reparatur abhängig von der Position im Genom zu sein.

4.1.4 Die basengenaue Analyse der Demethylierung nach der Überexpression von TET in repetitiven Elementen

Die Analyse von Reprogrammierungsmechanismen in der frühen Embryonalentwicklung erfordert neben den Immunfluoreszenz- Analysen, die einen globalen Überblick über epigenetische Dynamiken im Genom geben, auch die Analyse auf Sequenzebene. So ist es möglich, molekulare Mechanismen, die der Reprogrammierung zu Grunde liegen, aufzudecken. Durch die limitierte Menge an Zellen und

der damit verbundenen geringen Menge an DNA waren solche Analysen lange Zeit schwierig. In den letzten Jahren wurde es durch die immer weiter fortschreitende Entwicklung neuer Technologien möglich, tiefere, sogar genomweite, Einblicke in die Reprogrammierungsmechanismen während der frühen Embryonalentwicklung zu erhalten (Smith et al. 2012; Peat et al. 2014; L. Shen et al. 2014). Die Immunfluoreszenz- Analysen wurden zu weiten Teilen ergänzt, modifiziert und detaillierter. Somit ist ein hoch komplexes Bild der Methylierungsdynamiken in der Zygote entstanden und das lange gegoltene Bild der aktiven Demethylierung des paternalen Genoms und der replikationsabhängigen Demethylierung des maternalen wurde revolutioniert. So konnte gezeigt werden, dass die Demethylierung in der Zygote zu großen Teilen auf einem replikationsabhängigen Mechanismus beruht. Dieser erfolgt zu großen Teilen TET3- unabhängig, kann aber durch TET3 und die oxidierten Basen unterstützt bzw. erleichtert werden (Shen et al. 2014; von Meyenn, Iurlaro, et al. 2016; von Meyenn, Berrens, et al. 2016) (Kapitel 1.7). Die aktive Demethylierung mittels Reparaturwege erfolgt sequenzspezifisch und ist abhängig von TET3 (Peat et al. 2014; Wang et al. 2014; L. Shen et al. 2014; Arand et al. 2015; Hashimoto et al. 2012). Dabei oxidiert TET3 5mC zu 5hmC, 5fC und 5caC, woraufhin diese von Reparaturenzymen ausgebaut und mittels BER durch ein unmodifiziertes Cytosin ersetzt werden können (Wossidlo et al. 2010; Wossidlo et al. 2011; Hajkova et al. 2010; Xue et al. 2016; Santos et al. 2013).

Um einen tieferen Einblick in die Dynamiken der TET Enzyme, deren Rolle in der aktiven und passiven DNA Demethylierung und dem Zusammenspiel mit den DNMTs und dem damit verbunden komplexen Prozess des Erhalts, des Löschens und des Neuetablieren von epigenetischen Mustern zu bekommen, wurden Hairpin- Bisulfit- Analysen (HPBS) angewendet. Dabei sind die beiden komplementären DNA-Stränge über ein Linkeroligonukleotid miteinander verbunden, wodurch die CpG- Positionen beider Stränge gleichzeitig analysiert werden können und somit komplexe De- und Re-Methylierungsdynamiken aufgeklärt werden können. Da nur sehr wenig DNA zur Verfügung stand, wurden die repetitiven Elemente mSat, Line1 und IAP untersucht, da diese 1000-fach im Genom vertreten sind (Kapitel 3.1.6). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss darauf geachtet werden, dass 5hmC mit der herkömmlichen Bisulfitbehandlung nicht konvertierbar ist und dadurch nicht von 5mC unterschieden werden kann. 5fC und 5caC hingegen werden größtenteils konvertiert und können demnach nicht von unmethyliertem Cytosin unterschieden werden. Mit der hier verwendeten Bisulfitbehandlung (ZymoGold) ist die Konvertierung von 5caC komplett, die von 5fC liegt jedoch nur bei 60%. Somit bilden sich folgende Fraktionen 5mC/5hmC+40%5fC und C/5caC+60%5fC (Tabelle 3.6). Beim Vergleich der HPBS- Daten der Kontrolle (ICSI) dieser Studie mit den Daten von IVF- Zygoten von Arand et al. 2015 (Tabelle 8.6) wird deutlich, dass weder die Injektion von mRNA, noch die darauffolgende Inkubation und ICSI einen deutlichen Einfluss auf die Methylierung haben. Die prozentualen Werte der Gesamtmethylierung von mSat und IAP stimmen fast übereinstimmen. Die Werte für die Line1 Elemente variieren zwischen den Studien, was auch darauf zurückzuführen ist, dass in dieser Studie die Anzahl von analysierten Sequenzen für diese Region gering ist. Auch die Werte für

die hemimethylierten Positionen (postreplikativ) aller analysierten Elemente variieren, wobei der typische Anstieg nach der Replikation in beiden Studien immer vorhanden ist. Die deutlichen Variationen basieren erstens auf der Berechnung von Arand et al. 2015, bei der die hemimethylierten Positionen in Relation zu allen methylierten Positionen gesetzt wurde, was kleine Abweichungen der absoluten Werte groß erscheinen lässt. Zudem gab es Unterschiede im Zeitpunkt des Sammelns der Zygoten (präreplikativ- Arand 2015: bis 7,5hpf, in dieser Studie: 5- 6,5hpf; postreplikativ- Arand 2015: 14hpf, in dieser Studie: 12hpf). Auch hat möglicherweise die geringe und variable Anzahl der zur Verfügung stehenden Zygoten einen Einfluss (Arand 2015 verwendet 4-20 Zygoten, in dieser Studie 2-6 Zygoten). Zudem wurden bei Arand 2015 Zygoten der Kreuzung F1(C57BL/6xCBA) verwendet und in dieser Arbeit F1(C57BL/6xDBA), wodurch geringe Methylierungsunterschiede auf die spezifischen Kreuzungen zurückzuführen sind.

Betrachtet man nun die HPBS- Analysen der Zygoten, in welchen TET überexprimiert wurde (Abbildung 3.10, Abbildung 3.11, Abbildung 3.12, Abbildung 3.13, Abbildung 3.14, Abbildung 3.15), fällt auf, dass es starke Unterschiede im Einfluss der verschiedenen TET Varianten auf die unterschiedlichen repetitiven Elemente gibt. Der Effekt der TET Enzyme ist postreplikativ am stärksten ausgeprägt was folgende Gründe haben kann. Erstens, ist durch die Verdoppelung der Zeit vor dem Sammeln der Zygoten (von 6hpf auf 12hpf), die Zeit der Oxidationsaktivität größer. Dadurch kann der im Bisulfit detektierte Effekt von 5mC/5hmC (methyliert) zu 5fC/5caC (unmethyliert) vergrößert werden. Zweitens steht durch die verlängerte Wirkungsphase der TET Enzyme auch der Reparaturmaschinerie mehr Substrat und Zeit zur Verfügung. Und drittens ist zum Zeitpunkt 12hpf die Replikation vollzogen. Somit könnte durch das vermehrte Auftreten von oxidierten 5mC Derivaten während der Replikation die Erhaltungsmethyltransferase inhibiert werden. *In vitro* Analysen zeigen nämlich, dass die Aktivität von DNMT1 durch das Ersetzen von 5mC durch 5hmC um das 60- Fache reduziert wird (Hashimoto et al. 2012). 5fC und 5caC haben einen noch stärkeren negativen Effekt auf die Erhaltung der Methylierung, sogar auf CpGs, die sich lediglich in Nachbarpositionen befinden (Ji et al. 2014). Damit sind die drei möglichen Mechanismen beschrieben, durch die es zu den TET- abhängigen Effekten in den untersuchten repetitiven Elementen kommen kann: der oxidative Effekt (aktiv), der Reparatur-Effekt (aktiv) und der replikationsabhängige Effekt (passiv).

mSats

Für mSats ist die Übereinstimmung der HPBS- Daten und des Methylierungsmusters der Kontrollzygoten dieser Arbeit mit denen von Arand et al. 2015 sehr groß (Tabelle 8.6). Damit kann auch in dieser Studie gezeigt werden, dass die Sequenzen von mSat in der Kontrollgruppe passiv demethyliert werden. Dies ist durch den Verlust von Vollmethylierung und durch die auf dem oberen und unteren Strang zu gleichen Teilen auftretenden hemimethylierten CpG Positionen gekennzeichnet. Das Vorhandensein eines Anteils von Vollmethylierung zeigt aber, dass Erhaltungsmethylierungsaktivität vorhanden sein muss. Wie Immunfluoreszenz- Analysen zeigen (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3), können die Level von 5hmC, 5fC und 5caC global durch die

Überexpression von TET erhöht werden und somit potenziell einen Einfluss auf die Erhaltungsmethylierungsaktivität nehmen. Es wäre demnach zu erwarten gewesen, dass durch die erhöhte Menge von oxidierten Basen die Erhaltungsmethylierungsaktivität, durch vermindertes Binden von DNMT1 an die DNA, reduziert ist. Demnach würde die Vollmethylierung gegenüber der Kontrolle sinken, die Hemimethylierung steigen. Betrachtet man nun die HPBS- Daten von Zygoten, in welchen die TET Varianten überexprimiert wurden (Abbildung 3.10, Abbildung 3.13), ist bei Betrachtung der Methylierungsmuster nur ein sehr milder Effekt der Überexpression zu erkennen. Die erkennbaren Effekte in der Darstellung der relativen Werte basieren auf eben dieser Art der Darstellung. Die Überexpression von TET3FL und TET1FL führt zu einem leichten Anstieg der Gesamt- und einer Abnahme der Hemimethylierung und zeigt, wie oben beschrieben eine TET- bedingte *de novo* Methylierung (Seite 110). Nach der Überexpression von TET3CD und TET1CD bleibt die Vollmethylierung unverändert und die Hemimethylierung nimmt etwas ab. Es kommt nicht zu einer Veränderung der Methylierungsmuster. Diesen Daten zufolge stellen mSats also keine starke Zielsequenz der TET Enzyme dar und selbst die Überexpression der deregulierten TET1CD- Variante zeigt nur einen milden Effekt. mSats durchlaufen demnach also eine TET- unabhängige, aber replikationsabhängige Demethylierung. Unterstützt wird diese Theorie durch genomweite Bisulfitanalysen von *TET3* Knockout Zygoten (analysiert nach der Replikation), die zeigen, dass auch durch das Ausschalten von TET3 keine Veränderung des Methylierungslevels der mSats zu erkennen ist (Peat et al. 2014). Zudem zeigen CHIP- Analysen in ESCs, dass endogenes TET1 nicht mit mSats interagiert (de la Rica et al. 2016). Betrachtet man die HPBS- Analysen von Zygoten, die TET1CD überexprimieren und mit Aphidicolin behandelt wurden, zeigt sich ein interessantes, komplexes Bild (Abbildung 3.17). Die Erklärungen hierfür sind in Kapitel 4.1.4.1 zu finden.

L1

Frühere Bisulfitanalysen der L1 Elemente in der Zygote zeigen eine deutliche Demethylierung und weisen auf einen aktiven Mechanismus hin (Kim et al. 2004; Lane et al. 2003). Auch neuere Studien ordnen diesen Elementen eine TET3- vermittelte aktive Demethylierung zu, denn es konnte ein starker Anstieg von 5hmC zwischen PN2 und PN5 in L1 beobachtet werden (P. Zhang et al. 2012). Zudem wurde gezeigt, dass der KO von *TET3* zu erhöhten Methylierungsleveln führt (Gu et al. 2011). Arand et al. haben durch das Blockieren der Replikation und durch das Blockieren jeglicher Remethylierungsmechanismen hingegen gezeigt, dass L1 einer replikationsabhängigen Demethylierung mit gleichzeitiger Teilremethylierung unterliegt und nur ein geringer Teil der Demethylierung auf aktive Mechanismen zurückzuführen ist (Arand et al. 2015). L1 Elemente unterliegen also komplexen De- und Remethylierungsdynamiken.

Die Analyse der Zygoten, in welchen die TET Varianten überexprimiert wurden, zeigt, dass die TET Varianten einen postreplikativen Einfluss auf die Methylierung von L1 haben. Je nach Variante variiert dieser jedoch in seiner Ausprägungsform und Stärke.

Die Überexpression von TET3FL zeigt in Relation zur Kontrolle einen deutlichen postreplikativen Verlust der Gesamtmethylierung (-31,9%), der auf der Abnahme von voll- (-40,1%) und hemimethylierten Positionen (-12,2%) beruht (Abbildung 3.11, Abbildung 3.14). Dadurch, dass durch Immunfluoreszenz-Analysen ein deutlicher Anstieg von 5caC gezeigt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Verlust der Methylierung hier vorwiegend auf dem oxidativen Effekt basiert, bei dem 5mC zu großen Teilen zu 5caC (in Bisulfitanalysen unmethyliert dargestellt) oxidiert wird. Dies wird unterstützt durch den Anstieg des mosaikalen Musters und lässt auf eine Demethylierung durch eine distributive Oxidation schließen (Kapitel 1.5) (Tamanaha et al. 2016; Xu et al. 2014). Zudem können auch Reparaturmechanismen mitwirken (Hajkova et al. 2010; Wossidlo et al. 2010), die das mosaikale Muster hervorrufen. Die Reparatur müsste sich jedoch mehr auf 5hmC und weniger auf 5fC (wird zu 60% als unmethyliert dargestellt) beziehen. Da 5caC als unmethyliert dargestellt wird, ist seine Reparatur nicht detektierbar. Allerdings führt 5caC zu deutlichen Einschränkungen der Erhaltungsmethylierungsaktivität (Ji et al. 2014). Liegt nun 5caC in erhöhten Leveln vor, kann sich die Erhaltungsmethylierungsaktivität sehr mindern. Somit könnte durch die Überexpression auch eine Kombination aus Oxidation und eingeschränkter Erhaltungsmethylierung zu einer Demethylierung führen.

Ausschließlich die Überexpression von TET1FL führt zu einer detektierbaren replikationsabhängigen Demethylierung, die auf der Zunahme der oxidierten Basen beruht (Abbildung 3.11). Diese ist gekennzeichnet durch die Abnahme der Vollmethylierung (-26,1%) und die, im Vergleich zur Kontrolle, deutliche Zunahme von hemimethylierten Positionen (+30,7%). Bei den zusätzlichen hemimethylierten Positionen muss es sich um 5hmC handeln, da es im Gegensatz zu 5fC/5caC nach der Bisulfidbehandlung als methyliert dargestellt wird. Interessanterweise befinden sich die zusätzlichen (hydroxy)methylierten CpGs der hemimethylierten Positionen vorzugsweise auf einem der beiden Stränge (kontinuierliche Methylierung), was auf eine mögliche Strangspezifität und prozessiven Mechanismus von TET1FL in L1 hinweisen könnte (Kapitel 1.5). Um dazu aber genauere Aussagen machen zu können, müssten die Experimente wiederholt werden.

Die Überexpression von TET3CD führt zum gleichen Effekt, wie die von TET3FL (Gesamtmethylierung -25,4%, Vollmethylierung -20,5% und Hemimethylierung -37,1%, Abbildung 3.14). Der Effekt von TET3FL auf die Voll- und Hemimethylierung ist jedoch interessanterweise etwas stärker ausgeprägt. Dies könnte bedeuten, dass die CxxC Domäne von TET3FL eine Spezifität gegenüber der Sequenz von L1 besitzt und TET3FL somit effektiver die Oxidation von 5mC und damit die Demethylierung bedingt. Der Einfluss von TET1CD zeigt sich in einem starken Verlust der Methylierung (Gesamtmethylierung -38,5%, Vollmethylierung -29,8% und Hemimethylierung -60,5%, Abbildung 3.14). Dies kann auf einer sehr effektiven Oxidation von 5mC, mit möglicher folgender Reparatur basieren. Dieser Mechanismus müsste sich sehr schnell vollziehen, da es nicht zu einem Anstieg des charakteristischen mosaikalen Musters kommt. Die nach dem Bisulfit als unmethyliert dargestellten Sequenzen könnten aber auch mit 5caC angereichert sein (5caC wird nach der Bisulfidbehandlung als unmethyliert dargestellt). Diese

Annahme wird durch globale Immunfluoreszenz- Analysen unterstützt (Abbildung 3.3), die zeigen, dass 5mC schnell und zu hohen Levels in 5caC umgewandelt wird (hier wahrscheinlich vermehrt auf beiden Strängen, Abbildung 3.3). Zwar ist L1 Ziel der *de novo* Methylierung (Arand et al. 2015), sind die CpG-Positionen nicht demethyliert, sondern carboxyliert, ist kein Substrat für eine Remethylierung vorhanden. Somit sprechen die fehlende Remethylierung und das Fehlen von einem mosaikalen Muster für eine effektive Oxidation mit Akkumulation von 5caC und damit für eine nicht komplette Demodifizierung. Diese Theorie müsste mit MA- HPBS- Sequenzierungsanalysen überprüft werden. Die Überexpression von TET1CD suggeriert also eine starke Demethylierung, obwohl es möglicherweise zu einer Akkumulation von 5caC kommt. 5caC kann auch hier einen Einfluss auf die Erhaltungsmethylierung haben, was aber wie auch für TET3FL und TET3CD nicht durch Bisulfitanalysen detektiert werden kann. Möglicherweise wird ein Teil dieser 5caC- Positionen repariert, was wiederum durch die hier verwendete Bisulfit- Methode nicht sichtbar wird. Eine verstärkte Reparatur von 5hmC/5fC ist hier unwahrscheinlich, da es nicht zu einem Anstieg an mosaikalen Mustern kommt. Um eine genauere Aussage über die 5fC- oder 5caC- Level nach der Überexpression der verschiedenen TET Varianten machen zu können, müssten caCab- oder fCab-Analysen vorgenommen werden, die sehr materialintensiv sind.

Es kann also festgehalten werden, dass die Überexpression von TET Enzymen zu einem Methylierungsverlust führt, wobei jedoch 5caC möglicherweise als Endprodukt der Oxidationskette akkumulieren kann. So liegen L1 zwar hypomethyliert vor, eine Demodifizierung findet hier aber nicht zwangsläufig statt. Einhergehend mit dieser Beobachtung zeigt die Analyse von L1 in *TET1/TET3* DKO Blastozysten, dass die TET Enzyme *in vivo* für die Hypomethylierung von L1 verantwortlich sind (de la Rica et al. 2016). Zudem werden die generierten Ergebnisse durch die ChIP- Analysen in ESCs unterstützt, die eine Anreicherung von TET1 und TET2 in der 5'UTR von L1Tf zeigen. Beide TET Enzyme sind hier für die Hypomethylierung verantwortlich, wobei TET2 einen stärkeren oxidativen Effekt ausübt (de la Rica et al. 2016). Solche Unterschiede in der oxidativen Aktivität konnten auch für alle überexprimierten TET Varianten in Zygoten gezeigt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die oxidierten Basen die Erhaltungsmethylierung inhibieren, wodurch die DNA- Methylierung mit der Replikation „verdünnt“ wird. Dieser Effekt wird durch die Überexpression von TET1FL sehr deutlich. So zeigen die Überexpressionsexperimente, dass prinzipiell eine Kombination aus aktiven Mechanismen (Oxidation und Reparatur) und passiven Mechanismen (Inhibition der Erhaltungsmethylierung durch oxidierte Basen während der Replikation) zur Demethylierung von L1 führen kann. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit den bisherigen Theorien zur Methylierungsdynamik von L1 (Arand et al. 2015; Wang et al. 2014).

IAP

IAPs sind eine besondere Form der repetitiven Elemente. Sie werden, wie imprintete Gene, während der Reprogrammierung in der Zygote nicht demethyliert (Lane et al. 2003; Wossidlo et al. 2010; Smith et al. 2012; Arand et al. 2015; Kim et al. 2004). Sie sind dabei durch Stella/PGC7 vor Hydroxylierung

und Demethylierung geschützt (Nakamura et al. 2006). Der Effekt des *TET3* KOs in der Zygote fällt für die IAPs dementsprechend mild aus (Peat et al. 2014; L. Shen et al. 2014).

IAPs sind sowohl in Oozyten als auch in Spermien hypermethyliert (Arand et al. 2015; Wang et al. 2014; Kim et al. 2004). Nach der Replikation in der Zygote bleibt ein sehr großer Teil der CpGs vollmethyliert, mit einem geringen Anstieg von hemimethylierten Positionen und einem deutlichen Anstieg des mosaikalen Musters (Arand et al. 2015). Diese beiden Beobachtungen deuten neben einer leichten passiven Demethylierung auf eine Remethylierung hin. Die Daten der Kontrollzygoten dieser Arbeit zeigen sogar einen leichten postreplikativen Methylierungsanstieg (Abbildung 3.12), was ein Zusammenspiel von Demethylierung und Remethylierung unterstreicht und sogar *de novo* Methylierung (DNMT3a) dieser Elemente vermuten lässt. Der Anstieg der Gesamtmethylierung kann auch in Kontrollembryonen beobachtet werden, deren Replikation durch Aphidicolin blockiert ist (Abbildung 3.17), was die Methylierung durch DNMT3a wahrscheinlich macht. Die Methylierungslevel und -muster sind in Zygoten, in welchen *TET3FL* oder *TET1FL* überexprimiert wurde, durch einen leichten postreplikativen Verlust der Gesamtmethylierung in Relation zur Kontrolle gekennzeichnet (*TET3FL* -8,3, *TET1FL* -5,7). Veränderungen der Methylierungsmuster sind nicht zu erkennen. Die CxxC Domäne bindet schlechter an methylierte als an unmethylierte Sequenzen (Jin et al. 2016; Jin et al. 2014), wodurch der nur milde Verlust erklärbar wäre, da die Grundlevel von 5mC in IAP hoch sind. Dadurch werden an diesen Elementen wenig oxidierte Basen generiert, die auf die Methylierungsdynamik Auswirkungen haben oder die Reparatur aktivieren. Der in *TET3* KO Zygoten erkennbare nur milde Anstieg der Methylierungslevel von IAPs (ca. 7%) passt zu dieser Beobachtung (Peat et al. 2014).

In den Zygoten, welche *TET3CD* überexprimieren, zeigen präreplikativ einen leichten Anstieg der Gesamtmethylierung in Relation zur Kontrolle (+5,6%). Dies basiert wahrscheinlich auf einem technischen Artefakt. In den Zygoten, in welchen *TET1CD* überexprimiert wurde, ist kein präreplikativer Effekt zu detektieren. *TET3CD* und *TET1CD* erzielen postreplikativ die gleichen Effekte, in gleicher Stärke. Es ist ein deutlicher Verlust der Gesamtmethylierung zu detektieren (*TET3CD* und *TET1CD* -17,3%), wobei die Hemimethylierung etwas erhöht wird (*TET3CD* +17,7%, *TET1CD* +30,5%) und das Muster mosaikaler wird (*TET3CD* +38,8%, *TET1CD* +42,5%). Dies deutet auf einen distributiven Oxidationsprozess hin (Kapitel 1.5), der möglicherweise durch Reparaturmechanismen unterstützt wird. Der Demethylierungsschutz (PGC7/Stella) kann also übergangen werden und die IAPs werden augenscheinlich nicht wieder remethyliert. Dies kann auf einer fehlenden Erhaltungsmethylierungs- oder *de novo* Methylierungsaktivität gegenüber IAPs in postreplikativen Zygoten, in welchen *TETCD* überexprimiert wurde, basieren, was jedoch als unwahrscheinlich erscheint (siehe postreplikative Kontrollzygoten). Möglich wäre hingegen, dass 5caC akkumuliert und nicht wie ein Cytosin remethyliert werden kann.

Die Daten dieser Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit Peat et al., dass IAPs Zielsequenzen von *TET3* sind und, wie in Arand et al. beschrieben, einem starken De- und Remethylierungsmechanismus

unterliegen. Der Methylierungsverlust nach der Überexpression natürlich im Embryo vorkommender TET Enzyme (TET3FL, TET1FL) ist mild, was auf der CxxC Domäne gesteuerten Bindung beruhen kann. Durch die Überexpression von TET3CD/TET1CD verlieren die IAPs hingegen deutlich Methylierung. Neben den IAPs sind auch imprintete Gene vor der Demethylierung (PGC7/Stella, DNMT1) während der Reprogrammierung geschützt (Kurihara et al. 2008; M. Cecilia Cirio et al. 2008; M Cecilia Cirio et al. 2008; Hirasawa et al. 2008; Nakamura et al. 2006). Eine Analyse dieser Regionen in Zygoten, in welchen TET überexprimiert wurde, wäre von Interesse, um tiefer in die Rolle von TETCD und TETFL während der Reprogrammierung einblicken zu können.

Die HPBS- Daten zeigen im Vergleich zu den durch Immunfluoreszenz- Analysen generierten Bildern, die enorme globale Effekte der Überexpression zeigen, einen eher milden Effekt auf die repetitiven Elemente. Diese Dissonanz beruht auf der Sensitivität der Antikörper. Diese ist sehr hoch, sodass auch geringe Mengen 5hmC, 5fC und 5caC im Genom detektiert werden, wohingegen die tatsächlichen Mengen der oxidierten Basen eher gering und sequenzspezifisch sind (Kapitel 1.5.2). Zudem kann die hier angewendete Bisulfitmethode weder 5mC von 5hmC noch 5fC von 5caC und Cytosine unterscheiden. Jedoch fehlen bisweilen basengenaue Analysen, die den Grad der Oxidation und die oxidierten Sequenzen in geringen DNA- Mengen, wie Zygoten und präimplantive Embryonen, bestimmen. Zwar gibt es heute einige Methoden, um 5hmC (oxBis), 5fC (fCab) und 5caC (caCab) zu analysieren (Booth et al. 2014; Wu et al. 2014; Booth et al. 2013), sie verursachen jedoch eine starke Degradation der DNA und sind deshalb bisher für geringe DNA Mengen nicht gut geeignet. MAB-Sequenzierung hingegen basiert auf einer enzymatischen Reaktion und ermöglicht die Analyse von 5fC und 5caC. Dies konnte aus Zeitgründen nicht bewerkstelligt werden, wurde aber für Zygoten angewendet, in welchen TDG überexprimiert wurde (Kapitel 3.2.7 und 4.2.3).

Abschließend und im Vergleich zu *TET3* KO Bisulfitanalysen (Peat et al. 2014) kann man sagen, dass die HPBS- Analysen dieser Arbeit wie auch die *TET3* KO Daten zeigen, dass die analysierten repetitiven Elemente sehr unterschiedliche Zielsequenzen für die TET Enzyme und DNA modifikationsrelevante Enzyme (DNMT, BER) darstellen (siehe auch Kapitel 4.1.3). Diese Elemente sind deshalb von dem *TET3* KO oder einer Überexpression der TET Varianten unterschiedlich stark betroffen. Durch die unterschiedliche Aktivität der TET Varianten auf die jeweiligen Elemente unterliegen die Sequenzen auch unterschiedlichen Mechanismen der De- und Remethylierung. Somit unterstützen die HPBS- Daten dieser Arbeit die Theorie der sequenzspezifischen passiven und/oder aktiven Demethylierung (Arand et al. 2015; Peat et al. 2014; F. Guo et al. 2014). Die analysierten repetitiven Elemente sind zwar über das ganze Genom verteilt und damit für globale Mechanismusanalysen gut geeignet, sie sind aber sehr spezifisch (z.B. Lokalisation- Eu- oder Heterochromatin, Schutz vor Demethylierung). Um das Bild der TET Überexpressions- HPBS- Sequenzierungsanalysen zu komplettieren, wäre es sehr sinnvoll, Einzelkopie- Gene mittels HPBS in Zygoten, welche TET Enzyme überexprimieren, zu analysieren. Mögliche Kandidaten wären hier das *Oct4* und das *Nanog* Gen, welche ein direktes Ziel von TET1 und TET3 sind (Gao et al. 2013; Gu et al. 2011). Dies ist bisher leider nicht möglich, da die DNA- Mengen

sehr limitiert sind. Natürlich wäre es auch sehr erstrebenswert, die Methoden zur Sequenzierung von oxidierten 5mC- Derivaten in Zygoten zu etablieren. Zum ersten um einen allgemeinen Überblick über die in den repetitiven Elementen befindlichen Level von 5hmC, 5fC und 5caC zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln und zum zweiten, um die Effekte von (TET-) Überexpressionsexperimenten genauer zu definieren. Wenn es gelingen würde, die Methoden der Bestimmung der oxidierten Basen genomweit oder in Kombination mit RRBS anzuwenden, wäre ein globaler Überblick über die Level von 5hmC, 5fC und 5caC im präimplantiven Embryo möglich. So könnten weitere Aufschlüsse über die Mechanismen und die zeitliche Regulation der Methylierungsdynamiken und letztendlich auch über den Einfluss von überexprimierten Enzymen gegeben werden. Auch hier müssen die Methoden weiter optimiert werden, da aufgrund des limitierten Materials und der starken bisulfidbedingten Degradation eine hohe Sequenzierungsleistung erfolgen muss. Erste genomweite TAB- Seq- und fCab- Analysen von 2- Zellembryonen wurden bereits veröffentlicht. Sie zeigen, dass 5hmC und 5fC sowohl im maternalen als auch paternalen Genom vorkommen, wie erwartet zu geringen Mengen (5hmCpG aller Cytosine im CpG Kontext: durchschnittlich 2,0% maternal und 4,9% paternal; 5fCpG aller Cytosine im CpG Kontext: durchschnittlich 2,8% maternal und 2% paternal). (Wang et al. 2014).

4.1.4.1 Inhibition der Replikation – Der Einfluss von Aphidicolin auf die Zygoten, welche TET1CD überexprimieren

Um eine eindeutige Aussage darüber zu machen, ob der beobachtete Methylierungsverlust nach der Überexpression von TET1CD auf replikations- oder reparaturabhängige Mechanismen zurückzuführen sind, wurde die Replikation geblockt. Dazu wurde Aphidicolin verwendet, welches replikative Polymerasen blockiert. Aphidicolin ist ein Basenkompetitor und verdrängt Cytosin vom aktiven Zentrum der DNA- Polymerase, wodurch ihre Aktivität inhibiert wird. Es wurden HPBS- Analysen von mSat und IAP von prä- und postreplikativen Zygoten der Kontrolle und von Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, vorgenommen. Die erhobenen Daten zeigen für die Kontrolle das erwartete Bild des fehlenden Methylierungsverlust und der fehlenden Anreicherung von hemimethylierten Positionen. Für die Zygoten, die TET1CD überexprimieren, wäre zu erwarten gewesen, dass durch das Fehlen der Replikation auch der replikationsabhängige Methylierungsverlust fehlt. Der dann noch zu detektierende Methylierungsverlust wäre auf Reparatur zurückzuführen. Die Methylierungslevel wären im Vergleich zu Zygoten, die die Replikation durchlaufen, höher. Die HPBS- Daten zeigen jedoch einen unerwartet starken Methylierungsverlust, sowohl in mSats als auch in IAPs, zu beiden analysierten Zeitpunkten (6hpf und 12hpf) (Abbildung 3.17). In mSat ist ein sehr deutlicher Verlust der Vollmethylierung (präreplikativ von 21% auf 6%, postreplikativ von 26% auf 8%) und ein Anstieg der Hemimethylierung (präreplikativ von 2% auf 6%, postreplikativ von 3% auf 5%) zu erkennen. Das gleiche kann für IAPs beobachtet werden (Vollmethylierung präreplikativ von 69% auf 36%, postreplikativ von 85% auf 21%; Hemimethylierung präreplikative von 6% auf 16%, postreplikativ von 2% auf 13%). Da Immunfluoreszenz- Analysen von postreplikativen Zygoten keinen Einfluss von

Aphidicolin auf den Gehalt von 5hmC oder 5caC zeigen (Tabelle 8.12), kann ein direkter Effekt von Aphidicolin auf die katalytische Aktivität von TET1CD ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse sind demnach folgendermaßen zu erklären. Da Aphidicolin neben der Aktivität der Polymerase α auch die Aktivität der DNA-Reparatur-Polymerasen Pol δ und Pol ϵ blockiert, wird auch die LP-BER blockiert (Abbildung 1.9 und Kapitel 4.1.4.1). Die LP-BER scheint basierend auf Immunfluoreszenz-Analysen, die einen Ausschluss der Pol β aus den Pronuklei zeigen (Wossidlo et al. 2010), einen deutlichen Anteil der BER in der Zygote zu übernehmen. Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, führt die Überexpression von TET1CD zu einer starken Aktivierung der Reparatur. Durch die Aphidicolinbehandlung ist keine vollständige Reparatur von oxidierten Basen mit anschließender Remethylierung möglich. Stattdessen akkumulieren AP-Positionen bzw. Strangbrüche. Die zu analysierenden DNA-Abschnitte können durch die Strangbrüche nicht mittels PCR amplifiziert werden. Dadurch werden nur Fragmente, die vorher unmethyliert waren und demzufolge weder oxidiert noch repariert wurden, amplifiziert und sequenziert.

So kann mit diesen Ergebnissen indirekt die TET1CD-vermittelte Initiierung der Reparatur und damit die aktive Demethylierung von mSat und IAP in Zygoten, die TET1CD überexprimieren, gezeigt werden. Auch zeigen die Ergebnisse die Involvierung der LP-BER bei diesem aktiven Demethylierungsmechanismus. Dies rückt die NEIL1 Glykosylase in den Fokus dieses Mechanismus, denn sie kann mit allen oxidierten 5mC-Derivaten interagieren, die LP-BER einleiten und mit verschiedenen Enzymen dieser interagieren (Muralidhar L. Hegde et al. 2008; Spruijt et al. 2013). KD-Experimente könnten hier zu Aufklärung beitragen.

Betrachtet man unter den oben beschriebenen Voraussetzungen die HPBS-Daten von Zygoten, die TET1CD überexprimieren- ohne Aphidicolinbehandlung (**Abbildung 3.13, Abbildung 3.15**) - zeigen diese also, dass ein schneller und effektiver Reparatur-Remethylierungsmechanismus teilweise die Methylierungslevel von IAP und sehr stark die von mSat aufrechterhalten. Dies ist wiederum ein deutlicher Hinweis auf Remethylierungsaktivität in der Zygote.

In Aphidicolin-behandelten Zygoten der Kontrolle ist kein Methylierungsverlust zu beobachten. Lediglich der typische Aphidicolin-bedingte postreplikative Nichtverlust der Vollmethylierung und Nichtanstieg der Hemimethylierung sind zu beobachten. Das zeigt, dass mSat und IAP keine Zielsequenz der endogenen TET Enzyme sind, sehr wohl aber der überrepräsentierten Variante TET1CD. Ihr potentieller Schutzmechanismus vor Oxidation kann also durch die Überrepräsentation von TET1CD übergangen werden.

Biologisch gesehen ist ein starker Remethylierungsmechanismus von mSat sehr sinnvoll, da diese in der Zygote, anderes als in somatischen Zellen, hypomethyliert vorliegen. Da sie in zentromerischen Regionen lokalisiert sind, könnte es für den Embryo verheerend sein, wenn mSats ihre Methylierung verlieren würden, da damit die Stabilität der Heterochromatin- und Chromosomen-Struktur und eine korrekte mitotische Teilung in Gefahr wären (Probst & Almouzni 2011; Jachowicz et al. 2013).

4.1.5 Das epigenetische Gleichgewicht und das Entwicklungspotenzial

In den meisten Studien wird das Fehlen der TET Enzyme in verschiedenen Zelltypen oder auch in der embryonalen Entwicklung untersucht. Der Verlust eines einzelnen TET Enzyms hat auf die präimplantive Entwicklung keine Auswirkungen und zeigt auch in der folgenden Entwicklung nur milde Effekte, was auch zeigt, dass die TET Enzyme einander kompensieren können (Kapitel 1.5.1). So ist der Verlust von *TET1* mit kleinerer Körpergröße und Subfertilität verbunden (Dawlaty et al. 2011; Yamaguchi et al. 2013). Der Knockout von *TET2* wirkt sich vor allem auf das hematopoetische System aus. Die Mäuse sind überlebensfähig, erkranken jedoch 4-6 Monate nach der Geburt an letalen Leukämien (Li et al. 2011; Moran-Crusio et al. 2011; Quivoron et al. 2011). Der Knockout von *TET3* führt zwar zur Entwicklung von lebensfähigen Mäusen, jedoch in geringerer Zahl und mit Subletalität (Gu et al. 2011; Tsukada et al. 2015), wobei der heterozygote *TET3* Knockout eine Haploinsuffizienz aufweist, die unabhängig von der 5mC- Oxidation in der Zygote ist (Inoue et al. 2015). Auch der DKO von *TET1* und *TET2* hat keine starken Auswirkung auf die Entwicklung (Dawlaty et al. 2013). Einzig der DKO von *TET1* und *TET3*, den zwei präimplantiv exprimierten TET Enzymen, kann nicht kompensiert werden. Dieser führt zu Einschränkungen in der Entwicklung, welche sich durch reduziertes Bilden von 8- Zellembryonen und die Absorption an E10.5 äußern (Kang et al. 2015). Das Generieren von TKO Mäusen ist demnach nicht möglich (Dawlaty et al. 2014).

Im Gegensatz zu Knockout- Studien wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der Überexpression der TET Enzymvarianten in Embryonen auf ihre Entwicklung analysiert (Tabelle 3.1). Die Kontrollgruppe erreicht zu 100% das 2- Zellstadium. Die Überexpression von *TET1FL*, *TET3CD* und *TET3FL* führt zu einer leichten Einschränkung der ersten Zellteilung. Für Embryonen, welche *TET1CD* überexprimieren, liegt die Teilungsrate nur bei 14,8%, wobei die Replikation unbeeinflusst von der Oxidation statt (Abbildung 8.3). Die starke Einschränkung der ersten Zellteilung basiert wahrscheinlich auf einer Oxidationsbedingten starken DNA- Reparatur (Abbildung 3.4). Die Reparaturmaschinerie der Zygote scheint auf solche hohen Mengen von 5hmC, 5fC, 5caC und Strangbrüchen nicht ausgelegt zu sein, wodurch eine Akkumulation dieser entsteht (γ H2A.X- Foci). Eine solche Akkumulation wird jedoch nicht in Zygoten gefunden, welche die anderen TET Varianten überexprimieren (Abbildung 3.4). Demnach scheint eine mildere Erhöhung der Level der oxidierten Basen eine vollständige Reparatur zu erlauben. Es könnte jedoch auch durch die nicht- Überlappung der Oxidations- und Reparaturpositionen eine verstärkte Reparatur verhindert werden (Abbildung 4.2, Kapitel 4.1.3). Durch die DNA- Strangbrüche in *TET1CD* überexprimierenden Zygoten werden Signalkaskaden ausgelöst, woraufhin die Zygote an der Grenze von G2- zu Metaphase arretiert, um die Reparatur zu gewährleisten (Qian et al. 2016). Die Mechanismen sind nochmals genauer in Kapitel 4.2.7 beschrieben. Tatsächlich sind in arretierten 1- Zellembryonen 28hpf keine verstärkten γ H2A.X- Signale mehr zu detektieren, was zeigt, dass sehr viele Strangbrüche repariert wurden (Abbildung 8.23). So konnten dann einige Embryonen weitere Zellteilungen durchlaufen. In der folgenden Entwicklung unterlaufen sie jedoch häufig den Zelltod, was wahrscheinlich auf der Verzögerung des koordinierten Entwicklungsprogramms und nicht

kompletierter Reparatur basiert (Gawecka et al. 2013; Y. Zhang et al. 2016; Song et al. 2014). Dies würde erklären, warum die Blastozystenbildung der Embryonen, welche zygotisch TET1CD überexprimieren, kaum möglich ist (Tabelle 3.1). Die Embryonen, welche zygotisch die anderen TET Varianten überexprimieren, sind auch deutlich in ihrer Blastozystenentwicklung eingeschränkt (Tabelle 3.1). So hat interessanterweise nicht der Verlust von TET3 und der damit verbundene Verlust von oxidierten 5mC- Derivaten einen Einfluss auf die präimplantive Entwicklung (Inoue et al. 2015; Tsukada et al. 2015), jedoch ihre Zunahme. Die Reduktion des Entwicklungspotenzial der Embryonen, in welchen TET3FL, TET1FL oder TET3CD überexprimiert wurden, erfolgt, obwohl weder eine Akkumulation von γ H2A.X- Foci detektierbar ist, noch eine Arretierung im Zygotenstadium stattfindet (Tabelle 3.1, Abbildung 3.4). Die verminderten Entwicklungsmöglichkeiten müssen also andere Gründe haben, welche wahrscheinlich auf einer veränderten Expression basieren, was im Folgenden erklärt wird: Immunfluoreszenz- Analysen zeigen, dass nicht nur in Zygoten die Effekte der TET Überexpressionen auf die DNA- Modifikationen zu erkennen sind, sondern auch in 2- Zellembryonen und sogar in Blastozysten sind sie noch deutlich erkennbar (Abbildung 3.7). Das in der Zygote gesetzte epigenetische Muster bleibt also im präimplantiven Embryo aufrechterhalten (siehe auch Kapitel 4.2.5) und kann damit jedes Stadium beeinflussen. 5hmC, 5fC und 5caC sind in allen Gruppen erhöht, nach der TET3CD/TET1CD Überexpression stärker, nach TET3FL/TET1FL Überexpression eher mild. Wahrscheinlich liegt der ausschlaggebende Unterschied zwischen den TET Varianten in den Veränderungen der 5mC- Level. Basierend auf Immunfluoreszenz- Analysen zeigen Embryonen, welche TET1CD überexprimieren, einen fast kompletten Verlust von 5mC (Abbildung 3.3.) In Embryonen, in welchen TET3CD überexprimiert wurden, bleibt ein deutliches 5mC- Restsignal bestehen (Abbildung 3.3). In Embryonen, in welchen TET3FL oder TET1FL überexprimiert wurden, häuft sich 5mC sogar an (Abbildung 3.2). Die Veränderung von 5mC- Level kann in somatischen Zellen und Stammzellen zu enormen Expressionsänderungen führen (Gorbunova et al. 2004; Chen et al. 1998; Peng & Karpen 2008; Schübeler 2015). Auch in 2- Zellembryonen, in welchen TET1CD überexprimiert wurde, erfolgt ein Anstieg der Gesamtexpression (Abbildung 3.22). Dieser basiert wahrscheinlich primär auf der Reduktion von 5mC, wobei erhöhte 5fC/5caC- Level auch vermehrt aktivierende Proteine binden können (siehe auch Kapitel 1.5.2 und 4.2.6) (Iurlaro et al. 2013; Spruijt et al. 2013). Für die Überexpression von TET3FL, TET1FL und TET3CD liegen keine Expressionsanalysen vor, es wäre jedoch interessant zu sehen, ob die Expression sich auch hier verändert. Spekulativ diskutiert, ist wahrscheinlich der Effekt auf die Gesamtexpression in Embryonen, in welchen TETFL überexprimiert wurde, basierend auf milden Oxidationseffekten und den erhöhten 5mC- Leveln, geringer als in Zygoten, in welchen TETCD überexprimiert wurde. So sind die TETFL Enzyme durch die N- terminale Domäne stärker reguliert als TETCD, wodurch die Effekte wahrscheinlich sequenzspezifischer und gezielter sind. Möglicherweise werden bestimmte Loci, deren regulative Sequenzen oxidatives Ziel von TETCD oder TETFL sind, in Embryonen, in welchen TET Varianten überrepräsentiert sind, artifiziell exprimiert. Möglicherweise werden aber auch in Embryonen, in welchen TETFL überexprimiert wurde,

Gene durch erhöhte 5mC- Level reprimiert, die sonst exprimiert werden. Der DKO von *TET1* und *TET3* führt in 8- Zellembryonen zu keinem Anstieg der Gesamtexpression, aber deren erhöhter Variabilität. Diese Variabilität betrifft auch die Expression von Zellzyklus- und Apoptose- assoziierten Genen (Kang et al. 2015). Somit sind TET1 und TET3 potenzielle Expressionsregulatoren dieser Gene, sodass durch die Überexpression von TET3FL, TET1FL und möglicherweise auch TET3CD und TET1CD die Expression der genannten Gengruppen beeinflusst werden könnte. Durch diese veränderte Expression könnten die Embryonen bzw. Blastomere den Zellzyklusstopp unterlaufen oder in Apoptose übergehen. Dies geschieht in Embryonen, in welchen zygotisch TET3FL, TET1FL, oder TET3CD überexprimiert wurde, ab dem Zeitpunkt 48hpf. Zu dieser Zeit ist die Entwicklung verglichen zur Kontrolle leicht verzögert (Tabelle 8.2). Die Deregulation der Expression, basierend auf einer Verschiebung des epigenetischen Gleichgewichts durch TET1CD und die damit verbundene Entwicklungrestriktion, ist in den Kapiteln 4.2.6 und 4.2.7 detailliert diskutiert.

Vor allem das maternale Genom ist von der Oxidation und dem Methylierungsverlust durch die TET Überexpression betroffen. Somit ist es denkbar, dass vor allem maternale Allele dereguliert exprimiert sind. Diese würden dann unnatürlicher Weise vom maternalen Genom aus exprimiert (*Oct4*) oder reprimiert (*DNMT3b*, *Zbtb32*) werden, wobei auch imprintete Gene betroffen sein können. Dies könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Zellteilung und auch spätere Entwicklung haben (siehe auch Kapitel 4.2.6 und 4.2.7). Für detailliertere Information müsste dazu über SNP- Analysen (engl. single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid Polymorphismus) die allelspezifische Expression analysiert werden. Hierbei wären auch Analysen des X- Chromosoms, beispielsweise der Loci von *Xist* oder *Tsix*, interessant. Zudem wäre es erstrebenswert, die Veränderungen des gesamten Transkriptoms, abhängig von den überrepräsentierten TET Varianten, in einzelnen Zellen zu analysieren (engl. single cell RNA Sequenzierung, scRNA- Sequenzierung). scRNA- Sequenzierungsexperimente konnten aus technischen und zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Da in der Oozyte sehr viel maternale mRNA gespeichert ist und die TET kodierende mRNA nach der Injektion in großem Überschuss vorliegt, hätte die neu synthetisierte mRNA mittels BrU- Einbau und Antikörperpräzipitation isoliert werden müssen, was zusätzlich zur scRNA- Sequenzierung eine Herausforderung dargestellt hätte (Kageyama et al. 2004).

TETFL besitzen viele Interaktionspartner, mit welchen sie über ihre N- terminale Domäne interagieren. Durch die Überexpression der TETFL Proteinen können also auch deren Interaktionspartner verstärkt rekrutiert werden, sodass sie an für sie nicht- spezifischen Sequenzen aktiv sind. Durch die starke Überrepräsentation von TETFL könnten Interaktionspartner auch eingefangen werden und für spezifische Funktionen nicht mehr zur Verfügung stehen. So kann es durch dieses Zusammenspiel von TET Enzymen und interagierenden Proteinen zu Veränderungen der Transkription von bestimmten Genen, Veränderungen der Chromatinstruktur oder veränderten Reparaturereignissen kommen (Müller et al. 2014; Deplus et al. 2013; Chen et al. 2013). Um den Einfluss der Überexpression einem

nicht- katalytischen Effekt zuordnen zu können, müsste die katalytische Mutante von TETFL überexprimiert und der Effekt auf die Entwicklung beobachtet werden.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass die TET1CD- basierte Oxidation und die damit verbundene Akkumulation von γ H2A.X- Foci zu einer starken Einschränkung der Entwicklung führt. Auch die Überexpression der weiteren TET Varianten führt durch die Veränderung des epigenetischen Gleichgewichts und wahrscheinlich einer damit verbundenen Expressionsveränderung zu deutlichen Einschränkungen in der präimplantiven Entwicklung (ab dem 4- Zellstadium).

Zusammenfassung der Überexpression der TET Varianten

Die Überexpression aller TET Varianten führt zu einer deutlichen Oxidation beider parental Genome, woraus eine Einschränkung der Entwicklung resultiert. Die Immunfluoreszenz- Analyse der globalen Modifikationsmuster spiegelt nach der Überexpression in der Zygote und dem 2-Zellembryo die Präferenz der katalytischen Aktivität der TET Enzyme wider (5mC>5hmC>5fC). Die Überexpression von TETFL zeigt insgesamt einen milderen Effekt, der auf der CxxC Domäne beruht und eine regulierte Oxidation gewährleistet. Dahingegen ist die oxidative Aktivität von TET3CD und TET1CD nicht reguliert. Durch den sehr starken Umsatz von 5mC zu 5caC führt die TET1CD- vermittelte Oxidation zur Initiierung der Reparatur und damit zur aktiven Demethylierung. Es kommt zu einer starken Anhäufung von Strangbrüchen (γ H2A.X). Diese Akkumulation kann jedoch nicht in Zygoten detektiert werden, welche TET3FL, TET1FL oder TET3CD überexprimieren, was für eine quantitative Schwelle der Toleranz bezüglich oxidierten Basen oder für eine positionell getrennte Aktivität der Oxidation und Reparatur spricht. Die Reparaturinitiierung durch TET1CD kann sich bis in spätere Stadien der Entwicklung auswirken und behindert TET1CD überexprimierende Embryonen stark, sodass nur wenige das Blastozystenstadium erreichen können. Zudem führen die durch Überexpression hervorgerufenen epigenetischen Veränderungen, die bis ins Blastozystenstadium bestehen, wahrscheinlich zu einer deregulierten Expression, die sich negativ auf die Entwicklung auswirkt.

Durch HPBS- Sequenzierungsanalysen werden die oben beschriebenen Unterschiede in der Regulation der TET Enzyme und die TET1CD- vermittelte aktive Demethylierung abermals sichtbar. Diese Analysen zeigen eine Sequenzspezifität der TET Varianten und unterstützen die Theorie der sequenzspezifischen De- und Remethylierungsdynamik. Für ein starkes Remethylierungspotenzial der Zygote konnten in diesem Teil der Arbeit einige indirekte Hinweise geliefert werden.

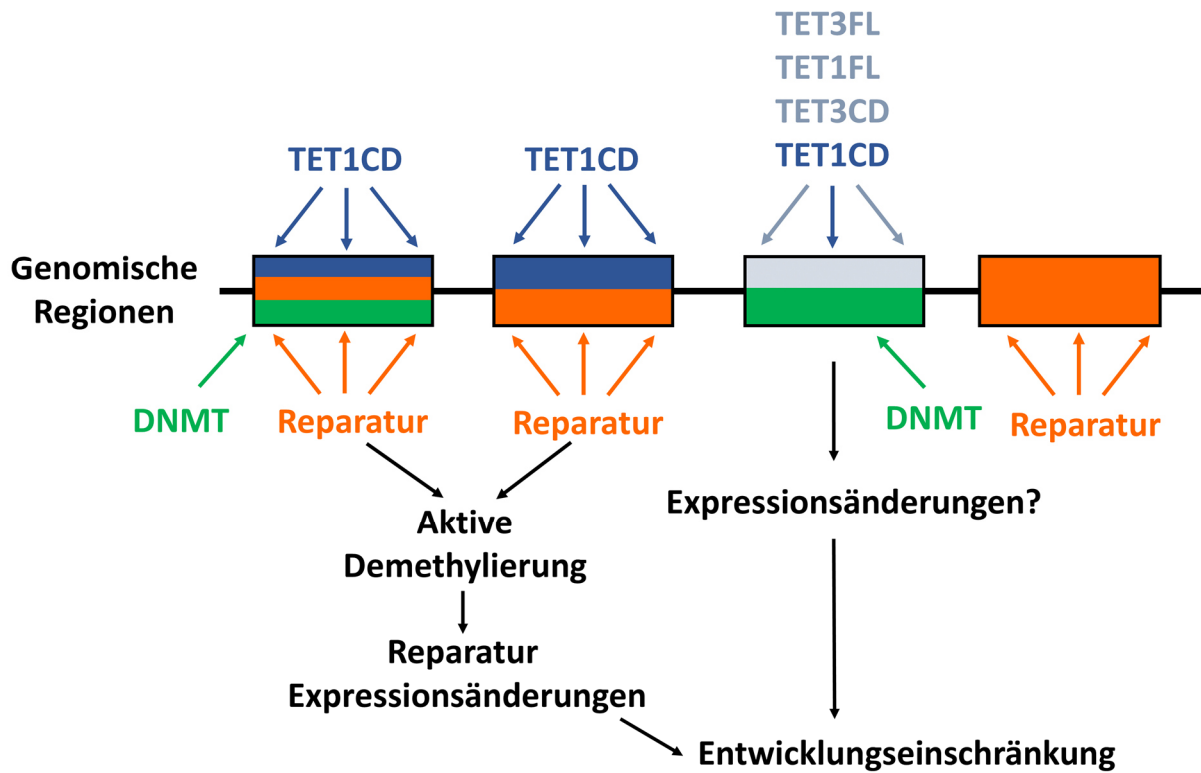


Abbildung 4.2 Schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit generierten Daten und Theorien, basierend auf der Überexpression von TET Varianten in der Zygote. Dargestellt sind genomische Regionen, welche für die TET Enzyme, die Reparaturenzyme und die Methyltransferasen unterschiedlich zugänglich sind. So erfolgen durch die spezifische Oxidation und Methylierungsänderungen unterschiedliche Auswirkungen auf die Reprogrammierung und Entwicklung.

4.2 Die Überexpression von TDG und die Auswirkungen auf das epigenetische Gleichgewicht und die präimplantive Entwicklung

Neben den TET Enzymen wurde in dieser Arbeit mit einem weiteren Enzym gearbeitet, welches epigenetische regulative Funktionen besitzt, nämlich TDG. TDG ist eine Glykosylase des BERs (Kapitel 1.6.2). Sie ist neben der Reparatur der T:G Fehlpaarung, auch spezifisch für die Basen 5fC und 5aC. Die Funktion von TDG wurde schon weitreichend in ESCs und auch embryonalen Stadien analysiert und so konnten diesem Enzym wichtige Aufgaben zugeschrieben werden (siehe Abschnitt TDG, Seite 18). Das Zusammenspiel von TDG mit den TET Enzymen konnte als der Initiator der aktiven Demethylierung in ESCs identifiziert werden (Weber et al. 2016; Shen et al. 2013; Wu et al. 2014). Dabei wird 5mC durch die TET Enzyme zu 5fC/5caC oxidiert, woraufhin TDG diese Basen effektiv aus der DNA schneidet (Maiti & Drohat 2011; He et al. 2010). Die entstandene AP- Position wird daraufhin von BER- Enzymen prozessiert und mit einem unmodifizierten Cytosin ersetzt (Krokan & Bjørås 2013). Der Knockout von *Tdg* in ESCs führt zu einer Anhäufung von 5fC und 5caC, hat aber weder Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status' und der damit verbundenen Expression von Pluripotenzgenen wie *Oct4*, *Sox2* und *Nanog*, noch auf die Expression der *TET* Gene oder auf die die Morphologie der Zellen (Shen et al. 2013; Cortázar et al. 2011). Dahingegen ist TDG während der Reprogrammierung von MEFs zu iPSCs essentiell wichtig. Sein Fehlen führt zu einem Block in der mesenchymal- epithelialen Transition (Hu et al. 2014). Im postimplantiven Embryo führt der Knockout von *Tdg* zu einer Anhäufung von 5fC und einer eingeschränkten Demethylierung bestimmter Sequenzen (Iurlaro et al. 2016; Cortellino et al. 2011). Kein KO einer Glykosylase ist letal, der KO von *Tdg* zeigt hingegen zum Zeitpunkt E11.5 die Absorption der Embryonen (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011). In frühen Entwicklungsstadien spielt TDG keine, oder eine untergeordnete Rolle, denn in der Zygote sind nur sehr niedrige Level von TDG detektierbar (Hajkova et al. 2010; Ma et al. 2014). So führt der in Oozyten etablierte konditionelle Knockout in Zygoten weder zu Effekten auf die Menge von 5fC/5caC, noch konnten Auswirkungen auf aktiv demethylierte Sequenzen nachgewiesen werden (F. Guo et al. 2014). Welche Enzyme letztendlich für die Reparatur- basierte Demethylierung in der Zygote und dem präimplantiven Embryo verantwortlich sind, ist bis heute nicht geklärt. Mögliche Kandidaten dafür sind NEIL1-3 und UNG2 (Spruijt et al. 2013; Müller et al. 2014; Xue et al. 2016) (Kapitel 1.6.2). Dies jedoch nachzuweisen, ist bisher nicht gelungen, da sich viele Glykosylasen bei einem Knockout in ihrer Aktivität gegenseitig ersetzen.

Da TDG spezifisch 5fC und 5caC schneidet, wurde ihre Überexpression in dieser Arbeit dazu genutzt, den Anteil dieser Basen im Genom der Zygote zu modulieren. Damit sollte, im Gegensatz zur Überexpression der TET Enzyme, 5fC und 5caC reduziert werden und die Auswirkung davon auf die präimplantive Entwicklung und die Reprogrammierung in der Zygote analysiert werden. Als Kontrolle sollte eine katalytische Mutante von TDG (TDGmut; N151A) dienen. TDGmut bindet an die DNA, schneidet jedoch 5fC/5caC nicht. Die Überexpression von TDGmut führte jedoch unerwarteter Weise

auch zu einem Effekt auf die Menge von 5fC/5caC (Abbildung 3.18) und somit wurde dieses Enzym als weiteres Werkzeug der Modulation des epigenetischen Gleichgewichts verwendet.

4.2.1 Die Überexpression von TDGwt und TDGmut verändern das Gleichgewicht von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote und dem 2- Zellembryo

Eine weitere wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass, neben der Überexpression einzelner TET Varianten (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2), auch die Überexpression von TDGwt starke Auswirkungen auf die Entwicklung zeigt. Um diese Einschränkung erklären zu können, wurden DNA- und Histonmodifikationen mittels Antikörperfärbungen auf Veränderungen hin untersucht und zudem globale Transkriptionsveränderungen analysiert.

Zunächst wurde der Einfluss der Überexpression von TDGwt und TDGmut auf die präimplantive Entwicklung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Überrepräsentation von TDGwt und TDGmut zu deutlichen Einschränkungen des Entwicklungspotenzials führen (Tabelle 3.4). Dabei erfolgt durch die Überexpression von TDGwt ein sehr früher dosisabhängiger Effekt und die Hälfte der analysierten Embryonen stoppen ihre Entwicklung im Zygotenstadium. Das Blastozystenstadium wird nur von einem noch geringen Prozentsatz (30%) der Embryonen erreicht. Der Effekt von TDGmut macht sich hingegen erst in späteren Stadien (ab 8- Zellstadium) bemerkbar, wobei nur 50% das Blastozystenstadium erreichen. Um einen Zusammenhang zwischen der Entwicklungsrestriktion und möglichen Veränderungen des epigenetischen Status' herzustellen wurden Antikörperfärbungen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC durchgeführt. Die Überexpression beider Enzyme führt zu deutlichen Effekten auf die 5fC- und 5caC- Mengen (Abbildung 3.18). Dabei werden 5fC und 5caC durch die Überexpression von TDGwt gegenüber der Kontrolle stark reduziert. Dieser durch vermehrte TDG-Aktivität erzielte Verlust von 5fC und 5caC ist stimmig zu Knockout Studien in ESCs und dem postimplantiven Embryo, die zeigen, dass das Löschen der TDG- Aktivität zu einer Akkumulation von 5fC und 5caC führt (Iurlaro et al. 2016; Raiber et al. 2012; Shen et al. 2013; He et al. 2011). Der paternale Vorkern ist vom Verlust von 5fC und 5caC stärker betroffen als der maternale. Dies basiert auf den unterschiedlichen Grundmengen von 5fC und 5caC in den jeweiligen Vorkernen. Im paternalen Genom liegen 5fC/5caC zum analysierten Zeitpunkt (12hpf) schon in größeren Mengen als im maternalen Genom vor (Inoue et al. 2011). Somit können im paternalen Genom mehr 5fC/5caC-Positionen repariert werden. Zudem interagiert TDG direkt mit TET1 und kann von diesem rekrutiert werden (Weber et al. 2016). Möglicherweise ist auch eine Interaktion von TDG mit TET3 möglich, welches vorrangig im paternalen Genom an die DNA bindet und dort 5mC oxidiert (Wossidlo et al. 2011; Gu et al. 2011). Dadurch würde TDG womöglich auch vorrangig an das paternale Genom rekrutiert werden und dort aktiv 5fC/5caC reparieren. Die Glykosylaseaktivität, insbesondere gegenüber dem paternalen Genom konnte durch Immunfluoreszenz- Analysen des Strangbruchmarkers γ H2A.X, bestätigt werden (Abbildung 3.19). Auch im 2-Zellembryo ist ein starker Verlust von 5fC und 5caC zu erkennen, welcher wie in der Zygote auf der überrepräsentierten

katalytischen Aktivität von TDGwt beruht (Abbildung 3.20). Mit diesen Experimenten konnte also gezeigt werden, dass das künstliche Einbringen der TDGwt- Aktivität in Zygoten und 2-Zellembryonen zur Initiierung der Reparatur von 5fC und 5caC mittels der BER führt.

Überexpressionsexperimente von TDGmut sollten als Kontrolle dienen, um die beobachteten Auswirkungen der Überexpression von TDGwt ihrer katalytischen Aktivität zuzuordnen. Es wurde also durch die Überexpression von TDGmut kein Effekt auf das epigenetische Gleichgewicht erwartet. Es zeigte sich jedoch, dass es im paternalen Genom zu einem enormen Anstieg des 5fC- Signals kommt, das 5caC- Signal hingegen abnimmt (Abbildung 3.18). Diese interessanten Ergebnisse sind folgendermaßen zu erklären. TDGwt besitzt eine hohe Affinität gegenüber 5fC, an welches es präferentiell bindet (Maiti & Drohat 2011; He et al. 2010). Demnach bindet auch TDGmut präferenziell an 5fC, kann es aber auf Grund seiner katalytischen Inaktivität nicht ausschneiden. Das führt erstens dazu, dass endogene Reparaturenzyme 5fC nicht reparieren können (beispielsweise NEIL Enzyme) und zweitens, dass die Oxidation von 5fC zu 5caC sterisch blockiert ist. Dadurch, dass TET 5hmC zu 5fC oxidiert und 5fC dann durch das Binden von TDGmut vor Reparatur und Oxidation geschützt ist, akkumuliert 5fC, wohingegen 5caC nicht gebildet werden kann (Weber et al. 2016). Für diese Theorie, welche auf nicht- katalytischen Mechanismen basiert, sprechen auch Immunfluoreszenz- Färbungen des Strangbruch- Markers γ H2A.X (Abbildung 3.19). Diese zeigen, dass Zygoten, in welchen TDGmut überexprimiert wurde, frei von γ H2A.X- Foci bleiben. Somit ist jegliche Reparaturaktivität für TDGmut ausgeschlossen, was die Hypothese des sterischen Blockens unterstützt. Auch in den Zygoten, in welchen TDGmut überexprimiert wurde, ist der paternale Kern stärker von den 5fC/5caC- Änderungen betroffen, als der maternale. Dies liegt, wie auch in Zygoten, in welchen TDGwt überexprimiert wurde, an der stärkeren Aktivität von TET3 auf das väterliche Genom. Das gleiche Bild der Veränderungen von 5fC und 5caC nach der zygotischen Überexpression von TDGmut, zeigt sich im 2- Zellstadium und bestätigt nochmals die oben beschriebenen Theorien (Abbildung 3.20). TDGmut wurde demnach im weiteren Verlauf der Studien nicht als Kontrolle, sondern als Werkzeug verwendet, um das epigenetische Gleichgewicht zu modulieren und die Effekte verschiedener Basenkompositionen auf die präimplantiven Embryonalentwicklung zu erforschen.

Eine weitere interessante Alternative der Veränderung des epigenetischen Gleichgewichts und der damit verbundenen Analyse der Auswirkungen auf die Entwicklung, Methylierungsdynamiken und Transkription, wäre die Mutation N191A. Dieses mutierte TDG Enzym ist zwar aktiv gegenüber 5fC, aber nicht gegenüber 5caC (Maiti et al. 2013).

4.2.2 Die Überexpression von TDGwt oder TDGmut in Kombination mit TET1CD

Sowohl die Überexpression von TDGwt, als auch von TDGmut zeigen einen negativen Einfluss auf das Entwicklungspotenzial des präimplantiven Embryos und zudem starke Effekte auf die Mengen von 5fC und 5caC. Um den, durch die Überexpression von TDGwt und TDGmut bedingten, 5fC- oder 5caC- Verlust zu kompensieren, wurde TDGwt oder TDGmut in Kombination mit TET1CD ko- überrepräsentiert.

In Embryonen, in welchen TET1CD in Kombination mit TDGwt überexprimiert wurde, sollten die reparierten 5fCpG- und 5caCpG- Positionen, die durch ein Cytosin ersetzt und möglicherweise methyliert wurden, durch TET1CD wieder oxidiert werden. Hinsichtlich der Entwicklung wurde der Effekt der Restriktion, der durch TDGwt entsteht, jedoch nicht kompensiert, sondern sogar weiter verstärkt und die Embryonen erreichten zu einem kleinen Anteil höchstens das 4- Zellstadium (Tabelle 3.4, Tabelle 8.16). Immunfluoreszenz- Analysen von 2- Zellembryonen, die TDGwt+ TET1CD überexprimieren, zeigen, verglichen zu 2- Zellembryonen, welche TDGwt allein überexprimieren, eine weitere Verschiebung des epigenetischen Gleichgewichts (Abbildung 3.20). Durch die Überexpression von TET1CD wird die Menge von 5mC durch dessen Oxidation stark reduziert, wobei die 5fC- und 5caC- Level nicht wieder erhöht werden, da sie unmittelbar von TDGwt repariert werden und schließlich mit Hilfe der BER ein unmodifiziertes Cytosin eingebaut wird. Diese Ergebnisse zeigen deutlich das Zusammenspiel von TET und TDGwt. Der Umsatz ($5mC \rightarrow 5fC/5caC \rightarrow C$) scheint sehr schnell, sodass die DNA aktiv demethyliert und demodifiziert wird. Unmethyliertes Cytosin wird, nach den Immunfluoreszenz- Analysen zu urteilen, nicht wieder remethyliert (Abbildung 3.20). Wahrscheinlich ist die Oxidationsaktivität von TET1CD so schnell, dass potenzielle Remethylierungsmechanismen die Oxidations- Reparatur- Effizienz nicht ausgleichen können. Mit diesem Experiment konnte also mittels exogenem TET1CD und exogenem TDGwt eine aktive Demethylierung/Demodifizierung im 2- Zellembryo erzielt werden, wodurch gezeigt wurde, dass eine dynamische Aktivitätsinteraktion zwischen TET, TDG und BER besteht. Das Zusammenspiel von TET und TDG konnte auch in vorherigen Studien gezeigt werden, wobei diese, im Gegensatz zu dieser Arbeit, auf Knockouts der beiden Enzyme basieren (Shen et al. 2013; Raiber et al. 2012; He et al. 2010; Hu et al. 2014). Eine neuere Studie liefert *in vitro* den direkten Beweis für das Zusammenwirken von TET, TDG und BER (Weber et al. 2016). Durch die Ko-Überexpression von TET1CD und TDGmut sollte versucht werden, die blockierte Oxidation von 5fC zu 5caC zu übergehen und die Level von 5caC, im Vergleich zu Embryonen, in welchen TDGmut alleine überexprimiert wurde, wieder zu erhöhen. Die Überexpression von TDGmut in Kombination mit TET1CD zeigt, neben dem Verlust des 5mC- Signals, eine Verstärkung des 5caC Signals und auch des 5fC- Signals, im Vergleich zur Überexpression von TDGmut alleine (Abbildung 3.20). Das bedeutet, dass 5mC zu 5hmC und 5hmC verstärkt zu 5fC oxidiert wird, welches durch den sterischen Schutz mittels TDGmut stark akkumuliert. Durch den Überschuss von TET1CD wird jedoch eine dem endogenen Level ähnliche Menge an 5caC gebildet. Durch die Überexpression dieser Enzymkombination wurde eine weitere Zusammensetzung der Mengen der unterschiedlichen Modifikationen erzielt, die die Entwicklung stark einschränkt (Abbildung 4.5). Der Entwicklungseinfluss und dessen Zusammenhang zu den epigenetischen Veränderungen ist in Kapitel 4.2.7 diskutiert.

4.2.3 Die Molekulare DNA- Analyse von repetitiven Elementen in Zygoten, die TDGwt überexprimieren

Immunfluoreszenz- Analysen von Zygoten, in welchen TDGwt überexprimiert wurde, zeigen eine deutliche Reduktion von 5fC/5caC gegenüber der Kontrolle. Da 5fC/5caC einen Einfluss auf die replikationsabhängige Demethylierung haben können, ist die basengenaue Untersuchung der Modifikationsdynamiken während der Reprogrammierung von großem Interesse. Dazu wurden Zygoten zum prä- und postreplikativen Zeitpunkt (6hpf und 12hpf) mittels MA- HPBS (Methylase-assisted- Hairpin- Bisulfit) analysiert (Kapitel 3.2.7 und Abbildung 3.23). Die Analyse wurde mittels drei verschiedener Bisulfitprotokolle durchgeführt. Dies war nötig, da laborinterne Tests (durchgeführt von S. Tierling) zeigten, dass alle drei Bisulfitanwendungen 5fC unterschiedlich effektiv konvertieren (Tabelle 3.6). Dabei konvertiert das standardmäßig verwendete EZ DNA Methylation-Gold™ Kit mit einer Rate von 63%, das auf diese Entdeckung folgend etablierte laborinterne Protokoll mit einer Rate von 95% und das EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit für WGBS- Analysen mit einer Rate von 35%. Diese Konvertierungsraten müssen in der folgenden Diskussion beachtet werden.

4.2.3.1 5fC/5caC in der Zygote und der Effekt von TDGwt Überexpression auf diese Modifikationen
Die basengenaue Analyse von oxidierten Basen in präimplantiven Embryonen ist technisch anspruchsvoll, denn die dafür angewendeten Methoden degradieren große Teile der DNA. Da nur kleine DNA- Mengen zur Verfügung stehen, stellt dies ein großes Problem dar. Es müssen also entweder die Methoden den DNA- Mengen angepasst werden oder die DNA- Mengen den Methoden. Deshalb ist für präimplantive Stadien des Mausembryos bisher nur ein Sequenzierungsdatensatz über den Gehalt von 5fC im 2- Zellembryo veröffentlicht (Wang et al. 2014). Demnach sind genomweit 2,5% aller Cytosine im CpG Kontext formyliert. Somit stellt 5fC wie erwartet relativ geringe Mengen im Genom dar. Betrachtet man die repetitiven Elemente, liegen die 5fCpG- Level im 2- Zellembryo je nach untersuchtem Element zwischen 1%-5%, wobei die Formylierung in der Summe aller major Satellites ca. 3%, aller LINE Elemente ca. 4% und aller LTR Elemente ca. 5% beträgt.

Auch in dieser Arbeit wurden die 5fC/5caC- Mengen in mSats, L1 und IAPs in Zygoten mittels MA- HPBS- Sequenzierung untersucht. Für diese Analyse wurden zwei verschiedene Protokolle der Bisulfitbehandlung angewendet. Einmal das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit und einmal das laborinterne Protokoll. Die *M.SssI*- Lamda- Kontrolle der Behandlung mittels EZ DNA Methylation- Gold™ Kit zeigt eine fast komplette Aufmethylierung (Tabelle 8.20). Die *M.SssI*- Lamda- Kontrolle nach der Behandlung mit dem laborinternen Protokoll zeigt hingegen keine komplette Aufmethylierung (85%- 95%) (Tabelle 8.21), während die analysierten repetitiven Elemente jedoch sehr stark methyliert wurden (Abbildung 8.26). Dies ist nur durch eine, nach der *M.SssI*- Behandlung stattgefunden, Kontamination der MAB- Proben mit unmethylierter Lambda- DNA zu erklären. Denn zudem stimmen auch die Daten der beiden Experimente (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit bzw. laborinternes BS)

tendenziell überein. Die generierten MA-HPBS- Sequenzierungsdaten beider Experimente wurden demnach analysiert und sind im Folgenden diskutiert.

Die beiden MA-HPBS- Analysen der mSat zeigen in der Kontrolle 2,5% bzw. 2,8% 5fC/5caC (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit bzw. laborinternes BS) und somit die geringsten Level von 5fC/5caC in den drei untersuchten Elementen (Abbildung 3.24, Abbildung 8.26). Dieses Ergebnis zeigt, dass mSats nicht stark von der Oxidation durch TET3 betroffen sind. *TET3* KO- Daten bestätigend dies, da durch das Ausschalten von TET3 keine Änderung der Methylierung detektiert werden konnte (Peat et al. 2014). Dieses Ergebnis unterstreicht die Theorie aus Kapitel 4.1.4.1, in dem gezeigt wurde, dass mSats keine Zielsequenz der endogenen TET Enzyme darstellen.

Für IAPs konnte ein 5fC/5caC- Gehalt von 4,6% detektiert werden (für beide BS- Methoden, Abbildung 3.24, Abbildung 8.26). Das Vorhandensein von 5fC/5caC in IAPs passt zu den *TET3* KO Daten, die zeigen, dass nach dem KO die Methylierung leicht ansteigt (ca.7%) (Peat et al. 2014). Somit könnten 5fC/5caC auch für den im Wildtyp milden Methylierungsverlust der IAPs verantwortlich sein. Das Vorhandensein von 5fC/5caC in IAPs passt demnach zu der Theorie von Arand et al., die besagt, dass IAPs einem ständigen De- und Remethylierungsmechanismus unterliegen. Dieses ist durch ein postreplikatives mosaikales Muster gekennzeichnet, welches durch die Oxidation von 5mC zu 5fC/5caC, die postreplikativ stark ist, unterstützt werden kann (Abbildung 3.24).

Lediglich die 5fC/5caC- Level in L1 unterscheiden sich etwas zwischen den Bisulfit- Behandlungen (4,5% EZ DNA Methylation-Gold™ Kit bzw. 6,8% laborinternes Protokoll; Abbildung 3.24, Abbildung 8.26). Dies kann an der verminderten Konvertierung des EZ DNA Methylation-Gold™ Kit oder der Konvertierung von 5mC des laborinternen Protokolls liegen. Auch die nur einmalige Durchführung der jeweiligen Experimente kann zu leichten Variationen führen. Dafür, dass L1 in der Zygote deutlich demethyliert werden (13% laut Arand et al.), sind die 5fC/5caC- Level relativ gering. Dies deutet also daraufhin, dass auch 5hmC in der Demethylierung von L1 eine bedeutende Rolle spielen könnte. Dies müsste durch hydroxylierungsspezifische Analysen (OxBis- oder TAB- Sequenzierungsmethoden) untersucht werden. Die Werte der analysierten repetitiven Elemente stimmen tendenziell mit denen von Wang et al. überein. Hierbei muss jedoch klargestellt werden, dass sich die Werte dieser Arbeit auf die Summe von 5fC und 5caC beziehen und nicht wie bei Wang et al. auf 5fC alleine. Da 5caC, zumindest im Genom von ESCs, noch seltener vorhanden ist als 5fC, handelt es sich in dieser Arbeit womöglich vorwiegend um Werte des 5fC- Gehalts (5fC 0,002% aller Cytosine, 5caC 0,0003% (Ito et al. 2011)).

Die Überexpression von TDGwt würde nun einen Verlust von 5fC/5caC erwarten lassen (siehe Immunfluoreszenz- Analysen Abbildung 3.18). Dieser ist jedoch nur für L1 zu detektieren (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit -2% bzw laborintern -2,5%), wohingegen die 5fC/5caC- Level in mSats und IAPs durch erhöhte Mengen von TDGwt nicht beeinflusst werden (Abbildung 3.24, Abbildung 8.26). Msat befinden sich im perizentromerischen Heterochromatin, und es gibt Hinweise darauf, dass TDG weder mit solchen Regionen noch mit heterochromatischen Promotoren interagiert (Cortázar et al. 2011;

Shen et al. 2013). So lassen auch die Ergebnisse dieser Arbeit einmal mehr die Vermutung zu, dass TDG in heterochromatischen Regionen nicht aktiv ist. Die 5fC/5caC- Level in IAPs ändern sich durch die TDGwt Überexpression nicht, was dafürspricht, dass TDG möglicherweise keine Spezifität gegenüber der Sequenz von IAP besitzt. Die, während der Reprogrammierung in der Zygote deutlich demethylierten, L1 Elemente werden hingegen durch die Überexpression von TDGwt beeinflusst und die 5fC/5caC- Level sinken um 50%. Dies weist L1 eine Zielsequenz für TDGwt zu. In ESCs gilt 5fC als semipermanente Base und wird nur zu 50% von TDG repariert (Su et al. 2016). Interessanterweise zeigen die in dieser Arbeit generierten Daten für L1, dass TDG die modifizierten Basen 5fC/5caC, trotz stark erhöhter Konzentrationen, nicht komplett repariert (Abbildung 3.24, Abbildung 8.26). Dies könnte bedeuten, dass 5fC auch in Zygoten eine semipermanente Base ist und als diese durch bestimmte Mechanismen geschützt ist, oder durch endogenen TET Enzyme erhalten bleibt. Neben seiner Funktion in der Demethylierung könnte 5fC demnach weitere Funktionen besitzen. In L1 Elementen könnten 5fC/5caC zum Beispiel die für die Embryonalentwicklung wichtige Expression der L1 (mit)regulieren (Beraldi et al. 2006).

Zusammenfassend zeigen die MA- HPBS- Daten, dass in den analysierten repetitiven Elementen in der postreplikativen Zygote 5fC/5caC vorhanden ist. Die prozentualen Level stimmen tendenziell mit veröffentlichten Daten überein und liegen zwischen 2,4% und 6,8%, je nach Element. Diese Daten unterstützen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, dass es für TET Enzyme unterschiedliche Zielsequenzen gibt, zu welchen nicht die mSat gehören, aber IAP und am deutlichsten L1. Die Überexpression von TDGwt führt ausschließlich in L1 zu teilweise- 5fC/5caC- Verlusten. Dies zeigt eine sequenzspezifische Aktivität von TDGwt. Zudem kann 5fC/5caC dadurch, dass nach der Überexpression von TDGwt ca. 50% von 5fC/5caC bestehen bleiben, diesen Basen, neben ihrer Intermediatfunktion, eine mögliche regulative Funktion zugewiesen werden.

4.2.3.2 Der Effekt von TDGwt auf 5mC – Inhibierung der *de novo* Methylierung

Neben 5fC/5caC wurde auch der Effekt der Überexpression von TDGwt auf die 5mC/5hmC- Level analysiert. Beachtenswerter Weise führt die Überexpression zu einem Verlust von 5mC/5hmC in L1 und IAP. Dies konnte für alle drei angewendeten Bisulfit- Protokolle beobachtet werden (z.B. Methylation-Gold™ Kit: Gesamtmethylierung L1 -12,2%, IAP -17,5%; Abbildung 3.24, Abbildung 8.26, Tabelle 8.24). Auch Immunfluoreszenz- Analysen zeigen einen deutlichen Verlust von 5mC in der Zygote und im 2- Zellembryo (paternal -17,5%, 2-Zellembryo -26,5%; Abbildung 3.18, Abbildung 3.20). Durch diese Beobachtung würde für TDG eine Aktivität gegenüber 5mC oder 5hmC vermutet werden. Eine solche Aktivität konnte jedoch *in vitro* und *in vivo* eindeutig nicht detektiert werden (He et al. 2011; Maiti & Drohat 2011; Shen et al. 2013). Ein Erklärungsansatz wäre der Folgende: Basierend auf der schlechten Konvertierung des EZ DNA Methylation-Gold™ Kit sind potenziell restliche 37% von 5fC nach der Behandlung in der Fraktion 5mC/5hmC enthalten (Tabelle 3.6). So könnte prinzipiell die Reduktion der 5mC/5hmC Fraktion dem Ausschneiden von 5fC durch TDG zugeordnet werden. Der starke Verlust von 5mC/5hmC spiegelt sich jedoch in keinsten Weise in dem in MA- HPBS- Daten

detektierten geringen Verlust von 5fC/5caC wider (L1-2%, IAP +0,2%). Auch die Daten nach der Behandlung mit dem laborinternen Bisulfit- Protokoll, bei dem eine nachgewiesene vollständige Konvertierung erzielt wird, zeigen Verlust der Gesamt- (L1 -7,0%, IAP -6,3) und vor allem Vollmethylierung (L1-18,6%, IAP -11,3). Das bedeutet, dass die Überexpression von TDGwt einen indirekten Effekt auf die Methylierungslevel ausüben muss. Eine Erklärung dafür wäre die folgende. DNMT3a besitzt gegenüber hemimodifizierten 5fCpG- Positionen eine erhöhte Methylierungsaktivität, gegenüber hemi- 5caCpG ist die Aktivität vergleichbar zu hemi- 5mCpG (Ji et al. 2014). Fehlen nun die 5fCpG- Positionen auf Grund der TDG Aktivität, sinkt auch die DNMT3a Aktivität an diesen Positionen und damit auch das 5mC- Level. Der Verlust von 5mC und 5fC sollte demnach korrelieren. Gegen diese Theorie sprechen die MA- HPBS - Daten, die einen großen Verlust von 5mC, jedoch einen geringen Verlust von 5fC/5caC und somit keine Korrelation der Abnahmen zeigen.

Auch die Immunfluoreszenz- Analysen von Zygoten/2- Zellembryonen, in welchen TDGmut überexprimiert wurde, zeigen einen starken Verlust von 5mC (Abbildung 3.18, Abbildung 3.20). In diesen Embryonen steigt das 5fC- Level. Die 5fCpG- Positionen werden durch TDGmut sterisch blockiert, was auch eine *de novo* Methylierungsaktivität vermindern würde. Es ist jedoch nicht klar, ob L1 und IAP von dem TDGmut- bedingten Anstieg von 5fC betroffen sind und wie stark der Anstieg von 5fC tatsächlich ist, da die Immunfluoreszenz- Analysen global und nur semiquantitativ sind. Es müssten also auch für Zygoten, in welchen TDGmut überrepräsentiert wurde, MA- HPBS- Analysen und zusätzliche fCab-Analysen durchgeführt werden.

Eine Erklärung für den beobachteten Methylierungsverlust wäre die folgende: Da der Verlust von 5mC mittels Immunfluoreszenz- Analysen, sowohl in TDGwt als auch in TDGmut überexprimierenden Embryonen zu detektieren ist, scheint die Überexpression einen TDG- aktivitätsunabhängigen Effekt zu bewirken. Der Effekt könnte demnach auf Interaktionen zwischen TDG und epigenetisch relevanten Enzymen basieren. So kann TDG mit vielen Proteinen, wie zum Beispiel den TET Enzymen oder der Histon- Acetyltransferase p300, interagieren (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011; Weber et al. 2016; Müller et al. 2014). Zu den Interaktionspartnern zählen auch die *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b, wobei jedoch nur DNMT3a in der Zygote exprimiert ist (Hirasawa et al. 2008; Li et al. 2007; Boland & Christman 2008). Knockout Experimente zeigen, dass die *de novo* Methylierung durch DNMT3a in der Zygote von zentraler Bedeutung zur Aufrechterhaltung der Methylierungslevel ist (Amouroux et al. 2016). Bei der Interaktion von TDG und DNMT3a werden zugleich die Aktivität von TDG stimuliert und die Aktivität von DNMT3a in einer dosisabhängigen Weise inhibiert (Li et al. 2007; Boland & Christman 2008). Die Interaktion von TDG und DNMT3a erfolgt bei DNMT3a über ihre PWWP oder PHD Domäne, bei TDG über einen großen Teil der N-terminalen Domäne (Li et al. 2007). Diese Interaktion kann unter anderem über die Aminosäuren 1-52 und 1-132 stattfinden (Li et al. 2007), wodurch keine Störung der Interaktion durch die Mutation von TDGmut (N151A) entstehen sollte. Somit kann nicht nur von einer Interaktion von TDGwt mit DNMT3a, sondern auch von TDGmut und DNMT3a ausgegangen werden. Dadurch, dass TDGwt und TDGmut in den

Überexpressionsexperimenten in einem enormen Überschuss in Zygote und im 2-Zellembryo vorliegen, ist theoretisch eine Interaktion mit vielen DNMT3a Molekülen möglich. Die Aktivität des Enzyms würde dadurch inhibiert und die *de novo* Methylierung unterbunden. Betrachtet man nun die 5mC- Level nach der Überexpression unter diesem Aspekt, lässt sich Folgendes sagen: In mSat ist kein Effekt der Überexpression von TDGwt auf 5mC zu erkennen. Die *de novo* Methylierung via DNMT3a scheint hier demnach nicht stattzufinden. Betrachtet man die HPBS- Daten des Experiments, in welchem die Zygoten mit Aphidicolin behandelt wurden wird deutlich, dass eine von der Replikation unabhängige Methylierung der mSats stattfindet (+6,3% 12hpf, Abbildung 3.17). Basierend auf der beschriebenen Hypothese des TDG- bedingten DNMT3a Aktivitätsverlust, würden mSat vornehmlich durch DNMT1 (*de novo*) methyliert werden. Dies wiederum entspricht Beobachtungen in ESCs, die zeigen, dass das Methylierungslevel von mSat sehr stark von DNMT1 und seinem Kofaktor UHRF1 abhängt. DNMT3a/b haben hier nur einen geringen Einfluss auf die Methylierung (Arand et al. 2012). Zudem konnte für DNMT1 *in vitro* und in ESCs eine *de novo* Methylierungsaktivität beobachtet werden (Vilkaitis et al. 2005; Goyal et al. 2006; Arand et al. 2012). Diese könnte nun, basierend auf den Daten der HPBS- Sequenzierung von Zygoten, die TDGwt überexprimieren oder mit Aphidicolin behandelt wurden, auch den mSat in Zygoten zugeordnet werden.

Nicht nur die Abnahme der Methylierung, sondern auch die Methylierungsmuster von L1 und IAP in Zygoten, in welchen TDGwt überexprimiert wurde, unterstreichen die Theorie der fehlenden *de novo* Methylierungsaktivität. Es vollzieht sich eine starke Abnahme der Vollmethylierung ohne, im Vergleich zur Kontrolle, deutliche Zunahme an hemimethylierten Positionen, was auf fehlende *de novo* Methylierung schließen lässt. Diese Daten weisen also auf eine Dynamik von Demethylierung und Remethylierung in L1 hin und stimmen somit mit der Theorie in Arand et al. überein.

IAP werden in der Zygote während der Reprogrammierungsphase nicht demethyliert, da, wie bisher angenommen, die Methylierung durch DNMT1 erhalten bleibt (Gaudet et al. 2004; Lane et al. 2003). Der maternale KO von *Dnmt3a* führt in Oozyten zu einem genomweiten Methylierungsverlust von bis zu 50% (Kaneda et al. 2004; Kato et al. 2007). Auch die Methylierungslevel von IAP in Oozyten sind DNMT3a- abhängig (Kaneda et al. 2010). In Zygoten wurde dies bisher noch nicht gezeigt. In dieser Arbeit wurde in IAP in Zygoten, in welchen TDGwt überexprimiert wurde, ein deutlicher Verlust der Vollmethylierung (-22%) und eine leichte Akkumulation von hemimethylierten Positionen detektiert (Abbildung 3.24). Basiert dies auf einer fehlenden *de novo* Methylierungsaktivität, zeigen diese Daten, dass IAPs in der Zygote stärker als bisher angenommen demethyliert werden und einer Dynamik aus Demethylierung und *de novo* Methylierung durch DNMT3a unterliegen. Dies zeigt auch, dass nicht DNMT1 alleine die entscheidende Rolle der Methylierungserhaltung der IAPs spielt.

Dieses Experiment liefert also einen weiteren indirekten Hinweis dafür, dass *de novo* Methylierung durch DNMT3a in der Zygote und den 2-Zellembryonen von Bedeutung ist. Leider gibt es bisher keine HPBS- Analysen von Zygoten mit einem *Dnmt3a* KO, sodass die in diesem Kapitel beschriebenen und diskutierten Ergebnisse etwas spekulativ bleiben. Die Analyse von Zygoten mit einem *Dnmt3a* KO wäre

in diesem Zusammenhang also sehr interessant. Zudem wäre auch die Analyse der Dynamiken von Einzelkopiegenen in Zygoten mit *Dnmt3a* KO oder TDGwt überexprimierenden Zygoten eine interessante Option, um die Dynamiken der De- und Remethylierung tiefer zu erforschen. Um diese Fragen zu klären wurden RR-MAB-Sequenzierungsexperimente von TDGwt überexprimierenden Zygoten durchgeführt. Diese erbrachten fast ausschließlich klonale Sequenzen. Die Optimierung dieser Methode benötigt also etwas Zeit.

In den Immunfluoreszenz- Analysen ist auch ein milder Verlust von 5hmC, vor allem im 2-Zellembryo nach zygotischer TDGwt/mut Überexpression, zu erkennen. Dieser Verlust basiert darauf, dass durch die reduzierten Level von 5mC auch reduzierte Substrat- Mengen für die TET Enzyme vorhanden sind. Dadurch kann folglich auch weniger 5hmC gebildet werden.

4.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Überexpression von TET und TDG auf die Modifikationsmuster der repetitiven Elemente mSat, L1 und IAP

mSat

Die in dieser Arbeit generierten HPBS- Daten für mSat sind in Abbildung 4.3 zusammengefasst dargestellt. Wie auch in Arand et al. 2015, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mSat replikationsabhängig demethyliert werden. Dabei kommt es während der Replikation zu einem leichten Verlust der Vollmethylierung und einer Akkumulation von hemimethylierten Positionen (Kapitel 4.1.4). Wird die Replikation blockiert, zeigen mSats keinen Methylierungsverlust, was die replikationsabhängige Demethylierung dieser Elemente direkt zeigt (Kapitel 4.1.4.1). Wie sich der replikationsabhängige Methylierungsverlust mechanistisch vollzieht, ist noch nicht geklärt. Dass er auf der Nichtbindung der DNMT1 durch 5fC/5caC beruht, ist basierend auf den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen unwahrscheinlich, denn die Level von 5fC/5caC sind gering (Kapitel 4.2.3.1). Demnach sind mSat keine Zielsequenz von endogenem TET3. Zu 5hmC können keine Aussagen gemacht werden, sodass möglicherweise diese Base einen Einfluss auf das Binden von DNMT1 hat.

Die Überexpression von TET1CD zeigt keinen Effekt auf die Methylierung in mSat. Werden nach der Überexpression von TET1CD durch Aphidicolin allerdings einige DNA- Polymerasen der BER blockiert, kommt es zu einem drastischen Methylierungsverlust. Erhöhte Level von TET1CD führen also zu einer starken Oxidation von 5mC in mSats, woraufhin 5hmC, 5fC und 5caC durch Reparatur entfernt werden (aktive Demethylierung; Kapitel 4.1.4.1). Durch den fehlenden Einbau von unmodifiziertem Cytosin kann keine Remethylierung stattfinden und es kommt zu einem Methylierungsverlust. Diese beiden Experimente zeigen demnach, dass mSat einer strengen Regulation der Methylierung unterliegen. Kommt es zu einer Störung der Methylierungslevel (TET1CD) wird dies direkt durch Reparatur und Remethylierung ausgeglichen (Kapitel 4.1.4.1). Für die Regulation der Methylierungslevel der mSats ist wahrscheinlich nicht DNMT3a verantwortlich. DNMT1 scheint demnach die Methylierung aufrechtzuerhalten und kann sogar *de novo* Methylierung ausüben (Remethylierung 6hpf nach der Überexpression von TET1CD) (Kapitel 4.2.3.2).

Die Überexpression von TDGwt zeigt keine Auswirkung auf 5fC/5caC von mSats und lässt in Verbindung mit den Methylierungsmustern die Vermutung zu, dass mSats keine Zielsequenz für TDGwt darstellen (Kapitel 4.2.3.1).

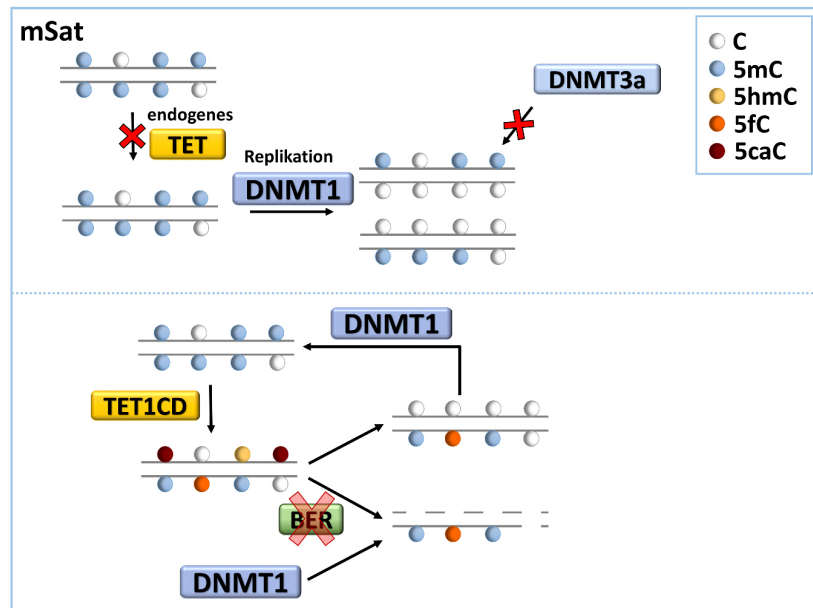


Abbildung 4.3 mSat - Schematische Zusammenfassung aller generierten HPBS- Daten dieser Arbeit

L1

Die in dieser Arbeit generierten HPBS- Daten für L1 sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst dargestellt. TET Überexpressionsexperimente zeigen, dass L1 Ziel der TET Enzyme sind und oxidiert werden, wodurch sie Methylierung verlieren (Kapitel 4.1.4). Dabei sind die Effekte der verschiedenen TET Varianten unterschiedlich. 5fC/5caC kommt in L1 im Wildtyp im Vergleich zu genomweiten Formylierungsleveln angehäuft vor (Kapitel 4.2.3.1). Die Überexpression von TDGwt bewirkt einen Verlust von 5fC/5caC und zeigt damit, dass L1 prinzipiell der TET- initiierten reparaturbedingten Demethylierung unterliegen kann. Die vergleichsweise hohen Level von 5fC/5caC, die Möglichkeit der Oxidation zu unterliegen und der damit verbundene Methylierungsverlust, unterstützen die Hypothese von einem teilweise aktiven Demethylierungsmechanismus von Arand et al. Der Verlust der Methylierung wird, basierend auf den Daten dieser Arbeit, vermutlich durch DNMT3a wieder zu gewissen Teilen kompensiert (Kapitel 4.2.3.2).

IAP

Die in dieser Arbeit generierten HPBS- Daten für IAP sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst dargestellt. In IAPs kommen 5fC/5caC wie in L1 zu vergleichsweise relativ hohen Leveln vor. Dies zeigt, dass IAPs eine Zielsequenz der TET Enzyme darstellen, was durch TET- Überexpressionsexperimente unterstrichen werden konnte (Kapitel 4.2.3.1 und 4.1.4). Die Überexpression von TET1CD in Kombination mit dem Blocken der Reparatur- DNA- Polymerasen zeigt, dass die oxidierten Basen nach der TET1CD Überexpression verstärkt repariert und remethyliert werden. In wildtypische Zygoten konnte trotz des Blockens der Replikation ein Anstieg der Gesamtmethylierung beobachtet werden,

was *de novo* Methylierungsaktivität zeigt (Kapitel 4.1.4.1). Die *de novo* Methylierung erfolgt, basierend auf den Daten dieser Arbeit, vermutlich durch DNMT3a- denn die Überexpression von TDGwt, welches vermutlich die DNMT3a- Aktivität blockiert, führt zu einem starken Verlust der Methylierung (Kapitel 4.2.3.2). Dies zeigt möglicherweise auch einen stärkeren De- und Remethylierungsprozess in diesen Elementen als bislang gedacht. Zudem wurde bisher angenommen, dass vor allem verschiedene Isoformen von DNMT1 verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus sind (M Cecilia Cirio et al. 2008; Gaudet et al. 2004). Die Überexpression von TDGwt hat keinen Effekt auf 5fC/5caC, sodass IAPs vermutlich keine Zielsequenz darstellen.

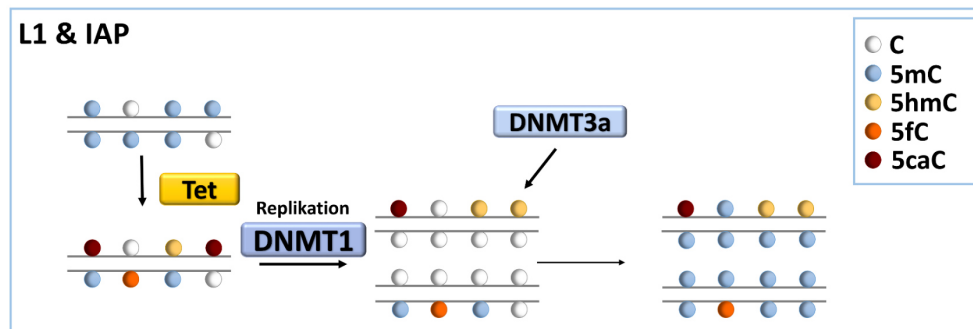


Abbildung 4.4 L1 und IAP- Schematische Zusammenfassung aller generierten HPBS- Daten dieser Arbeit.L1 und IAP unterliegen den gleichen Mechanismen der De- und Remethylierung, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Erklärungen siehe Text.

Die Gesamtheit der erhobenen (MA-) HPBS- Sequenzierungs- Daten dieser Arbeit unterstützen die Theorie, die sich in den letzten Jahren herauskristallisiert hat. Diese besagt, dass sich die Reprogrammierung in der Zygote durch ein dynamisches Zusammenspiel von Oxidation, Demethylierung und Remethylierung vollzieht, wobei die TET Enzyme, die Replikation, DNMT3a, DNMT1 und die BER- Enzyme eine wichtige Rolle spielen. Zudem zeigen diese Daten, dass die Demethylierung nicht auf genomweiten Mechanismen und Dynamiken basiert, sondern, dass ein sequenzspezifisches Zusammenspiel stattfindet.

4.2.4 5hmC, 5fC, 5caC und ihre Interaktion mit Histonmodifikationen

Histonmodifikationen stehen im direkten gegenseitigen Kontakt und Einfluss mit der DNA-Methylierung (Cedar & Bergman 2009). Ob und wie Histonmodifikationen und oxidierte Basen einander bedingen und inwiefern TDG und TET Enzyme durch Histonmodifikationen reguliert werden und andersherum, ist bisher noch wenig erforscht. Bekannt ist: Histonmodifikationen nehmen Einfluss auf die Regionen, in welchen TDG aktiv ist. So kann TDG nicht mit heterochromatischen Bereichen interagieren. TDG zeigt seine stärkste Aktivität in bivalenten (hohe Leveln H3K27me3 und mittlere Leveln H3K4me3) und reprimierten Promotoren (fehlende H3K4me3), wohingegen in aktiven Promotoren (hohe Level H3K4me3) 5fC/5caC nicht durch TDG ausgeschnitten wird (Cortázar et al. 2011; Shen et al. 2013). So konnte die Ko-Existenz von 5fC/5caC und aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me1/3, H3K27ac) in ESCs und embryonalen Geweben nachgewiesen werden (Iurlaro et al. 2016; Shen et al. 2013; Lu et al. 2015; Raiber et al. 2012). Aber auch andersherum,

kann TDG einen Einfluss auf die Histonmodifikationen nehmen. Der Verlust von TDG führt in MEFs zu einen Rückgang von aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me₂) und einen Anstieg von reprimierenden (H3K27me und H3K9me₃) (Cortázar et al. 2011). Im Gegensatz und stimmig dazu führt die Überexpression von TDG in GV Oozyten zu einem globalen Verlust von H3K9me_{2/3} (Ma et al. 2014). Ob diese Effekte auf der katalytischen Aktivität oder regulativen Domäne von TDG basieren ist nicht geklärt. Neben TDG kann auch TET Auswirkungen auf Histonmodifikationen haben. So führt die Überexpression von TET2, nicht aber die seiner katalytischen Mutante, in Zellkulturzellen zu Änderungen der Histonmodifikationen. Diese sind zwar nicht global, aber an Promotoren spezifischer Gene kommt es zu einem Anstieg von H3K4me₃ und H3K27me₃ und somit zu „*de novo*“ bivalenten Domänen. Der Verlust von TET1/TET2 in ESCs lässt die H3K27me₃- Level sinken. Andere Histonmodifikationen wie H3K4me₂, H3K9me₂ und H3K9me₃ ändern sich hingegen kaum (Kong et al. 2016). Insgesamt können TET1/TET2 und die mit ihrer Aktivität verbundene Oxidation und der Methylierungsverlust also Einfluss auf Histonmodifikationen nehmen.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von TDGwt/mut und TET1CD in der Zygote deutlich die Mengen und Verhältnisse von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC beeinflussen, wurden auch einige Histonmodifikationen auf eine mögliche DNA- modifikationsänderungsbedingte Histonmodifikationsänderung hin analysiert. Die Immunfluoreszenz- Analysen von postreplikativen Zygoten zeigen allerdings keine globalen Effekte der Überexpression von TDGwt/mut oder TET1CD auf die analysierten Histonmodifikationen (Tabelle 3.5). Weder die Menge der aktivierenden (H3K4me₃) noch der reprimierenden (H3K27me₃, H3K9me_{2/3}) Histonmodifikationen ändern sich global. Auch bei der Betrachtung der Immunfluoreszenz- Analysen von H3K27me₃, welches in den perizentromerischen Ringen lokalisiert ist (Santenard et al. 2010; Jachowicz et al. 2013), zeigt sich keine Änderung durch die Überexpressionen (Abbildung 8.25). Für die gemachten Beobachtungen gibt es folgende Erklärungen. Erstens, die Überexpression der Enzyme hat keinen globalen Effekt auf die Histonmodifikationslevel in der Zygote, so wie es auch für die Überexpression von TET2 in Zellkulturzellen beobachtet wurde (Kong et al. 2016). Somit kann eine sequenzspezifische Änderung der Histonmodifikationen nicht ausgeschlossen werden und müsste analysiert werden (siehe unten). Zweitens, im paternalen Genom sind zunächst nur wenige Histonmodifikationen vorhanden (vorrangig Monomethylierung). H3K27me₃, H3K9me₂ und H3K4me₃ werden erst während bzw. nach der Replikation gesetzt, wohingegen H3K9me₃ im gesamten Zygotenstadium ausschließlich im maternalen Genom detektierbar ist (Lepikhov & Walter 2004; Santos et al. 2005; Ma et al. 2015). Das bedeutet, dass durch den niedrigen Gehalt der Histonmodifikationen des paternalen Genoms ein möglicher Effekt der Überexpression nicht so stark und global ausgeprägt ist, als dass er durch Antikörperfärbungen detektierbar ist. Im maternalen Genom bleibt der Effekt der Überexpression von TDGwt/mut möglicherweise aus, da TDG auf DNA- Ebene vor allem Effekte im väterlichen Genom hervorruft (Immunfluoreszenz- Analysen, Abbildung 3.18), weil 5fC und 5caC im mütterlichen Genom erst in späteren Stadien vorhanden sind.

Um einen tieferen und basengenaue Einblick des Effekts der Überexpression auf mögliche Veränderung der Histonmodifikationen zu bekommen müssten ChIP- Sequenzierungsanalysen (Chromatin- Immunopräzipitation) vorgenommen werden. Diese Analysen sind zum heutigen Zeitpunkt, bezogen auf die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Zygoten, sehr materialintensiv. Zwar gelingt es, die benötigte Menge des Chromatins immer weiter zu reduzieren; es sind jedoch, je nach verwendetem Antikörper und Modifikation, 200-1000 Zellen nötig (J. Shen et al. 2014; B. Zhang et al. 2016).

4.2.5 Die Effekte der Überexpression von TDG und TET im präimplantiven Embryo – Ein Gedächtniseffekt

In der Zygote sind die DNA- und Histonmodifikationen asymmetrisch zwischen den parentalen Genomen verteilt. So ist die mütterliche DNA methyliert und mit verschiedenen Histonmodifikationen angereichert (Oswald et al. 2000; Mayer et al. 2000; Santos et al. 2002; Lepikhov & Walter 2004; Santos et al. 2005). Dahingegen liegt das väterliche Genom, besonders in späten Zygotenstadien demethyliert, aber oxidiert vor und besitzt neben Histonmonomethylierung kaum Histonmodifikationen (Wossidlo et al. 2011; Khursheed Iqbal et al. 2011; Gu et al. 2011; Santos et al. 2005; Lepikhov & Walter 2004). Mittels Immunfluoreszenz- Analysen lässt sich das in der Zygote gesetzte DNA- Modifikationsmuster auch im 2- Zellembryo wiederfinden (Abbildung 8.19, Abbildung 8.20, Abbildung 8.21). Auch in diesem Stadium ist die Trennung von mütterlichem und väterlichem Genom deutlich an dem Methylierungs- bzw. Oxidationsstatus zu erkennen. In späteren Stadien, wie 8- Zellstadium oder sogar der Blastozyste, sind auch definierte Bereiche von 5mC oder 5fC oder 5caC zu erkennen (Abbildung 3.21, Abbildung 8.29, Abbildung 8.30). Dabei sind wie in ESCs (Bachman et al. 2015) keine Überlappungen von 5mC mit 5fC oder 5mC mit 5caC erkennbar. Ob diese definierten Bereiche, die 5fC und 5caC einnehmen, nun noch immer dem maternalen und paternalen Genom zugeordnet werden können oder umstrukturiert wurden und spezifische Genombereiche (Heterochromatin/Euchromatin) betreffen, ist unklar.

In ESCs und auch in embryonalen Geweben wird 5fC, neben der Intermediatfunktion der aktiven Demethylierung, auch regulative und sogar gewebespezifische Aufgaben zugeschrieben. Dies basiert auch darauf, dass 5fC vergleichen zu 5hmC eine große Anzahl an potenziellen Bindeproteinen besitzt (Bachman et al. 2015; Iurlaro et al. 2016; Iurlaro et al. 2013; Spruijt et al. 2013; Su et al. 2016). In dieser Arbeit konnte ein gleichmäßig starkes, stabiles Level von 5fC und 5caC in jedem analysierten Stadium detektiert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass 5fC und 5caC auch in der präimplantiven Entwicklung nicht nur Intermediate des Demethylierungsprozess darstellen, sondern auch regulative Rollen haben. In der Blastozyste sind die höchsten Level von 5fC und 5caC in der ICM zu finden (Abbildung 3.7, Abbildung 3.21, Abbildung 8.27). Dies beruht wahrscheinlich auf der hohen Expression von TET1 in der ICM (Ito et al. 2010). Interessanterweise sind dort auch die 5mC- Level am höchsten, wobei es zu keiner Überlappung mit den Signalen von 5fC oder 5caC kommt (Abbildung 3.7, Abbildung 3.21, Abbildung 8.27). Das gleichzeitige Vorhandensein der drei Cytosin- Modifikationen zeigt

nochmals, dass 5fC und 5caC neben der Intermediatfunktion zusätzliche Aufgaben besitzen. Die aus der ICM gewonnen ESCs zeigen in basengenauen Analysen, dass 5mC, 5hmC, 5fC/5caC an verschiedenen Positionen existieren (Wu et al. 2014). Während 5mC- und 5hmC- Positionen überlappen, kommen 5mC-, 5fC- und 5caC- Positionen jeweils vorwiegend getrennt voneinander vor (Xia et al. 2015; Lu et al. 2015) (Kapitel 1.5.2). Dies lässt unterschiedliche Aufgaben von 5fC und 5caC vermuten. Auch die Immunfluoreszenz- Analysen zeigen sehr global, aber ähnlich der basengenauen Analyse, die unterschiedliche und getrennte Verteilung von 5mC und 5fC/5caC. Dies ist möglicherweise von Bedeutung, um in der ICM eine umfängliche und schnelle Dynamik der Expression von Pluripotenz- und Entwicklungsgenen zu gewährleisten.

Durch die Überexpression von TDGwt/mut oder TET1CD ändern sich in der Zygote die Mengen von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC stark (Abbildung 3.3, Abbildung 3.18). Diese Veränderungen sind auch im 2-Zellstadium deutlich erkennbar (Abbildung 8.19, Abbildung 8.20, Abbildung 8.21). Im 4-Zell- oder 8-Zellstadium und selbst in den Embryonen, die das Blastozystenstadium erreichen sind die in der Zygote erkennbaren DNA- Modifikationsveränderungen noch sichtbar (Abbildung 3.7, Abbildung 3.21, Abbildung 8.29, Abbildung 8.30, Abbildung 8.27). 5fC/5caC welches durch TDGwt ausgebaut wird, wird kaum neu gebildet, und das erhöhte Level von 5fC/5caC durch TET1CD (TDGmut für 5fC) wird bis zum Blastozystenstadium aufrechterhalten. Auch die beeinflussten 5mC- Level werden in der gesamten Präimplantationsphase nicht wieder korrigiert. Dies zeigt, dass die in der Zygote etablierten DNA- Modifikationen bis hin zum Blastozystenstadium keine globalen (durch Antikörper detektierbaren) Umstrukturierungen erfahren und somit einem „Gedächtnis- Effekt“ unterliegen. Diese Beobachtungen ist sehr interessant, und bedeuten, dass ein in der Zygote gesetztes Muster im präimplantiven Embryo aufrechterhalten bzw. vererbt wird.

Ein solcher „Gedächtnis- Effekt“ konnte kürzlich im Mausmodell für das imprintete Gen *Gpr1/Zdbf2* (DBF-type zinc finger-containing protein 2) nachgewiesen werden (Greenberg et al. 2016): Ein alternatives Transkript, *Liz* (lange Isoform von *Zdbf2*), wird vom paternalen Allel und ausschließlich in präimplantiven Stadien exprimiert. Die transiente *Liz* Expression ist für die Etablierung einer paternalen somatischen DMR (sDMR) verantwortlich. Diese Methylierung wirkt der H3K27me3- und Polycomb- bedingten Repression entgegen, wodurch die Expression von *Zdbf2* vom kanonischen Promotor des paternalen Allels stattfinden kann. Der epigenetische Status und die allelspezifische Expression bleiben das ganze Leben erhalten. Der Knockout von *Liz* ist zwar für die präimplantive Entwicklung ohne Bedeutung, wirkt sich aber in der späteren Entwicklung aus. Er führt dabei zur Anreicherung von H3K27me3/PCR2 und der damit verbundenen Repression von *Zdbf2* im Gehirn, was letztendlich zu einer geringeren Körpergröße führt (Greenberg et al. 2016). Damit konnte also gezeigt werden, dass in der Entwicklung präimplantiv gesetzte epigenetische Muster von Zelle zu Zelle vererbt werden und ein Leben lang erhalten bleiben können, wodurch sie sich auf die spätere Entwicklung auswirken. Es wäre also sehr interessant zu testen, ob der durch die Überexpression von TDGwt/mut oder TET1CD entstandene zygotische epigenetische Zustand auch über die präimplantive Entwicklung

hinaus in postimplantativen embryonalen Stadien bestehen bleibt. Dazu müssten Embryo Transfer Experimente vorgenommen werden. Diese konnten aus Zeitgründen in diese Arbeit nicht beendet werden.

4.2.6 Die Expression nach der Verschiebung des epigenetischen Gleichgewichts durch TDGwt, TDGmut und TET1CD

Die Überexpression von TDGwt/mut oder TET1CD führen zu deutlichen Einschränkungen in der Entwicklung. Außerdem konnten nach der Überexpression der Enzyme starke Veränderungen des Gehalts der Basen 5mC, 5hmC, 5fC, 5caC detektiert werden (Tabelle 3.4, Abbildung 3.18). Dies lässt auf einem Zusammenhang der beiden Beobachtungen schließen und wirft die Frage nach den Gründen und Mechanismen auf. Da epigenetische Modifikationen eine entscheidende Rolle in der Genexpression spielen, wurde die Gesamtexpression von 2- Zellembryonen analysiert, in welchen zygotisch TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimiert wurden, denn im Gegensatz zur Zygote sind 2- Zellembryonen transkriptionell aktiv (Kanka 2003; Schultz et al. 1999; Schultz 2002). Somit sollte überprüft werden, ob die jeweilige Überexpression die epigenetischen Voraussetzungen für eine regulierte Expression beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Entwicklung haben.

In dieser Arbeit konnte in den Embryonen, die TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimieren, ein Anstieg der Gesamtexpression im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Dieser Anstieg ist nach der Überexpression von TDGwt und TDGmut gleich stark (+20% /+22%), in 2-Zellembryonen, in welchen TET1CD überexprimiert wurde, ist er sogar noch etwas stärker (+43%) (Abbildung 3.22). Im Folgenden wird diskutiert, wie die jeweilige, veränderte Basenzusammensetzung und die erhöhte Expression zusammenhängen können. Wie in der Einleitung detailliert beschrieben (Kapitel 1.5.2), hat 5mC in Promotoren meistens eine repressive Wirkung auf die Genexpression (Dong et al. 2001). Dahingegen spielt 5hmC eine duale Rolle in der Transkription und kann, je nachdem in welcher Region es sich befindet, aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken (Wu, Ana C D'Alessio, et al. 2011; Pastor et al. 2011; Williams et al. 2011; Ficz et al. 2011). 5fC und 5caC sind generell aktivierende Modifikationen (Iurlaro et al. 2013; Neri et al. 2015; Song et al. 2013; Spruijt et al. 2013; Raiber et al. 2012). Die aktivierende Auswirkung auf die Transkription sieht in der Reihenfolge also folgendermaßen aus: 5caC ≥5fC >5hmC >5mC (Raiber et al. 2012; Lu et al. 2015) (Kapitel 1.5.2).

Die zygotische Überexpression von TDGwt führt zu einem deutlichen globalen und sequenzspezifischen Verlust von 5mC, 5fC und 5caC, der auch in 2- Zellembryonen zu erkennen ist (Abbildung 3.20, Abbildung 3.24). Obwohl ein starker Verlust der aktivierenden Modifikationen 5fC und 5caC, die durch das Binden von aktivierenden Proteinen die Transkription fördern, erfolgt, führt die Überexpression von TDGwt zu einer erhöhten Transkription. Basierend auf bisher bekannten Sequenzierungsdaten des Genoms von ESCs, 2- Zellembryonen und den in dieser Arbeit erhobenen MA- HPBS- Daten der Zygote (Abbildung 3.24) machen 5fC und 5caC nur einen geringen Anteil des Genoms aus (Wang et al. 2014; Wu & Zhang 2015). Möglicherweise hat ihr Verlust somit keine globalen, negativen Effekte auf die

Expression. Der Verlust von 5mC in CpGs von Promotorregionen hat eine aktivierende Wirkung auf die Expression (Bergman & Mostoslavsky 1998; Deaton & Bird 2011). So wirkt sich wahrscheinlich der sehr deutliche Verlust von 5mC (Immunfluoreszenz- Analyse -26,5%; Zygote: L1 -12,2%, IAP-18,8%) am stärksten auf die Transkription aus. Dieser führt möglicherweise dazu, dass viele normalerweise methylierte Promotoren nun unmethyliert vorliegen und somit die Transkription aktiviert werden kann. Zudem könnten auch nicht- katalytische Funktionen von TDGwt eine Rolle spielen, insbesondere, da sie auch Histonmodifikationen betreffen können. TDG interagiert mit dem Histonacetylierungskomplex CBP/p300, wobei TDG deutlich zum Binden von CBP/p300 an Promotoren beiträgt (Cortázar et al. 2011). Basierend auf Immunfluoreszenz- Analysen ist CBP, jedoch nicht p300, in den Kernen von 2- Zellembryonen zu finden (Kwok et al. 2006). Das überrepräsentierte TDGwt könnte in 2-Zellembryonen also vermehrt einen Komplex mit CBP bilden, wodurch es zu einer stärkeren Rekrutierung des TDG/CBP- Komplexes an die DNA kommt. Durch die starke Rekrutierung des TDG/CBP- Komplexes können dann vermehrt Histone acetyliert werden, wodurch auch eine stärkere Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie initiiert würde. Dadurch würden viele vorher reprimierte Gene, insbesondere diese, welche ihre Methylierung verloren haben, stärker transkribiert werden (Cortellino et al. 2011; Tini et al. 2002; Bannister & Kouzarides 1996; Ogryzko et al. 1996). Eine Ko- Lokalisation und das dadurch bedingte vermehrte Binden von CBP an der DNA in Embryonen, welche TDGwt überexprimieren, müsste mittels Immunfluoreszenz- Analysen überprüft werden. Auch mögliche Veränderungen der Histonacetylierung müssten mittels Immunfluoreszenz- Analysen geprüft werden, wobei erhöhte Level zu erwarten wären.

2-Zellembryonen, in welchen TDGmut überexprimiert wurde, zeigen auch einen deutlichen Anstieg der globalen Transkription. Diese ist ähnlich stark wie in 2- Zellembryonen, in welchen TDGwt überexprimiert wurde. Auch hier könnte eine Interaktion von TDGmut und CBP eine Rolle spielen. Für die Interaktion mit CBP sind die Aminosäuren 32-91, 92-121 und 273-421 entscheidend (Tini et al. 2002). Die Punktmutation in der katalytischen Domäne von TDGmut (AS 151) sollte demnach keine Auswirkungen auf die Interaktion mit CBP haben. Die in ihrer Stärke ähnlichen Veränderungen der globalen Expressionslevel unterstützten die Theorie eines solchen Interaktionseffekts. In 2-Zellembryonen, in welchen zygotisch TDGmut überexprimiert wurde, kommt zu einem Verlust von 5mC, einem starken Anstieg von 5fC und einem deutlichen Verlust von 5caC (Abbildung 3.20). Der Verlust von 5mC führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung der Transkription, womöglich sehr ähnlich wie in Embryonen, in welchen zygotisch TDGwt überexprimiert wurde, da der Verlust von 5mC vermutlich auf nicht katalytischen Eigenschaften basiert (Kapitel 4.2.3.2). Durch die erhöhten Level von 5fC könnten zudem Enhancer aktiviert und damit die Transkription erhöht werden. Hohe Level von 5fC an benachbarten CpGs können, zumindest *in vitro*, zu DNA- Konformationsänderungen führen, sodass die DNA nicht mehr als B- DNA, sondern in einer F- Struktur vorliegt (Raiber et al. 2014). Diese ist durch weniger helikale Windung (*underwinding*) gekennzeichnet und verändert wahrscheinlich das Chromatin und seine Zugänglichkeit, auch für Transkriptionsfaktoren (Raiber et al. 2014).

Die Überexpression von TET1CD führt in 2- Zellembryonen zu einem, verglichen zur Überexpression von TDGwt/TDGmut, sehr starken Verlust von 5mC (Immunfluoreszenz- Analyse: -66%; Abbildung 3.6, Abbildung 3.20). Dieser Verlust ist gepaart mit einem starken Anstieg der 5hmC-, 5fC- und 5caC- Level (+85%, +61%, +46%) und einem deutlichen Anstieg der Gesamtexpression (Abbildung 3.22). Der DKO von *TET1/TET3* zeigt hingegen im präimplantiven Embryo keinen Einfluss auf die Expressionslevel, sehr wohl aber qualitative Veränderungen. Er führt zu einer großen Variabilität der Expression (Kang et al. 2015). Dies zeigt, dass TET1 und TET3 grundsätzlich einen Einfluss auf die Expression haben. Die Überexpression von TET1CD führt wahrscheinlich durch den dramatischen Verlust von 5mC zu einem deutlichen Expressionsanstieg (siehe TDGwt/TDGmut). Zudem hat womöglich auch der drastische Anstieg der oxidierten Basen einen Effekt. 5hmC kann in seiner dualen Rolle die Expression zu beiden Seiten hin verändern (Kapitel 1.5.2) und kann deshalb und aufgrund fehlender basengenaue Analysen nicht detaillierter diskutiert werden. Da 5fC und 5caC aktivierende Proteine binden (Iurlaro et al. 2013; Spruijt et al. 2013) (Kapitel 1.5.2), könnten die erhöhten 5fC- und 5caC- Level auch eine erhöhte Möglichkeit der Bindung von aktivierenden Proteinen darstellen und somit die Expression erhöhen. Zudem kann auch hier die DNA durch den hohen Gehalt von 5fC möglicherweise eine F- Konfirmation einnehmen, die für die Transkription unterstützend wirken kann (siehe TDGmut) (Raiber et al. 2014). Die Überexpression von TET2(FL) führt in HEK293T- Zellen zu einem Anstieg der Expression. Dieser beruht jedoch nicht ausschließlich auf dem Oxidationseffekt, sondern kann auch auf die Veränderungen der Histonmodifikationen zurückgeführt werden (Kong et al. 2016). Ein solcher Mechanismus ist für keine der analysierten Embryonen auszuschließen, jedoch nur mit CHIP-Sequenzierungsexperimenten nachzuweisen (Kapitel 4.2.4). Interessant wäre auch die qualitative Analyse des Expressionsanstiegs, um die Auswirkungen der Überexpression auf die Transkription definierter Gene zu erforschen. Da zu diesem Zeitpunkt völlig unklar ist, welche Gene oder nicht-kodierenden RNAs von der Überexpression betroffen sind, wäre die zeit- und kostengünstigste Herangehensweise mit dem größten Informationsgewinn, die Gesamtheit der neu synthetisierten RNAs eines Embryos oder sogar Blastomers mittels scRNA- Seq zu analysieren. Somit könnten auch Unterschiede zwischen einzelnen Embryonen einer Gruppe oder Blastomere eines Embryos detektiert werden.

Abschließend ist zu sagen, dass die Überexpression von TDGwt, TDGmut oder TET1CD zu einer veränderten Gesamtexpression führt, die auf dem direkten Effekt von DNA- Modifikationen basiert. Dabei scheint der Verlust von 5mC eine zentrale Rolle einzunehmen. Aber auch Interaktionseffekte, insbesondere für TDGwt/mut, können Einfluss auf die Expression nehmen und nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine definierte Modifikationskomposition und die daraus resultierende Expression für die Entwicklung essentiell sind. Die Störung des epigenetischen Gleichgewichts führt zu einer deregulierten Expression und letztendlich zur Einschränkung der Entwicklung.

4.2.7 Die Effekte der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD auf die Entwicklung

Die Analyse der Embryonen, die TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimieren, zeigt auf der globalen Ebene der DNA- Modifikationen starke Veränderungen und eine darauf basierende Erhöhung der globalen Expressionslevel. Dies ist mit einer Einschränkung des Entwicklungspotenzials verbunden (Zusammenfassung der Ergebnisse Abbildung 4.5). Dabei führt die Überexpression von TDGwt und TET1CD zur verminderten Teilungsfähigkeit zum 2- Zellembryo (TDGwt 54%, TET1CD 57%) und bilden nur zu einem geringen Prozentsatz Blastozysten (TDGwt 30%, TET1CD 14%) (Tabelle 3.4). Die Überexpression von TDGmut wirkt sich dahingegen ausschließlich auf die Bildung späterer Stadien, wie das Blastozystenstadium, aus (52%) (Tabelle 3.4). Interessanterweise hat im Gegensatz dazu weder der Verlust von TDG, noch seiner katalytischen Aktivität, noch der Verlust von TET1 Auswirkungen auf die Entwicklung des präimplantiven Embryos (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011; Dawlaty et al. 2011). Der Verlust von TDG, oder seiner katalytischen Aktivität, ist erst im postimplantiven Stadien letal (E11.5 bzw. E10.5) (Cortellino et al. 2011; Cortázar et al. 2011). Das Fehlen von TET1 führt zwar zu einer Verschiebung der Bildung der ICM, hin zur Trophoblastenentwicklung, die geborenen Mäuse sind aber überlebensfähig und fertil (Dawlaty et al. 2011; Wu, A C D'Alessio, et al. 2011). Selbst Mäuse die den DKO von *TET1* und *TET2* tragen sind lebensfähig (Dawlaty et al. 2013). Ausschließlich der DKO von den präimplantiv am stärksten exprimierten TET Enzymen, *TET3* und *TET1*, zeigt Effekte in präimplantiven Stadien. Dabei erreichen nicht alle Embryonen das 8- Zellstadium, doch diese, die es erreichen, zeigen eine hohe Variabilität in den Methylierungs- und Expressionsleveln. Spätestens an E10.5 sind die Embryonen resorbiert (Kang et al. 2015).

Es gibt nun verschiedene Ansätze, die Restriktion der Entwicklung der Embryonen, in welchen zygotisch TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimiert wurde, zu erklären. Der erste Ansatz bezieht sich auf die deregulierte Expression. In 2- Zellembryonen, in welchen TDGwt, TDGmut oder TET1CD zygotisch überexprimiert wurde, konnte eine erhöhte Gesamtexpression detektiert werden (Abbildung 3.22, Kapitel 4.2.6). Bis hin zum Blastozystenstadium können die verschobenen Basenzusammensetzungen beobachtet werden (Gedächtniseffekt, Kapitel 4.2.5). Damit besteht wahrscheinlich eine deregulierte Expression auch über das 2-Zellstadium hinweg, wovon beispielsweise auch die Expression von Entwicklungs- oder Pluripotenzgenen betroffen sein könnte. Leider liegen in dieser Arbeit nur quantitative Expressionsdaten für 2-Zellembryonen vor. Die Analyse weitere Stadien wären für die Entwicklungsanalysen interessant und auch qualitative Daten (scRNA-Sequenzierung) könnten weiteren Aufschluss über die zum Entwicklungsstopp führenden Mechanismen geben. Neben DNA- Modifikationen haben bei der Aktivierung der Expression auch Histonmodifikationen einen großen Einfluss (Cedar & Bergman 2009). Ob diese sich durch die Überexpression sequenzspezifisch ändern, wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Über den Einfluss der Überexpression von TDGwt/mut und TET1CD auf DNA- und Histonmodifikationen an einzelnen Loci kann also nur spekuliert werden. Die Überexpression der verschiedenen Enzyme könnte zu einem

erhöhten Gehalt oder einer artifiziellen Zusammensetzung von Transkriptionsfaktoren oder Zellzykluskontroll- Proteinen führen. Dies würde möglicherweise die Teilung der Zellen hemmen oder diese sogar in Apoptose übergehen (Bertoli et al. 2013; Toyoshima 2009; F. Lu et al. 2016).

8- Zellembryonen, die den DKO von *TET1* und *TET3* tragen, zeigen eine stark erhöhte Variabilität der Expression von Zellzyklus- oder Apoptose- assoziierter Gene (Kang et al. 2015). Die Expression dieser Gene wird also von TET1/TET3 reguliert. Möglicherweise besitzt auch TET1CD eine regulative Funktion dieser Zellzyklus- oder Apoptosegene, da seine Überexpression schon in frühen Stadien zu einem Entwicklungsstopp führt (Tabelle 3.1, Tabelle 3.4). Eine solche regulative Aufgabe und die damit verbundene deregulierte Expression nach der Überexpression, würde auch die asynchronen Zellteilungen (Tabelle 8.16) und die geringere Anzahl der Zellen im Embryo zum Zeitpunkt E4.0 („Blastozyste“) erklären (Abbildung 3.7) (Bertoli et al. 2013; Toyoshima 2009; F. Lu et al. 2016; Wang et al. 2013; García-López & del Mazo 2012).

Auch könnte durch die Überexpression bedingte veränderte Modifikationskomposition die Expression von kleinen RNAs betroffen sein. Kleine RNAs werden im präimplantiven Embryo dynamisch exprimiert und spielen dort eine entscheidende Rolle in der Entwicklung (Liu et al. 2012; Yuan et al. 2016; García-López & del Mazo 2012). So sind im 2- Zell- und im 4-Zellstadium definierte, entwicklungspezifische miRNAs exprimiert (Wang et al. 2013). Ab dem 4-Zellstadium wird die Expression des Prozessierungsapparats der miRNAs reduziert (García-López & del Mazo 2012). Möglicherweise können jedoch in den Embryonen, in welchen Enzyme zygotisch überexprimiert wurden, über das 4-Zellstadium hinweg kleine RNAs prozessiert werden, woraufhin dann möglicherweise wichtige stadien- oder zellzyklusspezifische Gene reprimiert werden könnten und damit die Entwicklung hemmen. Ein Beispiel für eine miRNA, die im 2-/4- Zellembryo von Bedeutung ist, ist miR-154. Diese reguliert das Zellzyklusprotein *Cdca4* und den Transkriptionsfaktor *Tcf12* (Wang et al. 2013). Bei einer Deregulation der Expression von miR-154 könnte also möglicherweise ein Einfluss auf die Zellteilung und die Entwicklung ausgeübt werden.

Durch die frühen epigenetischen Effekte der Überexpression sind die Embryonen sehr in ihrer Entwicklung eingeschränkt und können nur zu geringen Prozentsätzen das Blastozystenstadium erreichen (TDGwt 30%, TDGmut 52%, TET1CD 14%). Einige Embryonen erreichen jedoch das Blastozystenstadium, formen aber nicht häufig eine klassische Blastozyste (Abbildung 3.7, Abbildung 3.21). Eine Blastozyste besteht aus einer ICM, welche den Embryo bildet, und Trophektoderm, welches die extraembryonalen Gewebe bildet (Abbildung 8.1). Schon im 4- Zellembryo werden die ersten Muster für die Zellidentität und morphologische Zugehörigkeit (ICM oder TE) in der späteren Blastozyste etabliert (Fujimori et al. 2003; Tabansky et al. 2013; Piotrowska-Nitsche & Zernicka-Goetz 2005). Die Pluripotenz und Zugehörigkeit zur ICM werden dabei maßgeblich von PRDM14 und CARM1 (H3R26me spezifische Methyltransferase) bestimmt (Torres-Padilla et al. 2007; Burton et al. 2013). PRDM14 wird im 4- Zellembryo ausschließlich in zwei Blastomeren exprimiert. Es interagiert mit CARM1 und bedingt deren Rekrutierung zur DNA. (Burton et al. 2013). Durch die Dimethylierung von

H3R26 in diesen zwei Zellen entsteht eine epigenetische Asymmetrie, wobei Blastomere mit hohen PRDM14- Leveln auch höhere Level von H3R26me2 besitzen (Burton et al. 2013). Erhöhte H3R26me2- Level erhöhen die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Zellen die ICM zu formen (Piotrowska-Nitsche & Zernicka-Goetz 2005; Torres-Padilla et al. 2007). Die Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD führt zu einer erhöhten Gesamtexpression im 2-Zellstadium (Abbildung 3.22). Von dieser Erhöhung könnten auch PRDM14 und/oder CARM1 betroffen sein und damit ein Einfluss auf die korrekte Blastozystenformation ausgeübt werden. Eine erhöhte Expression bzw. Fehlexpression von PRDM14 oder CARM1 würde das entsprechende Blastomer der ICM „zuordnen“. Um diesen möglichen Einfluss zu zeigen, müssten PRDM14 und CARM1 mittels Immunfluoreszenz- Analysen oder mittels qRT- PCRs der einzelnen Blastomere von behandelten Embryonen untersucht werden. Auch die Immunfluoreszenz- Analyse von H3R26me2 wäre in diesem Zusammenhang wichtig. Interessanterweise zeigen Blastozysten, in welchen zygotisch TDGwt oder TDGmut überexprimiert wurde, tendenziell eine höhere Expression des ICM- charakteristischen Proteins NANOG und eine höhere Anzahl von NANOG- positiven Zellen gegenüber der Kontrolle. Diese Zellen formen nicht zwangsläufig eine ICM, sondern können in der Blastozyste verteilt sein (Abbildung 8.32), was abermals die deregulierte Blastozystenformation zeigt. Embryonen, in welchen TET1CD überexprimiert wurde, bilden nicht annähernd morphologisch normale Blastozysten aus.

Der frühe Entwicklungsstopp der Embryonen, in welchen TDGwt oder TET1CD überexprimiert wurde, kann neben der Deregulation der Expression auch auf der extremen Akkumulation von Strangbrüchen (γ H2A.X- Foci) basieren (Abbildung 3.4, Abbildung 3.19). Studien von Zygoten, deren Spermien- DNA vor der Befruchtung durch H₂O₂ geschädigt wurde, zeigen einen Entwicklungsstopp im Zygotenstadium an der G₂- Metaphase- Grenze. Dieser Stopp wird durch die Phosphorylierung der Zellzykluskontrollpunkt- Proteine Cdc25 und Cdc2 via der ATM (pSer-1981)-Chk1 (pSer-345) Kaskade induziert (Qian et al. 2016). Zygoten besitzen zwar keinen G₁/S Kontrollpunkt, allerdings diesen G₂/M Kontrollpunkt, der es ihnen erlaubt DNA- Schäden vor der Zellteilung zu beheben. Die Zygoten, die nach einem solchen Stopp trotzdem das 2-Zellsatdium erreichen, unterlaufen bei nicht effektiver Reparatur in der weiteren Entwicklung den graduellen Zelltod (Gawecka et al. 2013; Y. Zhang et al. 2016; Song et al. 2014). Ein solcher Stopp war für Zygoten zu beobachten, in welchen TDGwt oder TET1CD überexprimiert wurde. Sie arretierten am Übergang von G₂- zu Metaphase, was dadurch zu erkennen war, dass die Embryonen immer noch zwei Pronuklei besaßen und sich somit nicht in der Metaphase befinden (Abbildung 8.23). Die Zeit des Arrests wurde für die Reparatur der Strangbrüche genutzt, was durch die deutliche Reduktion der γ H2A.X- Foci 28hpf erkennbar ist (Abbildung 8.23). 28hpf haben einige arretierte Zygoten das 2-Zellstadium erreicht, wobei sich dennoch viele 1- Zellembryonen in der G₂- Phase befanden. Embryonen, die das 2- Zellstadium erreichten, erreichten jedoch nicht zwangsläufig das Blastozystenstadium (TDGwt 30%, TET1CD 14%), sondern arretierten in verschiedenen präimplantiven Stadien (Tabelle 8.16). Diese Entwicklungsstopps basieren wahrscheinlich auf unvollständiger/falscher Reparatur. Der Effekt der Arretierung im Zygotenstadium

war bei Zygoten, welche TET1CD überexprimierten, bei hoher mRNA- Dosis noch größer als bei Zygoten, in welchen TDGwt überrepräsentiert wurde (Tabelle 3.4). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die DNA- Schäden nach der Überexpression von TET1CD extremer ausfallen und zudem sogar beide parentalen Genome betreffen (Abbildung 3.4). Extremer heißt hier, dass sich durch die Überexpression von TET1CD im Gegensatz zu TDGwt Doppelstrangbrüche (DSB) bilden können. *In vitro*- Analysen der TET Aktivität zeigen eine bevorzugte symmetrische Oxidation, zumindest von 5hmC zu 5fC (Xu et al. 2014). Eine gleichzeitige Reparatur von symmetrischen 5fCpGs würde zu DSBs führen. Die enormen Mengen der oxidierten Basen in Zygoten, die TET1CD überexprimieren, die mögliche direkte Nachbarschaft dieser Basen und das folgende mögliche symmetrische Reparieren führen hier wahrscheinlich zu vermehrten DSBs. Diese DSBs sind in Zygoten, welche TDGwt überexprimieren, wahrscheinlich weniger zu finden. Das liegt daran, dass die zu reparierenden Basen (5fC/5caC) wildtypisch in viel geringeren Mengen vorhanden sind, als bei der artifiziellen Oxidation mittels TET1CD. Zudem repariert TDGwt nicht zwei symmetrische 5fCpGs oder 5caCpGs gleichzeitig, wodurch DSBs verhindert werden (Weber et al. 2016). Die MA- HPBS- Daten, die in dieser Arbeit generiert wurden zeigen, zudem, dass ungefähr die Hälfte der 5fCpG/5caCpG- Positionen hemimodifiziert vorliegt (Abbildung 3.24). An diesen 5fCpG/5caCpG- Position wäre dann nur ein Strang von der Aktivität exogenem TDGwt betroffen, wodurch nur SSBs entstehen. Welche Glykosylasen für die Reparatur der oxidierten Basen in der Zygote verantwortlich sind und ob diese gleichzeitig symmetrische 5fCpG/5caCpG- Positionen reparieren ist bisher nicht bekannt.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die im Zygotenstadium von TDGwt und TET1CD provozierten DNA- Schäden Auswirkungen bis hin zum Blastozystenstadium haben können, ähnlich der Zygoten mit H₂O₂- beschädigter Spermien- DNA. Zudem konnte wie bei Zygoten mit H₂O₂- beschädigter Spermien- DNA auch für TDGwt und TET1CD ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden (Qian et al. 2016). Um zu untersuchen, ob diese Zygoten wirklich dem G2/M- Kontrollpunktstopp unterliegen, müssten weitere Immunfluoreszenz- Analysen der phosphorylierten Proteine Cdc25 und Cdc2 vorgenommen werden.

In Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, ist auffällig oft das Vorkommen von mehr als zwei Pronuklei zu beobachten (Abbildung 8.2). Möglicherweise beruht dies auf der Fragmentierung des Genoms. Diese könnte auf den Verlust von 5mC und Chromatinveränderungen zurückzuführen sein, was zur Genominstabilität führt (Xu et al. 1999; Shimoda et al. 2014; Morales-Ramírez et al. 2008). Zudem kann die Fragmentierung auf den akkumulierenden (Doppel-)Strangbrüchen basieren. Die Bildung von Mikronuklei konnte auch in PGC7/Stella KO Embryonen beobachtet werden. In diesen Embryonen wird durch das Fehlen von PGC7/Stella die Oxidation und Demethylierung des maternalen Genoms erlaubt. Die Mikronuklei entstehen aus eben diesem maternalen Genom und rühren von beschädigtem Chromatin her (Nakatani et al. 2015). So wäre es auch für Zygoten, welche TET1CD überexprimieren, interessant, die Instabilität und die damit verbundenen zusätzlichen Nuklei einem

der parentalen Genom zuzuordnen. Dazu wären Immunfluoreszenzfärbungen von H3K9me2 nötig, welches stark im maternalen Genom, aber nicht im paternalen Genom vorhanden ist.

Noch größere Einschränkung der Entwicklung als Embryonen, welche TET1CD überexprimieren, zeigen Embryonen, in welchen TDGwt+TET1CD überexprimiert wurde (Tabelle 3.4). Dies basiert wahrscheinlich darauf, dass der Umsatz von 5mC und 5fC/5caC hier noch stärker ist, was heißt, dass TET1CD große Mengen von 5mC zu 5fC/5caC oxidiert und TDGwt diese Basen ausschneidet (Abbildung 3.20). Dies würde bedeuten, dass TET1CD symmetrisch an sehr vielen benachbarten Positionen 5mC oxidiert, woraufhin diese Positionen von endogenen Reparaturenzymen (siehe TET1CD) und durch das exogene TDGwt (5fC/5caC) repariert werden. Ob die endogenen Glykosylasen symmetrisch oxidierte Positionen gleichzeitig reparieren, ist nicht geklärt. TDG jedenfalls schneidet zwar keine symmetrisch vorhandenen 5fCpG/5caCpG- Positionen (Weber et al. 2016), könnte aber durch die gleichzeitige Reparatur benachbarter 5fCpG/5caCpG- Positionen zu gefährlichen DSBs führen. Die vermutlich resultierende Kombination aus DSBs und SSBs, welche durch TET1CD, endogene Enzyme und TDGwt entstanden sind, und die wahrscheinlich hohen Mengen von DSBs/SSBs vermindern das Entwicklungspotenzial stark. So kann lediglich ein geringer Anteil der Zygoten das 4-Zellstadium erreichen (Tabelle 8.16). Zudem könnte durch den fast kompletten Verlust der DNA- Modifikationen (nur noch 5hmC vorhanden) die Regulation der Genexpression besonders stark beeinträchtigt sein. Gesamtexpressionsanalysen liegen für diese Embryonen nicht vor.

Embryonen, welche homozygot für TDGmut (*Tdg*^{N151A/N151A}) sind, haben eine kleinere Körpergröße und sterben einen Tag früher als *Tdg* KO Embryonen (E10.5 vs E11.5) (Cortellino et al. 2011). Für dieses Phänomen konnte von Cortellino et al. keine Erklärung gefunden werden. Im Jahr der Veröffentlichung dieser Studie (2011) waren 5fC/5caC und die Aktivität von TDG gegenüber diesen beiden Basen noch nicht entdeckt und demnach wurden lediglich die 5mC- Level untersucht. Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass durch die Überexpression von TDGmut die 5fC- Level stark steigen und es zu einem Anstieg der Gesamtexpression kommt, könnte eine mögliche Erklärung für den früheren Tod der *Tdg*^{N151A/N151A} Embryonen sein. Die zygotische Überexpression von TDGmut zeigt, im Gegensatz zu *Tdg*^{N151A/N151A} Embryonen, schon im präimplantiven Embryo deutliche Effekte auf die Entwicklung (Tabelle 3.4). Dies hängt einerseits womöglich mit dem deutlichen Verlust von 5mC zusammen und der damit verbundenen deregulierten Expression. Andererseits sind im Embryo artifiziell hohe Level des überexprimierten Proteins vorhanden, wohingegen bei Cortellino et al. die Expression von TDGmut nur endogene TDG- Expressionslevel erreicht, die in frühen präimplantiven Stadien niedrig sind. 5fC akkumuliert dann also bis in postimplantive Stadien der *Tdg*^{N151A/N151A} Embryonen, wobei an E10.5 vermutlich zu hohe, letale 5fC- Level erreicht sind. Die Analyse von 5fC in präimplantiven und postimplantiven *Tdg*^{N151A/N151A} Embryonen wäre demnach sehr interessant.

Die Überexpression von TDGmut hat im Vergleich zu TDGwt keinen Effekt auf die erste Zellteilung. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass auf Grund der fehlenden katalytischen Aktivität von TDGmut keine Akkumulation von Strangbrüchen stattfindet (keine erhöhten γ H2A.X- Level, Abbildung 3.19). Auch

hier scheint die in Kapitel 4.1.3 beschriebene quantitative Toleranzschwelle und die Position der Oxidation von Bedeutung zu sein (Abbildung 4.2), da die durch die Überexpression von TDGmut bedingten erhöhten Mengen von 5fC keine Reparaturreaktion auslösen. Somit erfolgt kein G2/M-Stopp. Interessanterweise entwickeln sich jedoch nur ca. 50% der Embryonen zur Blastozyste. Dieser Verlust muss mit den in den frühen Stadien erzielten epigenetischen Veränderungen zusammenhängen. Diese betreffen unter Umständen Sequenzen, die erst in späteren Stadien regulative Aufgaben der Expression besitzen und sich somit erst dann auf die Entwicklung auswirken (siehe 4.2.5 Beispiel *Liz*). Möglicherweise akkumuliert 5fC über die Zeit auch sehr stark, sodass sowohl die deregulierte Expression als auch Reparatur- basierte Strangbrüche das Entwicklungspotenzial vermindern. Erhöhte Level von 5fC scheinen sich stärker negativ auf die Entwicklung auszuwirken als niedrige, denn der DKO von *TET1/2*, der mit einer Reduktion von 5fC verbunden ist, zeigt weder prä- noch postimplantive Entwicklungsdefekte (Cortázar et al. 2011; Dawlaty et al. 2013). Demnach haben definierte Mengen von 5fC eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Mausembryos. Dies konnte auch durch die gewebespezifische Detektion von 5fC im postimplantiven Embryo gezeigt werden (Iurlaro et al. 2016).

Die Überexpression von TDGmut+TET1CD zeigt in Embryonen den gleichen Entwicklungseffekt wie die von TDGwt+TET1CD, nämlich die Entwicklung bis zum 4-Zellembryo (Tabelle 3.4, Tabelle 8.16). Dies mag einerseits an der deregulierten Expression bestimmter Gene liegen (siehe oben). Andererseits entstehen durch die Überexpression von TET1CD starke γ H2A.X- Foci (nicht nachgewiesen für die Kombination), die auch im Zusammenhang mit DSB stehen können (siehe TET1CD). Diese DNA-Schäden entstehen vermutlich auch bei der Überexpression von TDGmut+TET1CD und führen dann schon im 2-/4- Zellstadium zu Entwicklungseinschränkungen (siehe oben TDGwt, TET1CD). Interessanterweise unterscheiden sich Embryonen, welche TDGmut+TET1CD oder TET1CD überexprimieren, in ihrer Entwicklung deutlich, obwohl die Modifikationskombination sich nicht grundlegend unterscheidet, tendenziell sogar ähnlich ist (Abbildung 3.20, Zusammenfassung Abbildung 4.5). In beiden Gruppen werden die 5mC- Level deutlich reduziert, die Level von 5hmC erhöht. In TDGmut+TET1CD überexprimierenden Embryonen ist das Level halt von 5fC etwas erhöht gegenüber den Embryonen, die TET1CD überexprimieren. Das Level von 5caC ist sogar vergleichbar zur Kontrolle. Während fast alle Embryonen, welche zygotisch TDGmut+TET1CD überexprimieren, 48hpf im 2- Zellstadium arretieren, entwickeln sich Embryonen, in welchen TET1CD zygotisch überexprimiert wurde, zum ungefähr gleichen prozentualen Anteil zum 2-, 4- und 6- Zellembryo (Tabelle 8.16). Dieser Unterschied muss also mit dem Level von 5fC/5caC, den betroffenen Sequenzen und den damit verbundenen Expressionsänderungen zusammenhängen.

Es wäre interessant zu analysieren, wie sich die frühen durch Überexpression erzielten epigenetischen Effekte auf die postimplantive Entwicklung auswirken und ob der beschriebene Gedächtniseffekt auch noch später in der Entwicklung global zu detektieren ist. Eindrucksvolle Ergebnisse diesbezüglich konnten von Greenberg et al. erzielt werden (siehe Kapitel 4.2.5). Es wurde gezeigt, dass der Knockout

eines ausschließlich in der präimplantativen Phase exprimierten imprinteten Gens, welches zu diesem Zeitpunkt keine Rolle spielt, zu lebenslangen Veränderungen des DNA- Methylierungszustandes, der H3K27me3- Level und der Expression führt. Dies hat letztendlich Auswirkungen auf die Entwicklung und ist mit einer verminderten Körpergröße verbunden (Greenberg et al. 2016). Damit wurde gezeigt, dass die präimplantive Transkription und der zu diesem Zeitpunkt etablierte epigenetische Status Auswirkungen in der späteren Entwicklung haben kann. Um einen solchen Effekt auch für die Überexpression von TDGwt, TDGmut oder TET1CD zu erforschen, müssten Embryotransfer-Experimente durchgeführt werden. Mit diesen Experimenten wurde begonnen; die Ergebnisse liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Zusammenfassung der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD

Basengenaue Analysen von 5fC/5caC zeigen, dass in den analysierten repetitiven Elementen die Mengen der beiden Basen relativ gering sind, aber zwischen den Elementen schwanken. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese der sequenzspezifischen Oxidation durch die TET Enzyme und der damit verbundenen sequenzspezifischen Mechanismen der Demethylierung (Kapitel 4.1.4). Die Überexpression von TDGwt führt zu einem drastischen Methylierungsverlust in diesen Elementen und lässt auf einen nicht- katalytischen Effekt schließen, was durch die Immunfluoreszenzanalysen von TDGmut unterstützt wird.

Die zygotische Überexpression verschiedener epigenetisch wirksamer Enzyme führt zu unterschiedlichen Veränderungen des epigenetischen Gleichgewichts (Abbildung 4.5). Die in der Zygote/2- Zellembryo veränderten Basenkompositionen bleiben bis zur Blastozyste erhalten und unterliegen einem epigenetischen Gedächtnis- Effekt. Die Veränderung der erzielten Modifikationszusammensetzung führt zu verstärkter Expression, die vorrangig auf dem Verlust von 5mC und möglicherweise dem Anstieg von 5fC basiert. Durch die deregulierte Expression verliert der Embryo sein Entwicklungspotenzial und erreicht, abhängig vom überrepräsentierten Enzym, nur zu verminderter Prozentzahl das Blastozystenstadium. Zudem ist das Potenzial der Entwicklung abhängig von der in der Zygote erfolgten bzw. erforderlichen Reparaturintensität. Ist diese stark, arretiert die Zygote, um die größtmögliche Reparaturleistung zu ermöglichen. Häufig ist diese jedoch nicht komplett, sodass der Embryo in der weiteren präimplantiven Entwicklung den graduellen Zelltod durchläuft.

Somit konnte gezeigt werden, dass das in der Zygote etablierte epigenetische Gleichgewicht und die damit verbundene Regulation von Expression und Reparatur essentiell wichtig für die präimplantive Entwicklung ist.

	5mC	5hmC	5fC	5caC	γH2A.X	Transkription	Entwicklung	
							2-Zell	Blastozyste
Tet1CD	↓	↑	↑	↑	♂♀	↑	×	×
TDGwt	↘	↘	↓	↓	♂	↗	×	×
TDGmut	↘	↘	↑	↓	×	↗	✓	×
Tet1CD+TDGwt	↓	↗	↓	na	♂♀ na	na	×	×
Tet1CD+TDGmut	↓	↑	↑	→	♂♀ na	na	×	×

Abbildung 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Überexpression von TDG und TET1CD. na= nicht analysiert; die unter „na“ befindlichen hellgrauen Zeichen geben die, auf den erzielten Ergebnissen basierenden, zu erwartenden Auswirkungen der Überexpression an.

4.3 Fazit

Die Funktion von 5hmC, 5fC und 5caC im Genom des präimplantiven Embryos konnte aus technischen Gründen bisher nur ansatzweise analysiert werden. Es konnte bislang gezeigt werden, dass diese Basen vornehmlich im paternalen Genom der Zygote lokalisiert sind und dort eine Aufgabe während der epigenetischen Reprogrammierung haben.

In dieser Arbeit wurde mittels Überrepräsentation epigenetisch wirksamer Enzyme das epigenetische Gleichgewicht beeinflusst und die Auswirkungen auf die Entwicklung und die epigenetische Reprogrammierung analysiert. Dadurch konnten den jeweiligen Modifikationskompositionen eine definierte Rolle im Entwicklungspotenzial zugeschrieben werden und die Funktion der einzelnen Basen genauer erklärt werden. So konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass definierte Mengen und wahrscheinlich definierte Positionen der epigenetischen DNA- Modifikationen essentiell für die präimplantive Entwicklung sind. Ein Ändern dieses Gleichgewichts führt basierend auf unterschiedlichen Mechanismen zu einer Einschränkung der Entwicklung.

Um diesen Beobachtungen weitere Tiefe zu verleihen, müssen in Zukunft zusätzliche basengenaue Untersuchungen der verschiedenen DNA- Modifikationen durchgeführt werden. Genomweite Analysen (Entwicklungs- und Pluripotenzgene eingeschlossen) könnten wildtypischen und überexprimierenden Embryonen einen definierten epigenetischen Status zuweisen. Die gleichzeitige Analyse des Transkriptoms, genau dieser Embryonen mittels scRNA- Sequenzierung, würde das Bild der regulativen Funktion von 5hmC, 5fC und 5caC komplettieren. Dadurch könnten direkte Rückschlüsse auf die Rolle der oxidierten Basen in der Entwicklung gezogen werden. Das gezielte Leiten von TET Enzymen oder TDG an bestimmte Loci (CRIPR/Cas9), mit folgenden DNA- und RNA- Sequenzierungsanalysen, könnte zudem die Funktion der entsprechenden Modifikationen an definierten Positionen aufklären. Genomweite Hairpin- Bisulfitanalysen, in Kombination mit der Analyse der oxidierten Basen, wären zukünftig erstrebenswert, um die Reprogrammierungsdynamiken in der Zygote weitgreifend zu verstehen.

Durch die Aufklärung der Lokalisation, Funktion und Dynamiken von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der totipotenten Zygote und den pluripotenten Zellen der folgenden präimplantiven Stadien könnten neue Ansatzpunkte für die effiziente künstliche Reprogrammierung geschaffen werden und eine Möglichkeit bieten, die personalisierte regenerative Medizin voran zu bringen. Zudem könnte durch die umfassende Aufklärung von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC auch die reproduktive Medizin optimiert werden. Auch kann die Aufklärung von allgemeingültigen Mechanismen der Regulation der Dynamiken der DNA- Modifikationen zu Therapieansätzen von Krebs oder Immunkrankheiten beitragen.

5 Zusammenfassung

Während der präimplantiven Säugerentwicklung finden genomweite Umstrukturierungen der epigenetischen DNA- und Histonmodifikationen statt, die den Embryo auf die transkriptionelle Aktivierung und die damit verbundene korrekte Entwicklung vorbereiten. Dabei erfolgt der Verlust von 5mC mit einem gleichzeitigen Anstieg von 5hmC, 5fC und 5caC.

In dieser Arbeit wurden Enzyme in die Mauszygote eingebracht, die für die Oxidation von 5mC oder das Ausschneiden von 5fC/5caC verantwortlich sind, wodurch sich die Mengen und Muster dieser Basen änderten. Dies erlaubte die funktionelle Analyse von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der epigenetischen Reprogrammierung und der präimplantiven Entwicklung. Es konnte ein Einfluss der Oxidation von 5mC auf die DNA- Methylierungsdynamiken gezeigt werden. Die Daten unterstützen die Theorie der komplexen, sequenzspezifischen De- und Remethylierungsmechanismen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der epigenetische Status, welcher in der Zygote etabliert wird, im präimplantiven Embryo aufrechterhalten wird und entscheidend für dessen Entwicklung ist. Ein epigenetisches Ungleichgewicht ist mit einer Entwicklungsrestriktion verbunden, welche auf verschiedenen Mechanismen wie z.B. Expressionsvariation oder DNA- Schäden basiert. Der Anstieg der oxidierten Basen führt dabei nämlich zu DNA- Reparaturinitiierung.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass das in der Zygote etablierte epigenetische Gleichgewicht essentiell für die präimplantive Entwicklung ist.

6 Summary

During preimplantation mouse development, the genome encounters a dramatic epigenetic reprogramming, which is essential for transcriptional activation and a proper early development. The reprogramming includes extensive changes of histone modifications and genome-wide loss of DNA methylation which is coupled to oxidation of 5mC to 5hmC, 5fC and 5caC.

In this study, different enzymes, responsible for the oxidation of 5mC and the excision of 5fC/5caC have been over represented in the zygote to alter the amounts and patterns of these epigenetic modifications. This approach enabled the functional analysis of 5hmC, 5fC and 5caC in reprogramming and preimplantation development. It was shown, that the artificial oxidation of 5mC influences the DNA methylation dynamics. Overall the data, support the existing theories about complex de- and remethylation dynamics in the zygote. Beside this it was shown, that the epigenetic state which is established in the zygote is maintained in the preimplantation embryo and is essential for a proper development. The epigenetic imbalance leads to developmental restrictions, which are based on different mechanisms like expression variations or DNA damage. The enhanced oxidation thereby leads to DNA repair initiation which results in a stop of further development.

The results of this study show, that the epigenetic equilibrium established in the zygote is essential for the preimplantation development.

7 Referenzen

- Abdel-Wahab, O. et al., 2009. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, 114(1), pp.144–147.
- Adenot, P.G. et al., 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), pp.4615–4625.
- Agius, F., Kapoor, A. & Zhu, J.-K., 2006. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), pp.11796–11801.
- Amouroux, R. et al., 2016. supplement De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nature cell biology*, (November 2015), pp.1–5.
- Anderson, R. et al., 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 91(1–2), pp.61–68.
- Aoki, F., Worrall, D.M. & Schultz, R.M., 1997. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology*, 181(2), pp.296–307.
- Arand, J. et al., 2012. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases D. Schübeler, ed. *PLoS Genetics*, 8(6), p.e1002750.
- Arand, J. et al., 2015. Selective impairment of methylation maintenance is the major cause of DNA methylation reprogramming in the early embryo. *Epigenetics & chromatin*, 8(1), p.1.
- Aravind, L. & Koonin, E. V., 2000. The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome biology*, 1(4), p.RESEARCH0007.
- Bachman, M. et al., 2015. 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nature chemical biology*, pp.1–4.
- Bachman, M. et al., 2014. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem*, 6(12), pp.1049–1055.
- Balhorn, R., 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology*, 8(9), p.227.
- Bannister, A.J. et al., 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp.17732–17736.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–395.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384, pp.641–3.
- Baranovskiy, A.G. et al., 2014. Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Research*, 42(22), pp.14013–14021.
- Barreto, G. et al., 2007. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 445, pp.671–675.
- Beraldi, R. et al., 2006. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(3), pp.279–287.
- Beranek, D.T., 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(1), pp.11–30.
- Bergman, Y. & Mostoslavsky, R., 1998. DNA demethylation: Turning genes on. *Biological Chemistry*, 379(4–5), pp.401–407.
- Bernstein, N.K. et al., 2005. The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Molecular Cell*, 17(5), pp.657–670.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M. & de Bruin, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), pp.518–28.
- Bestor, T.H. & Bourc'his, D., 2004. Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp. 381–387.

- Bhattacharya, S.K. et al., 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397(6720), pp.579–583.
- Bian, C. & Yu, X., 2014. PGC7 suppresses TET3 for protecting DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 42(5), pp.2893–2905.
- Boland, M.J. & Christman, J.K., 2008. Characterization of Dnmt3b:Thymine-DNA Glycosylase Interaction and Stimulation of Thymine Glycosylase-Mediated Repair by DNA Methyltransferase(s) and RNA. *Journal of Molecular Biology*, 379(3), pp.492–504.
- Bollati, V. et al., 2009. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis*, 30(8), pp.1330–1335.
- Booth, M.J. et al., 2013. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nature protocols*, 8(10), pp.1841–1851.
- Booth, M.J. et al., 2014. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution. *Nature chemistry*, 6(5), pp.435–40.
- Bottiglieri, T., 2002. S-Adenosyl-L-methionine (S-AdoMet): From the bench to the bedside - Molecular basis of a pleiotropic molecule. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5).
- Boyes, J. & Bird, A., 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, 64(6), pp.1123–1134.
- Bransteitter, R. et al., 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp.4102–7.
- Braude, P. et al., 1979. Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature*, 282(5734), pp.102–5.
- Broderick, P. et al., 2006. Evaluation of NTHL1, NEIL1, NEIL2, MPG, TDG, UNG and SMUG1 genes in familial colorectal cancer predisposition. *BMC cancer*, 6, p.243.
- Brundret, K., Dalziel, W. & Hesp, B., 1972. X-ray crystallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: A tetracyclic Diterpenoid Containing a New Ring System. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, pp.1027–1028.
- Brykczynska, U. et al., 2010. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*, 17(6), pp.679–687.
- Buechner, C.N. et al., 2015. Lesion search and recognition by thymine DNA glycosylase revealed by single molecule imaging. *Nucleic Acids Research*, 43(5), pp.2716–2729.
- Burton, A. et al., 2013. Single-Cell Profiling of Epigenetic Modifiers Identifies PRDM14 as an Inducer of Cell Fate in the Mammalian Embryo. *Cell Reports*, 5(3), pp.687–701.
- Carlson, L.L., Page, A.W. & Bestor, T.H., 1992. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: Implications for genomic imprinting. *Genes and Development*, 6, pp.2536–2541.
- Cedar, H. & Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics*, 10(5), pp.295–304.
- Chadwick, B.P. & Lane, T.F., 2005. BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma*, 114(6), pp.432–439.
- Chedin, F., Lieber, M.R. & Hsieh, C.-L., 2002. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), pp.16916–21.
- Chen, Q. et al., 2013. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 493(7433), pp.561–4.
- Chen, R.Z. et al., 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395(6697), pp.89–93.
- Cho, C. et al., 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature genetics*, 28(may), pp.82–86.
- Choi, Y. et al., 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell*, 110(1), pp.33–42.

- Cirio, M.C. et al., 2008. DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Developmental Biology*, 324, pp.139–150.
- Cirio, M.C. et al., 2008. Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints. *BMC developmental biology*, 8, p.9.
- Cortázar, D. et al., 2011. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*, 470, pp.419–423.
- Cortellino, S. et al., 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146, pp.67–79.
- Costa, Y. et al., 2013. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*, 495(7441), pp.370–4.
- Crawford, D.J. et al., 2016. Tet2 Catalyzes Stepwise 5-Methylcytosine Oxidation by an Iterative and de novo Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), pp.730–733.
- Dawlaty, M.M. et al., 2013. Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development. *Developmental Cell*, 24(3), pp.310–323.
- Dawlaty, M.M. et al., 2014. Loss of tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Developmental Cell*, 29(1), pp.102–111.
- Dawlaty, M.M. et al., 2011. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell*, 9(2), pp.166–175.
- Dean, W. et al., 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), pp.13734–13738.
- Dean, W., 2008. The elusive Dnmt1 and its role during early development. *Epigenetics*, 3(4), pp.175–178.
- Dean, W., Santos, F. & Reik, W., 2003. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 14(1), pp.93–100.
- Deaton, A.M. & Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, 25(10), pp.1010–22.
- Deplus, R. et al., 2013. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *The EMBO Journal*, 32(5), pp.645–655.
- Dietrich, J.-E. & Hiiragi, T., 2007. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development (Cambridge, England)*, 134(23), pp.4219–4231.
- Doherty, A.S., Bartolomei, M.S. & Schultz, R.M., 2002. Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development. *Dev Biol*, 242(2), pp.255–266.
- Dong, S.M. et al., 2001. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(7), pp.1982–1986.
- Eckersley-Maslin, M.A. et al., 2016. MERVL/Zscan4 Network Activation Results in Transient Genome-wide DNA Demethylation of mESCs. *Cell Reports*, 17(1), pp.179–192.
- Engel, N. et al., 2009. Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 4(2), pp.98–9.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, pp.154–156.
- Farthing, C.R. et al., 2008. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet*, 4(6), p.e1000116.
- Feng, S., Jacobsen, S.E. & Reik, W., 2010. Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development. *Science*, 330(1), pp.622–627.
- Ficz, G. et al., 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 473(7347), pp.398–402.
- Friedman, J.I. & Stivers, J.T., 2010. Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes. *Biochemistry*, 49(24), pp.4957–4967.

- Frosina, G. et al., 1996. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(16), pp.9573–9578.
- Fujimori, T. et al., 2003. Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos. *Development*, 130(21), pp.5113–22.
- Fulka, H. et al., 2004. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction*, 128(6), pp.703–708.
- Fulka, J. et al., 2006. DNA methylation pattern in pig in vivo produced embryos. *Histochemistry and Cell Biology*, 126(2), pp.213–217.
- Furuya, M. et al., 2007. H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. *The Journal of reproduction and development*, 53(4), pp.895–902.
- Gao, Y. et al., 2013. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell*, 12(4), pp.453–469.
- García-López, J. & del Mazo, J., 2012. Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(8), pp.847–854.
- Gatewood, J.M. et al., 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, 236(4804), pp.962–964.
- Gaudet, F. et al., 2004. Dnmt1 expression in pre- and postimplantation embryogenesis and the maintenance of IAP silencing. *Molecular and cellular biology*, 24(4), pp.1640–1648.
- Gawecka, J.E. et al., 2013. Mouse Zygotes Respond to Severe Sperm DNA Damage by Delaying Paternal DNA Replication and Embryonic Development. *PLoS ONE*, 8(2).
- Giehr, P. et al., 2016. The Influence of Hydroxylation on Maintaining CpG Methylation Patterns: A Hidden Markov Model Approach. *PLoS Computational Biology*, 12(5).
- Goodier, J.L. et al., 2001. A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Research*, 11(10), pp.1677–1685.
- Gopalakrishnan, S. et al., 2009. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Human Molecular Genetics*, 18(17), pp.3178–3193.
- Gorbunova, V. et al., 2004. Genome-wide demethylation destabilizes CTG-CAG trinucleotide repeats in mammalian cells. *Human Molecular Genetics*, 13(23), pp.2979–2989.
- Gowher, H. & Jeltsch, A., 2001. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites. *Journal of Molecular Biology*, 309(5), pp.1201–1208.
- Goyal, R., Reinhardt, R. & Jeltsch, A., 2006. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 34(4), pp.1182–1188.
- Greenberg, M.V.C. et al., 2016. Transient transcription in the early embryo sets an epigenetic state that programs postnatal growth. *Nature genetics*, (November).
- Grosser, C. et al., 2015. Altering TET dioxygenase levels within physiological range affects DNA methylation dynamics of HEK293 cells. *Epigenetics*, 10(9), pp.819–833.
- Gu, T.P. et al., 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), pp.606–610.
- Guibert, S., Forné, T. & Weber, M., 2012. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Research*, 22(4), pp.633–641.
- Guo, F. et al., 2014. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, 15(4), pp.447–458.
- Guo, F. et al., 2015. The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell*, 161(6), pp.1437–1452.
- Guo, H. et al., 2014. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature*, 511(7511), pp.606–10.
- Guo, J.U. et al., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), pp.423–434.

- Gurdon, J.B., 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*, 10(4), pp.622–40.
- Gurdon, J.B. & Wilmut, I., 2011. Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), pp.1–14.
- Habibi, E. et al., 2013. Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 13(3), pp.360–369.
- Hackett, J.A. et al., 2013. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6118), pp.448–52.
- Hajkova, P. et al., 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*, 452(7189), pp.877–881.
- Hajkova, P. et al., 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 117(1–2), pp.15–23.
- Hajkova, P. et al., 2010. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, 329(5987), pp.78–82.
- Hammoud, S.S. et al., 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 460(7254), pp.473–478.
- Hardeland, U. et al., 2002. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO Journal*, 21(6), pp.1456–1464.
- Hashimoto, H. et al., 2012. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Research*, 40(11), pp.4841–4849.
- Hashimoto, H. et al., 2014. Structure of a Naegleria Tet-like dioxygenase in complex with 5-methylcytosine DNA. *Nature*, 506(7488), pp.391–5.
- Hata, K. et al., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development (Cambridge, England)*, 129, pp.1983–1993.
- Hazra, T.K. et al., 2002. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021–9258 (Print)), pp.30417–30420.
- He, Y.-F. et al., 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), pp.1303–7.
- He, Y.-F. et al., 2010. Tet mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science*, 333(September), pp.1303–1307.
- Heard, E., Clerc, P. & Avner, P., 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annual review of genetics*, 31, pp.571–610.
- Hegde, M.L. et al., 2008. Physical and functional interaction between human oxidized base-specific DNA glycosylase NEIL1 and flap endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), pp.27028–27037.
- Hegde, M.L., Hazra, T.K. & Mitra, S., 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell research*, 18(1), pp.27–47.
- Van Der Heijden, G.W. et al., 2005. Asymmetry in Histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of Development*, 122(9), pp.1008–1022.
- Hemberger, M., Dean, W. & Reik, W., 2009. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(8), pp.526–537.
- Hendrich, B. & Bird, A., 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and cellular biology*, 18(11), pp.6538–47.
- Henninger, E.E. & Pursell, Z.F., 2014. DNA polymerase ϵ and its roles in genome stability. *IUBMB Life*, 66(5), pp.339–351.
- Hirasawa, R. et al., 2008. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes and Development*, 22, pp.1607–1616.

- Howlett, S.K. & Reik, W., 1991. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development (Cambridge, England)*, 113(1), pp.119–27.
- Hsieh, C.-L., 2005. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC biochemistry*, 6, p.6.
- Hu, L. et al., 2013. Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation. *Cell*, 155(7), pp.1545–1555.
- Hu, L. et al., 2015. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature*, 527(7576), pp.118–22.
- Hu, S. et al., 2013. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *eLife*, 2013(2).
- Hu, X. et al., 2014. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14, pp.512–522.
- Huang, Y. et al., 2014. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), pp.1361–6.
- Huffman, J.L., Sundheim, O. & Tainer, J.A., 2005. DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 577(1–2 SPEC. ISS.), pp.55–76.
- I Okamoto, A P Otte, C D Allis, D Reinberg, E.H., 2004. Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. *Science*, 303(January), pp.644–650.
- Imhof, P. & Zahran, M., 2013. The Effect of a G:T Mismatch on the Dynamics of DNA. *PLoS ONE*, 8(1).
- Inoue, A. et al., 2011. Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development. *Cell Research*, 21(12), pp.1670–1676.
- Inoue, A. et al., 2015. Haploinsufficiency, but not defective paternal 5mC oxidation, accounts for the developmental defects of maternal Tet3 knockouts. *Cell Reports*, 10(4), pp.463–470.
- Inoue, A., Matoba, S. & Zhang, Y., 2012. Transcriptional activation of transposable elements in mouse zygotes is independent of Tet3-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Cell research*, 22, pp.1640–9.
- Inoue, A. & Zhang, Y., 2011. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6053), p.194.
- Iqbal, K. et al., 2011. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(9), pp.3642–3647.
- Iqbal, K. et al., 2011. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp.3642–3647.
- Ito, R. et al., 2014. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes to Cells*, 19(1), pp.52–65.
- Ito, S. et al., 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466, pp.1129–1133.
- Ito, S. et al., 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), pp.1300–3.
- Itskovitz-Eldor, J. et al., 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(2), pp.88–95.
- Iurlaro, M. et al., 2013. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome biology*, 14(10), p.R119.
- Iurlaro, M. et al., 2016. In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-formylcytosine. *Genome biology*, 17(1), p.141.
- Iyer, L.M. et al., 2009. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle*, 8(11), pp.1698–1710.
- Iyer, L.M., Abhiman, S. & Aravind, L., 2011. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 101, pp.25–104.

- Jachowicz, J.W. et al., 2013. Heterochromatin establishment at pericentromeres depends on nuclear position. *Genes and Development*, 27(22), pp.2427–2432.
- Jacobs, A.L. & Schär, P., 2012. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. *Chromosoma*, 121(1), pp.1–20.
- Ji, D. et al., 2014. Effects of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine on Dnmt1- and DNMT3a-mediated cytosine methylation. *Molecular bioSystems*, 10(7), pp.1749–52.
- Jia, D. et al., 2007. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449(7159), pp.248–51.
- Jin, C. et al., 2015. Minimal role of base excision repair in TET-induced global DNA demethylation in HEK293T cells. *Epigenetics*, 10(11), pp.1006–13.
- Jin, C. et al., 2014. TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells. *Nucleic Acids Research*, 42(11), pp.6956–6971.
- Jin, S.G. et al., 2016. Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Reports*, 14(3), pp.493–505.
- Jin, S.G. et al., 2015. Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Reports*.
- Jin, S.G., Guo, C. & Pfeifer, G.P., 2008. GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genetics*, 4(3).
- Jung, S.P. et al., 2007. Dynamic DNA methylation reprogramming: Active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Developmental Dynamics*, 236(9), pp.2523–2533.
- Kageyama, S.-I., Nagata, M. & Aoki, F., 2004. Isolation of nascent messenger RNA from mouse preimplantation embryos. *Biology of reproduction*, 71(6), pp.1948–55.
- Kagiwada, S. et al., 2013. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO journal*, 32, pp.340–53.
- Kaneda, M. et al., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 429(6994), pp.900–903.
- Kaneda, M. et al., 2010. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with Zp3-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. *Genes to Cells*, 15(3), pp.169–179.
- Kang, J. et al., 2015. Simultaneous deletion of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet3 increases transcriptome variability in early embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), pp.E4236-45.
- Kang, J., Kalantry, S. & Rao, A., 2012. PGC7, H3K9me2 and Tet3: regulators of DNA methylation in zygotes. *Cell Research*, 23(1), pp.6–9.
- Kanka, J., 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology*, 59(1), pp.3–19.
- Kareta, M.S. et al., 2006. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), pp.25893–25902.
- Kato, Y. et al., 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 16(19), pp.2272–2280.
- Kigami, D. et al., 2002. MuERV-L Is One of the Earliest Transcribed Genes in Mouse One-Cell Embryos. *Biology of Reproduction*, 68(2), pp.651–654.
- Kim, K., Biade, S. & Matsumoto, Y., 1998. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), pp.8842–8848.
- Kim, S.H. et al., 2004. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), pp.58–63.
- Kinner, A. et al., 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17), pp.5678–5694.

- Klose, R.J. & Bird, A.P., 2006. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(2), pp.89–97.
- Klug, M. et al., 2010. Active DNA demethylation in human postmitotic cells correlates with activating histone modifications, but not transcription levels. *Genome biology*, 11, p.R63.
- Klungland, A. & Lindahl, T., 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: Reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO Journal*, 16(11), pp.3341–3348.
- Ko, M. et al., 2010. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 468(7325), pp.839–843.
- Ko, M. et al., 2013. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), pp.122–6.
- Kobayashi, H. et al., 2012. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish Oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genetics*, 8(1).
- Koh, K.P. et al., 2011. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(2), pp.200–213.
- Kohli, R.M. & Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), pp.472–479.
- Kong, L. et al., 2016. A primary role of TET proteins in establishment and maintenance of De Novo bivalency at CpG islands. *Nucleic Acids Research*, p.gkw529.
- Kornberg, R.D. & Lorch, Y., 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), pp.285–294.
- Kouzarides, T., 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), pp.198–209.
- Kramer, J. et al., 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of development*, 92(2), pp.193–205.
- Krokan, H.E. & Bjørås, M., 2013. Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), pp.1–22.
- Kubota, Y. et al., 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *The EMBO journal*, 15(23), pp.6662–70.
- Kurihara, Y. et al., 2008. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Developmental Biology*, 313, pp.335–346.
- Kwok, R.P.S., Liu, X.T. & Smith, G.D., 2006. Distribution of co-activators CBP and p300 during mouse oocyte and embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(7), pp.885–894.
- de la Rica, L. et al., 2016. TET-dependent regulation of retrotransposable elements in mouse embryonic stem cells. *Genome biology*, 17(1), p.234.
- Laird, C.D. et al., 2004. Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), pp.204–9.
- Lane, N. et al., 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, 35(2), pp.88–93.
- Latham, K.E. et al., 1991. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development (Cambridge, England)*, 112(4), pp.921–932.
- Lawson, K.A. et al., 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, 13(4), pp.424–436.
- Lawson, K.A. & Hage, W.J., 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation symposium*, 182, pp.68–91.
- Leitch, H.G. et al., 2013. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), pp.311–6.

- Leitch, H.G. et al., 2013. Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem Cell Reports*, 1(1), pp.66–78.
- Leitch, H.G. & Smith, A., 2013. The mammalian germline as a pluripotency cycle. *Development*, 140(12), pp.2495–2501.
- Lepikhov, K. et al., 2008. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics & chromatin*, 1(1), p.8.
- Lepikhov, K. & Walter, J., 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC developmental biology*, 4, p.12.
- Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), pp.915–926.
- Li, H. et al., 2006. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), pp.19489–19500.
- Li, T. et al., 2014. Critical Role of Tet3 in Neural Progenitor Cell Maintenance and Terminal Differentiation. *Molecular Neurobiology*, 51(1), pp.142–154.
- Li, Y.Q. et al., 2007. Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Research*, 35(2), pp.390–400.
- Li, Z. et al., 2011. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. In *Blood*. pp. 4509–4518.
- Li, Z. et al., 2015. Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucleic Acids Research*, 43(8), pp.3986–3997.
- Lindahl, T. & Wood, R.D., 1999. Quality Control by DNA Repair. *Science*, 286(5446), pp.1897–1905.
- Liu, N. et al., 2013. Intrinsic and Extrinsic Connections of Tet3 Dioxygenase with CXXC Zinc Finger Modules. *PLoS ONE*, 8(5).
- Liu, W.-M. et al., 2012. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), pp.490–4.
- Liutkevičiūtė, Z. et al., 2014. Direct decarboxylation of 5-Carboxylcytosine by DNA C5-Methyltransferases. *Journal of the American Chemical Society*, 136(16), pp.5884–5887.
- Long, H.K., Blackledge, N.P. & Klose, R.J., 2013. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochemical Society transactions*, 41(3), pp.727–40.
- Lu, F. et al., 2016. Establishing chromatin regulatory landscape during mouse preimplantation development. *Cell*, 165(6), pp.1375–1388.
- Lu, J. et al., 2016. A Computational Investigation on the Substrate Preference of TET2. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(6), pp.4728–4738.
- Lu, X. et al., 2015. Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics. *Cell Research*, 25(3), pp.386–389.
- Lutsik, P. et al., 2011. BiQ Analyzer HT: Locus-specific analysis of DNA methylation by high-throughput bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Research*, 39.
- Ma, J.Y. et al., 2014. Exogenous thymine DNA glycosylase regulates epigenetic modifications and meiotic cell cycle progression of mouse oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 21(2), pp.186–194.
- Ma, X.-S. et al., 2015. The Dynamics and Regulatory Mechanism of Pronuclear H3k9me2 Asymmetry in Mouse Zygotes. *Scientific Reports*, 5, p.17924.
- Macfarlan, T.S. et al., 2012. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, 487(7405), pp.57–63.
- Madabushi, A. et al., 2013. Histone deacetylase SIRT1 modulates and deacetylates DNA base excision repair enzyme thymine DNA glycosylase. *The Biochemical journal*, 456(1), pp.89–98.
- Maeder, M.L. et al., 2013. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature biotechnology*, 31(12), pp.1137–42.

- Maiti, A. et al., 2013. Divergent mechanisms for enzymatic excision of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine from DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 135(42), pp.15813–15822.
- Maiti, A. & Drohat, A.C., 2011. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), pp.35334–35338.
- Malik, S.S. et al., 2015. Thymine DNA glycosylase exhibits negligible affinity for nucleobases that it removes from DNA. *Nucleic Acids Research*, 43(19).
- Marteijn, J. a et al., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(7), pp.465–81.
- Marti, T.M. et al., 2006. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26), pp.9891–9896.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), pp.7634–7638.
- Martin, J.L. & McMillan, F.M., 2002. SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), pp.783–793.
- Martinowich, K. et al., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), pp.890–3.
- Masui, S. et al., 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 9(6), pp.625–U26.
- Matsumoto, Y. & Kim, K., 1995. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5224), pp.699–702.
- Mayer, W. et al., 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), pp.501–502.
- Métivier, R. et al., 2008. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, 452(7183), pp.45–50.
- von Meyenn, F., Berrens, R. V, et al., 2016. Comparative Principles of DNA Methylation Reprogramming during Human and Mouse In Vitro Primordial Germ Cell Specification. *Developmental cell*, 39(1), pp.104–115.
- von Meyenn, F., Iurlaro, M., et al., 2016. Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, 62(6), pp.848–861.
- Mitsui, K. et al., 2003. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), pp.631–642.
- Mohan, R.D. et al., 2009. Opposing regulatory roles of phosphorylation and acetylation in DNA mismatch processing by thymine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Research*, 38(4), pp.1135–1148.
- Molyneaux, K.A. et al., 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol*, 240(2), pp.488–498.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. & Cruz-Vallejo, V.L., 2008. Mechanisms of DNA breaks induction in vivo by 5-azacytidine: Paths of micronucleus induction by azaC. *Journal of Applied Toxicology*, 28(3), pp.254–259.
- Moran-Crusio, K. et al., 2011. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell*, 20(1), pp.11–24.
- Morgan, H.D. et al., 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: Implications for epigenetic reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), pp.52353–52360.
- Morgan, H.D. et al., 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No, pp.R47–58.
- Müller, U. et al., 2014. TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation. *Nucleic Acids Research*, 42, pp.8592–8604.
- Naas, T.P. et al., 1998. An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements. *EMBO Journal*, 17(2), pp.590–597.

- Nabel, C.S. et al., 2012. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nature Chemical Biology*, 8, pp.751–758.
- Nakamura, T. et al., 2006. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature cell biology*, 9(1), pp.64–71.
- Nakamura, T. et al., 2012. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*, 486(7403), pp.415–9.
- Nakatani, T. et al., 2015. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation. *EMBO reports*, 16(5), pp.582–9.
- Neri, F. et al., 2013. Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb PRC2 in mouse embryonic stem cells. *Genome Biology*, 14(8), p.R91.
- Neri, F. et al., 2015. Single-Base resolution analysis of 5-formyl and 5-carboxyl cytosine reveals promoter DNA Methylation Dynamics. *Cell Reports*, 10(5), pp.674–683.
- Ng, R.K. et al., 2008. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. *Nature cell biology*, 10(11), pp.1280–1290.
- Nichols, J. et al., 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), pp.379–391.
- Oda, M. et al., 2013. Regulation of Lineage Specific DNA Hypomethylation in Mouse Trophectoderm. *PLoS ONE*, 8(6).
- Oestrup, O. et al., 2009. From zygote to implantation: Morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(SUPPL. 3), pp.39–49.
- Ogryzko, V. V. et al., 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87(5), pp.953–959.
- Ohhata, T. & Wutz, A., 2013. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(14), pp.2443–2461.
- Ohinata, Y. et al., 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137(3), pp.571–584.
- Ohinata, Y. et al., 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048), pp.207–213.
- Okano, M. et al., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), pp.247–257.
- Olariu, V., Lövkvist, C. & Sneppen, K., 2016. Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency. *Scientific reports*, 6, p.25438.
- Ooi, S.K.T. et al., 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154), pp.714–717.
- Oswald, J. et al., 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10, pp.475–478.
- Pais, J.E. et al., 2015. Biochemical characterization of a Naegleria TET-like oxygenase and its application in single molecule sequencing of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14), pp.4316–21.
- Pastor, W.A. et al., 2011. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), pp.394–7.
- Peaston, A.E. et al., 2004. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell*, 7(4), pp.597–606.
- Peat, J.R. et al., 2014. Genome-wide Bisulfite Sequencing in Zygotes Identifies Demethylation Targets and Maps the Contribution of TET3 Oxidation. *Cell Reports*, 9(6), pp.1990–2000.
- Peng, J.C. & Karpen, G.H., 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(2), pp.204–211.
- Penn, N.W. et al., 1972. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 126(4), pp.781–790.
- Peters, J., 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature reviews. Genetics*, 15(8), pp.517–530.

- Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S. & Neuberger, M.S., 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, 418(6893), pp.99–103.
- Piccolo, F.M. et al., 2013. Different Roles for Tet1 and Tet2 Proteins in Reprogramming-Mediated Erasure of Imprints Induced by EGC Fusion. *Molecular Cell*, 49(6), pp.1023–1033.
- Piersen, C.E. et al., 1996. Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase β deoxyribose phosphate excision reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), pp.17811–17815.
- Piotrowska-Nitsche, K. & Zernicka-Goetz, M., 2005. Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 122(4), pp.487–500.
- Plasschaert, R.N. & Bartolomei, M.S., 2014. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development*, 141(9), pp.1805–13.
- Popp, C. et al., 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), pp.1101–5.
- Prindle, M.J. & Loeb, L.A., 2012. DNA polymerase delta in dna replication and genome maintenance. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(9), pp.666–682.
- Probst, A. V. & Almouzni, G., 2011. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends in Genetics*, 27(5), pp.177–185.
- Probst, A. V., Dunleavy, E. & Almouzni, G., 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(3), pp.192–206.
- Qian, D. et al., 2016. Response of Mouse Zygotes Treated with Mild Hydrogen Peroxide as a Model to Reveal Novel Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Injury in Early Embryos. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp.1–11.
- Qian, Y. et al., 2015. Dynamic changes of DNA epigenetic marks in mouse oocytes during natural and accelerated aging. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 67, pp.121–127.
- Quivoron, C. et al., 2011. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 20(1), pp.25–38.
- Raiber, E.-A. et al., 2014. 5-Formylcytosine alters the structure of the DNA double helix. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), pp.44–49.
- Raiber, E.-A. et al., 2012. Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biology*, 13(8), p.R69.
- Ramsahoye, B.H. et al., 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), pp.5237–5242.
- Ratnam, S. et al., 2002. Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Developmental biology*, 245, pp.304–314.
- Reik, W. & Dean, W., 2001. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, 22(14), pp.2838–2843.
- Riggs, A.D. & Porter, T.N., 1996. Overview of Epigenetic Mechanisms. In *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. pp. 29–45.
- De Robertis, E.M. & Gurdon, J.B., 1977. Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6), pp.2470–4.
- Roberts, R.J. & Cheng, X., 1998. Base flipping. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.181–98.
- Robertson, A.B. et al., 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(6), pp.981–93.
- Robertson, J., Robertson, A.B. & Klungland, A., 2011. The presence of 5-hydroxymethylcytosine at the gene promoter and not in the gene body negatively regulates gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(1), pp.40–43.
- Rogakou, E.P. et al., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp.5858–5868.

- Rosa, S. & Shaw, P., 2013. Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology*, 2(4), pp.1378–410.
- Ruzov, A. et al., 2011. Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res*, 21(9), pp.1332–1342.
- Santenard, A. et al., 2010. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*, 12(9), pp.853–862.
- Santos, F. et al., 2013. Active demethylation in mouse zygotes involves cytosine deamination and base excision repair. *Epigenetics & chromatin*, 6, p.39.
- Santos, F. et al., 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Developmental Biology*, 280(1), pp.225–236.
- Santos, F. et al., 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 241(1), pp.172–182.
- Schneider, R. et al., 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biology*, 6(1), pp.73–77.
- Schomacher, L. et al., 2016. Neil DNA glycosylases promote substrate turnover by Tdg during DNA demethylation. *Nat Struct Mol Biol*, advance on(2), pp.116–124.
- Schübeler, D., 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534).
- Schultz, R.M. et al., 1999. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *Journal of Experimental Zoology*, 285(3), pp.276–282.
- Schultz, R.M., 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*, 8(4), pp.323–331.
- Schwartz, Y.B. & Pirrotta, V., 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), pp.9–22.
- Seisenberger, S. et al., 2012. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*, 48(6), pp.849–862.
- Seki, Y. et al., 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, 134(14), pp.2627–2638.
- Seki, Y. et al., 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol*, 278(2), pp.440–458.
- Sérandour, A.A. et al., 2012. Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Research*, 40(17), pp.8255–8265.
- Sheaff, R., Ilsley, D. & Kuchta, R., 1991. Mechanism of DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin. *Biochemistry*, 30(35), pp.8590–7.
- Shen, J. et al., 2014. H3K4me3 epigenomic landscape derived from ChIP-Seq of 1 000 mouse early embryonic cells. *Cell Research*, 25(1), pp.143–147.
- Shen, L. et al., 2013. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*, 153, pp.692–706.
- Shen, L. et al., 2014. Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell*, 15(4), pp.459–470.
- Shimoda, N. et al., 2014. Decrease in cytosine methylation at CpG island shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging. *Age*, 36(1), pp.103–115.
- Slotkin, R.K. & Martienssen, R., 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), pp.272–85.
- Smallwood, S.A. et al., 2011. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature genetics*, 43, pp.811–814.
- Smet-Nocca, C. et al., 2008. The thymine-DNA glycosylase regulatory domain: Residual structure and DNA binding. *Biochemistry*, 47(25), pp.6519–6530.
- Smith, Z.D. et al., 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 484(7394), pp.339–344.
- Smith, Z.D. & Meissner, A., 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), pp.204–220.

- Sobol, R.W. et al., 2000. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, 405(6788), pp.807–10.
- Song, C.X. et al., 2013. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell*, 153(3), pp.678–691.
- Song, Y. et al., 2014. Phospho-Cdc25 correlates with activating G2/M checkpoint in mouse zygotes fertilized with hydrogen peroxide-treated mouse sperm. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 396(1–2), pp.41–48.
- Spruijt, C.G. et al., 2013. Dynamic readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, 152(5), pp.1146–1159.
- Spruijt, C.G. & Vermeulen, M., 2014. DNA methylation: old dog, new tricks? *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), pp.949–954.
- Stavridis, M.P. & Smith, a G., 2003. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 1), pp.45–49.
- Strumpf, D. et al., 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development*, 132(9), pp.2093–2102.
- Su, M. et al., 2016. 5-Formylcytosine Could Be a Semipermanent Base in Specific Genome Sites. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(39), pp.1–5.
- Svilar, D. et al., 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidants & redox signaling*, 14(12), pp.2491–2507.
- Tabansky, I. et al., 2013. Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Current Biology*, 23(1), pp.21–31.
- Tahiliani, M. et al., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), pp.930–5.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Tamanaha, E. et al., 2016. Distributive Processing by the Iron(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Catalytic Domains of the TET Enzymes Is Consistent with Epigenetic Roles for Oxidized 5-Methylcytosine Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 138(30), pp.9345–9348.
- Tanaka, M. et al., 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development (Cambridge, England)*, 128, pp.655–664.
- Tanaka, M. et al., 2003. H1oo: A pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. In *Molecular and Cellular Endocrinology*. pp. 5–9.
- Tini, M. et al., 2002. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Molecular Cell*, 9(2), pp.265–277.
- Tomizawa, S. et al., 2011. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development (Cambridge, England)*, 138(5), pp.811–20.
- Torres-Padilla, M.-E. et al., 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*, 445(7124), pp.214–8.
- Toyoshima, M., 2009. Analysis of p53 dependent damage response in sperm-irradiated mouse embryos. *Journal of Radiation Research*, 50(1), pp.11–17.
- Trojer, P. & Reinberg, D., 2007. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell*, 28(1), pp.1–13.
- Tsukada, Y., Akiyama, T. & Nakayama, K.I., 2015. Maternal TET3 is dispensable for embryonic development but is required for neonatal growth. *Scientific reports*, 5, p.15876.
- Valinluck, V. & Sowers, L.C., 2007. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Research*, 67(3), pp.946–950.
- Vallur, A.C. et al., 2002. Effects of hydrogen bonding within a damaged base pair on the activity of wild type and DNA-intercalating mutants of human alkyladenine DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp.31673–31678.

- Vasovcak, P. et al., 2012. Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency. *DNA Repair*, 11(7), pp.616–623.
- Vella, P. et al., 2013. Tet Proteins Connect the O-Linked N-acetylglucosamine Transferase Ogt to Chromatin in Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, 49(4), pp.645–656.
- Vermeulen, M. et al., 2007. Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4. *Cell*, 131(1), pp.58–69.
- Vilkaitis, G. et al., 2005. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp.64–72.
- Vincent, J.J. et al., 2013. Stage-specific roles for Tet1 and Tet2 in DNA demethylation in primordial germ cells. *Cell Stem Cell*, 12(4), pp.470–478.
- Wakayama, T. et al., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394(6691), pp.369–374.
- Wallner, S. et al., 2016. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1), p.33.
- Walsh, C., Chaillet, J. & Bestor, T., 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature genetics*, 20(October), pp.116–117.
- Wang, L. et al., 2014. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 157, pp.979–991.
- Wang, P. et al., 2013. Differential expression of microRNAs in 2-cell and 4-cell mouse embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, pp.1–7.
- Wang, S. et al., 2010. Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.17639–17644.
- Ward, P.S. et al., 2010. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 17(3), pp.225–234.
- Waterston, R.H. et al., 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), pp.520–562.
- Watt, F. & Molloy, P.L., 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development*, 2(9), pp.1136–1143.
- Weber, A.R. et al., 2016. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nature communications*, 7(372), p.10806.
- Wei, Y.F. et al., 1995. Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol*, 15(6), pp.3206–3216.
- Wiebauer, K. & Jiricny, J., 1989. In vitro correction of GT mispairs to GC pairs in nuclear extracts from human cells. *Nature*, 339(6221), pp.234–236.
- Wiebauer, K. & Jiricny, J., 1990. Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), pp.5842–5845.
- Williams, K. et al., 2011. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 473(7347), pp.343–8.
- Wilmot, I. et al., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), pp.810–813.
- Wilson, D.M. & Barsky, D., 2001. The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research - DNA Repair*, 485(4), pp.283–307.
- Wossidlo, M. et al., 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*, 2, p.241.
- Wossidlo, M. et al., 2010. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J*, 29(11), pp.1877–1888.

- Wu, H., D'Alessio, A.C., et al., 2011. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), pp.389–393.
- Wu, H., D'Alessio, A.C., et al., 2011. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes & development*, 25(7), pp.679–84.
- Wu, H. et al., 2014. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nature biotechnology*, 32(12), pp.1231–40.
- Wu, H. & Zhang, Y., 2015. Charting oxidized methylcytosines at base resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(9), pp.656–661.
- WYATT, G.R. & COHEN, S.S., 1953. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *The Biochemical journal*, 55(5), pp.774–82.
- Wyrobek, A.J. et al., 1976. Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J*, 16(7), pp.811–825.
- Xia, B. et al., 2015. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale. *Nature Methods*, 12(11), pp.1047–1050.
- Xu, C. et al., 2011. The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nature communications*, 2, p.227.
- Xu, G.L. et al., 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 402(6758), pp.187–191.
- Xu, L. et al., 2014. Pyrene-Based Quantitative Detection of the 5-Formylcytosine Loci Symmetry in the CpG Duplex Content during TET-Dependent Demethylation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(42), pp.11223–11227.
- Xu, X. et al., 2016. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discovery*, 2(10), p.16009.
- Xu, Y. et al., 2012. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for xenopus eye and neural development. *Cell*, 151(6), pp.1200–1213.
- Xue, J.H. et al., 2016. Uracil-DNA glycosylase UNG promotes tet-mediated DNA demethylation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), pp.731–738.
- Yamagata, K. et al., 2005. Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis*, 43(2), pp.71–79.
- Yamaguchi, S. et al., 2013. Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature*, 504(7480), pp.460–4.
- Yamaji, M. et al., 2008. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet*, 40(8), pp.1016–1022.
- Yeom, Y.I. et al., 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122(3), pp.881–894.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. & Bestor, T.H., 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 13(8), pp.335–340.
- Yuan, S. et al., 2016. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development*, 143(4), pp.635–647.
- Zhang, B. et al., 2016. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature*, 537(7621), pp.553–557.
- Zhang, J. et al., 2016. Tet3-Mediated DNA Demethylation Contributes to the Direct Conversion of Fibroblast to Functional Neuron. *Cell Reports*, 17(9), pp.2326–2339.
- Zhang, L. et al., 2012. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nature chemical biology*, 8(February), pp.1–27.
- Zhang, P. et al., 2012. The Involvement of 5-Hydroxymethylcytosine in Active DNA Demethylation in Mice. *Biology of Reproduction*, 86(4), pp.104–104.
- Zhang, R.R. et al., 2013. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell*, 13, pp.237–245.
- Zhang, Y. et al., 2016. Oxidative stress-induced DNA damage of mouse zygotes triggers G2/M checkpoint and phosphorylates Cdc25 and Cdc2. *Cell Stress and Chaperones*, 21(4), pp.687–696.

- Zhu, J. et al., 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends in genetics : TIG*, 24(10), pp.481–4.
- Zhu, J.-K., 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual review of genetics*, 43, pp.143–66.

8 Anhang

8.1 Überexpression der TET Enzym Varianten

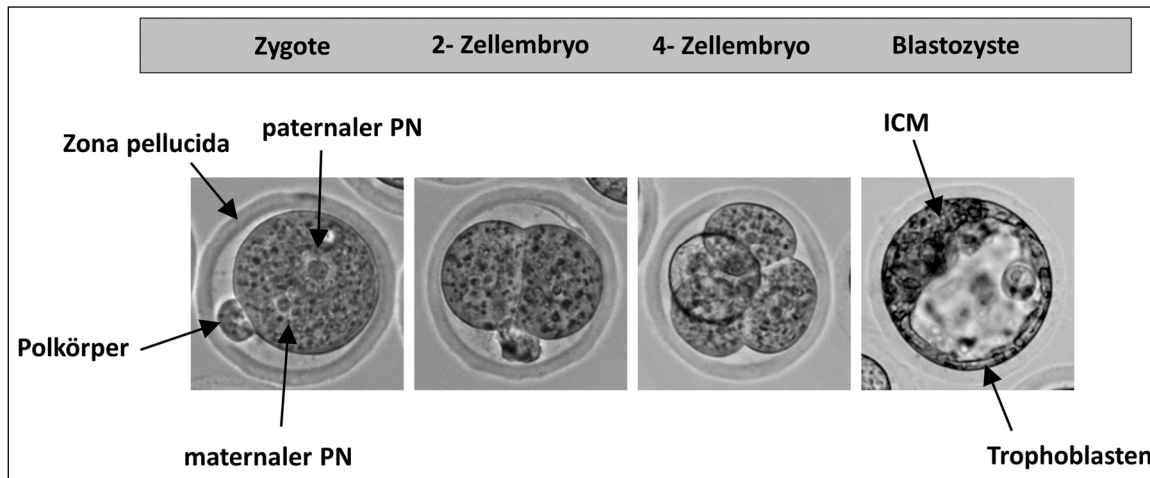


Abbildung 8.1 Die Morphologie von Zygote, 2- Zell-, 4-Zellembryo und Blastozyste. Dargestellt sind exemplarisch eine Zygote- mit deutlich sichtbarem größerem paternalem Pronukleus und kleinerem maternalem Pronukleus- ein 2- Zellembryo, ein 4-Zellembryo und die Blastozyste- mit ihrer charakteristischen Morphologie aus ICM und Trophoblasten.

Tabelle 8.1 Anzahl der auf ihr Entwicklungspotenzial analysierten Embryonen, in welchen TET3FL, TET1FL, TET3CD oder TET1CD überexprimiert wurde – 2-Zellembryonen und Blastozysten. Zur Analyse des Entwicklungspotenzials der Zygoten, welche die verschiedenen TET Varianten überexprimieren, wurden frühe Zygoten (2-3hpf) mit der jeweiligen mRNA (TET3FL, TET1FL, TET3CD oder TET1CD) injiziert, inkubiert und die Anzahl der korrekt entwickelten Embryonen im 2- Zell- oder Blastozystenstadium gezählt (24hpf oder E4.0). Dann wurde die Anzahl der 2-Zellembryonen oder Blastozysten in Relation zu der Anzahl der befruchteten Eizellen gesetzt (=100%) und die Ergebnisse prozentual dargestellt (Tabelle 3.1). Als Kontrolle wurde bei jedem Experiment eine mit GFP injizierte Gruppe mitgeführt. Die Experimente bzgl. der 2- Zellembryonen wurden vier Mal durchgeführt, die der Blastozysten zwei Mal.

	Anzahl befruchtete Oozyten	Anzahl 2-Zellembryonen	Anzahl befruchtete Oozyten	Anzahl Blastozysten
GFP	69	69	38	34
TET3FL	55	46	34	12
TET1FL	76	71	38	18
TET3CD	59	58	38	15
TET1CD	81	12	41	3

Tabelle 8.2 Anzahl der Embryonen nach der Überexpression von TET Varianten im jeweiligen Stadium zum Zeitpunkt 24hpf oder 48hpf. Die befruchteten Oozyten und die Embryonen wurden in den jeweiligen Stadien gezählt und der prozentuale Anteil der entwickelten Embryonen zu den befruchteten Oozyten (=100%) errechnet.

	24hpf		48hpf								Gesamtzahl
	2-Zell Anzahl	2- Zell %	2-Zell Anzahl	2-Zell %	4-Zell Anzahl	4-Zell %	6-Zell Anzahl	6-Zell %	Anzahl 8-Zell	8-Zell %	
GFP	69,0	100,0	2,0	5,0	18,0	45,0	13,0	32,5	7,0	17,5	40,0
TET3FL	46,0	83,6	8,0	47,1	7,0	41,2	6,0	35,3	2,0	11,8	17,0
TET1FL	71,0	93,4	3,0	9,1	20,0	60,6	7,0	21,2	3,0	9,1	33,0
TET3CD	58,0	98,3	5,0	14,7	19,0	55,9	7,0	20,6	3,0	8,8	34,0
TET1CD	12,0	14,8	28,0	84,8	3,0	9,1	2,0	6,1	0,0	0,0	33,0

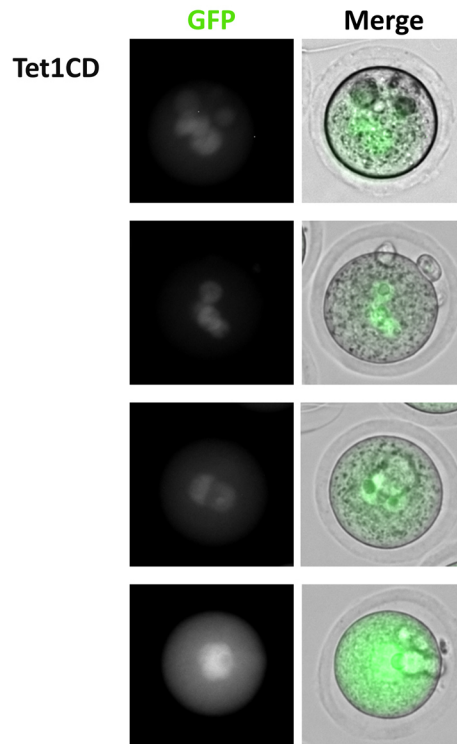


Abbildung 8.2 Abnormale Pronuklei- Formation in sich nicht teilenden Zygoten (24hpf), welche TET1CD überexprimieren. Mit Hilfe des GFP- Signals des TET1CD- GFP- Fusionsproteins ist die abnormale Pronuklei- Bildung gut erkennbar. Die beiden oberen Aufnahmen zeigen die Bildung vielzähliger Pronuklei. Die dritte Aufnahme zeigt die nicht vollzogene Fusion der beiden Pronuklei. Die untere Aufnahme zeigt hingegen die Formation von nur einem Pronukleus, welche verhältnismäßig häufig in Zygoten vorkommt, die mit TET1CD überexprimiert wurden.

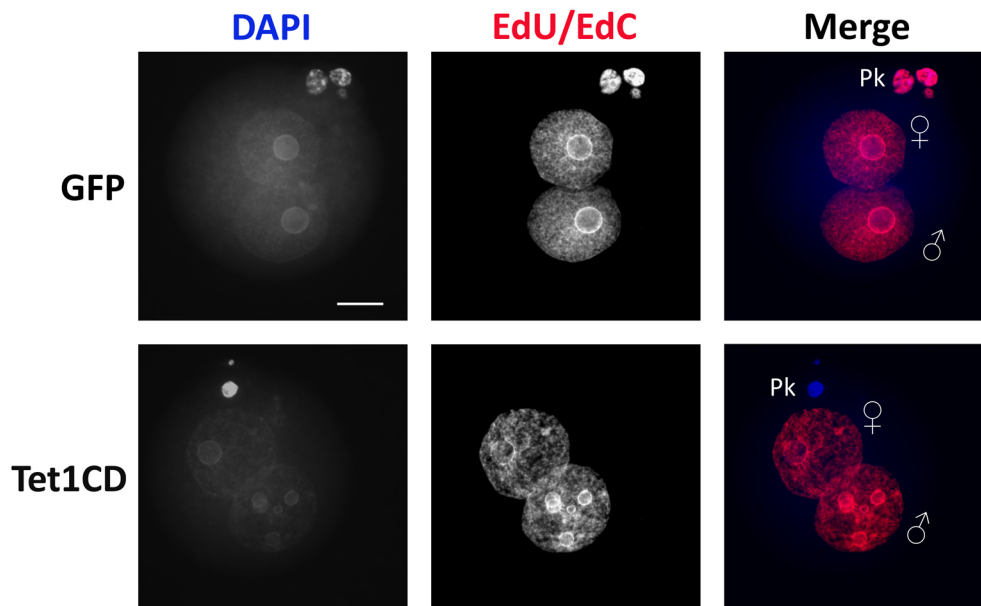


Abbildung 8.3 Kontrolle der gesamten Replikation der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren. Um zu überprüfen, ob die TET1CD überexprimierenden Zygoten in die S- Phase übergehen, und ob die Replikation zwischen Kontrolle und überexprimierten Zygoten gleich effizient abläuft (Kapitel 3.1.1), wurden die Zygoten mit einer Mischung aus zwei Basenanaloga (EdU/EdC) inkubiert. Die exemplarisch dargestellten Zygoten wurden etwas vor und über die gesamte Zeit der Replikation (von 5hpf-13hpf) mit EdU/EdC (50µM) inkubiert. Mittels einer Click-it Reaktion wurde der Einbau von EdU/EdC in die DNA sichtbar gemacht. Es ist zu erkennen, dass die EdU/EdC- Signale beider Gruppen sehr ähnlich ist, woraus gefolgert werden kann, dass die Replikation gleich abläuft und TET1CD keinen Einfluss auf diese hat. N>6, ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabbalken=20 µM.

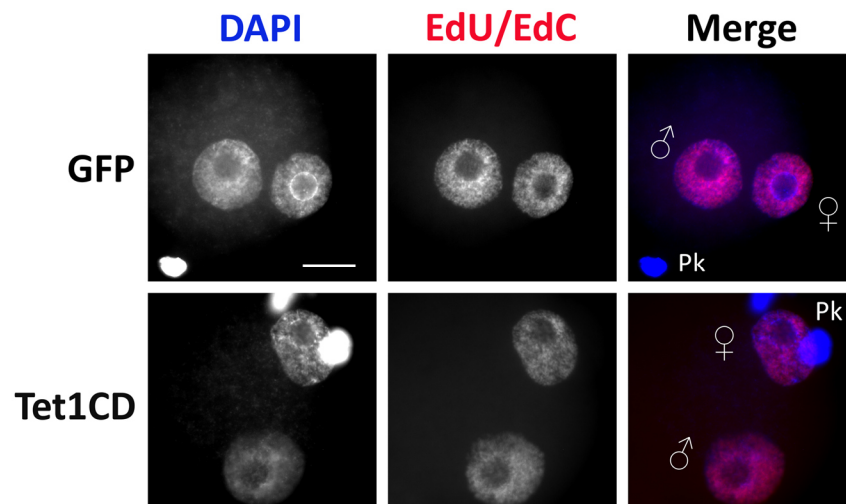


Abbildung 8.5 Kontrolle des Beginns der Replikation der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren. Um zu überprüfen, ob die TET1CD überexprimierenden Zygoten in die S- Phase übergehen (Kapitel 3.1.1), wurden die Zygoten mit einer Mischung aus zwei Basenanaloga (EdU/EdC) inkubiert. Dies erfolgte von kurz vor dem Beginn der Replikation für eine Stunde (7.5hpf- 8.5hpf). Es ist zu erkennen, dass die EdU/EdC- Signale beider Gruppen sehr ähnlich ist, woraus gefolgert werden kann, dass beide Gruppen gleichzeitig in die Replikation übergehen und TET1CD keinen Einfluss auf diese hat. N>6, ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabbalken=20 μ M.

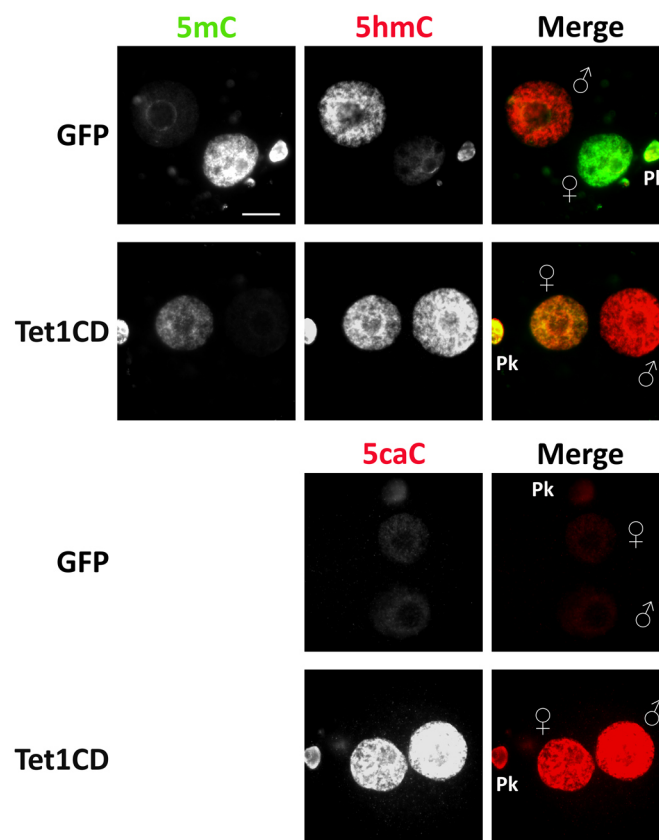


Abbildung 8.4 5mC-, 5hmC- und 5caC- in präreplikativen Zygoten, welche TET1CD überexprimieren. Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen von präreplikativen Zygoten, welche TET1CD überexprimieren. In die Zygoten wurde 2hpf mRNA mikroinjiziert, diese 6hpf fixiert und mittels Antikörper gegen 5mC, 5hmC und 5caC angefärbt. Das Signal für 5hmC ist nach der Überexpression in beiden Pronuklei deutlich erhöht, wohingegen das 5mC- Signale im paternalen Vorkern nicht mehr detektierbar ist, im maternalen Genom aber noch leicht vorhanden ist. 5caC ist präreplikativ in den Kontrollembryonen kaum detektierbar. Es steigt erst 8hpf deutlich an. In den TET1CD überexprimierenden Zygoten ist hingegen ein extremes 5caC- Signal zu erkennen. IF-Färbungen von 5mC sind für dieses Beispiel nicht vorhanden. ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabbalken=20 μ M

Im Folgenden sind Immunfluoreszenz- Analysen (5mC, 5hmC, 5fC und 5caC) von Zygoten dargestellt, in welchen die verschiedenen TET Varianten überexprimiert wurden. Leichte Unterschiede in den Intensitäten der 5mC-Signale zwischen den verschiedenen Abbildungen beruhen darauf, dass die Aufnahmen mit unterschiedlichen Mikroskopen und verschiedenen Einstellungen aufgenommen und unterschiedlicher Software bearbeitet wurden. Die Aufnahmen in Abbildung 8.6 und Abbildung 8.8 wurden mit dem Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop gemacht. Die in Abbildung 8.7 mit dem Axiovert ZI und Apotom, was die Bildqualität sehr verbessert. Bei den Aufnahmen der 5mC- Antikörperfärbungen oft zusätzliche Punkte zu erkennen. Diese sind lediglich Hintergrund und zu vernachlässigen.

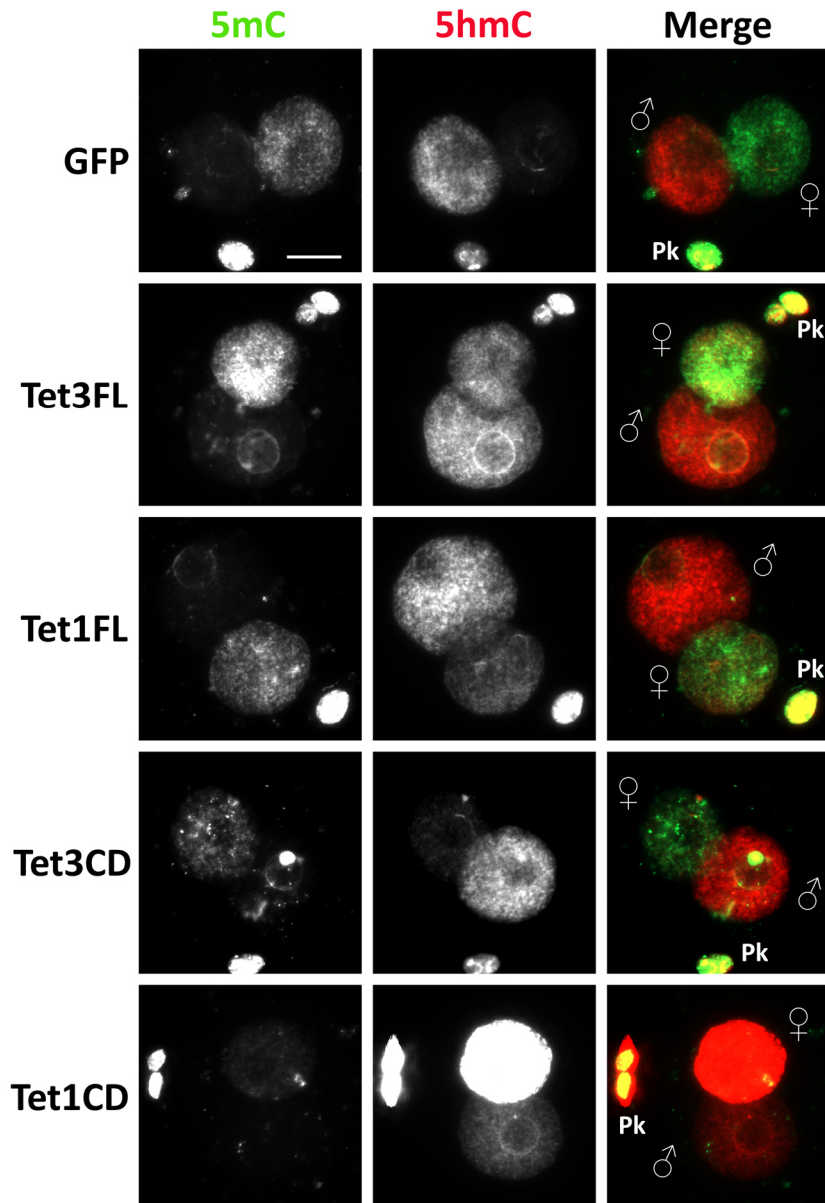


Abbildung 8.6 5hmC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten (12hpf), die mit den vier Tet Varianten überexprimiert. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf mit die entsprechende mRNA injiziert, 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5hmC angefärbt. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt zu einem deutlichen Anstieg des 5hmC- Signales im mütterlichen Pronukleus. Die 5hmC- Level im väterlichen steigen nur etwas. Beide TetFL Varianten führen zu einem leichten Anstieg von 5mC in beiden Pronuklei, wobei Tet3FL einen größeren Effekt hervorruft. Die Zygoten, welche Tet3CD überexprimieren, zeigen einen Anstieg von 5hmC in beiden Vorkernen, der mit einem Verlust von 5mC verbunden ist. Die Überexpression von Tet1CD führt zu einem extremen Anstieg von 5hmC im maternalen Pronukleus, während der paternale etwas an 5hmC- Signal verliert. Zudem kommt es zu einem dramatischen Verlust von 5mC in beiden Vorkernen. Quantifizierungen der Signale sind in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zu finden. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM

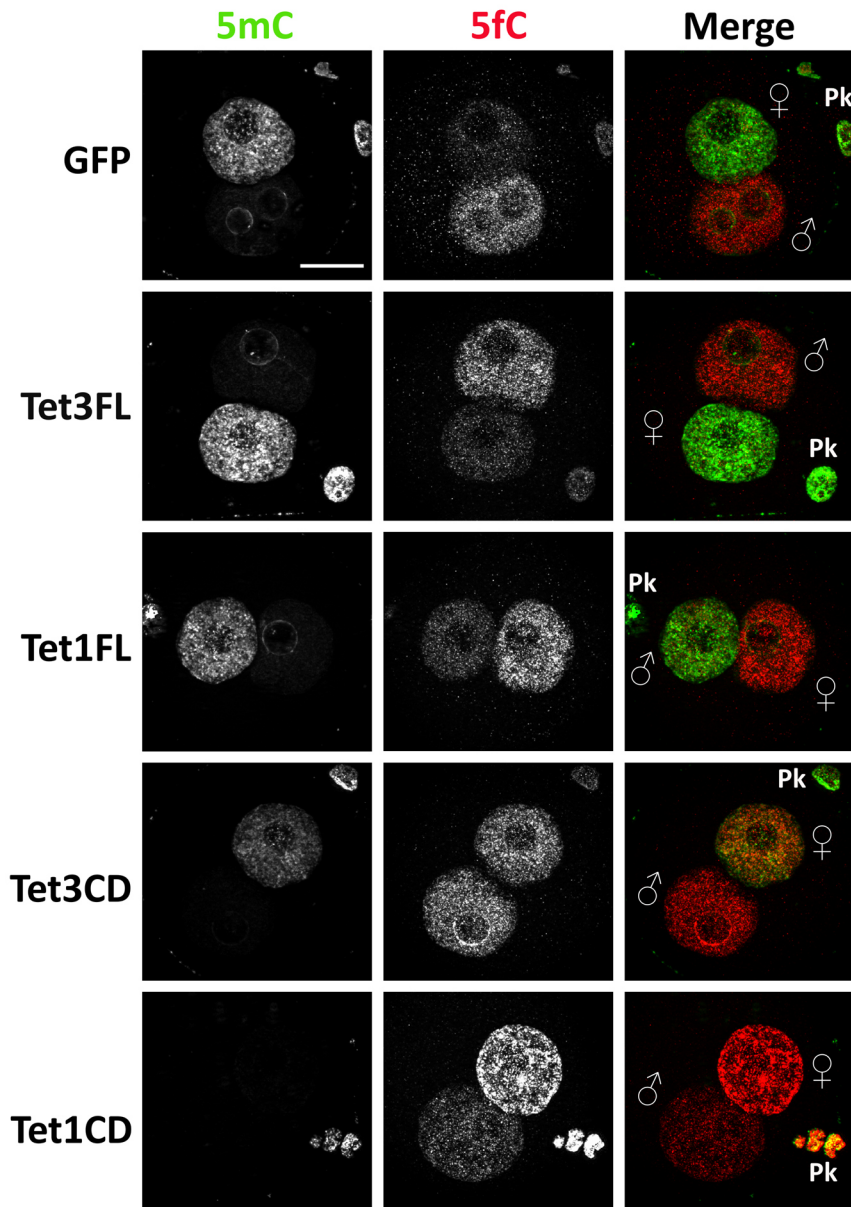


Abbildung 8.7 5fC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten (12hpf), die mit jeweils eine der vier Tet Varianten überexprimiert wurden. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf mit die entsprechende mRNA injiziert, 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5fC angefärbt. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt zu einem leichten Anstieg des 5fC- Signales in beiden Vorkernen. Zudem führen beide TetFL Varianten zu einem leichten Anstieg von 5mC in beiden Pronuklei. Die Zygoten, welche Tet3CD überexprimieren, zeigen auch einen leichten Anstieg von 5fC in beiden Vorkernen, wobei dieser mit einem Verlust von 5mC verbunden ist. Die Überexpression von Tet1CD hingegen führt zu einem sehr deutlichen Anstieg von 5fC im maternalen Pronukleus, während der paternale 5fC verliert. Ein 5mC- Signal ist in beiden Vorkernen nicht mehr zu erkennen. Quantifizierungen der Signale sind in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 dargestellt. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

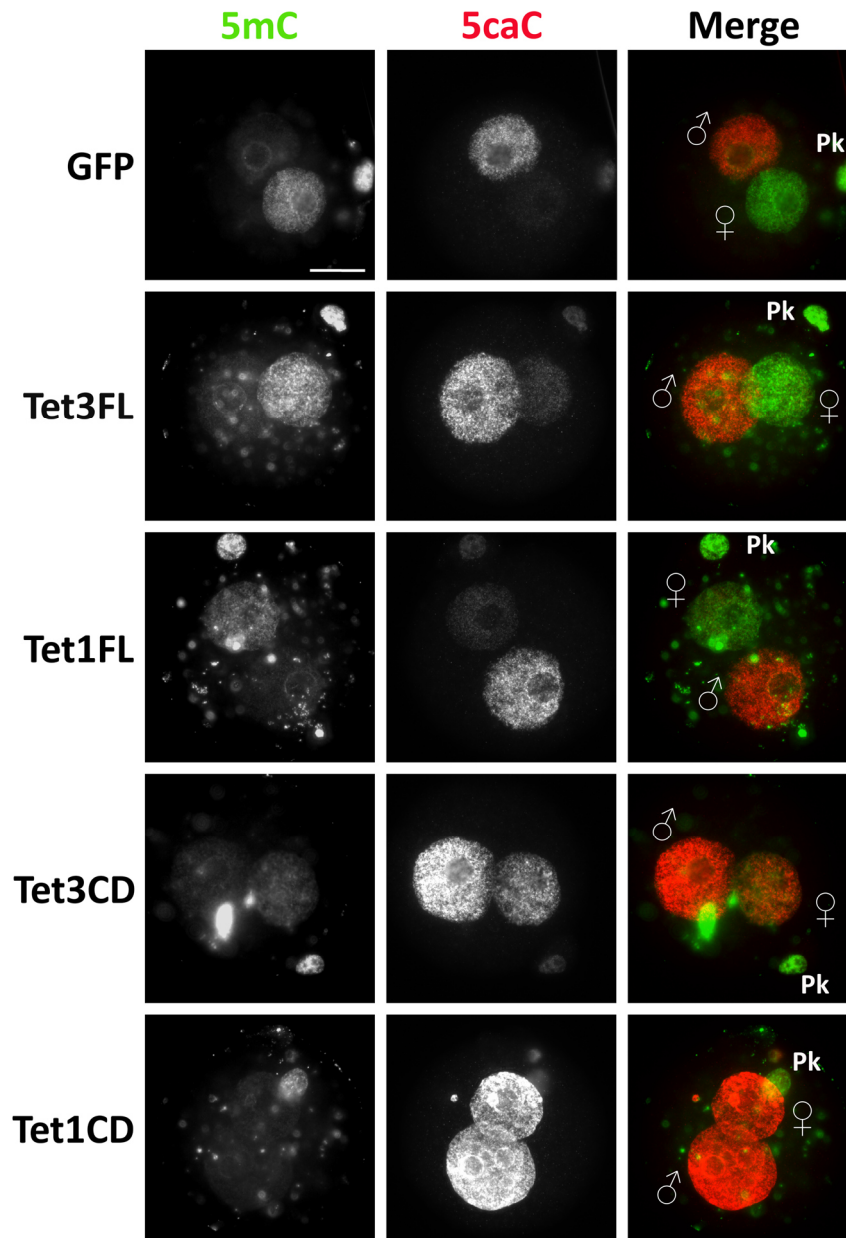


Abbildung 8.8 5caC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten (12hpf), die mit jeweils eine der vier Tet Varianten überexprimiert wurden. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf mit die entsprechende mRNA injiziert, 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5caC angefärbt. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem leichten Anstieg des 5caC-Signales in beiden Vorkernen, wobei die Überexpression von Tet3FL leicht stärkere Effekte, vor allem im maternalen Vorkern, hervorruft. Zudem führen beide TetFL Varianten zu einem leichten Anstieg von 5mC in beiden Pronuklei. Die hier sichtbaren Punkte sind Hintergrund und damit nicht relevant. Die Zygoten, die Tet3CD überexprimieren, zeigen einen deutlichen Anstieg von 5caC in beiden Vorkernen, wobei dieser mit einem Verlust von 5mC verbunden ist. Die Zygoten, die Tet1CD überexprimieren, zeigen einen noch deutlicheren Anstieg von 5caC in beiden Pronuklei und einen fast kompletten Verlust von 5mC. Quantifizierungen der Signale sind in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zu finden. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

Tabelle 8.3 Anzahl der analysierten parentalen Pronuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen Zygoten, welche TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren. Zudem ist die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben. Diese Angaben beziehen sich auf Kapitel 3.1.2.

	maternal		paternal	
	Anzahl Pronuklei	Anzahl	Anzahl Pronuklei	Anzahl
	5mC			
GFP	47	10	45	10
TET3FL	31	6	30	5
TET1FL	29	5	27	5
TET3CD	18	5	16	3
TET1CD	29	8	32	8
	5hmC			
GFP	30	6	30	6
TET3FL	16	4	15	4
TET1FL	14	2	13	3
TET3CD	11	3	10	3
TET1CD	22	4	26	5
	5fC			
GFP	17	3	17	3
TET3FL	11	2	11	2
TET1FL	13	2	13	2
TET3CD	13	2	14	2
TET1CD	15	3	15	3
	5caC			
GFP	11	3	11	3
TET3FL	9	2	7	2
TET1FL	9	2	9	2
TET3CD	7	2	6	2
TET1CD	10	3	9	3

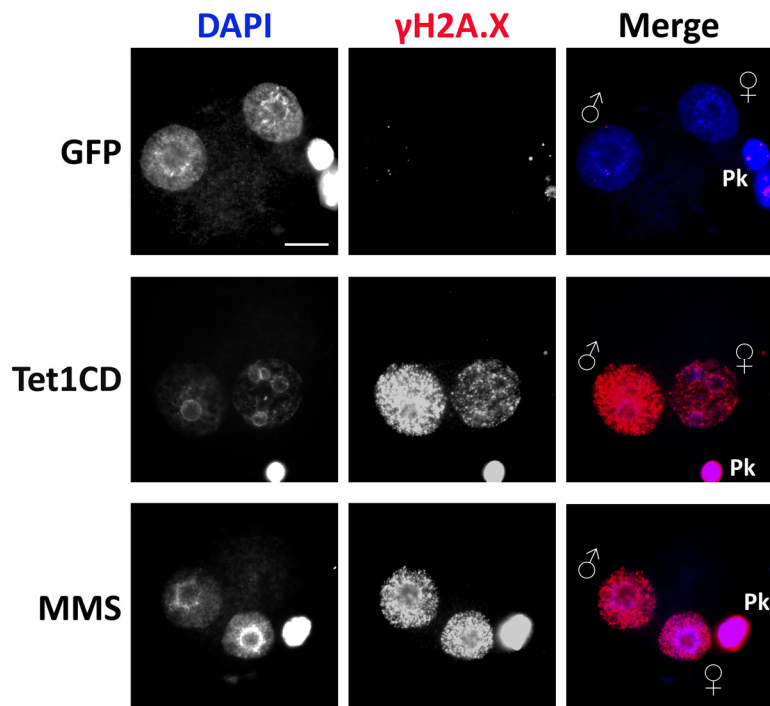


Abbildung 8.10 γ H2A.X in präreplikativen Zygoten, welche Tet1CD überexprimieren. Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen von präreplikativen Kontroll- und Tet1CD- Zygoten. In Zygoten wurde 2hpf Tet1CD mRNA mikroinjiziert, diese 6hpf fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2A.X angefärbt. Als Negativkontrolle dienten Zygoten, welche GFP überexprimieren, als Positivkontrolle MMS - behandelte Zygoten. MMS führt durch Alkylierung zu Basenfehlpaarungen und aktiviert die Reparatur. In der Kontrolle sind keine γ H2A.X- Foci erkennbar, während in der MMS- Kontrolle eine starke Akkumulation in beiden Vorkernen vergleichbar vorhanden ist. In Zygoten, welche Tet1CD überexprimieren, ist eine starke Akkumulation in beiden Vorkernen erkennbar, wobei die im paternalen noch um ein Deutliches stärker ist. Dies zeigt damit eine Aktivierung der Reparatur durch TET1CD. ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronucleus, Pk=Polkörper, Maßstabbalken=20 μ M

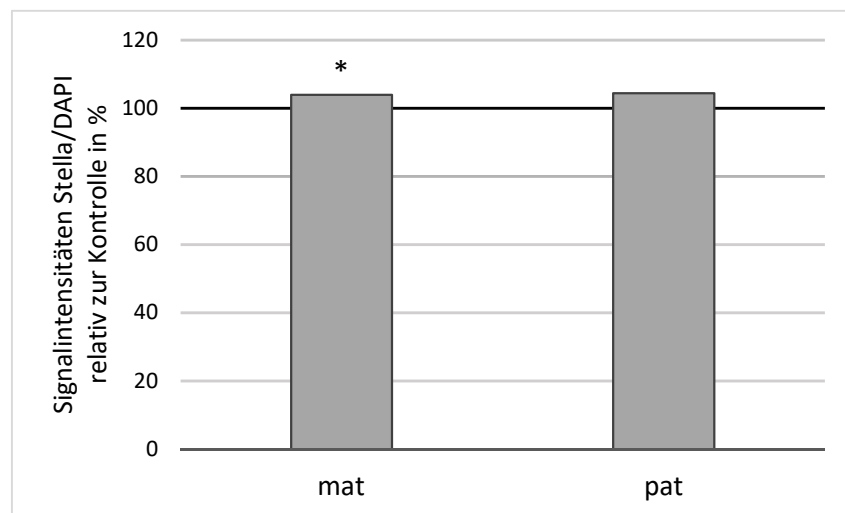


Abbildung 8.9 PGC7/Stella in Zygoten, in welchen Tet1CD überexprimiert wurde. Dargestellt sind die gegen DAPI normalisierten Signalintensitäten der Antikörperfärbungen von PGC7/Stella relativ zur Kontrolle (Kontrolle=100%, schwarze Linie). Dazu wurde in Zygoten (IVF) 3hpf Tet1CD kodierende mRNA injiziert, diese 12hpf fixiert und mittels Antikörper gegen PGC7/Stella und DAPI angefärbt. Die PGC7/Stella- Level ändern sich durch die Überexpression von Tet1CD nicht. Kontrolle n=4, Tet1CD n=5; p-Wert (T-test) * <0.05 , ** $<0,01$, *** $<0,001$

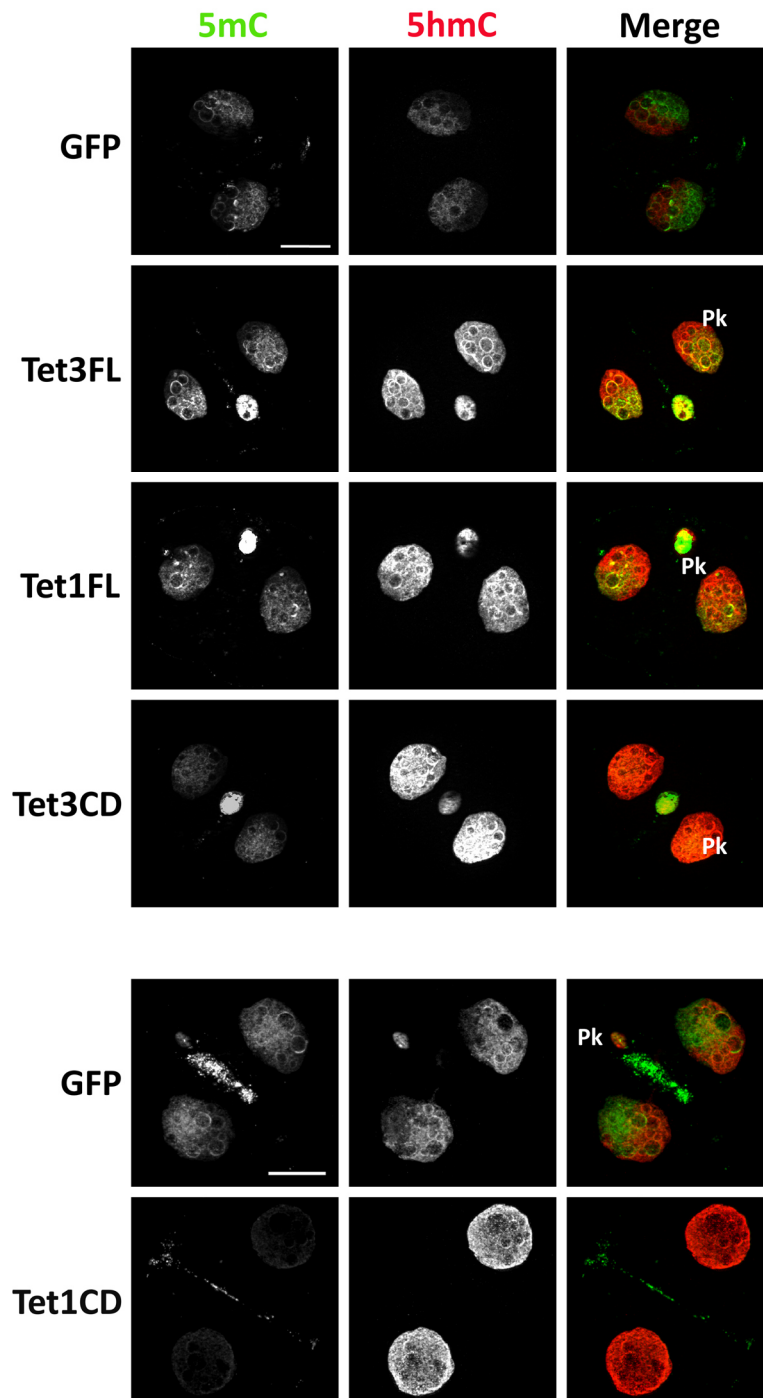


Abbildung 8.11 5hmC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von 2-Zellembryonen (postreplikativ; 30hpf), welche jeweils eine der vier Tet Varianten überexprimieren. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 30hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5hmC angefärbt. Die Überexpression der jeweiligen Varianten zeigen unterschiedliche Effekte. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt zu einem deutlichen Anstieg des 5hmC- Signals. Zudem führen beide TetFL Varianten zu einem Anstieg von 5mC, der bei Tet3FL Überexprimierten stärker ausgeprägt ist. Die Embryonen, welche zygotisch Tet3CD überexprimieren, zeigen einen sehr deutlichen Anstieg von 5hmC und einen leichten Verlust von 5mC. Die Überexpression von Tet1CD hingegen führt zu einem deutlichen Anstieg von 5hmC und einem drastischen Verlust von 5mC. Quantifizierungen der Signale sind in Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 dargestellt. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

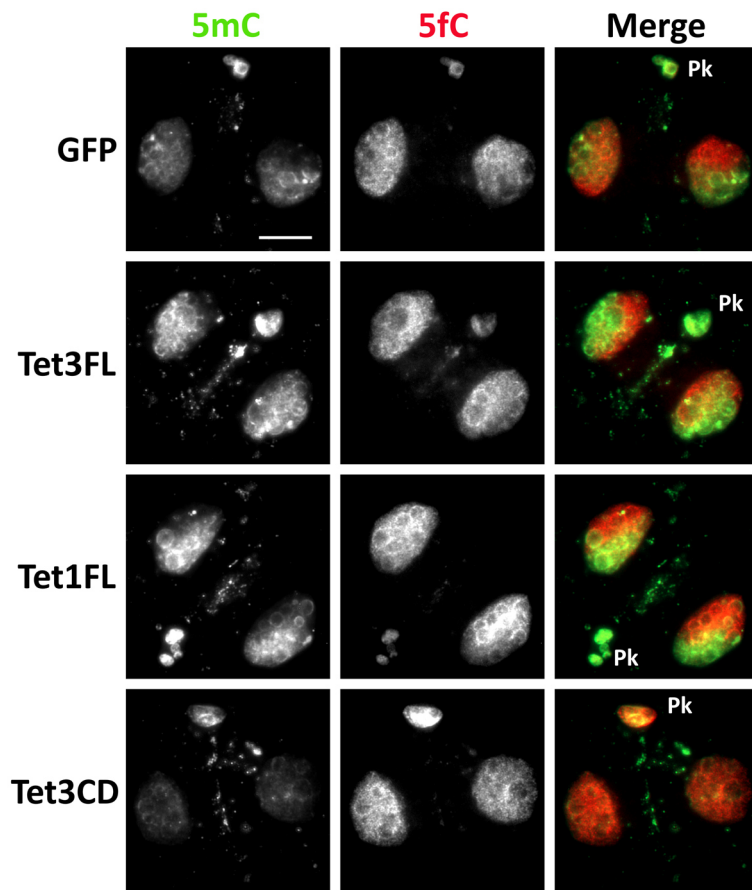


Abbildung 8.13 5fC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von 2-Zellembryonen (postreplikativ; 30hpf). In Zygoten wurde 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, 30hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5fC angefärbt. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt zu einem leichten Anstieg des 5fC- Signals und zudem zu einem leichten Anstieg von 5mC. Die Embryonen, welche Tet3CD überexprimieren, zeigen einem leichten Anstieg des 5fC- Signals, jedoch einen leichten Verlust von 5mC. Die Quantifizierung der Signale sind in Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 zu finden. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM. Für die Überexpression von Tet1CD siehe Abbildung 8.20.

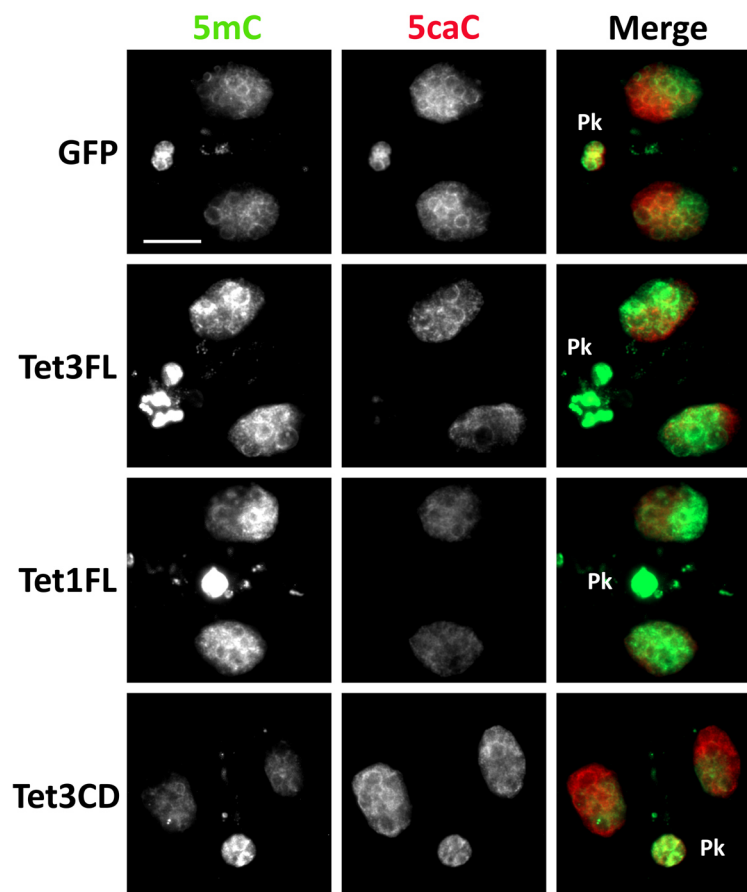


Abbildung 8.12 5caC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der 5caC-Antikörperfärbungen von 2-Zellembryonen (postreplikativ; 30hpf). In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 30hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5caC angefärbt. Die Überexpression von Tet3FL und Tet1FL führt zu einem Verlust des 5caC- Signals gegenüber der Kontrolle und zudem zu einem leichten Anstieg von 5mC, der jedoch bei Tet3FL Überexprimierenden stärker ausgeprägt ist. Die Embryonen, in welche Tet3CD überexprimieren, zeigen keinen Unterschied zur Kontrolle im 5caC-Signal, jedoch einen leichten Verlust des 5mC- Signals. Quantifizierungen der Signale sind in Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 zu finden PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM. Für Tet1CD siehe Abbildung 8.21.

Tabelle 8.4 Anzahl der analysierten Nuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen 2-Zellembryonen (29-31hpf), welche zygotisch TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren. Zudem ist die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben. Diese Angaben gehören zu Kapitel 3.1.5.1.

	Anzahl	Anzahl
	5mC	
GFP	29	6
TET3FL	20	4
TET1FL	24	5
TET3CD	20	3
TET1CD	7	2
	5hmC	
GFP	19	4
TET3FL	11	2
TET1FL	15	3
TET3CD	9	1
TET1CD	6	2
	5fC	
GFP	5	1
TET3FL	5	1
TET1FL	3	1
TET3CD	5	1
TET1CD	9	3
	5caC	
GFP	6	1
TET3FL	4	1
TET1FL	5	1
TET3CD	8	1
TET1CD	13	3

Tabelle 8.5 Referenzsequenzen der Hairpinbisulfitanalysen

mSat
ggaaaatttagaaatgtccaatgtaggacgtggaatatggcaagaaaactgaaaatcatgggaaatgagaaacatccactgtgcgacttg aaaaatgacgaaatcactaaaaaacgtgaaaaatgagaaatgcacactgaaggacc
L1
tccggaccggaggacaggtgccaccggctggggaggcgcctaagccacagcagcagcggtcgccatcttggctccgggactccaagg aacttaggaatttagtctgcttaagttagagagtctgtaccactgggaactgccaagcaacacagtgtctgagaaaggctctgtttgg
IAP
ctaagtgtaaacaaataatctgcgcatatgccgagggtggttctactccatgtgctctgcttcccgtgacgtcaactcggccgatggg ctgcagcaatcaggagtgacacgtcctaggcgaaatataactctcctaaaaaggggacgggttctgtttctctctcttctcttaca ctcttctctgaagatgtaagcaataaagttttgc

Tabelle 8.6 Vergleich der HPBS- Daten der Kontrolle dieser Arbeit mit den Daten von Arand et al. 2015. Die Hemimethylierung ist hier anders berechnet, nämlich nicht die absolute Hemimethylierung, wie in dieser Arbeit, sondern die hemimethylierten Positionen in Relation zu allen methylierten Positionen.

		Gesamtmethylierung		Hemimethylierung	
		prä	post	prä	post
mSat	GFP	22,4%	18,9%	12,9%	77,4%
	Arand et al.	23,0%	23,0%	19,0%	51,0%
L1	GFP-	51,9%	41,3%	15,9%	33,7%
	Arand et al.	36,0%	23,0%	17,0%	62,0%
IAP	GFP	77,9%	80,8%	12,7%	13,6%
	Arand et al.	80,0%	82,0%	8,0%	18,0%

Tabelle 8.7 Informationen zu den Hairpinbisulfid- Analysen von Zygoten, in welchen TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überrepräsentiert wurde. Es wurden prä- und postreplikative Zygoten analysiert (6hpf bzw 12 hpf). Dazu wurde das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit verwendet. Die Ergebnisse zu diesen Analysen sind in Kapitel 3.2.7 zu finden.

	Amplikon	Anzahl	Anzahl Läufe	Anzahl	Anzahl CpGs
GFP 6hpf	mSat	3,4,2,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	26461	76396
GFP 12hpf	mSat	4,4,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	21518	60994
TET3FL 6hpf	mSat	2,2,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	7429	20862
TET3FL 12hpf	mSat	3,3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	9214	27642
TET1FL 6hpf	mSat	3,3,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	9560	25694
TET1FL 12hpf	mSat	4,2,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	8456	24745
TET3CD 6hpf	mSat	2,2,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	8209	24627
TET3CD 12hpf	mSat	2,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	29288	81763
TET1CD 6hpf	mSat	3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	10474	31422
TET1CD 12hpf	mSat	3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	13436	38552
GFP 6hpf	L1	2,4,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	732	3513
GFP 12hpf	L1	4,5	2 1	280	1323
TET3FL 6hpf	L1	3,3	1	407	1891
TET3FL 12hpf	L1	3,3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	1194	5682
TET1FL 6hpf	L1	3,4,3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	2147	10112
TET1FL 12hpf	L1	3,4,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	1833	8686
TET3CD 6hpf	L1	2,3	1	916	4319
TET3CD 12hpf	L1	3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	253	1194
TET1CD 6hpf	L1	3,3,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	364	1747
TET1CD 12hpf	L1	3,3,4,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	135	643

GFP 6hpf	IAP	3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	629	2765
GFP 12hpf	IAP	4,5	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	575	2551
TET3FL 6hpf	IAP	4	2	326	1529
TET3FL 12hpf	IAP	3,3,4	2	1267	6097
TET1FL 6hpf	IAP	3,4,3,3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	1088	4519
TET1FL 12hpf	IAP	3,4,3,3,4	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	1824	8139
TET3CD 6hpf	IAP	3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	229	977
TET3CD 12hpf	IAP	3,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	813	3577
TET1CD 6hpf	IAP	3,4,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	318	1416
TET1CD 12hpf	IAP	3,3,3	für die ersten 2 Zellzahlen 2, für die Letzten 1	563	2490

Tabelle 8.8 Informationen zur Hairpinbisulfite Sequenzierung von Zygoten, in welchen TET1CD überrepräsentiert wurde und deren Replikation mittels Aphidicolin geblockt wurde. Es wurden prä- und postreplikative Zygoten analysiert (6hpf bzw 12 hpf). Dazu wurde das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit verwendet. Die Ergebnisse sind in 3.1.6.3 zu finden.

	Amplikon	Anzahl Zellen	Anzahl Läufe	Anzahl Reads	Anzahl CpGs
GFP+ Aph 6hpf	mSat	3	1	2905	8715
GFP+ Aph 12hpf	mSat	4,4	2	7749	20831
GFP+ Aph 6hpf	IAP	4	1	395	1870
GFP+ Aph 12hpf	IAP	4,4	2	14926	71576
TET1CD+ Aph 6hpf	mSat	4	1	2988	8964
TET1CD+ Aph 12hpf	mSat	4,4	2	17104	45612
TET1CD+ Aph 6hpf	IAP	4	1	227	1108
TET1CD+ Aph 12hpf	IAP	4,4	2	7565	38745

Tabelle 8.9 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfite- Sequenzierungen von mSat in Zygoten (siehe Kapitel 3.2.7)

Methylierung in %						
mSats	Gesamtmethylierung		Vollmethylierung		Hemimethylierung	
	6hpf	12 hpf	6hpf	12 hpf	6hpf	12 hpf
GFP	22,4%	18,9%	19,2%	11,9%	3,2%	7,0%
TET3FL	25,3%	22,2%	23,7%	16,5%	1,6%	5,7%
TET1FL	21,0%	21,1%	19,1%	16,8%	1,9%	8,0%
TET3CD	24,4%	17,2%	21,8%	11,9%	2,6%	5,3%
TET1CD	22,7%	17,9%	19,3%	11,9%	3,4%	6,0%
Standardabweichung in %						
GFP	2,4%	1,9%	2,8%	4,0%	2,0%	2,2%
TET3FL	2,0%	2,2%	2,1%	3,1%	0,1%	1,1%
TET1FL	1,2%	3,8%	1,0%	5,3%	0,4%	3,5%
TET3CD	0,4%	2,4%	0,9%	2,8%	0,7%	0,7%
TET1CD	3,6%	0,8%	3,7%	2,5%	0,5%	1,7%

Tabelle 8.10 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfit- Sequenzierungen von L1 in Zygoten aus Kapitel 3.2.7.

Methylierung in %			
L1	Gesamtmethylierung	Vollmethylierung	Hemimethylierung
	12hpf	12hpf	12hpf
GFP	41,3%	29,3%	12,0%
TET3FL	28,1%	17,5%	10,6%
TET1FL	37,3%	21,6%	15,7%
TET3CD	30,8%	23,2%	7,6%
TET1CD	25,4%	20,5%	4,9%
Standardabweichung in %			
GFP	7,0%	2,0%	2,1%
TET3FL	1,0%	1,4%	2,3%
TET1FL	6,3%	4,5%	3,1%
TET3CD	5,5%	5,4%	1,4%
TET1CD	1,7%	1,3%	0,4%

Tabelle 8.11 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfit- Sequenzierungen von L1 in Zygoten aus Kapitel 3.2.7.

Methylierung in %						
IAP	Gesamtmethylierung		Vollmethylierung		Hemimethylierung	
	6hpf	12hpf	6hpf	12hpf	6hpf	12hpf
GFP	78,0%	80,8%	69,4%	71,2%	8,5%	9,6%
TET3FL	74,5%	74,1%	68,5%	63,1%	6,0%	11,0%
TET1FL	76,8%	76,2%	71,7%	66,0%	5,1%	10,2%
TET3CD	82,4%	66,9%	77,3%	55,6%	5,1%	11,3%
TET1CD	76,7%	66,8%	67,8%	54,3%	8,9%	12,6%
Standardabweichung in %						
GFP	3,6%	3,8%	6,2%	4,3%	4,2%	1,2%
TET3FL	-	5,2%	-	5,5%	-	1,2%
TET1FL	4,1%	4,7%	5,0%	6,0%	1,9%	1,4%
TET3CD	2,4%	4,0%	5,1%	4,9%	2,7%	1,3%
TET1CD	3,8%	6,3%	4,3%	9,5%	1,2%	3,4%

Tabelle 8.12 Prozentuale Werte der Quantifizierung der Signale der Immunfluoreszenz- Analysen von Aphidicolin- behandelten Zygoten. Behandelte und unbehandelte Zygoten wurde 12hpf fixiert und 5mC, 5hmC und 5caC mittels Antikörperfärbungen angefärbt die Antikörpersignale quantifiziert. In behandelten Zygoten findet keine Replikation statt, wodurch der DNA- Gehalt im Vergleich zu unbehandelten verringert ist. Dies hat auch Auswirkungen auf die Mengen von 5mC, 5hmC und 5caC. Deswegen wurden die Signale von 5hmC und 5caC jeweils gegen das Signal von 5mC normalisiert. Dann wurde die Veränderung der Signalintensitäten nach der Aphidicolinbehandlung prozentual errechnet, wobei die Signalintensitäten der unbehandelten Zygoten auf 100% gesetzt wurden. Die Differenz der Werte und damit der Effekte der Behandlung mit Aphidicolin gegenüber den unbehandelten Zygoten sind in der Tabelle dargestellt. Es wurden je 3-5 Zygoten analysiert.

	GFP+Aph	TET1CD+Aph
5hmC/5mC mat	-2,1	8,4
5hmC/5mC pat	0,9	-6,4
5caC/5mC mat	-7,7	9,2
5caC/5mC pat	5,6	4,7

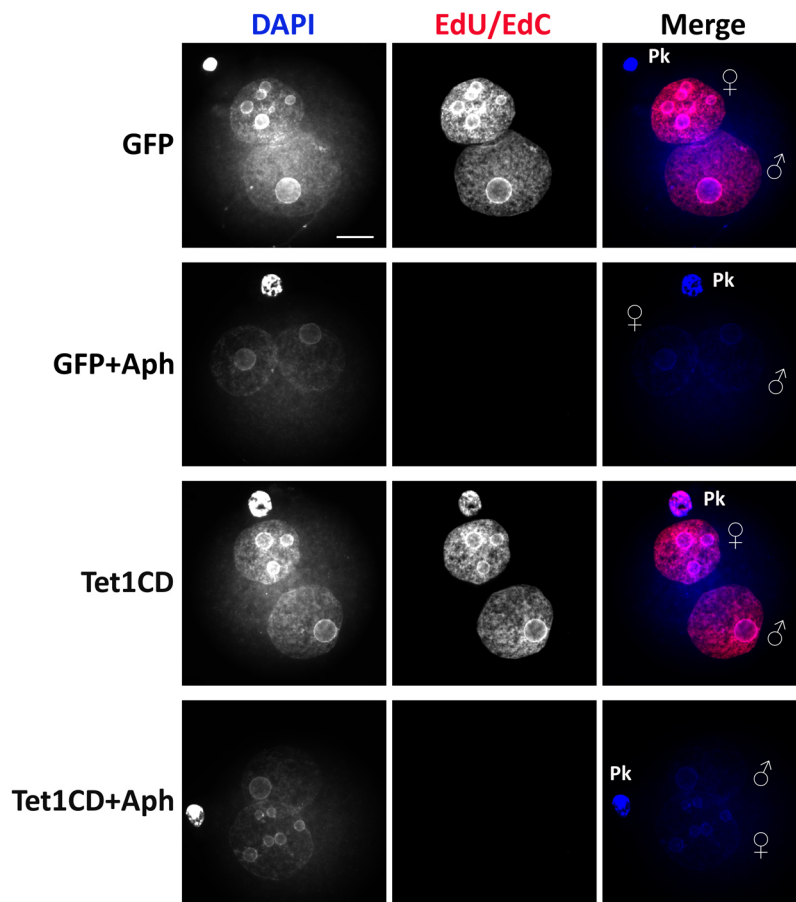


Abbildung 8.14 EdU/EdC Inkorporation nach dem Blocken der Replikation mit Aphidicolin. Dargestellt sind repräsentative Immunfluoreszenz- Aufnahmen der EdU/EdC Inkorporation von Zygoten (12hpf), welche GFP oder Tet1CD überexprimieren. Dieses Experiment wurde zum Test auf erfolgreiches Blockieren der Replikation durchgeführt. Dazu wurden Zygoten ab dem Zeitpunkt 5hpf mit 3 μ M/ml Aphidicolin und einem Mix aus EdU/EdC- Mix (50 μ M jeweils) inkubiert. Zu erkennen ist, dass die Embryonen, die ohne Aphidicolin inkubiert wurden, ein Immunfluoreszenz- Signal für EdU/EdC zeigen. Das bedeutet, dass sie EdU/EdC während der Replikation in ihre DNA inkorporiert haben. In den Zygoten, die mit Aphidicolin inkubiert wurden, ist kein Signal zu erkennen, was ein erfolgreiches Blockieren der Replikation bedeutet. PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20 μ M

Tabelle 8.13 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die verschiedene TET Varianten überexprimieren.

Experiment Nr.	Modifikation	ÜE/Pronukleus	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanzen (Ttest)
Exp1	5mC	GFP- mat	89,4	6,8	0,66
		GFP- pat	26,5	3,4	
		TET3FL- mat	84,0	23,8	
		TET3FL- pat	15,5	2,6	
		TET1FL- mat	95,1	17,1	
		TET1FL- pat	23,1	9,8	
		TET1CD- mat	42,0	1,2	
		TET1CD- pat	14,7	2,2	
	5hmC	GFP- mat	53,8	11,1	0,48
		GFP- pat	139,1	21,4	
		TET3FL- mat	75,3	29,9	
		TET3FL- pat	138,2	12,2	
		TET1FL- mat	86,5	18,5	
		TET1FL- pat	147,2	32,6	
TET1CD- mat		211,4	5,5		
TET1CD- pat		167,3	8,7		
Exp2	5mC	GFP- mat	91,8	24,3	0,007
		GFP- pat	27,2	10,1	
		TET1CD- mat	40,9	12,0	
		TET1CD- pat	14,4	1,6	
	5hmC	GFP- mat	36,2	12,0	1,15E-06
		GFP- pat	78,0	14,9	
		TET1CD- mat	168,0	30,9	
		TET1CD- pat	110,4	19,6	
Exp3	5mC	GFP- mat	69,1	7,7	0,001
		GFP- pat	18,3	2,3	
		TET1CD- mat	12,7	6,8	
		TET1CD- pat	11,1	6,0	
	5hmC	GFP- mat	32,3	6,6	0,0003
		GFP- pat	118,3	22,8	
		TET1CD- mat	174,6	19,8	
		TET1CD- pat	66,5	4,4	
Exp4	5mC	GFP- mat	57,3	12,6	0,012
		TET3FL- mat	94,3	14,9	
		TET1FL- mat	65,8	16,0	
		TET3CD- mat	56,9	0,6	
		TET1CD- mat	23,9	1,2	
	5hmC	GFP- mat	21,6	3,8	0,001
		GFP- pat	101,8	12,8	
		TET3FL- mat	94,3	7,1	
		TET3FL- pat	174,3	25,4	
		TET1FL- mat	136,3	25,8	
		TET1FL- pat	185,0	11,8	7,79E-05

		TET3CD- mat	170,5	19,0	0,004
		TET3CD- pat	183,1	16,2	0,002
		TET1CD- pat	61,8	5,8	0,004
Exp5	5mC	GFP- mat	53,3	7,5	
		GFP- pat	21,9	3,9	
		TET3FL- mat	93,8	6,1	0,0003
		TET3FL- pat	31,6	4,6	0,014
		TET1FL- mat	66,1	7,9	0,039
		TET1FL- pat	23,4	4,0	0,562
		TET3CD- mat	80,3	12,6	0,015
		TET1CD- mat	10,3	2,5	9,37E-07
		TET1CD- pat	3,7	0,4	1,17E-05
	5hmC	GFP- mat	27,6	6,5	
		GFP- pat	118,5	21,6	
		TET3FL- mat	99,9	8,4	1,61E-05
		TET3FL- pat	166,2	13,4	0,002
		TET1FL- mat	61,2	9,0	0,001
		TET1FL- pat	113,8	12,0	0,659
		TET3CD- mat	45,9	10,2	0,028
		TET3CD- pat	115,5	8,8	0,996
		TET1CD- mat	129,8	9,0	5,81E-06
TET1CD- pat	68,2	30,9	0,009		
Exp1	5mC	GFP- mat	65,4	7,8	
		GFP- pat	0,2	0,1	
		TET3FL- mat	88,0	4,9	1,071E-05
		TET3FL- pat	19,1	6,3	0,111
		TET1FL- mat	81,8	8,7	0,001
		TET1FL- pat	17,2	2,6	0,023
		TET3CD- mat	57,6	8,1	0,073
		TET3CD- pat	7,0	1,5	5,92E-06
		TET1CD- mat	5,2	0,9	7,60E-09
	TET1CD- pat	0,8	0,2	4,56E-07	
	5fC	GFP- mat	43,6	5,5	
		GFP- pat	76,5	7,2	
		TET3FL- mat	47,2	6,2	0,276
		TET3FL- pat	65,9	7,3	0,019
		TET1FL- mat	63,3	6,0	4,89E-06
		TET1FL- pat	88,8	5,6	0,001
		TET3CD- mat	78,2	10,6	1,574E-06
		TET3CD- pat	83,7	4,2	0,023
TET1CD- mat		94,6	9,8	6,73E-07	
TET1CD- pat	50,1	8,6	3,05E-05		
Exp2	5mC	GFP- mat	29,6	3,0	
		GFP- pat	4,8	0,9	
		TET3FL- mat	51,4	9,1	0,004
		TET3FL- pat	7,9	1,4	0,004
		TET1FL- mat	24,3	4,3	0,054
		TET1FL- pat	5,5	0,5	0,205
		TET3CD- mat	18,3	4,3	0,002

		TET3CD- pat	3,5	0,4	0,027	
		TET1CD- mat	2,4	0,7	1,34E-05	
		TET1CD- pat	1,8	0,2	0,001	
	5fC	GFP- mat	15,7	1,7		
		GFP- pat	27,1	5,6		
		TET3FL- mat	27,6	5,1	0,005	
		TET3FL- pat	42,3	3,2	0,006	
		TET1FL- mat	18,4	3,3	0,145	
		TET1FL- pat	36,2	3,8	0,041	
		TET3CD- mat	48,8	8,3	0,003	
		TET3CD- pat	55,4	12,6	0,005	
		TET1CD- mat	42,6	10,0	0,003	
		TET1CD- pat	22,8	9,6	0,375	
Exp1	5mC	GFP- mat	68,5	7,4		
		GFP- pat	26,3	5,4		
		TET3FL- mat	93,0	29,7	0,198	
		TET3FL- pat	30,5	10,0	0,476	
		TET1FL- mat	76,1	13,2	0,350	
		TET1FL- pat	19,5	4,6	0,061	
		TET3CD- mat	62,3	8,0	0,454	
		TET3CD- pat	23,6	0,3	0,225	
		TET1CD- mat	12,5	2,2	2,62E-07	
		TET1CD- pat	8,9	2,0	6,04E-05	
		5caC	GFP- mat	47,5	6,2	
			GFP- pat	157,6	11,9	
			TET3FL- mat	33,7	11,5	0,089
			TET3FL- pat	127,6	5,5	0,0003
			TET1FL- mat	27,3	3,7	9,15E-05
			TET1FL- pat	99,9	10,0	4,34E-05
			TET3CD- mat	158,9	20,1	0,074
			TET3CD- pat	52,7	11,1	0,012
			TET1CD- mat	128,7	17,4	3,25E-05
			TET1CD- pat	125,5	20,6	0,003
Exp2	5caC	GFP- mat	12,7	3,5		
		GFP- pat	90,3	6,3		
		TET3FL- mat	29,2	6,1	0,001	
		TET3FL- pat	130,3	5,0	8,03E-05	
		TET1FL- mat	15,0	5,8	0,463	
		TET1FL- pat	84,4	18,4	0,492	
		TET3CD- mat	78,5	9,4	1,81E-05	
		TET3CD- pat	149,4	11,5	0,0004	
		TET1CD- mat	104,0	26,1	6,89E-05	
		TET1CD- pat	115,2	18,4	0,020	
Exp3	5caC	GFP- mat	19,7	1,8		
		GFP- pat	140,9	14,8		
		TET1CD- mat	162,3	37,4	0,022	
		TET1CD- pat	177,6	10,3	0,029	

Tabelle 8.14 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2- Zellembryonen, die zygotisch verschiedene TET Varianten überexprimieren.

Modifikation	Experiment	Antikörper & Modifikation	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanzen (T-test)
5hmC	Exp 1	GFP- 5hmC	109,66	7,00	
		GFP- 5mC	46,08	3,83	
		TET1FL- 5hmC	177,62	15,79	8,12E-05
		TET1FL- 5mC	57,88	9,65	0,027
		TET1CD- 5hmC	159,16	14,99	0,022
		TET1CD- 5mC	21,06	3,36	8,89E-06
	Exp2	GFP- 5hmC	35,72	5,42	
		GFP- 5mC	65,47	6,67	
		TET3FL- 5hmC	140,07	25,28	3,48E-06
		TET3FL- 5mC	101,06	9,36	5,11E-05
		TET1FL- 5hmC	166,92	25,22	0,0002
		TET1FL- 5mC	84,00	12,36	0,026
	Exp3	TET3CD- 5hmC	196,44	12,55	6,60E-13
		TET3CD- 5mC	69,49	10,41	0,456
		GFP- 5hmC	107,33	3,43	
		GFP- 5mC	94,13	6,29	
	Exp4	TET3FL- 5hmC	176,62	9,79	0,003
		TET3FL- 5mC	137,58	9,64	0,004
GFP- 5hmC		98,83	17,00		
GFP- 5mC		117,90	10,92		
TET1FL- 5hmC		197,31	10,86	0,0009	
TET1FL- 5mC		25,65	6,90	0,002	
5fC	Exp1	TET1CD- 5hmC	196,41	31,55	0,0009
		TET1CD- 5mC	110,96	12,20	0,002
		GFP- 5fC	53,51	9,26	
		GFP- 5mC	55,18	4,32	
		TET3FL- 5fC	74,80	8,80	0,006
		TET3FL- 5mC	84,35	13,72	0,007
		TET1FL- 5fC	74,53	5,85	0,008
		TET1FL- 5mC	73,88	10,15	0,073
5caC	Exp1	TET3CD- 5fC	79,32	10,24	0,003
		TET3CD- 5mC	41,80	11,49	0,058
		GFP- 5caC	102,13	8,29	
		GFP- 5mC	64,70	7,01	
		TET3FL- 5caC	68,05	8,62	0,001
		TET3FL- 5mC	81,27	10,84	0,0455
		TET1FL- 5caC	55,05	7,33	3,76E-06
		TET1FL- 5mC	70,70	13,79	0,41
TET3CD- 5caC	112,08	8,04	0,046		
TET3CD- 5mC	46,36	7,19	0,0003		

8.2 Überexpression von TDGwt und TDGmut

Tabelle 8.15 Anzahl der befruchteten Oozyten, 2- Zellembryonen (24 hpf) und Blastozysten (E4.0) nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD. Zur Analyse des Entwicklungspotenzials der Zygoten, in welchen verschiedene Enzymen überexprimiert wurden, wurde in frühe Zygoten (2-3hpf) die jeweilige mRNA (TDGwt, TDGmut, TET1CD, TET1CD+ TDGwt, TET1CD+ TDGmut) injiziert, diese inkubiert und die Anzahl der korrekt entwickelten Embryonen im 2- Zell- oder Blastozystenstadium gezählt. (korrekte Entwicklung siehe Abbildung 8.1) Dann wurde die Anzahl der 2-Zellembryonen oder Blastozysten in Relation zu der Anzahl der befruchteten Eizellen (=100%) gesetzt und die Ergebnisse prozentual dargestellt (Tabelle 3.4). Bei jedem Überexpressionsexperiment wurde eine Kontrollgruppe (GFP injiziert) mitgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist zudem aufgelistet.

	Anzahl befruchtete Oozyten	Anzahl 2-Zellembryonen	Anzahl Experimente	Anzahl befruchtete Oozyten	Anzahl Blastozysten	Anzahl Experimente
GFP	207	202	10	156	143	4
TDGwt	208	113	10	123	37	4
TDGmut	180	174	10	60	31	2
TET1CD	107	61	6	36	5	2
TET1CD+TDGwt	-	-	-	27	0	1
TET1CD+TDGmut	-	-	-	20	0	1

Tabelle 8.16 Anzahl der befruchteten Oozyten und 2-/3-/4-/5-/6-/7-/8- Zellembryonen 48 Stunden nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, TET1CD, TET1CD+ TDGwt oder TET1CD+ TDGmut. Die befruchteten Oozyten sowie die verschieden- zelligen Embryonen wurden 48hpf gezählt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Embryonen errechnet. Zum Zeitpunkt 48hpf sollten die Embryonen entweder das 4- oder 8-Zellstadium (grau unterlegt) erreicht haben (siehe GFP). Das Experiment wurde zwei Mal durchgeführt.

	Gesamt anzahl	Anzahl Zygoten	% Zygoten	Anzahl 2-Zell	% 2-Zell	Anzahl 3-Zell	% 3-Zell	Anzahl 4-Zell	% 4-Zell
GFP	68	0	0	1	1,5	0	0	22	32,4
TDGwt	84	0	0	27	32,1	8	9,5	34	40,5
TDGmut	76	0	0	9	11,8	4	5,3	34	44,7
TET1CD	53	4	7,5	14	26,4	10	18,9	12	22,6
TET1CD+ TDGwt	34	1	2,9	25	73,5	2	5,9	5	14,7
TET1CD+ TDGmut	23	2	8,7	12	52,2	3	13	6	26,1
48hpf	Anzahl 5-Zell	% 5-Zell	Anzahl 6-Zell	% 6-Zell	Anzahl 7-Zell	% 7-Zell	Anzahl 8-Zell	% 8-Zell	
GFP	0	0	11	16,2	0	0	34	50	
TDGwt	9	10,7	6	7,1	0	0	9	10,7	
TDGmut	1	1,3	3	3,9	4	5,3	18	23,7	
TET1CD	0	0	10	18,9	0	0	1	1,9	
TET1CD+ TDGwt	0	0	2	5,9	0	0	0	0	
TET1CD+ TDGmut	0	0	0	0	0	0	0	0	

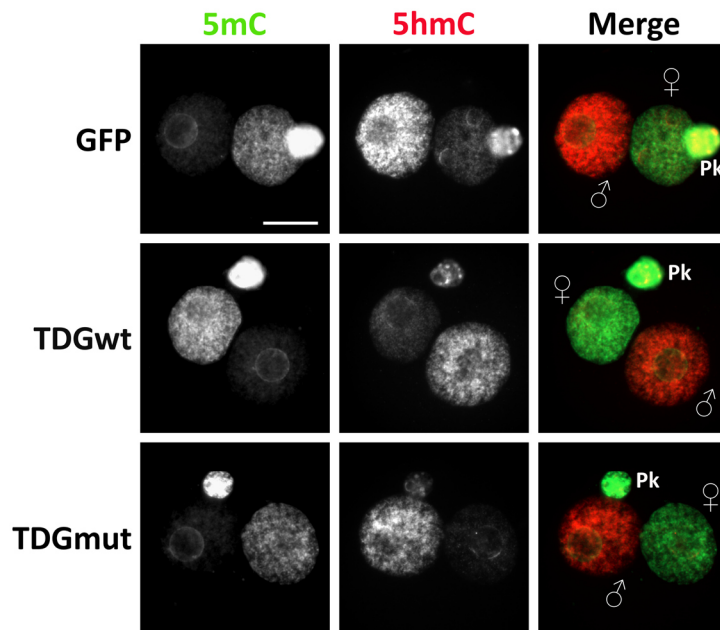


Abbildung 8.15 5hmC und 5mC in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten (12hpf), die TDGwt oder TDGmut überexprimieren. In Zygoten (IVF) wurde 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5hmC gefärbt. Die Überexpression von TDGwt und TDGmut hat keine deutlichen Auswirkungen auf das 5hmC- Signal, führt jedoch zu einem sehr milden Verlust des 5mC- Signals. (Quantifizierungen in Abbildung 3.18) PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

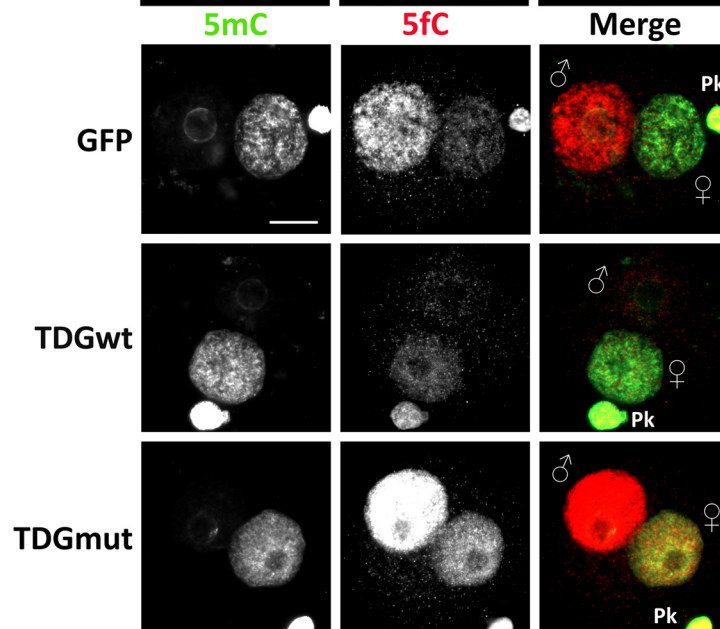


Abbildung 8.17 5fC und 5mC in Zygoten, die mit TDGwt oder TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren (12hpf). Dazu wurde in Zygoten (IVF) 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5fC gefärbt. Die Überexpression von TDGwt führt zu einem deutlichen Verlust des 5fC- Signals im paternalen Pronukleus, während TDGmut zu einem starken Anstieg in beiden Vorkernen führt. (Quantifizierungen in Abbildung 3.18) PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

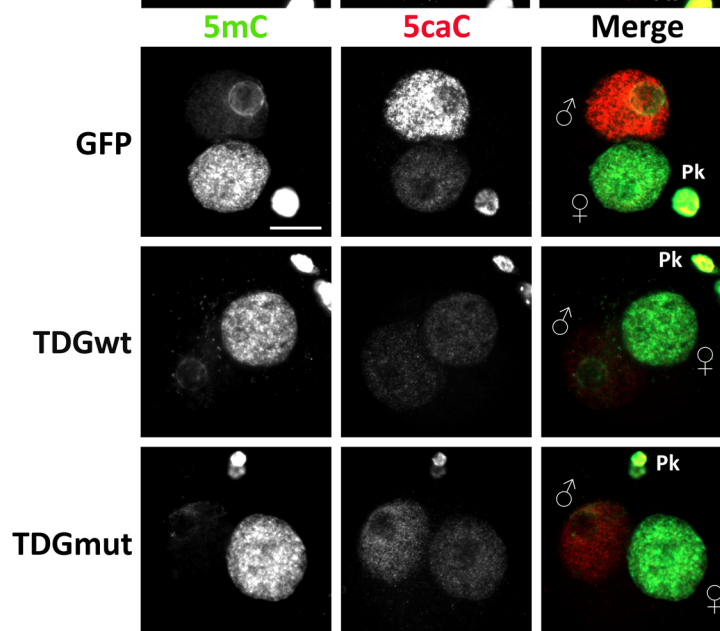


Abbildung 8.16 5caC und 5mC in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von postreplikativen Zygoten (12hpf), welche TDGwt oder TDGmut überexprimieren. Dazu wurde in Zygoten (IVF) 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 12hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen 5mC und 5fC gefärbt. Die Überexpression von TDGwt und TDGmut führt zu einem deutlichen Verlust des 5caC- Signals insbesondere im paternalen Pronukleus. Der maternale Vorkern ist nur gering und vor allem von TDGwt betroffen. (Quantifizierung Abbildung 3.18) PK= Polkörper, ♀= maternaler Pronukleus, ♂= paternaler Pronukleus; Maßstabsbalken 20µM.

Tabelle 8.17 Informationen zur Anzahl der analysierten maternalen und paternalen Pronuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen Zygoten, welche TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren. Zudem ist die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben.

	maternal		paternal	
	Anzahl	Anzahl Experimente	Anzahl	Anzahl Experimente
5mC				
GFP	48	7	54	7
TDGwt	55	7	59	7
TDGmut	39	6	37	7
5hmC				
GFP	14	3	13	3
TDGwt	19	3	19	3
TDGmut	14	3	12	3
5fC				
GFP	10	3	11	3
TDGwt	14	3	13	3
TDGmut	14	3	14	3
5caC				
GFP	39	3	35	3
TDGwt	34	3	39	3
TDGmut	27	2	28	3

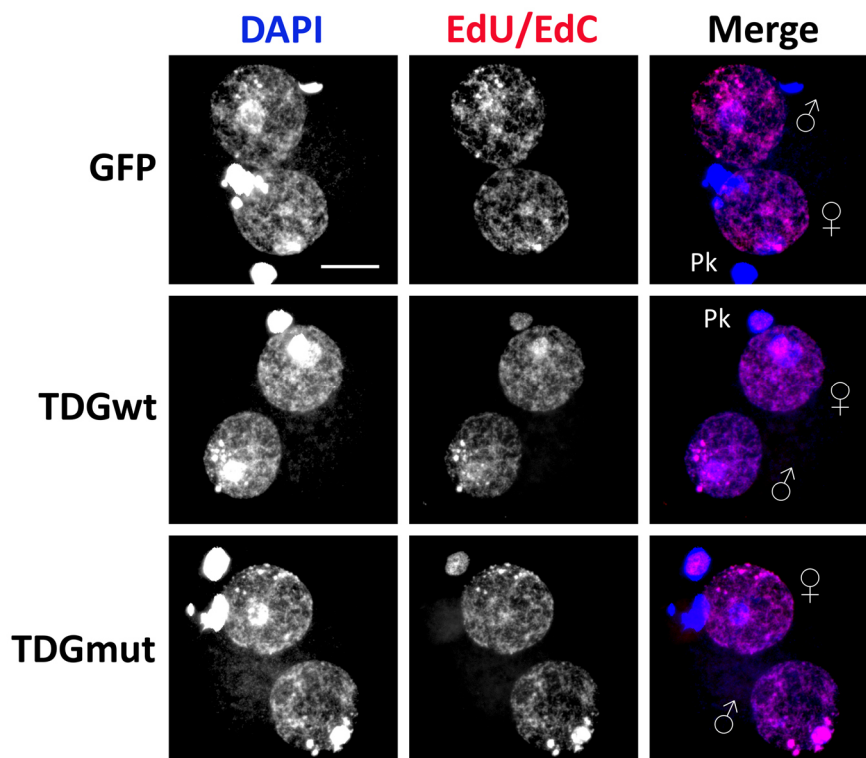


Abbildung 8.18 Kontrolle der Replikation der Zygoten, welche TDGwt oder TDGmut überexprimieren. Um zu überprüfen, ob die überexprimierenden Zygoten, wie auch die Kontrollzygoten, in die S- Phase übergehen, wurden die Zygoten mit einer Mischung aus zwei Basenanaloga (EdU/EdC) inkubiert. Die exemplarisch dargestellten Zygoten wurden 6hpf-8hpf mit EdU/EdC (50 μ M) inkubiert. Mittels einer Click-it Reaktion wurde der Einbau von EdU/EdC in die DNA sichtbar gemacht. Es ist zu erkennen, dass die EdU/EdC- Signale aller Gruppen sehr ähnlich sind, woraus gefolgert werden kann, dass die Replikation zum gleichen Zeitpunkt startet und TDGwt/mut keinen Einfluss den Startzeitpunkt ausüben. N>5, ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabsbalken=20 μ M.

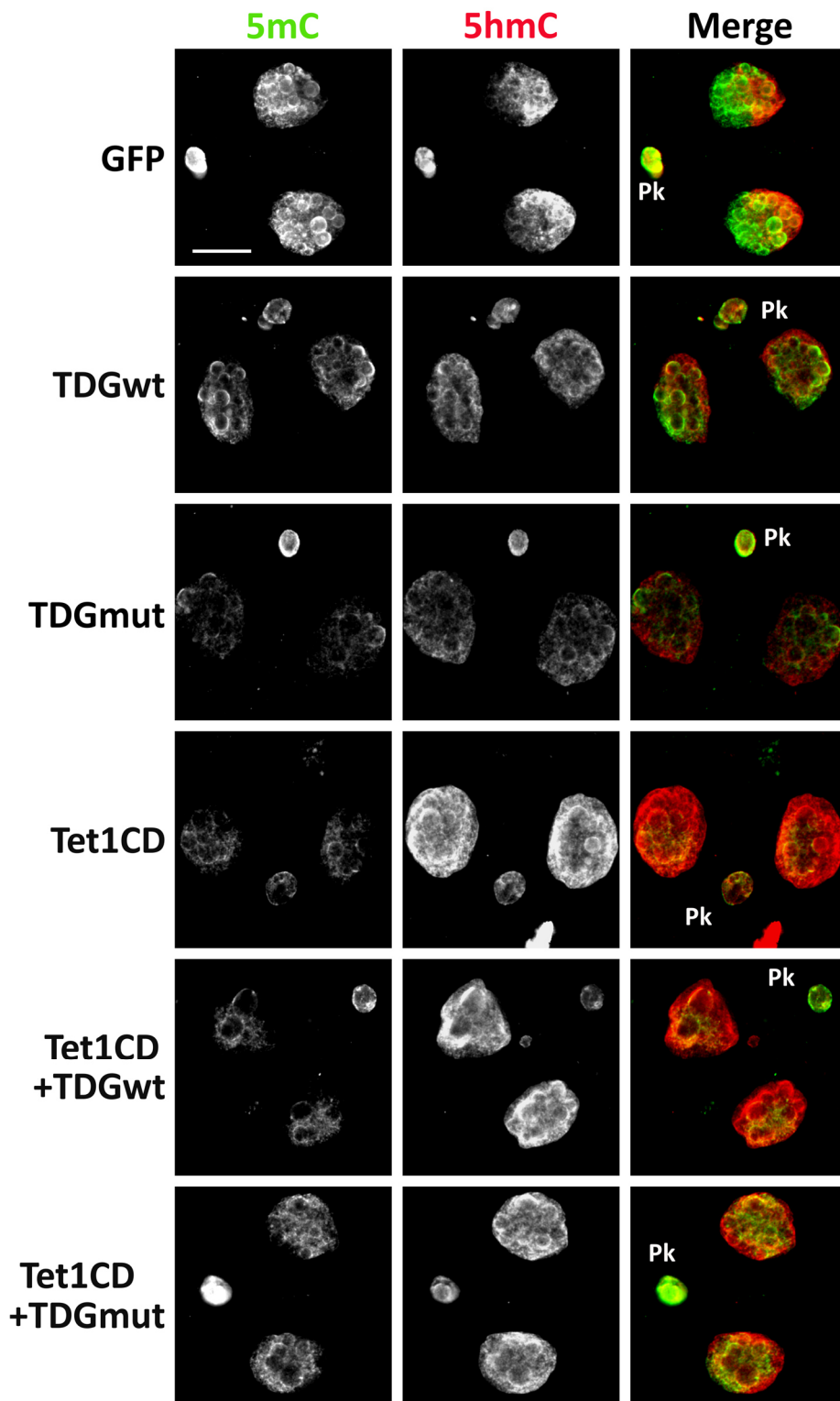


Abbildung 8.19 5hmC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von 2- Zellembryonen. Dazu wurde in Zygoten (IVF) 3hpf die entsprechende mRNA injiziert, diese 29-31hpf (postreplikativ) fixiert und mittels Antikörpern gegen 5hmC und 5mC gefärbt. In allen Embryonen kommt es durch die Überexpression zu einem deutlichen Verlust von 5mC, welcher am stärksten in Embryonen ausgeprägt ist, in welchen TDGmut, Tet1CD und Tet1CD+ TDGwt überexprimiert wurde. Ein Verlust des 5hmC- Signals ist in Zygoten zu detektieren, in denen TDGwt oder TDGmut überexprimiert wurden. Dies basiert auf dem deutlichen Verlust von 5mC und der damit verminderten Menge an Substrat für Tet. In Zygoten die mit Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überrepräsentiert wurden, steigen auf grund der Aktivität von Tet1CD die 5hmC- Level. (Quantifizierung Abbildung 3.20) PK= Polkörper; Maßstabsbalken 20µM.

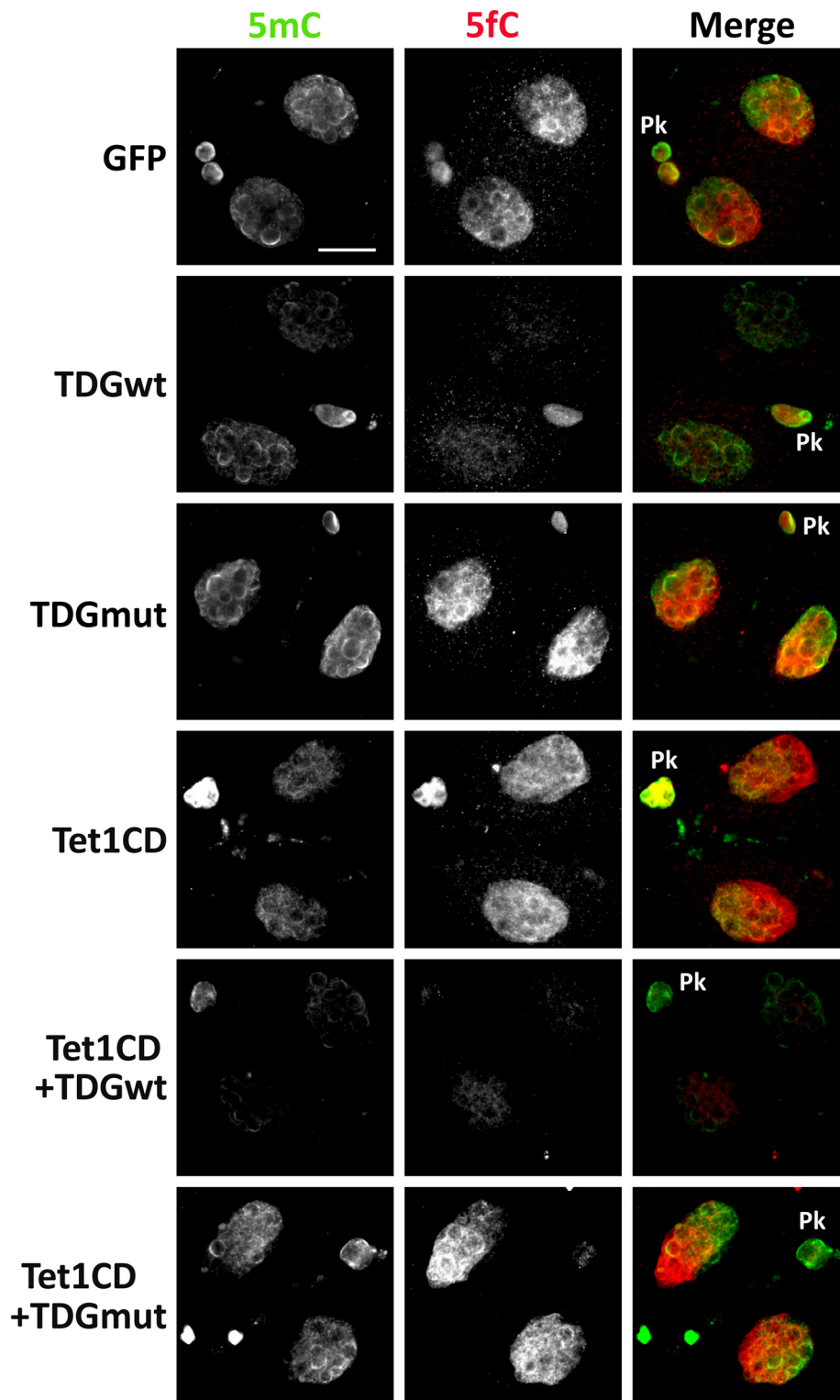


Abbildung 8.20 5fC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von 2- Zellembryonen. Dazu wurden Zygoten (IVF) 3hpf mit der entsprechenden mRNA injiziert, 29-31hpf (postreplikativ) fixiert und mittels Antikörpern gegen 5fC und 5mC gefärbt. Die 5mC- Signale sind auch hier wie in Abbildung 8.19. In Embryonen, die TDGwt oder Tet1CD+ TDGwt überexprimieren kommt es zu einem deutlichen Verlust von 5fC. Dies basiert auf der Aktivität von TDGwt gegenüber 5fC. In Embryonen, die TDGmut und Tet1CD+ TDGmut überexprimieren, akkumuliert 5fC. Die Anhäufung ist in beiden Gruppen sogar stärker als in Embryonen, welche Tet1CD überexprimieren. Dies beruht vermutlich darauf, dass TDGmut aufgrund seiner Spezifität an 5fC bindet, es durch die Mutation jedoch nicht entfernt wird und somit seine Oxidation zu 5caC blockiert. (Quantifizierung Abbildung 3.20 PK= Polkörper; Maßstabsbalken 20µM.

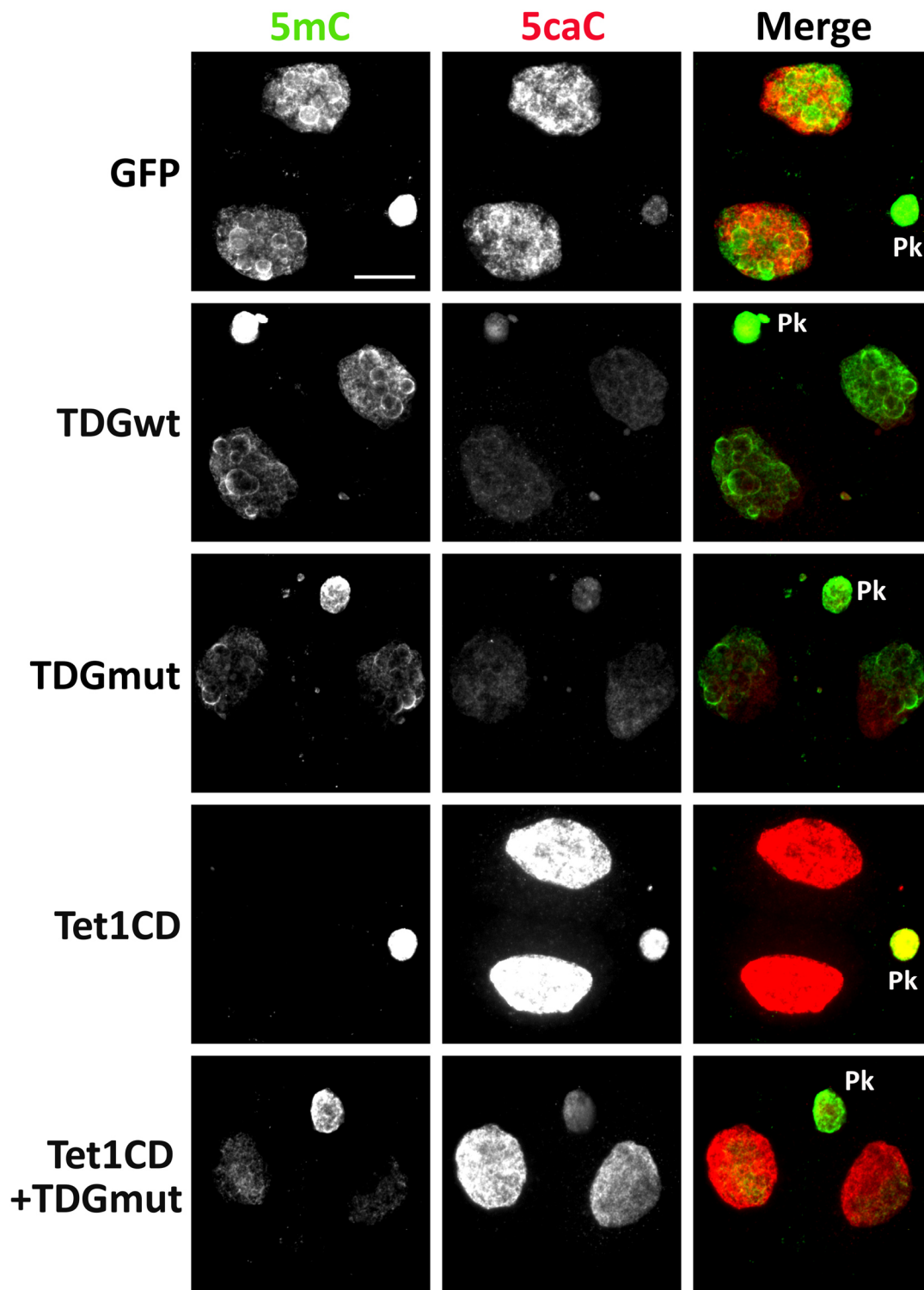


Abbildung 8.21 5caC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbungen von 2- Zellembryonen. In Zygoten (IVF) 3hpf wurde die entsprechende mRNA injiziert, sie 29-31 hpf (postreplikativ), fixiert und mittels Antikörpern gegen 5caC und 5mC gefärbt. Die 5mC- Signale sind auch hier wie in Abbildung 8.19 beschrieben. In Embryonen, welche TDGwt überexprimieren kommt es zu einem deutlichen Verlust von 5caC, was auf der Aktivität von TDGwt gegenüber 5caC basiert. In Embryonen, in welchen TDGmut überexprimiert wurde, kommt es auch zu einem Verlust von 5caC. In Embryonen, in welchen Tet1CD überexprimiert wurde, akkumuliert 5caC. Das 5caC- Signal in Embryonen, in welchen Tet1CD+TDGmut überrepräsentiert wurde, ist im Vergleich zu Tet1CD etwas reduziert. Dies basiert vermutlich darauf, dass TDGmut aufgrund seiner Spezifität an 5fC bindet, es durch die Mutation jedoch nicht entfernt wird und somit seine Oxidation zu 5caC blockiert. (Quantifizierungen Abbildung 3.20) PK= Polkörper; Maßstabsbalken 20µM.

Tabelle 8.18 Anzahl der analysierten Nuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen 2-Zellembryonen (29-31hpf), in welchen TDGwt, TDGmut, TET1CD, TET1CD+ TDGwt und TET1CD+ TDGmut überexprimiert wurde. Zudem ist die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben.

	Anzahl	Anzahl
	5mC	
GFP	84	11
TDGwt	50	8
TDGmut	66	6
TET1CD	29	8
TET1CD+wt	10	4
TET1CD+mut	22	2
	5hmC	
GFP	27	3
TDGwt	20	2
TDGmut	19	3
TET1CD	9	2
TET1CD+wt	5	1
TET1CD+mut	10	1
	5fC	
GFP	31	5
TDGwt	17	4
TDGmut	28	3
TET1CD	9	3
TET1CD+wt	5	2
TET1CD+mut	2	1
	5caC	
GFP	20	3
TDGwt	13	2
TDGmut	19	3
TET1CD	13	3
TET1CD+mut	7	1

Tabelle 8.19 Anzahl der auf die Veränderung bestimmter Histonmodifikationen analysierten Zygoten, in welchen TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimiert wurde.

12hpf	H3K9me2	H3K9me3	H3K27me3	H3K4me2	PGC7/Stella
GFP	6	3	4	5	4
TDGwt	4	3	4	-	-
TDGmut	5	3	3	4	3
TET1CD	10	4	4	4	5

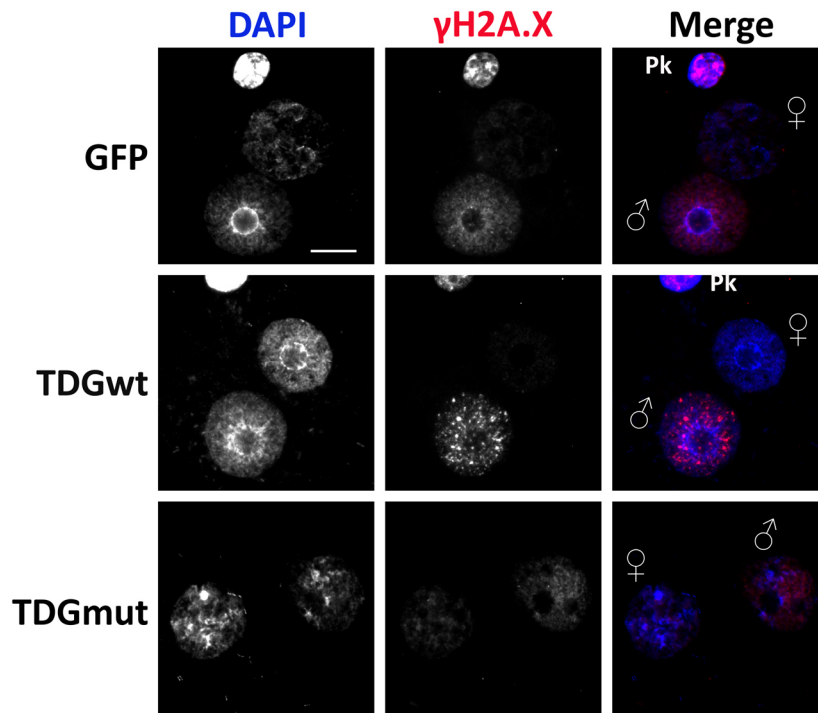


Abbildung 8.22 γ H2A.X- Signale in präreplikativen Zygoten, in welchen TDGwt oder TDGmut überrepräsentiert wurde. Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen von präreplikativen Kontroll- Zygoten und Zygoten, welche TDGwt oder TDGmut überexprimieren. In die Zygoten wurde 2hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert, diese 6hpf fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2A.X gefärbt. In Zygoten der GFP- Kontrolle sind keine γ H2A.X- Foci erkennbar, während in Zygoten, welche TDGwt überexprimieren, eine starke Akkumulation im paternalen Vorkern zu erkennen ist. In Zygoten, welche TDGmut überexprimieren, sind keine γ H2A.X- Foci vorhanden. Die leichten, flächigen Signale in GFP- Kontrollzygoten und Zygoten, welche TDGmut überexprimieren sind Hintergrundsignal. Der gleiche Effekt zeigt sich auch in postreplikativen Zygoten (Abbildung 3.19) ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabballen=20 μ M.

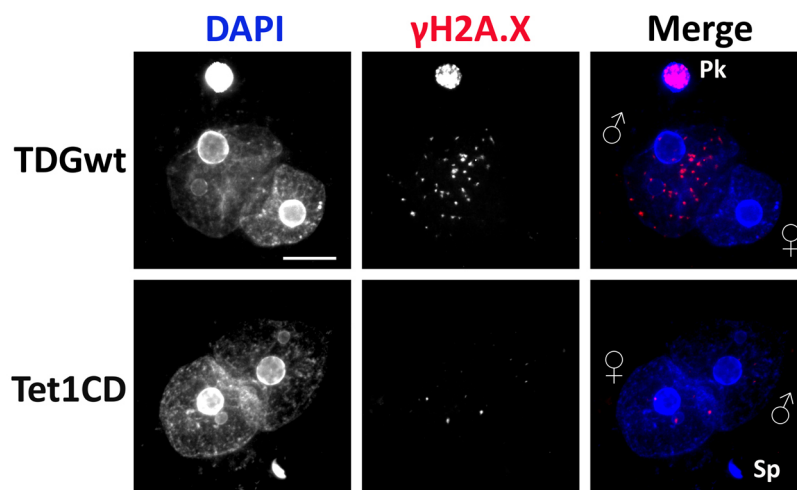


Abbildung 8.23 γ H2A.X- Signale in Embryonen, welche mit TDGwt oder Tet1CD überexprimieren zum Zeitpunkt 28hpf. Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen von 1- Zellembryonen, welche TDGwt oder Tet1CD überexprimieren, zum Zeitpunkt (28hpf) an dem sie das 2- Zellstadium erreicht haben sollten. In die Zygoten wurde 2hpf die entsprechende mRNA mikroinjiziert, diese 28hpf fixiert und mittels Antikörpern gegen γ H2A.X gefärbt. In 1- Zellembryonen, welche TDGwt überexprimieren, ist eine Anhäufung von γ H2A.X- Foci im paternalen Pronukleus zu erkennen, welche auf die Aktivität von TDGwt zurückzuführen ist. Die Signale sind im Vergleich zu 6hpf oder 12hpf deutlich reduziert (Abbildung 8.22 und Abbildung 3.19). In Zygoten, die Tet1CD überexprimieren, sind nur sehr wenige γ H2A.X- Foci vorhanden, insbesondere im Vergleich zu 7hpf oder 12hpf (Abbildung 8.10 und Abbildung 3.4) . ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Maßstabballen=20 μ M.

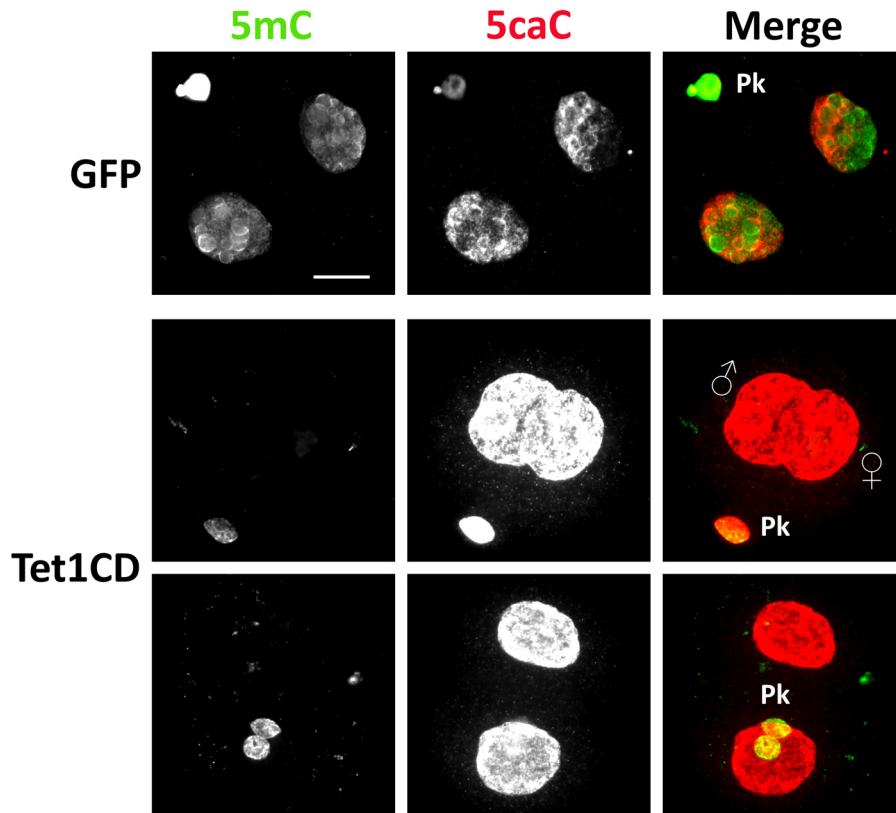


Abbildung 8.24 5caC- Signale nach der Überexpression von Tet1CD in Embryonen 24hpf. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Embryonen 24hpf, welche mittels Antikörper gegen 5caC angefärbt wurden. Diese Embryonen befinden sich normalerweise im 2- Zellstadium. Durch die Überexpression von TET1CD arretieren die Embryonen zu 87% im Zygotenstadium. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Embryonen, die sich im 1-Zellstadium befinden, als auch die, welche sich im 2- Zellstadium befinden, einen deutlichen Anstieg des 5caC- Signals zeigen

Tabelle 8.20 Methylierungswerte der Lambda- Kontroll- Amplikons, der Proben, die mittels des ZymoGold Kits behandelt wurden. Die Bisulfite- DNA (BIS) wurde nicht mit der Methyltransferase behandelt. Die Werte liegen alle bei 0,5%. Die MAB- DNA (MAB) wurde mit M.SssI behandelt und aufmethyliert, was an den hohen Methylierungswerten erkennbar ist. Die Werte gehören zu Abbildung 3.24.

Lambda	BIS			MAB		
	mSat	L1	IAP	mSat	L1	IAP
12hpf	mSat	L1	IAP	mSat	L1	IAP
GFP	0,5%	0,5%	0,5%	97,2%	97,7%	95,9%
TDGwt	0,5%	0,5%	0,5%	97,2%	97,3%	97,1%

Tabelle 8.21 Methylierungswerte der Lambda- Kontroll- Amplikons, der DNA, die mittels des laborinternen Bisulfite behandelt wurden. Die Bis- DNA wurde nicht mit der Methyltransferase behandelt. Die Werte liegen alle bei 0,5%. Die MAB- DNA wurde mit M.SssI behandelt und aufmethyliert, was an den hohen Methylierungswerten erkennbar ist. Im Vergleich zu den Werten aus Tabelle 8.20 sind die MAB- Methylierungswerte relativ niedrig. Die Werte gehören zu Abbildung 8.26.

Lambda	BIS			MAB		
	mSat	L1	IAP	mSat	L1	IAP
12hpf	mSat	L1	IAP	mSat	L1	IAP
GFP	0,5%	0,6%	0,6%	84,8%	89,8%	90,6%
TDGwt	0,5%	/	0,6%	87,2%	87,2%	90,0%

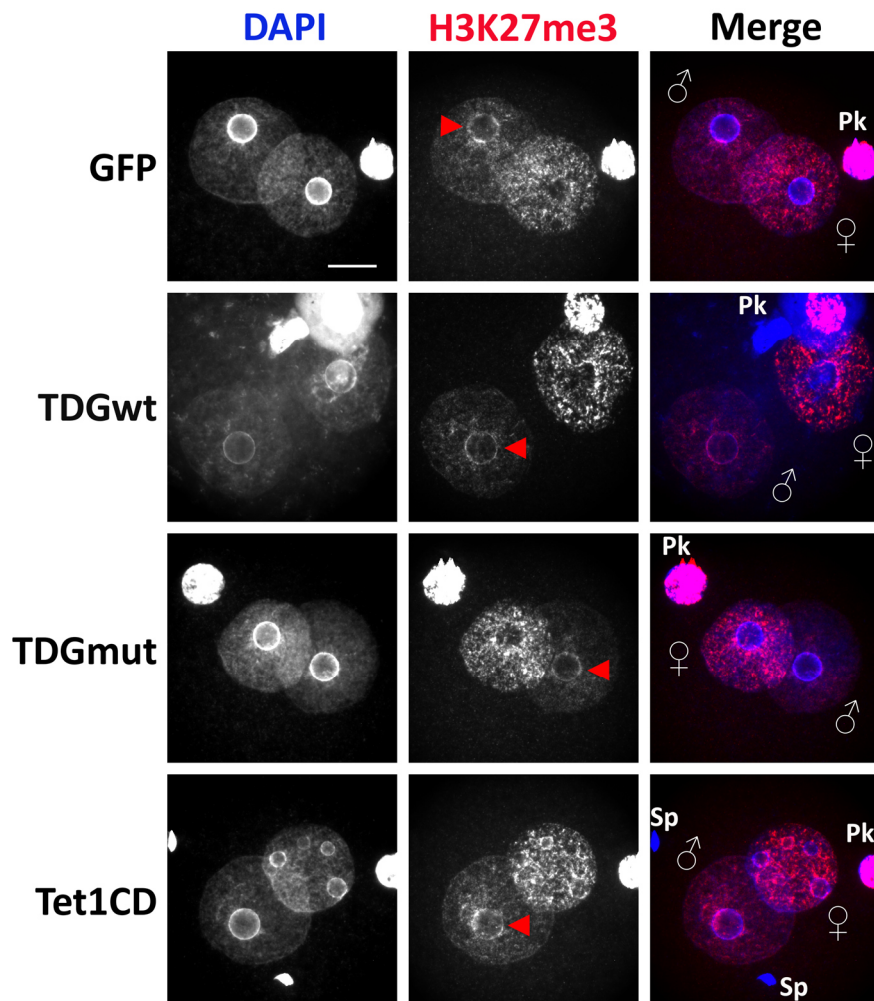


Abbildung 8.25 H3K27me3- Level und seine Lokalisation an perizentromerischen Ringen in Zygoten, welche TDGwt, TDGmut und Tet1CD überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von postreplikativen Zygoten (12hpf), welche TDGwt, TDGmut oder Tet1CD überexprimieren. Die Zygoten (IVF) wurden 3hpf mit der entsprechenden mRNA mikroinjiziert, 12hpf fixiert und mittels Antikörper gegen H3K27me3 gefärbt. Es sind keine Unterschiede in den einzelnen Zygoten auf Ebene der H3K27me3 zu erkennen (bei Miteinbeziehen der unterschiedlichen DAPI- Signale). Auch die mit roten Pfeilen markierten perizentromerischen Ringe zeigen unter Einbeziehung der DAPI- Signale keine deutlichen Unterschiede von den Zygoten, die mit den verschiedenen Enzymen überexprimiert wurden, zur Kontrolle. ♂=paternaler und ♀=maternaler Pronukleus, Pk=Polkörper, Sp=Spermium, Maßstabballen=20 μ M.

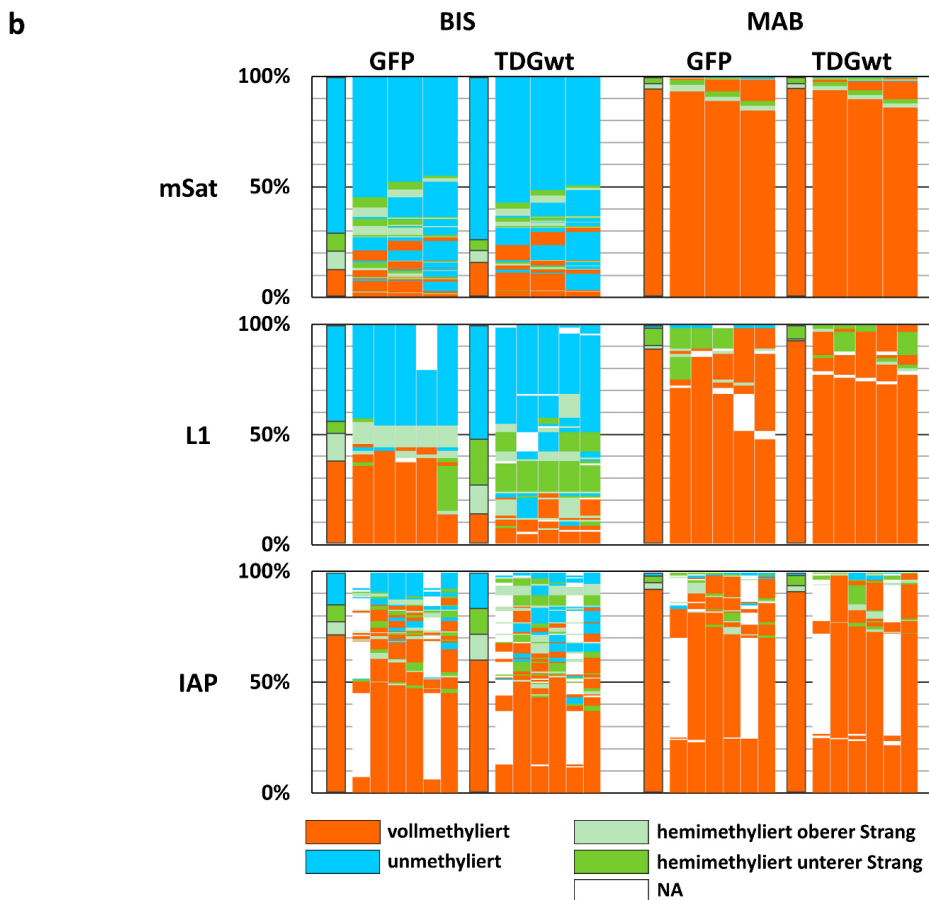
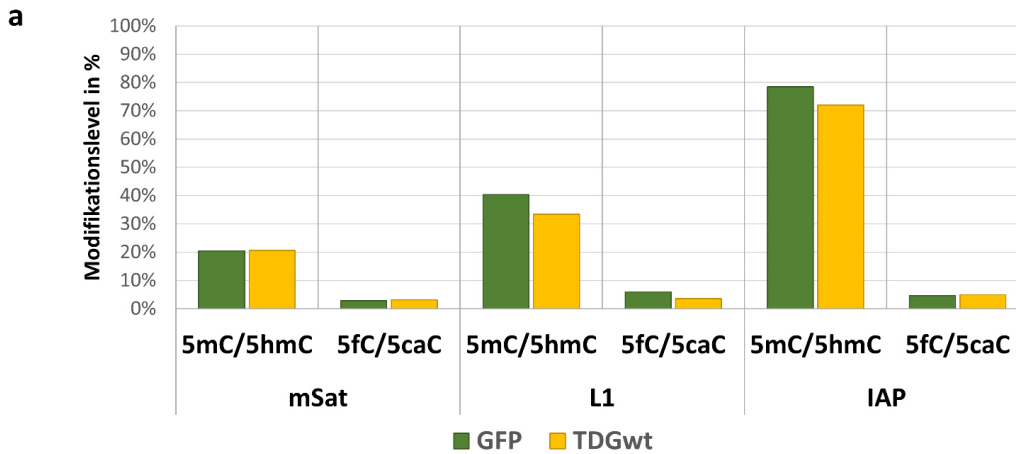


Abbildung 8.26 MA-HPBS- Sequenzierungsanalyse von mSat, L1 und IAP in postreplikativen Zygoten, die TDGwt überexprimieren (laborinternes Bisulfit- Protokoll). Es wurden postreplikative (12hpf) Zygoten, welche TDGwt überexprimieren (ICSI) gesammelt und mittels HPBS- Sequenzierung analysiert. a: 5mC/5hmC in % b: 5fC/5caC in % c: Methylierungsmuster der BIS- und MAB- Analyse. Die Überexpression von TDGwt hat keinen Effekt auf 5mC/5hmC in mSat. Die Überexpression von TDGwt führt jedoch zu einer Abnahme der Gesamtmethylierung in L1 und IAP. Dabei nimmt die Vollmethylierung stark ab- und die Hemimethylierung mild zu. Zudem werden 5fC/5caC durch die Überexpression in mSat leicht erhöht, was möglicherweise auf einem Sequenzierungsfehler beruht, da das Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Die Überexpression von TDGwt führt in L1 zur Reduktion von 5fC/5caC, auf IAPs hat sie hingegen keinen Effekt. In Tabelle 8.21 sind die Methylierungswerte der Lambda- Amplikons dargestellt. In Tabelle 8.23 sind technische Informationen zu diesem Experiment aufgelistet. In Abbildung 3.24 ist das gleiche Experiment mit einer anderen Bisulfitbehandlung dargestellt.

Tabelle 8.22 Informationen zur MA- Hairpinbisulfitsequenzierung von Zygoten, in welchen TDGwt überrepräsentiert wurden. (Kapitel 3.2.7) Es wurden prä- und postreplikative Zygoten analysiert (6hpf bzw 12 hpf). Dazu wurde das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit verwendet.

EZ DNA MethylationGold™	Amplikon	Anzahl Zellen	Anzahl Läufe	Reads	Anzahl CpGs
GFP BIS 12hpf	mSat	2	1	15649	41662
TDGwt BIS 12hpf	mSat	1,5	1	15242	41050
GFP BIS 12hpf	L1	2	1	953	4439
TDGwt BIS 12hpf	L1	2	1	936	4440
GFP BIS 12hpf	IAP	2	1	309	1497
TDGwt BIS 12hpf	IAP	2	1	704	3370
GFP MAB 12hpf	mSat	2	1	4303	11649
TDGwt MAB 12hpf	mSat	1,5	1	3964	10361
GFP MAB 12hpf	L1	2	1	142	660
TDGwt MAB 12hpf	L1	2	1	503	2376
GFP MAB 12hpf	IAP	2	1	222	1112
TDGwt MAB 12hpf	IAP	2	1	159	778

Tabelle 8.23 Informationen zur MA- Hairpinbisulfitsequenzierung von Zygoten, in welchen TDGwt überrepräsentiert wurden. (Abbildung 8.26). Es wurden prä- und postreplikative Zygoten analysiert (6hpf bzw 12 hpf). Dazu wurde das laborinterne Bisulfitprotokoll (Kapitel 2.2.26) verwendet.

laborintern	Amplikon	Anzahl Zellen	Anzahl Läufe	Reads	Anzahl CpGs
GFP-BIS 12hpf	mSat	1,5	1	1731	5193
GFP-MAB 12hpf	mSat	1,5	1	2566	7698
TDGwt-BIS 12hpf	mSat	2	1	2763	8289
TDGwt-MAB 12hpf	mSat	2	1	2627	7881
GFP-BIS 12hpf	L1	2	1	115	554
GFP-MAB 12hpf	L1	2	1	77	361
TDGwt-BIS 12hpf	L1	2	1	262	1257
TDGwt-MAB 12hpf	L1	2	1	67	328
GFP-BIS 12hpf	IAP	2	1	233	1039
GFP-MAB 12hpf	IAP	2	1	183	863
TDGwt-BIS 12hpf	IAP	2	1	156	735
TDGwt-MAB 12hpf	IAP	2	1	245	1140

Tabelle 8.24 Veränderung der Methylierungslevel von postreplikativen Zygoten (12-14hpf) in welche TDGwt überexprimieren, im Vergleich zur GFP- Kontrolle. In Oozyten wurde TDGwt kodierende mRNA mikroinjiziert. Nach 1,5h wurden die leicht grün fluoreszierenden Oozyten mittels ICSI befruchtet. 12-14hpf wurden die Zygoten sortiert und zum Sequenzieren gesammelt. Für die Bisulfitanalyse wurde das EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit für die genomweite Analyse sehr geringer DNA- Mengen verwendet. Aus unbekanntem Gründen wurden ausschließlich repetitive Elemente sequenziert. Es wurde jedes CpG einzeln bezüglich seiner Methylierung analysiert und dann der Mittelwert $\bar{\varnothing}$ aus allen CpGs gebildet (siehe Tabelle 8.25). Es ist ein deutlicher Verlust der DNA- Methylierung von L1MdA, L1MdT, Etn und IAPez im Vergleich zur Kontrolle (Differenzen der Methylierungswerte aus Kontrolle und TDGwt dargestellt) zu erkennen, insbesondere in Etn. Interessanterweise ist auch, dass das während der Reprogrammierung in seinen Methylierungsleveln konstante L1MdA von der Überexpression betroffen ist.

	Durchschnittliche Methylierung in %			
	L1MdA	L1MdT	Etn	IAPez
GFP	72,6	28,3	72,0	77,4
TDGwt	59,7	23,3	40,1	71,4
Differenz	-12,9	-5,8	-31,9	-6,0

Tabelle 8.25 Methylierungswerte der einzelnen CpG- Positionen und die daraus resultierenden mittleren Methylierungswerte von Zygoten, die TDGwt überexprimieren. Interessanterweise sind manche stark methylierten CpGs benachbart zu sehr niedrig methylierten CpGs. Die Anzahl der Sequenzen der jeweiligen CpG- Positionen sind in Tabelle 8.26 aufgeführt.

	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14	CpG 15	CpG 16	CpG 17	CpG 18	CpG 19	CpG 20	$\bar{\varnothing}$
GFP L1MdA	70,4	73,6	77,5	68,9	71,3	62,6	76,5	70,7	69,7	75,4	73,8	82,0	77,1	74,8	75,8	75,1	69,1	72,0	63,0		72,6
TDGwt L1MdA	58,7	59,1	61,2	60,1	53,6	53,7	62,9	59,6	59,4	65,1	59,6	68,8	62,8	60,0	60,2	60,8	60,5	54,1	54,0		59,7
GFP L1MdT	44,8	10,9	80,7	0,9	79,2	X	X	14,3	5,2	26,5	37,5	10,7	X	4,7	71,3	1,4	26,0				28,3
TDGwt L1MdT	29,3	4,3	69,1	1,2	71,6	X	X	8,3	4,1	16,8	26,9	7,2	X	3,5	60,9	2,0	17,8				23,0
GFP Etn	56,2	69,1	60,6	67,4	X	73,0	76,1	69,2	76,2	78,4	79,6	69,8	76,2	78,4	79,6	69,8					72,0
TDGwt Etn	30,1	37,7	38,5	39,1	X	54,1	35,6	22,0	43,2	46,7	36,2	45,8	43,2	46,7	36,2	45,8					40,1
GFP IAPez										69,3	86,5	75,9	88,4	89,1	83,7	51,4	71,1	77,5	82,8	75,5	77,4
TDGwt IAPez										59,9	78,1	74,0	83,8	84,3	81,4	49,8	59,9	67,3	74,9	72,2	71,4

Tabelle 8.26 Anzahl der Sequenzen der einzelnen CpG- Positionen

	Anzahl der Reads																			
	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14	CpG 15	CpG 16	CpG 17	CpG 18	CpG 19	CpG 20
	L1MdA																			
GFP	6356	6356	6356	5779	5779	5779	3921	3921	3921	3921	4229	3064	3064	3064	3064	3064	5913	5913	5913	
TDGwt	18397	18397	18397	17140	17140	17140	10284	10284	10284	10284	9388	8826	8826	8826	8826	8826	17650	17650	17650	
	L1MdT																			
GFP	4008	4522	1970	1978	1815	35	52	8514	8732	650	4169	1264	186	8979	8299	948	888			
TDGwt	10744	11173	3597	3600	3400	108	226	20521	21131	1844	15114	2890	449	18591	16143	2236	2072			
	Etn																			
GFP	347	457	251	552		196	264	266	260	269	269	258	260	269	269	258				
TDGwt	815	1034	611	1099		431	593	555	488	473	469	400	488	473	469	400				
	IAPez																			
GFP	534	534	525	501	565	563	528	564	540	2183	1987	2375	2826	2895	2870	2499	2790	2758	2790	2725
TDGwt	1224	1194	1137	742	826	800	813	787	710	3753	2780	3885	4023	3893	3774	5740	5757	5797	5677	5454

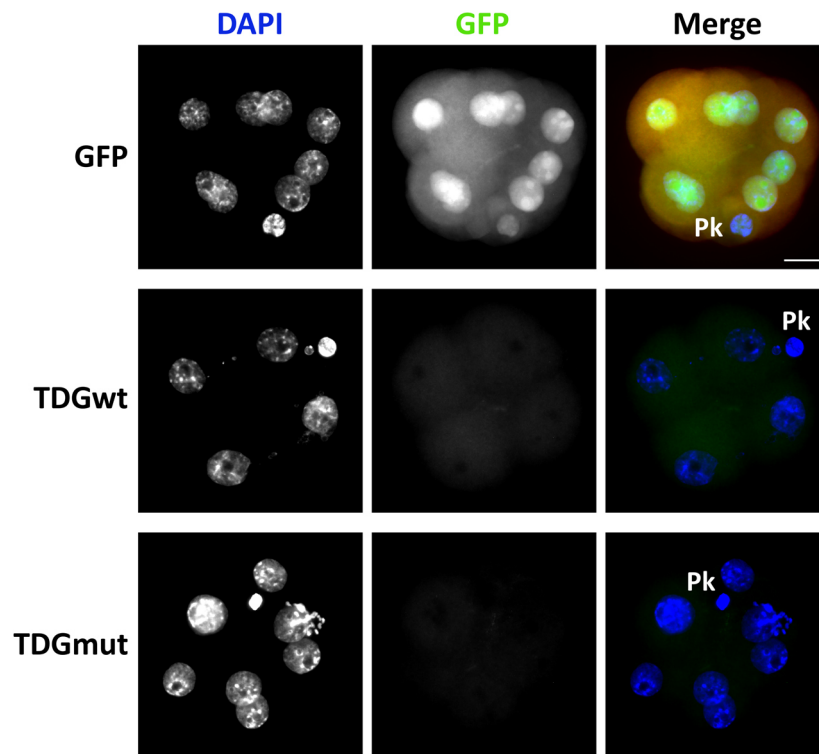


Abbildung 8.28 Nachweis des Abbaus der überrepräsentierten Proteine anhand des GFP- Signals. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 8- Zellembryonen (52hpf), welche zygotisch GFP oder TDGmut überexprimierten, für TDGwt konnten nur 4-Zellembryonen analysiert werden, da sie in ihrer Entwicklung eingeschränkt sind. Zygoten (IVF) wurde die jeweilige mRNA injiziert. Die Embryonen wurden dann bis zum Zeitpunkt der Fixierung inkubiert. Dann wurden die Embryonen mit DAPI gefärbt. Für Embryonen, in denen GFP überexprimiert wurde, ist ein deutliches GFP- Signal, sowohl im Cytoplasma als auch in den Kernen erkennbar. In den Embryonen, in welchen TDGwt oder TDGmut überexprimiert wurde, ist bei gleicher Belichtungszeit eine leichte Autofluoreszenz im Cytoplasma zu erkennen, wohingegen die Kerne selbst frei von jedem GFP- Signal sind. Somit konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Analyse von 8- Zellembryonen kein überexprimiertes Fusionsprotein mehr vorhanden ist. PK= Polkörper, Maßstabsbalken= 20µM.

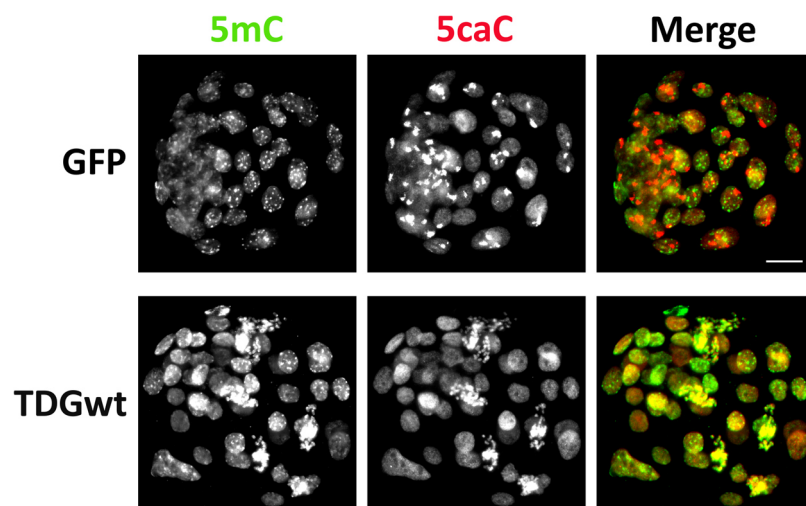


Abbildung 8.27 Immunfluoreszenz- Analysen der 5caC- Level in Blastozysten, welche TDGwt überexprimierten.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Blastozysten, in welchen GFP oder TDGwt zygotisch überrepräsentiert wurden. Dazu wurden Zygoten (IVF) 3hpf mit der entsprechenden mRNA injiziert. Die Embryonen wurden inkubiert und zum Zeitpunkt E4.0 fixiert. Dann wurden sie mittels 5mC- und 5caC- Antikörpern gefärbt. Zu erkennen ist, dass das flächige 5caC- Signal nach der TDGwt Überexpression dem der Kontrolle ähnelt. Allerdings fehlen die in der Kontrolle deutlich erkennbaren 5caC- Foci. (IF- Analysen von 5fC in Abbildung 3.21) Maßstabsbalken= 20µM.

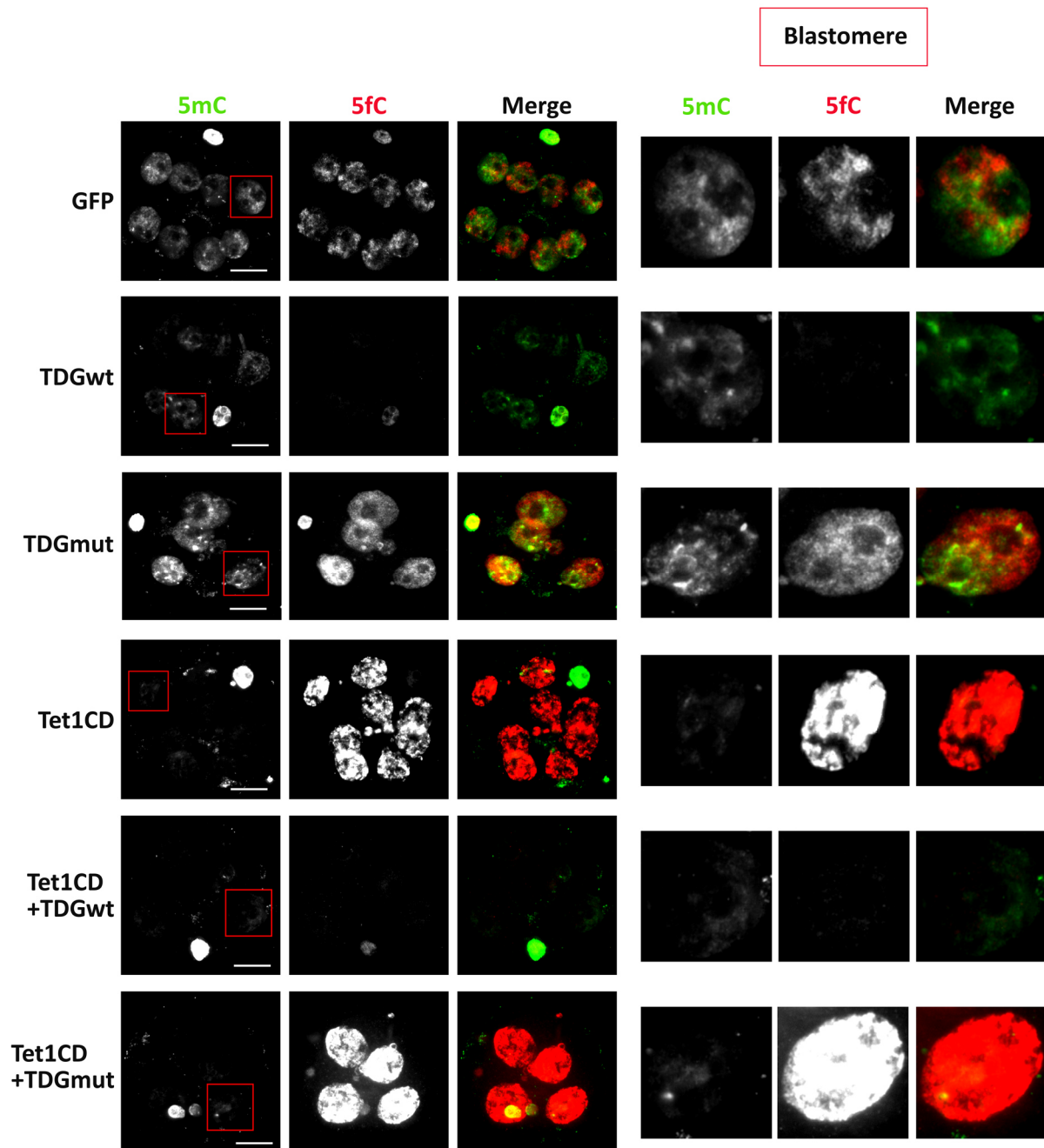


Abbildung 8.29 5mC und 5fC- Muster im 4-/8- Zellembryo nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 8- Zelle bzw 4-Zellembryonen nach der Überexpression verschiedener Enzyme. Dazu wurde in Zygoten (IVF) die entsprechende mRNA injiziert und 52h inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen mittels Antikörper gegen 5mC und 5fC gefärbt. Im rechten Teil der Abbildung sind einzelne Blastomere vergrößert dargestellt, um die Muster der Modifikationen besser erkennen zu können. Es ist zu erkennen, dass 5mC und 5fC in den Blastomeren der Kontrolle räumlich definierte Bereiche einnehmen und nicht überlappen. Nach der zygotischen Überexpression von TDGwt ist auch im 8- Zellembryo eine starke Reduktion des 5fC- Signals erkennbar. Das 5mC- Signal ist etwas reduziert. Die Überexpression von TDGmut führt auch zu einem milden Verlust des 5mC- Signal, aber zu einer Akkumulation von 5fC in definierten Bereichen. Die Überexpression von TET1CD führt zu einem starken Anstieg des 5fC- Signals. Es wirkt, als ob hier definierte 5fC- Bereiche existieren. Demnach scheinen die vorbestimmten 5fC- Regionen durch die Überexpression einer noch stärkeren Oxidation ausgesetzt zu sein. Die Überexpression von TET1CD+ TDGwt führt zu einem fast kompletten Signalverlust von 5mC und 5fC. Embryonen, die zygotisch TET1CD+ TDGmut überexprimierten, verlieren fast das komplette 5mC- Signal und gewinnen stark an 5fC- Signal hinzu. Maßstabsbalken= 20µM

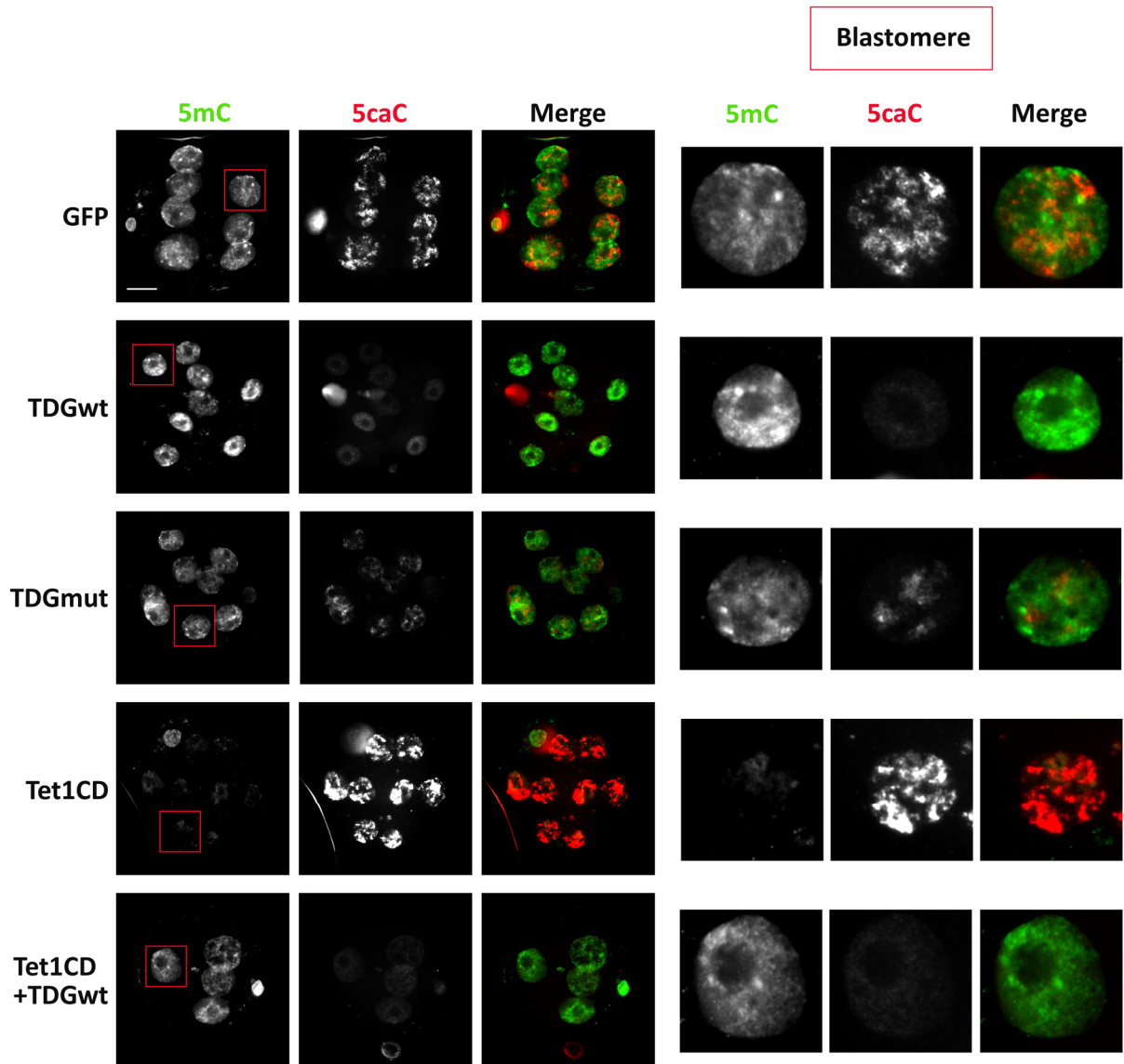


Abbildung 8.30 5mC- und 5caC- Muster im 4-/8- Zellembryo nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, Tet1CD oder Tet1CD+ TDGwt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 8- Zelle bzw 4- Zellembryonen nach der Überexpression verschiedener Enzyme. Dazu wurden Zygoten (IVF) mit der entsprechenden mRNA injiziert und 52h inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen mittels Antikörper gegen 5mC und 5caC gefärbt. Im rechten Teil der Abbildung sind einzelne Blastomere vergrößert dargestellt, um die Muster der Modifikationen besser erkennen zu können. Es ist zu erkennen, dass 5mC und 5caC in den Blastomeren der Kontrolle räumlich definierte Bereiche einnehmen und nicht überlappen. Nach der zygotischen Überexpression von TDGwt ist auch im 8- Zellembryo eine starke Reduktion des 5caC- Signals erkennbar. Das 5mC- Signal ändert sich kaum. Gleiches gilt für TDGmut. Die Überexpression von TET1CD führt zu einem starken Anstieg des 5caC- Signals. Es wirkt, als ob auch hier definierte 5caC- Bereiche existieren. Demnach scheinen die vorbestimmten 5caC- Regionen durch die Überexpression einer noch stärkeren Oxidation ausgesetzt zu sein. Die Überexpression von TET1CD+ TDGwt führt zu einem Signalverlust von 5caC. Der Verlust von 5mC fällt mild aus. Maßstabsbalken= 20µM

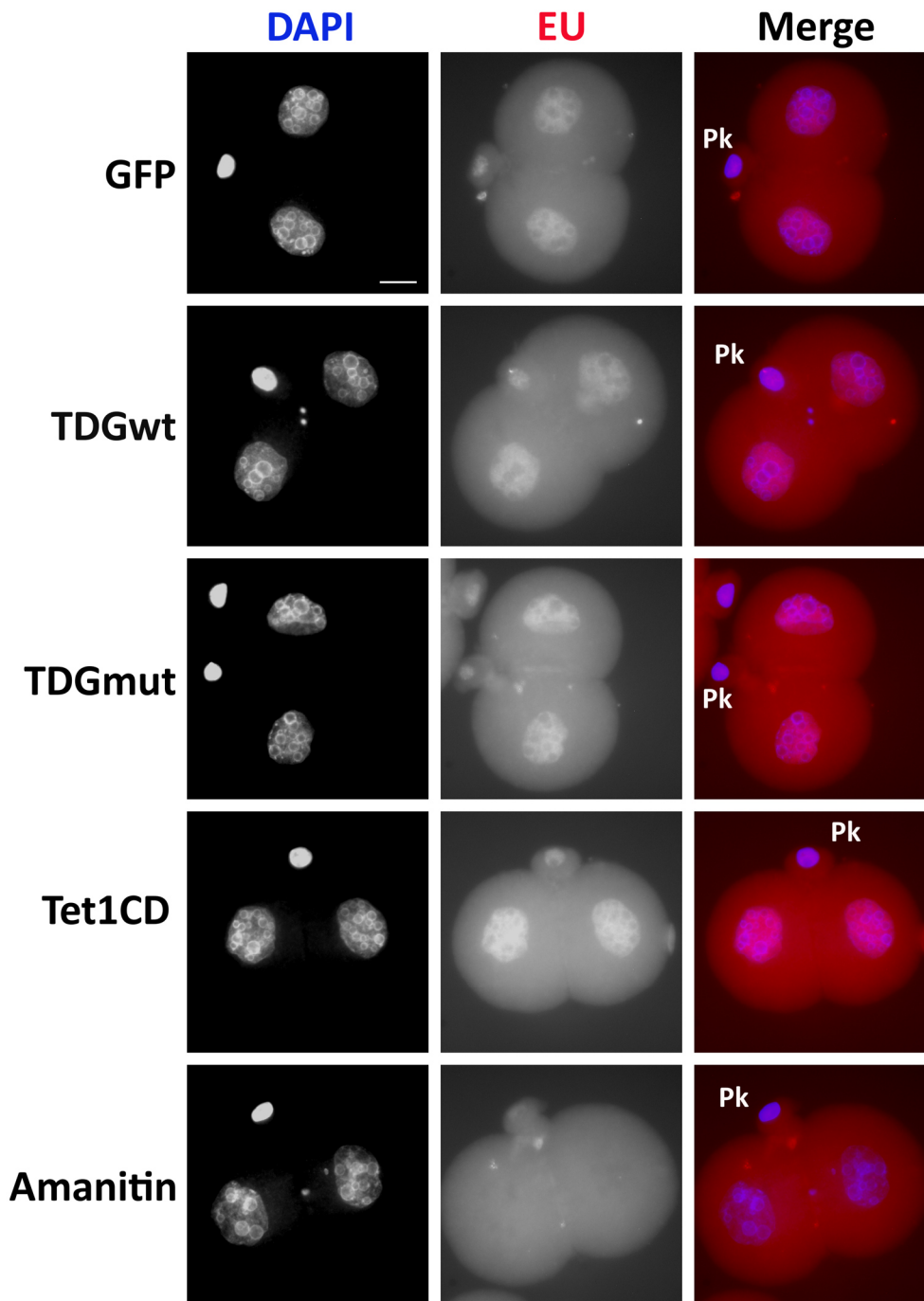


Abbildung 8.31 Analyse der Expression mittels EU- Inkorporation in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut oder Tet1CD überexprimieren. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Analyse der Expression mit Hilfe der Inkorporation von EU in neu synthetisierte RNA. Dazu wurde in Zygoten (IVF) 3hpf die entsprechende mRNA injiziert. Die Embryonen wurden für 29h inkubiert, dann wurde die Zona pellucida entfernt und die Embryonen mit 2,5mM EU für 1,5h weiter inkubiert. Nach der Fixierung wurde der EU- Einbau mittels einer click- it- Reaktion detektierbar gemacht. Die Fluoreszenz- Aufnahmen zeigen, dass die Expression in den 2- Zellembryonen, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren, leicht erhöht ist gegenüber der Kontrolle. Die Embryonen, in welchen Tet1CD überexprimiert wurde, zeigen eine deutlich erhöhte RNA- Expression. Als Kontrolle, dass EU auch wirklich und ausschließlich in die neu synthetisierte RNA eingebaut wurde, wurde eine Gruppe von Embryonen ab 5hpf mit dem RNA- Polymerase II- Hemmer α - Amanitin (24ng/ μ l) inkubiert. In diesen Embryonen ist nur Hintergrund- Signal, aber kein Signal am Ort der Neusynthese (Nukleus) zu erkennen. Maßstabsbalken= 20 μ M

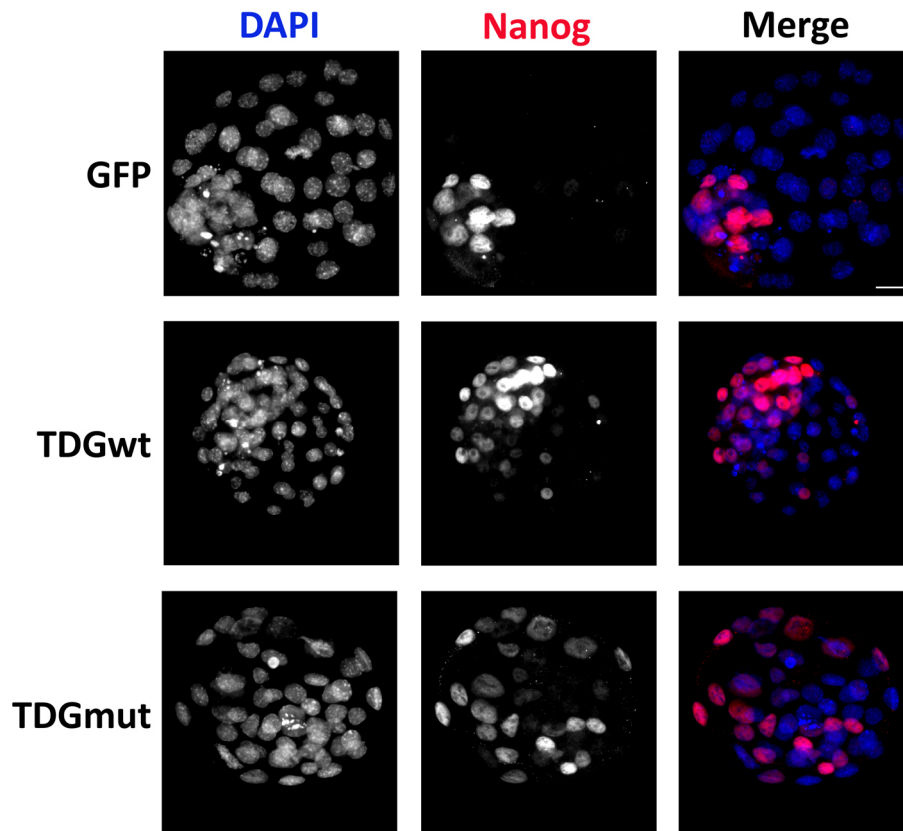


Abbildung 8.32 Nanog in Blastozysten, welche zygotisch TDGwt oder TDGmut überexprimierten. Dargestellt sind exemplarisch Aufnahmen von Blastozysten, welche zygotisch TDGwt oder TDGmut überexprimierten. In Zygoten (IVF) wurde die jeweilige mRNA injiziert und die Embryonen bis E4.0 inkubiert. Dann wurden sie für 30min bei RT fixiert. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht. Zu sehen ist, dass in den Kontroll- Embryonen ca. 10 Zellen NANOG- positiv sind. Diese Anzahl ist normal, und diese Zellen stellen die innere Zellmasse dar. In den Embryonen, die zygotisch TDGwt überexprimierten, zeigen vergleichsweise viele, nämlich 23-27 Zellen ein NANOG- Signal. Dieses ist in acht der Zellen vergleichsweise stark. Die Nanog- exprimierenden Zellen akkumulieren und definieren auch hier eine Art ICM. Die Blastozysten, die zygotisch TDGmut überexprimierten, zeigen eine diffuse Expression von NANOG. Dabei exprimieren viele Zellen NANOG auf einem niedrigen Level, einige auf einem etwas Höheren. Sie sind anderes als bei GFP oder TDGwt in der gesamten Blastozyste verteilt. Maßstabsbalken= 20µM

Tabelle 8.27 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren.

Experiment Nr	Modifikation	Antikörper & Pronukleus	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanzen (Ttest)
Exp1	5mC	GFP-mat	89,8	15,4	
		GFP- pat	27,8	4,1	
		TDGwt- mat	96,8	16,3	0,45
		TDGwt- pat	20,8	2,6	0,014
		TDGmut-mat	75,9	12,4	0,153
		TDGmut-pat	16,6	2,1	0,0016
	5hmC	GFP-mat	40,9	7,6	
		GFP- pat	125,6	10,4	
		TDGwt- mat	40,5	7,3	0,91
		TDGwt- pat	119,3	27,5	0,53
		TDGmut-mat	33,8	7,6	0,19
		TDGmut-pat	137,2	2,1	0,065
Exp2	5hmC	GFP-mat	47,5	16,4	
		GFP- pat	149,3	6,4	
		TDGwt- mat	49,8	8,8	0,79
		TDGwt- pat	150,3	17,1	0,91
		TDGmut-mat	52,0	5,9	0,59
		TDGmut-pat	149,4	6,2	0,98
Exp3	5hmC	GFP-mat	44,0	3,1	
		GFP- pat	146,8	5,1	
		TDGwt- mat	51,4	5,5	0,12
		TDGwt- pat	149,5	5,4	0,46
		TDGmut-mat	44,0	5,3	0,99
		TDGmut-pat	142,7	11,6	0,55
Exp1	5mC	GFP-mat	71,0	9,3	
		GFP- pat	13,5	1,9	
		TDGwt- mat	106,5	13,0	0,0039
		TDGwt- pat	12,9	3,6	0,78
		TDGmut-mat	98,4	12,4	0,021
		TDGmut-pat	18,2	4,9	0,16
	5fC	GFP-mat	29,0	8,9	
		GFP- pat	82,9	3,2	
		TDGwt- mat	30,1	1,4	0,89
		TDGwt- pat	9,6	3,8	9,32E-07
		TDGmut-mat	57,4	10,2	0,059
		TDGmut-pat	166,1	5,6	1,82E-07
Exp2	5mC	GFP-mat	13,9	5,1	
		GFP- pat	68,6	12,9	
		TDGwt- mat	9,8	5,4	0,97
		TDGwt- pat	7,5	1,0	0,012
		TDGmut-mat	25,5	8,6	0,072
		TDGmut-pat	98,6	1,9	0,062
	GFP-mat	31,1	4,7		

		GFP- pat	11,5	3,6		
		TDGwt- mat	29,8	7,0	0,92	
	5fC	TDGwt- pat	7,2	3,2	0,19	
		TDGmut-mat	32,7	7,3	0,45	
		TDGmut-pat	10,6	3,2	0,40	
Exp3	5mC	GFP-mat	17,7	1,3		
		GFP- pat	6,1	1,7		
		TDGwt- mat	29,9	1,5	0,019	
		TDGwt- pat	14,7	1,3	0,02	
	5fC	GFP-mat	15,4	8,0		
		GFP- pat	67,2	6,3		
		TDGwt- mat	12,0	4,3	0,31	
		TDGwt- pat	3,6	1,9	3,19E-05	
		TDGmut-mat	24,1	3,8	0,034	
		TDGmut-pat	109,1	0,2	0,0002	
Exp1	5mC	GFP-mat	129,3	13,0		
		GFP- pat	28,3	3,7		
		TDGwt- mat	112,4	20,7	0,047	
		TDGwt- pat	24,3	2,9	0,0079	
		TDGmut-mat	112,4	20,7	0,047	
		TDGmut-pat	24,3	2,9	0,0079	
	5caC	GFP-mat	26,1	5,8		
		GFP- pat	74,3	74,3		
		TDGwt- mat	24,8	4,6	0,34	
		TDGwt- pat	12,1	3,8	2,50E-09	
		TDGmut-mat	24,8	4,6	0,340	
		TDGmut-pat	12,1	3,8	2,50E-09	
		5mC	GFP-mat	117,5	8,4	
			GFP- pat	26,1	4,8	
TDGwt- mat	91,1		10,8	5,36E-07		
TDGwt- pat	12,7		3,6	1,36E-08		
TDGmut-mat	102,7		15,0	0,008		
TDGmut-pat	16,9		4,6	0,0001		
Exp2	5caC	GFP-mat	32,9	4,2		
		GFP- pat	100,6	25,7		
		TDGwt- mat	33,2	4,2	0,960	
		TDGwt- pat	16,6	3,1	4,6E-08	
		TDGmut-mat	30,7	4,6	0,19	
		TDGmut-pat	30,7	6,4	2,42E-07	
	Exp3	5mC	GFP- pat	18,2	3,1	
TDGwt- pat			15,5	3,8	0,12	
TDGmut-pat			14,3	3,6	0,035	
5caC		GFP- pat	81,6	6,1		
		TDGwt- pat	18,3	4,4	1,15E-17	
		TDGmut-pat	39,1	5,4	3,11E-07	

Tabelle 8.28 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2-Zellembryonen, die zygotisch TDGwt, TDGmut, TET1CD oder Kombinationen überexprimieren.

Modifikation	Experiment	Antikörper & Modifikation	Mittelwert	Standardabweichung	T-test
5hmC & 5mC	Exp1	GFP- 5hmC	85,9	5,7	
		GFP- 5mC	97,3	13,8	
		TDGmut-5hmC	79,0	17,5	0,506
		TDGmut-5mC	60,7	17,4	0,018
		TET1CD- 5hmC	192,8	6,8	0,000
	Exp2	GFP- 5hmC	122,5	13,8	
		GFP- 5mC	116,1	18,5	
		TDGwt- 5hmC	103,4	24,1	0,026
		TDGwt- 5mC	83,6	17,9	7,5358E-05
		TDGmut-5hmC	85,6	13,7	2,25E-05
		TDGmut-5mC	55,9	6,1	4,3451E-11
		TET1CD- 5hmC	183,8	15,9	2,9854E-05
		TET1CD- 5mC	58,5	6,4	1,4544E-10
		TDGwt+TET1CD- 5hmC	140,4	15,3	0,057
		TDGwt+TET1CD- 5mC	52,8	11,7	1,1587E-07
	TDGmut+TET1CD- 5hmC	189,6	23,1	1,2776E-06	
	TDGmut+TET1CD- 5mC	106,4	10,7	0,097	
	Exp3	GFP- 5hmC	104,2	5,7	
GFP- 5mC		108,2	12,6		
TDGwt- 5hmC		106,3	14,6	0,700	
TDGwt- 5mC		96,0	12,0	0,069	
TDGmut-5hmC		124,6	15,9	0,014	
TDGmut-5mC		88,8	8,3	0,006	
5fC & 5mC	Exp1	GFP- 5fC	62,8	9,9	
		GFP- 5mC	95,4	11,3	
		TET1CD- 5fC	95,3	11,6	0,022
	Exp2	GFP- 5fC	66,3	8,4	
		GFP- 5mC	70,7	9,1	
		TDGwt- 5fC	33,3	5,7	0,001
		TDGmut-5fC	117,7	3,4	0,0004
		TET1CD- 5fC	90,0	8,6	0,018
		TET1CD- 5mC	38,1	2,2	0,004
		TDGwt+TET1CD- 5fC	33,2	5,3	0,007
		TDGwt+TET1CD- 5mC	33,0	6,7	0,012
		TDGmut+TET1CD- 5fC	114,7	1,3	0,001
	TDGmut+TET1CD- 5mC	66,8	4,5	0,492	
	Exp3	GFP- 5fC	76,3	9,3	
		GFP- 5mC	93,1	15,4	
		TDGwt- 5fC	19,7	6,4	2,8284E-11
		TDGwt- 5mC	49,3	14,5	2,8498E-05
		TDGmut-5fC	95,9	7,5	2,2743E-05
Exp4	GFP- 5fC	82,6	10,3		
	GFP- 5mC	59,2	7,6		
	TDGwt- 5fC	41,9	10,0	0,001	

		TDGwt- 5mC	60,7	10,5	0,812
		TDGmut-5fC	116,2	10,8	5,8216E-07
		TDGmut-5mC	53,3	5,8	0,055
5caC&5mC	Exp1	GFP- 5caC	91,2	11,3	
		GFP- 5mC	95,0	5,6	
		TDGmut-caC	24,8	9,6	0,001
		TDGmut-5mC	53,8	10,5	0,000
		TET1CD- 5mC	33,6	2,1	4,5005E-05
	Exp2	GFP- 5caC	95,2	16,4	
		GFP- 5mC	99,2	16,8	
		TDGwt- 5caC	24,9	6,8	3,6409E-05
		TDGwt-5mC	75,2	18,5	0,035
		TDGmut-caC	34,7	10,2	5,1228E-05
		TDGmut-5mC	59,5	8,3	0,000
		TDGmut+TET1CD-caC	100,3	18,6	0,615
	TDGmut+TET1CD-5mC	46,6	4,8	0,00010368	
	Exp3	GFP- 5caC	103,3	10,9	
		GFP- 5mC	95,0	10,1	
TDGwt- 5caC		18,1	4,5	1,0206E-12	
TDGwt-5mC		75,2	20,7	0,07	
TDGmut-caC		38,7	6,5	3,9467E-11	
TDGmut-5mC		88,8	9,9	0,23	
TET1CD-caC		162,7	15,6	9,1117E-07	
TET1CD- 5mC		11,4	7,5	4,835E-12	

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3' PUA	3' phospho α,β unsaturatet aldehyde
3'P	3'Phosphat (3'P)
5'P	5'Phosphat
5caC	5- Carboxylcytosin
5hmC	5- Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
AID	activation induced deaminase
AP	engl. apurinic/apyriminic
APE1	AP- Endonuklease
Aph	Aphidicolin
Apobec	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen Exzisionsreparatur, engl. Base excision repair
BER	Basenexzisionsreparatur
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
CD	engl. catalytical domain; katalytische Domäne
CDS	engl. coding sequence, kodierende Sequenz
CGI	CpG Insel, engl. CpG island
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DKO	Doppel Knockout
DMR	differentiell methylierte Region, engl. differential methylated Region
DNMT	DNA- Methyltransferase
dRP	5'-Deoxyribosephosphat
DSB	Doppelstrangbruch
EdC	5-Ethynyl-Desoxycytidin
EdU	5-Ethynyl-Desoxyuridin

engl.	englisch
ESC	embryonic stem cell Embryonale Stammzelle
FEN-1	Flap Endonuklease-1
FL	engl. full length Volllängen
G	Guanin
h	engl. hour, Stunde
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HPBS	Hairpin- Bisulfit
hpf	engl. hours post fertilization; Stunden nach der Befruchtung
IAP	Intracisternal elements
ICM	engl. inner cell mass; innere Zellmasse
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IF	Immunfluoreszenz
iPSC	engl. induced pluripotent stem cell, induzierte pluripotente Stammzelle
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
KD	Knockdown
KO	Knockout
L	Liter
L1	Line1
LINE	long interspersed nuclear elements
LP	engl. long- patch
LTR	long terminal repeats
M	molar
mat	maternal
MBD	Methyl-binding domain; Methylbindedomäne
MCS	engl. multiple cloning site, multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMS	Methyl Methansulfonat
mRNA	messenger RNA
mSat	major Satellite
MuERVL	murines endogenous retrovirus- like
NER	Nukleotid Exzisions Reparatur
NLS	engl. nuclear localisation sequence, Kernlokalisationssequenz
nt	Nukleotide

pat	paternal
PGCs	engl. primordial germ cells; primordialien Keimzellen
Pk	Polkörper
PN	Pronukleus
PNK	Polynukleotid Kinase
Polβ	DNA- Polymerase β´
RRBS	engl. Reduced Represented Bisulfite Sequencing
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SBS	engl. sequencing by synthesis, SBS
SCNT	engl. somatic nuklear transfer; Somatischer Kerntransfer
scRNA	engl. single cell RNA, Einzelzell RNA
sec	engl. second, Sekunde
SINE	short interspersed nuclear elements
siRNA	small interfering
SNP	engl. single nucleotide polymorphism; Einzelnukleotid Polymorphismus
SP	engl. short patch
T	Thymin
TDG	Thymin DNA Glykosylase
TE	transposables Element
TET	Ten- Eleven translocation
TKO	Trippel Knockout
TSS	engl. transcriptional start site, Transkriptionelle Startstelle
U	Unit
ÜE	Überexpression
üe	überexprimiert
ÜN	über Nacht
WGBS	engl. Whole- Genome Bisulfite Sequencing, genomweite Bisulfitsequenzierung

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Die Struktur der DNA (Chromatinstruktur).	1
Abbildung 1.2 Modell der Epigenetik nach Waddington	3
Abbildung 1.3 Funktionen der Methyltransferasen.	6
Abbildung 1.4 Aufbau der drei TET Proteine.	8
Abbildung 1.5 Die stufenweise Oxidation von 5hmC, 5fC und 5caC durch die TET Proteine.	8
Abbildung 1.6 Reaktionsmechanismus der katalytischen Domäne der TET Enzyme	9
Abbildung 1.7 Mechanismen der passiven und aktiven Demethylierung.	15
Abbildung 1.8 5- Methylcytosin und seine möglichen Angriffspunkte der aktiven Demethylierung.	16
Abbildung 1.9 Basen Exzisions Reparatur (BER).	17
Abbildung 1.10 Die Dynamik der DNA- Modifikationen im Lebenszyklus der Maus.	26
Abbildung 2.1 Der schematische, zeitliche Ablauf der Experimente.	41
Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der verwendeten Plasmid- Konstrukte.	42
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Mutagenese- PCR.	44
Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente mit Embryonen.	46
Abbildung 2.5 Aufnahmen während mRNA Mikroinjektion und ICSI.	48
Abbildung 3.1 Verteilung der TET- eGFP- Fusionsproteine in der Zygote 12hpf.	59
Abbildung 3.2 Der Einfluss der Überexpression von TET3FL und TET1FL auf die epigenetischen Modifikationen in der postreplikativen Zygote.	63
Abbildung 3.3 Der Einfluss der Überexpression von TET3CD und TET1CD auf die epigenetischen Modifikationen in der postreplikativen Zygote.	64
Abbildung 3.4 γ H2A.X Signale in der postreplikativen Mauszygote.	67
Abbildung 3.5 Der Einfluss der Überexpression von TET3FL und TET1FL auf die epigenetischen Modifikationen im 2-Zellembryo.	69
Abbildung 3.6 Der Effekt der Überexpression von TET3CD und TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC im 2- Zellembryo.	70
Abbildung 3.7 5mC- und 5hmC- Signale in Blastozysten, welche zygotisch TET Varianten überexprimieren.	72
Abbildung 3.8 Schematische Darstellung des Ablaufs der Hairpin- Bisulfitbehandlung.	74
Abbildung 3.9 Zum Sequenzieren sortierte Zygoten, welche TET3FL überexprimieren.	75
Abbildung 3.10 DNA- Methylierung von mSat in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren.	76
Abbildung 3.11 DNA- Methylierung von L1 in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren.	78
Abbildung 3.12 DNA- Methylierung von IAP in Zygoten, welche TET3FL und TET1FL überexprimieren.	79

Abbildung 3.13 DNA- Methylierung von mSat in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren.	81
Abbildung 3.14 DNA- Methylierung von L1 in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren.	82
Abbildung 3.15 DNA- Methylierung von IAP in Zygoten, welche TET3CD und TET1CD überexprimieren.	83
Abbildung 3.16 Anteil der mosaikal bzw. kontinuierlich methylierten Sequenzen in IAPs relativ zur Kontrolle.	84
Abbildung 3.17 DNA- Methylierung von mSat und IAP in Zygoten, welche TET1CD überexprimieren und mit Aphidicolin behandelt wurden.	86
Abbildung 3.18 Der Einfluss der Überexpression von TDGwt und TDGmut auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in der Zygote.	90
Abbildung 3.19 γ H2A.X Zygoten, die TDG überexprimieren.	91
Abbildung 3.20 Der Effekt der Überexpression von TDGwt, TDGmut, TET1CD, TDGwt+TET1CD und TDGmut+TET1CD auf 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC im 2- Zellembryo.	94
Abbildung 3.21 5fC in der Blastozyste nach der zygotischen Überexpression von TDGwt, TDGmut oder TET1CD.	95
Abbildung 3.22 Expressionsanalyse von neu synthetisierter Gesamt- RNA in 2- Zellembryonen, die zygotische TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimieren.	97
Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Detektion der verschiedenen Modifikationen nach der Behandlung mittels Bisulfit- Sequenzierung oder MAB- Sequenzierung	98
Abbildung 3.24 MA-HPBS- Sequenzierungsanalyse von mSat, L1 und IAP in postreplikativen Zygoten, die TDGwt überexprimieren.	100
Abbildung 4.1 Die Präferenzen von TETCD in der prä- und postreplikativen Zygote.	106
Abbildung 4.2 Schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit generierten Daten und Theorien, basierend auf der Überexpression von TET Varianten in der Zygote.	128
Abbildung 4.3 mSat - Schematische Zusammenfassung aller generierten HPBS- Daten dieser Arbeit	139
Abbildung 4.4 L1 und IAP- Schematische Zusammenfassung aller generierten HPBS- Daten dieser Arbeit.	140
Abbildung 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Überexpression von TDG und TET1CD.	154
Abbildung 8.1 Die Morphologie von Zygote, 2- Zell-, 4-Zellembryo und Blastozyste.	175
Abbildung 8.2 Abnormale Pronuklei- Formation in sich nicht teilenden Zygoten (24hpf), welche TET1CD überexprimieren.	176
Abbildung 8.3 Kontrolle der gesamten Replikation der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren.	176
Abbildung 8.4 5mC-, 5hmC- und 5caC- in präreplikativen Zygoten, welche TET1CD überexprimieren.	177

Abbildung 8.5 Kontrolle des Beginns der Replikation der Zygoten, welche TET1CD überexprimieren.	177
Abbildung 8.6 5hmC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden.	178
Abbildung 8.7 5fC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden.	179
Abbildung 8.8 5caC- und 5mC- Level in Zygoten, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurden.	180
Abbildung 8.9 PGC7/Stella in Zygoten, in welchen Tet1CD überexprimiert wurde.	182
Abbildung 8.10 γ H2A.X in präreplikativen Zygoten, welche Tet1CD überexprimieren.	182
Abbildung 8.11 5hmC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde.	183
Abbildung 8.12 5caC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde.	184
Abbildung 8.13 5fC- und 5mC- Level in 2-Zellembryonen, in welchen Tet3FL, Tet1FL, Tet3CD oder Tet1CD überexprimiert wurde.	184
Abbildung 8.14 EdU/EdC Inkorporation nach dem Blocken der Replikation mit Aphidicolin.	189
Abbildung 8.15 5hmC und 5mC in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren.	195
Abbildung 8.16 5caC und 5mC in Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren.	195
Abbildung 8.17 5fC und 5mC in Zygoten, die mit TDGwt oder TDGmut überexprimieren.	195
Abbildung 8.18 Kontrolle der Replikation der Zygoten, welche TDGwt oder TDGmut überexprimieren.	196
Abbildung 8.19 5hmC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen,welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren.	197
Abbildung 8.20 5fC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren.	198
Abbildung 8.21 5caC- und 5mC- Level in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut überexprimieren.	199
Abbildung 8.22 γ H2A.X- Signale in präreplikativen Zygoten, in welchen TDGwt oder TDGmut überrepräsentiert wurde.	201
Abbildung 8.23 γ H2A.X- Signale in Embryonen, welche mit TDGwt oder Tet1CD überexprimieren zum Zeitpunkt 28hpf.	201
Abbildung 8.24 5caC- Signale nach der Überexpression von Tet1CD in Embryonen 24hpf.	202
Abbildung 8.25 H3K27me3- Level und seine Lokalisation an perizentromerischen Ringen in Zygoten, welche TDGwt, TDGmut und Tet1CD überexprimieren.	203
Abbildung 8.26 MA-HPBS- Sequenzierungsanalyse von mSat, L1 und IAP in postreplikativen Zygoten, die TDGwt überexprimieren (laborinternes Bisulfit- Protokoll).	204

Abbildung 8.27 Immunfluoreszenz- Analysen der 5caC- Level in Blastozysten, welche TDGwt überexprimierten. _____	207
Abbildung 8.28 Nachweis des Abbaus der überrepräsentierten Proteine anhand des GFP- Signals. _____	207
Abbildung 8.29 5mC und 5caC- Muster im 4-/8- Zellembryo nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, Tet1CD, Tet1CD+ TDGwt oder Tet1CD+ TDGmut. _____	208
Abbildung 8.30 5mC- und 5caC- Muster im 4-/8- Zellembryo nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, Tet1CD oder Tet1CD+ TDGwt. _____	209
Abbildung 8.31 Analyse der Expression mittels EU- Inkorporation in 2- Zellembryonen, welche TDGwt, TDGmut oder Tet1CD überexprimieren. _____	210
Abbildung 8.32 Nanog in Blastozysten, welche zygotisch TDGwt oder TDGmut überexprimierten. _____	211

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Histonmodifikation und ihre Funktion nach Kouzarides 2007	7
Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper	33
Tabelle 2.2 Oligonukleotide zum Klonieren	38
Tabelle 2.3 Verwendete Oligonukleotide für die (MAB-) Hairpin- Bisulfitsequenzierung.	39
Tabelle 2.4 Verwendete Linkeroligonukleotide der (MAB-) Hairpin- Bisulfitsequenzierung.	39
Tabelle 2.5 Endonukleasen für die Restriktion der verschiedenen repetitiven Elemente bei der Hairpin- Bisulfitbehandlung	54
Tabelle 3.1 Das Entwicklungspotenzial von Embryonen, die eine der TET Varianten überexprimieren.	61
Tabelle 3.2 Effekt der Überexpression der TET Varianten auf H3K9me2 in postreplikativen Zygoten.	66
Tabelle 3.3 Die zur Analyse der DNA- Methylierung ausgewählten repetitiven Elemente.	74
Tabelle 3.4 Entwicklungspotenzial von TDGwt, TDGmut und TET1CD überexprimierten Embryonen.	89
Tabelle 3.5 Analyse von Histonmodifikationen in Zygoten nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD.	92
Tabelle 3.6 Die nach der Bisulfitbehandlung noch in der DNA vorhandenen Modifikationen in %.	99
Tabelle 8.1 Anzahl der auf ihr Entwicklungspotenzial analysierten Embryonen, in welchen TET3FL, TET1FL, TET3CD oder TET1CD überexprimiert wurde – 2-Zellembryonen und Blastozysten.	175
Tabelle 8.2 Anzahl der Embryonen nach der Überexpression von TET Varianten im jeweiligen Stadium zum Zeitpunkt 24hpf oder 48hpf.	175
Tabelle 8.3 Anzahl der analysierten parentalen Pronuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen Zygoten, welche TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren.	181
Tabelle 8.4 Anzahl der analysierten Nuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen 2-Zellembryonen (29-31hpf), welche zygotisch TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren.	185
Tabelle 8.5 Referenzsequenzen der Hairpinbisulfitanalysen	186
Tabelle 8.6 Vergleich der HPBS- Daten der Kontrolle dieser Arbeit mit den Daten von Arand et al. 2015.	186
Tabelle 8.7 Informationen zu den Hairpinbisulfit- Analysen von Zygoten, in welchen TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überrepräsentiert wurde.	186
Tabelle 8.8 Informationen zur Hairpinbisulfitsequenzierung von Zygoten, in welchen TET1CD überrepräsentiert wurde und deren Replikation mittels Aphidicolin geblockt wurde.	187
Tabelle 8.9 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfit- Sequenzierungen von mSat in Zygoten.	187
Tabelle 8.10 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfit- Sequenzierungen von L1 in Zygoten	188

Tabelle 8.11 Prozentuale Werte der Methylierung und deren Standardabweichung der Experimente der Hairpinbisulfit- Sequenzierungen von L1 in Zygoten	188
Tabelle 8.12 Prozentuale Werte der Quantifizierung der Signale der Immunfluoreszenz- Analysen von Aphidicolin- behandelten Zygoten.	188
Tabelle 8.13 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die verschiedene TET Varianten überexprimieren.....	190
Tabelle 8.14 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2- Zellembryonen, die zygotisch verschiedene TET Varianten überexprimieren.....	193
Tabelle 8.15 Anzahl der befruchteten Oozyten, 2- Zellembryonen (24 hpf) und Blastozysten (E4.0) nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut und TET1CD.	194
Tabelle 8.16 Anzahl der befruchteten Oozyten und 2-/3-/4-/5-/6-/7-/8- Zellembryonen 48 Stunden nach der Überexpression von TDGwt, TDGmut, TET1CD, TET1CD+ TDGwt oder TET1CD+ TDGmut.	194
Tabelle 8.17 Informationen zur Anzahl der analysierten maternalen und paternalen Pronuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen Zygoten, welche TET3FL, TET1FL, TET3CD und TET1CD überexprimieren.....	196
Tabelle 8.18 Anzahl der analysierten Nuklei der Immunfluoreszenzanalyse von postreplikativen 2- Zellembryonen (29-31hpf), in welchen TDGwt, TDGmut, TET1CD, TET1CD+ TDGwt und TET1CD+ TDGmut überexprimiert wurde.....	200
Tabelle 8.19 Anzahl der auf die Veränderung bestimmter Histonmodifikationen analysierten Zygoten, in welchen TDGwt, TDGmut oder TET1CD überexprimiert wurde.	200
Tabelle 8.20 Methylierungswerte der Lambda- Kontroll- Amplikons, der Proben, die mittels des ZymoGold Kits behandelt wurden.....	202
Tabelle 8.21 Methylierungswerte der Lambda- Kontroll- Amplikons, der DNA, die mittels des laborinternen Bisulfit behandelt wurden.....	202
Tabelle 8.22 Informationen zur MA- Hairpinbisulfitsequenzierung von Zygoten, in welchen TDGwt überrepräsentiert wurden.	205
Tabelle 8.23 Informationen zur MA- Hairpinbisulfitsequenzierung von Zygoten, in welchen TDGwt überrepräsentiert wurden.	205
Tabelle 8.24 Veränderung der Methylierungslevel von postreplikativen Zygoten (12-14hpf) in welche TDGwt überexprimieren, im Vergleich zur GFP- Kontrolle.	206
Tabelle 8.25 Methylierungswerte der einzelnen CpG- Positionen und die daraus resultierenden mittleren Methylierungswerte von Zygoten, die TDGwt überexprimieren.....	206
Tabelle 8.26 Anzahl der Sequenzen der einzelnen CpG- Positionen.....	206

Tabelle 8.27 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in postreplikativen Zygoten, die TDGwt oder TDGmut überexprimieren.....	212
Tabelle 8.28 Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen der mittleren Grauwerte der Quantifizierungen der Antikörpersignale von 5mC, 5hmC, 5fC und 5caC in 2-Zellembryonen, die zygotisch TDGwt, TDGmut, TET1CD oder Kombinationen überexprimieren.....	214

12 Lebenslauf

Sarah Fuchs
Diplom- Biologin

Persönliche Daten

Name: Sarah Fuchs
Geburtsdatum: 15.04.1985
Geburtsort: Trier
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

1991 – 1995 Grundschole Aach-Newel
1995 – 2004 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium Trier,
Abschluss: Abitur

Studium

10.2005- 10.2010 Human- und Molekularbiologie,
Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Abschluss: Diplom
Diplomprüfungen und Diplomarbeit
Hauptfach: Genetik/Epigenetik
Nebenfächer: Virologie/Immunologie, Entwicklungsbiologie
Titel der Diplomarbeit: Generierung und Mikroinjektion von eGFP-
Fusionsproteinen zur Analyse des Mechanismus der aktiven
Demethylierung in der frühen Mauszygote

03.2011- 12.2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Genetik/Epigenetik,
Universität des Saarlandes

Publikationen/Buchkapitel

K. Lepikhov, J. Arand, **S. Fuchs**, J. Lan, M. Wossidlo and J. Walter
DNA Methylation Reprogramming in Preimplantation Development
in "Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming" (pp. 69-99). Epigenetics and Human Health
Meissner, Alexander, Walter, Jörn (Eds.) 2015, XVIII, 230 p. Springer Berlin Heidelberg 2015.

Posterpräsentationen

4th Cancer Research School, German-Israeli Molecular Genetics and Epigenetics of Cancer, Kibbutz Kfar Giladi / Israel, 2011, „Identification of components of the active demethylation mechanism in the early mouse zygote“

2013 German-French DNA repair meeting on Epigenetics and Genome Integrity, Co- organized by SFTG, DGDR, GUM and IREBS, Illkirch, France, 2013, „Reprogramming in the early mouse development and the role of 5hmC/5caC and DNA repair“, **Erhalt des Poster Awards der DGDR 2013**

Chromatin and Epigenetics: From Omics to Single Cells (abcam), IGBMC Strasbourg, France, 2014, „The role of 5hmC and DNA repair in epigenetic reprogramming in the zygote“

SyBoSS 2015 Double Conference on Program of Early Mammalian Development and Systems Biology of Stem Cells, Oberstdorf, Germany, 2015, „The role of 5hmC and DNA repair in epigenetic reprogramming in the zygote“

2016 IMB Conference: Epigenetics in Development, Mainz, Germany, 2016 „The role of the epigenetic equilibrium in the preimplantation development“

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Saarbrücken, 2017