

Epigenetische Effekte der *in vitro*-Maturation von  
Eizellen auf DNA-Methylierungsprofile  
entwicklungsrelevanter Gene im Modellorganismus  
*Bos taurus*



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tamara Schneider geb. Hansmann

geboren in

München

Würzburg, März 2014



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



Die vorliegende Arbeit wurde von November 2008 bis April 2012 an den Instituten für Humangenetik der Universitäten Mainz und Würzburg unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf angefertigt.

### **Eidesstattliche Versicherung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Doktorarbeit selbständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung sowie ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich an Eides statt, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre hiermit, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden. Die Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Hochschule oder in einem anderen Prüfungsfach mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Am 29.10.2008 wurde mir von der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg der akademische Grad „Diplombiologin“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch versucht zu erwerben.

Würzburg, März 2014

---

Tamara Schneider

---

## DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Haaf für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und der Doktorandenstelle, sowie für die Betreuung und Hilfestellungen in den vergangenen fünf Jahren. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Georg Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch meinen Kollegen und Mitdoktoranden in Würzburg und Mainz danke ich für das angenehme und freundschaftliche Klima im Institut. Speziell danke ich Dr. Eberhard Schneider, Felix Mattern und Katharina Eirich für das Korrekturlesen meiner Dissertation und ihre Verbesserungsvorschläge, sowie Dr. Nady El Hajj für viele wissenschaftliche Diskussionen, Ratschläge und die aufbauenden Worte in schwierigen Laborzeiten.

Sehr verbunden bin ich Herrn Prof. Heiner Niemann, Dr. Julia Heinzmann und Dr. Mike Diederich des Friedrich-Löffler-Instituts in Mariensee für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt meiner Schwiegermama Romy Schneider für unzählige Stunden Kinderbetreuung, in welchen ich mich dem Erstellen der Arbeit widmen konnte.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken für all die Jahre Zuversicht und ihren Glauben an mich, ihre finanzielle Unterstützung in den Studienjahren, für die immer richtigen und aufbauenden Worte und Motivation.

Schließlich danke ich meinem Ehemann Christian Schneider für seine Geduld und sein Verständnis in der Zeit des Schreibens, für das Bekochen und das Rückenfreihalten, und besonders für seine Liebe und unsere Tochter Mila.

---

INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>10</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
1.1. Epigenetik .....	12
1.1.1. DNA-Methylierung .....	13
1.1.2. Genomische Prägung.....	15
1.1.2.1. Funktion geprägter Gene.....	16
1.1.2.2. Regulation geprägter Gene.....	18
1.1.3. Imprintingkrankungen .....	21
1.1.3.1. Der PWS/AS-Genlocus .....	21
1.1.3.2. Der SRS/BWS-Genlocus .....	23
1.1.4. Epigenetische Genomreprogrammierung.....	25
1.2. Assistierte Reproduktion .....	29
1.2.1. Assistierte Reproduktionstechniken beim Mensch .....	30
1.2.2. Assistierte Reproduktionstechniken beim Zuchttier.....	32
1.2.3. Assistierte Reproduktion und Inzidenzen von Geburtsdefekten .....	33
1.3. Oogenese und Oozytenmaturation.....	35
1.3.1. Allgemeine Oogenese und Follikulogenese .....	35
1.3.2. Oogenese und Follikulogenese beim Rind ( <i>Bos taurus</i> ).....	38
1.3.3. Oozytenmaturation .....	40
1.3.4. Oozyten-spezifische Faktoren .....	41
1.4. <i>In vitro</i> -Maturation von Eizellen.....	44
1.4.1. Chancen und Schwierigkeiten der IVM zur humanen Reproduktion.....	44
1.4.2. Stand der IVM bei Tiermodellen .....	46
1.4.3. IVM und Imprinting .....	47
1.5. Das Hausrind ( <i>Bos taurus</i> ) als Modellorganismus der humanen Reproduktion.....	47
1.6. Zielsetzung der Arbeit .....	49
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>52</b>
2.1. Biologisches Material .....	52
2.1.1. Präparation unreifer Eizellen aus Tertiärfollikeln .....	52
2.1.2. IVM boviner Eizellen.....	53
2.1.3. <i>In vivo</i> -Reifung boviner Eizellen .....	54
2.1.4. Eizellen aus hormonell stimulierten präpuberalen und adulten Spendertieren .	55
2.1.5. Parthenogenetische Rinderembryonen .....	56
2.1.6. Gewebeproben und Spermien .....	57
2.2. Puffer und Medien .....	57

---

2.3.	Kommerzielle Kits und Enzyme .....	60
2.4.	Isolation genomischer DNA .....	61
2.4.1.	Spermien.....	61
2.4.2.	Gewebe.....	61
2.5.	Polymerasekettenreaktion .....	62
2.6.	Natriumbisulfitbehandlung der DNA.....	62
2.6.1.	Eizellen und parthenogenetische Embryonen .....	64
2.6.2.	Spermien und Gewebe .....	65
2.7.	Methoden der Bisulfitsequenzierung.....	67
2.7.1.	Bisulfit-Pyrosequenzierung .....	67
2.7.2.	Klassische Bisulfitsequenzierung nach Klonierung.....	72
2.7.3.	Direkte Bisulfitsequenzierung .....	76
2.8.	Limiting Dilution .....	78
2.8.1.	Limiting Dilution mit Genset 1.....	80
2.8.2.	Limiting Dilution mit Genset 2.....	81
2.9.	Primersequenzen und PCR-Bedingungen.....	81
2.9.1.	DMR-Charakterisierung von <i>bIGF2/bH19</i> , <i>bSNRPN</i> und <i>bPEG3</i> .....	82
2.9.2.	Limiting Dilution mit Genset 1.....	84
2.9.3.	Limiting Dilution mit Genset 2.....	86
2.10.	Computerprogramme und Datenbanken.....	88
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>90</b>
3.1.	Charakterisierung der differenziell methylierten Regionen von drei geprägten Genen beim Rind .....	90
3.1.1.	Identifizierung und Charakterisierung der bovinen, intergenischen <i>IGF2/H19</i> -Imprintingkontrollregion .....	90
3.1.1.1.	<i>In silico</i> -Recherche zur Identifizierung einer Kandidatenregion beim Rind ...	90
3.1.1.2.	Elternspezifische Methylierung der bovinen <i>IGF2/H19</i> -ICR.....	95
3.1.2.	Quantitativer Nachweis der differenziellen Methylierung der geprägten Gene <i>IGF2/H19</i> , <i>SNRPN</i> und <i>PEG3</i> in unterschiedlichen bovinen Zelltypen.....	96
3.2.	Limiting Dilution und Methylierungsanalyse von bovinen Oozyten .....	97
3.2.1.	DNA-Methylierungsprofile der geprägten Gene in ungerreifen, <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> - gereiften adulten Rindereizellen .....	99
3.2.2.	DNA-Methylierungsprofile ungeprägter Gene in ungerreifen und <i>in vitro</i> - gereiften präpuberalen und adulten Rindereizellen.....	106
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>112</b>
4.1.	Identifizierung und Charakterisierung der bovinen, intergenischen <i>IGF2/H19</i> -Imprintingkontrollregion .....	114
4.1.1.	Lokalisation und Konservierung der bovinen <i>IGF2/H19</i> -ICR.....	114
4.1.2.	Differenzielle Methylierung der bovinen <i>IGF2/H19</i> -ICR .....	115

---



4.2.	Einfluss der IVM auf die DNA-Methylierung geprägter Gene .....	117
4.2.1.	Vergleich <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -gereifte Oozyten .....	118
4.2.2.	Einfluss der IVM-Medien mSOF und TCM auf bovine Oozyten .....	121
4.2.3.	Effekte des Kulturmediums in Embryo- und Follikelkultursystemen.....	123
4.2.4.	Geringes Epimutationsrisiko der IVM?.....	124
4.3.	Einfluss des Oozytenalters und der hormonellen Stimulation des Follikelwachstums auf die Epigenetik präpuberaler und adulter Kühe.....	126
4.3.1.	Einfluss des Alters auf die Promotormethylierung oozytenspezifischer Gene..	127
4.3.2.	Einfluss der ovariellen Stimulation auf die Promotormethylierung oozytenspezifischer Gene .....	130
4.3.3.	Epigenetische Risiken der ovariellen Stimulation und ihre Implikationen für die humane assistierte Reproduktion .....	132
4.4.	Die Bedeutung der zytoplasmatischen Reife für die Entwicklungskompetenz von Eizellen.....	133
4.5.	Effizienz der Limiting Dilution-Methode zum Studium von einzelnen Zellen.....	136
4.6.	Schlussfolgerung und Ausblick .....	138
<b>5.</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>140</b>
5.1.	Literaturverzeichnis.....	140
5.2.	Elektronische Quellen.....	163
<b>6.</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>164</b>
6.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	164
6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	167
6.3.	Tabellenverzeichnis .....	168
<b>7.</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>170</b>
<b>8.</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>172</b>
8.1.	Publikationen.....	172
8.2.	Kongressbeiträge.....	173

---

### ZUSAMMENFASSUNG

Assistierte Reproduktionstechniken (ARTs) zur Behandlung von Infertilität werden mit einer erhöhten Häufigkeit von epigenetischen Aberrationen während der Gametogenese und der frühen Embryonalentwicklung in Verbindung gebracht, speziell durch eine Beeinträchtigung von geprägten Genen. Die *in vitro*-Maturation (IVM) von Eizellen ist eine ART, die bereits routinemäßig zur Reproduktion von ökonomisch wertvollen Zuchttieren wie dem Hausrind (*Bos taurus*) eingesetzt wird. IVM-Oozyten weisen jedoch eine verringerte Entwicklungskompetenz zum Blastozystenstadium dar, welche möglicherweise auf eine beeinträchtigte epigenetische Regulation zurückzuführen ist.

Von allen bekannten epigenetischen Mechanismen ist die DNA-Methylierung die meist untersuchte DNA-Modifikation. In dieser Arbeit wurden zur Klärung der Frage nach den Auswirkungen der IVM auf die DNA-Methylierung geprägter als auch nicht geprägter Gene Oozyten des Hausrinds analysiert. Diese Tierart weist eine ähnliche Präimplantationsentwicklung und Tragezeit wie der Mensch auf und wird daher zunehmend als Modell zum Studium der humanen Keimzell- und Embryonalentwicklung herangezogen. Im Gegensatz zu Mensch und Maus gibt es bislang nur wenig Information über bovine geprägte Gene. Das erste Ziel der hier dargestellten Forschungsarbeiten war daher die Identifizierung und Charakterisierung der bovinen differenziell methylierten Regionen (DMRs) der drei geprägten Genorte von *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3*, welche mit Imprintingdefekten des Menschen und/oder im Mausmodell assoziiert werden. Die hier erstmalig erfolgte Beschreibung von mehreren intergenischen DMRs mittels Bisulfitsequenzierung und Pyrosequenzierung belegt die Existenz und evolutionäre Konservierung der *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion (ICR) beim Rind. Der geprägte Zustand der *IGF2/H19*-ICR sowie der bovinen Gene *SNRPN* und *PEG3* wurde durch den Nachweis differenzieller Methylierung in plazentalen und somatischen Geweben sowie in Spermien und parthenogenetischen Embryonen bestätigt. Die beobachteten Methylierungsprofile waren typisch für genomische Prägung.

Die direkte Bisulfitsequenzierung nach vorangegangener Limiting Dilution (LD) erlaubt die Analyse von Methylierungsmustern einzelner Allele (DNA-Moleküle) von einigen wenigen oder auch nur einer einzigen Zelle (El Hajj *et al.*, 2011). In einem ersten LD-Versuch an bovinen Oozyten wurden die drei vorab charakterisierten und geprägten Gene hinsichtlich möglicher epigenetischer Veränderungen untersucht, welche durch verschiedene IVM-Bedingungen und -Medien (TCM und mSOF) hervorgerufen werden könnten. Die Gesamtrate von Methylierungsfehlern einzelner CpG-Stellen sowie die von ganzen Allelen (Imprintingfehlern) unterschied sich nicht wesentlich zwischen den beiden IVM-Gruppen und der *in vivo*-Gruppe. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die gängigen IVM-Protokolle keinen oder nur einen geringfügigen Einfluss auf diese entscheidenden epigenetischen Markierungen haben.

IVM-Oozyten präpuberaler Kälber weisen eine herabgesetzte Entwicklungskompetenz im Vergleich zu IVM-Oozyten aus adulten Tieren auf. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten LD-Versuchsansatz die Promotormethylierung von drei entwicklungsrelevanten, nicht geprägten Genen (*SLC2A1*, *PRDX1*, *ZAR1*) nach ovarieller Stimulation mit FSH und/oder IGF1 untersucht. Sowohl ungeriffte als auch *in vitro*-geriffte Oozyten präpuberaler und adulter Kühe zeigten eine deutliche, unbeeinträchtigte Hypomethylierung der drei Genpromotoren ohne jegliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Alterstypen der Spendertiere oder

deren Behandlung. Weder das Alter, die hormonelle Stimulation noch die IVM scheinen somit einen Einfluss auf den Methylierungsstatus dieser drei Gene zu haben.

Zusammenfassend spiegelte sich die reduzierte Entwicklungsfähigkeit von IVM-Eizellen aus adulten und präpuberalen Kühen nicht in abnormalen Methylierungsmustern der untersuchten geprägten und ungeprägten Gene wider. Dies lässt auf eine generelle Stabilität der etablierten DNA-Methylierungsprofile in Oozyten schließen. Aus diesem Grund müssen andere epigenetische Mechanismen als die DNA-Methylierung wie beispielsweise ncRNAs oder Histonmodifikationen zur Reduktion der Entwicklungskompetenz von präpuberalen und IVM-Oozyten beitragen. Diese Veränderungen behindern mutmaßlich die zytoplasmatische Reifung der Eizelle, welche wiederum zu einer späteren Beeinträchtigung der Entwicklung der Zygote und des Embryos führt.

## SUMMARY

Infertility treatments by assisted reproductive technologies (ARTs) are associated with an increased incidence of epigenetic aberrations during gametogenesis and early embryogenesis, specifically in imprinted genes. *In vitro*-maturation (IVM) of oocytes is an ART which is routinely applied for reproduction of agriculturally and economically important species like cattle (*Bos taurus*). However, IVM oocytes exhibit a reduced developmental competence to the blastocyst stage which may be caused by an impaired epigenetic regulation.

Of all known epigenetic mechanisms DNA-methylation is the most studied DNA-modification. In this thesis, bovine oocytes have been analyzed in order to investigate the impact of IVM on the DNA-methylation of imprinted and non-imprinted genes. Because this species exhibits a similar preimplantation development and gestation length as humans, it is increasingly being used as a model for human germ-cell and embryo development. In contrast to humans and mice, only little information on bovine imprinted genes is available. Thus, the first attempt of the research presented here was to identify and characterize the bovine differentially methylated regions (DMRs) of the three imprinted loci, namely *IGF2/H19*, *SNRPN* and *PEG3* which are each associated with imprinting defects in humans and/or the mouse model. The first description of several intergenic DMRs by bisulfite sequencing and pyrosequencing proved the existence of an intergenic *IGF2/H19* imprinting control region (ICR) in the bovine. The imprinted status of the *IGF2/H19*-ICR as well as the bovine genes *SNRPN* and *PEG3* was confirmed by differential methylation consistent with genomic imprinting in placental and somatic bovine tissues, in sperm and parthenogenetic embryos.

Limiting Dilution (LD) Bisulfite Sequencing (El Hajj *et al.*, 2011) followed by direct bisulfite sequencing allows the analysis of methylation profiles of individual alleles (DNA molecules) from only a few or even single cells. In a first approach using LD, the three characterized imprinted regions were analyzed to determine putative epigenetic alterations in bovine oocytes cultured with different types of IVM conditions and media (TCM and mSOF). The total rate of individual CpG and entire allele methylation errors did not differ significantly between the two IVM and the *in vivo* group, indicating that current IVM protocols have no or only marginal effects on these critical epigenetic marks.

The developmental capacity of IVM oocytes from prepubertal calves is reduced compared with their IVM oocyte counterparts from adult animals. Therefore, in a second LD approach, the promoter methylation of three developmentally important, non-imprinted genes (*SLC2A1*, *PRDX1*, *ZAR1*) has been studied in IVM oocytes from prepubertal cattle after ovarian stimulation with FSH and/or IGF1. Both immature and *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes showed unimpaired hypomethylation of the three gene promoters without differences between the different ages of donors and treatments. Thus, neither age nor hormonal treatment or IVM seem to influence the methylation status of these three genes.

In conclusion, the reduced developmental capacity of IVM oocytes from adult and prepubertal cattle were not associated with aberrant methylation patterns of the investigated imprinted and non-imprinted genes suggesting a general stability of established DNA-methylation marks in oocytes. Therefore, epigenetic mechanisms other than DNA-methylation such as ncRNAs or histone modifications might confer to the reduced developmental competence of prepubertal and IVM oocytes. These factors are supposed to interfere with cytoplasmic maturation of the oocyte leading to an impaired development of the zygote and embryo rather than to influence nuclear maturation of the oocyte.



### 1. EINLEITUNG

#### 1.1. Epigenetik

Die Epigenetik (griech.: *epi* = über, oberhalb, auf) befasst sich mit all jenen biochemischen Änderungen, welche unabhängig von der DNA-Sequenz zu einer Modulation der Genexpression führen können. Das Epigenom fasst alle epigenetischen Mechanismen des Genoms zusammen. Epigenetische Veränderungen sind kovalente Modifikationen der DNA oder der Histonproteine (Smallwood und Kelsey, 2012), welche eine „zusätzliche Schicht von Information auf der DNA“ bilden und dadurch die physische Zugänglichkeit der DNA für transkriptionelle oder repressive Prozesse im Zellkern regulieren (Tomizawa *et al.*, 2012). Während in jeder Körperzelle die identische Erbinformation des diploiden Genoms vorhanden ist, dienen die verschiedenen epigenetischen Mechanismen der plastischen Kontrolle sowohl der räumlichen (zell- oder gewebespezifischen), zeitlichen (entwicklungsspezifischen) als auch der elternspezifischen Expression der Erbinformation (El Hajj und Haaf, 2013). Daher spielen sie eine wichtige Rolle bei der spezifischen Genexpression, insbesondere während der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung (Jaenisch und Bird, 2003). So sind in ausdifferenzierten Körperzellen nur ca. 5-10% der Gene zur Umsetzung der zell- und gewebespezifischen Aufgaben aktiviert, während der Großteil der Gene epigenetisch stillgelegt ist (El Hajj und Haaf, 2013). Epigenetische Modifikationen stellen außerdem Reaktionen auf Umwelteinflüsse dar, welche Rückschlüsse auf zurückliegende äußere Einflüsse zulassen (Dolinoy *et al.*, 2007). Vorhandene epigenetische Anpassungen können wiederum positiven oder negativen Einfluss auf die spätere Antwort auf erneute Umweltänderungen nehmen. Somit gibt das Epigenom nicht nur die zell- und gewebespezifischen Funktionen des Genoms vor, sondern fungiert auch als zelluläres Gedächtnis für seine Entwicklungsgeschichte und Reaktionen auf äußere Umwelteinflüsse (Tomizawa *et al.*, 2012).

Epigenetische Mechanismen sind meist biochemische Modifikationen der DNA, die zu einer mehr oder weniger dichten Chromatinpackung führen. Dies sind vor allem Histonmodifikationen durch Phosphorylierung, Methylierung oder Acetylierung sowie die DNA-Methylierung. Ebenso wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren, microRNAs oder Komplexen regulatorisch aktiver Proteine an die DNA zur Epigenetik gezählt. Schließlich handelt es sich auch bei *cis*- bzw. *trans*-regulatorischen Chromatininteraktionen, die in besonderer Weise zusammenwirken, um die Genexpression zu steuern, im weitesten Sinne

um epigenetische Prozesse (Meehan, 2003). All diese epigenetischen Veränderungen sind reversibel, können jedoch wie im Falle der DNA-Methylierung (s. Kap. 1.1.1) stabil an Tochterzellen sowie von generationsübergreifend weitergegeben werden (Hitchins *et al.*, 2011). Daher können vererbte epigenetische Veränderungen phänotypische Auswirkungen haben, obwohl keine Änderung der DNA-Sequenz stattgefunden hat. Eine fehlerhafte epigenetische Modifikation, die vom Normalzustand abweichende Auswirkungen hat, wird analog zum Begriff der Mutation in der Genetik als Epimutation bezeichnet. Da Epimutationen reversibel sind, stellen sie jedoch keine Mutationen im Sinne der Mendel'schen Genetik dar. Auch die Vererbung der bislang bekannten epigenetisch basierten Imprintingkrankungen folgt nicht der Mendel'schen Segregationslehre, sondern ist abhängig von dem Geschlecht des Elternteils, von welchem die Epimutation vererbt wird. Man spricht in diesen Fällen von elternspezifischer oder parentaler Vererbung, auf welche in Kap. 1.1.3 genauer eingegangen wird.

### **1.1.1. DNA-Methylierung**

Die DNA-Methylierung ist die wohl am besten untersuchte epigenetische Modifikation (Reik *et al.*, 2001). Sie ist eine vergleichsweise stabile Veränderung der DNA, die mit einer Umorganisation der Chromatinstruktur einhergeht und dadurch eine permanente Repression der Transkription vermittelt. Die methylierte DNA bildet dazu Komplexe mit verschiedenen Proteinen, welche Methylcytosinbindedomänen aufweisen. Diese Komplexierung bewirkt eine lokal dichtere Verpackung des Chromatins (Kondensierung), die wiederum zu einer Unzugänglichkeit für transkriptionelle Faktoren und Proteine führt (Jaenisch und Bird, 2003; Meehan, 2003). Aus diesem Grund wird eine niedrige DNA-Methylierung im Promotorbereich eines Gens mit aktiver Transkription desselbigen assoziiert (Neumann und Barlow, 1996), während die Promotormethylierung mit einer Repression der Transkription in Verbindung gebracht wird (Bird und Wolffe, 1999).

Mittels DNA-Methylierung können Zellen zum Einen die intrinsische Expression von Genen reprimieren, zum Anderen aber auch mobile extrinsische DNA-Elemente unschädlich machen wie beispielsweise virale DNA, Retrotransposons oder invasive Plasmide (Yoder *et al.*, 1997b; Bestor, 2000; Jaenisch und Bird, 2003). Spezielle Funktionen der DNA-Methylierung sind u.a. die X-Chromosom-Inaktivierung, genomisches Imprinting und die Stilllegung von Genen bei der Differenzierung von Zellen. Die Methylierung findet am Kohlenstoffatom 5 des Pyrimidinringes des Cytosins statt (5mC), dem in 3'-Richtung der

Basenabfolge zumeist ein Guanin folgt (Cytosin-phosphatidyl-Guanin oder CpG-Dinukleotid). Die Methylierung ist spiegelsymmetrisch auf beiden Strängen des DNA-Doppelstranges vorhanden. Die nach der DNA-Replikation bestehende asymmetrische „Hemimethylierung“ des DNA-Doppelstrangs wird durch enzymatischen Transfer einer Methylgruppe auf das Cytosin des neusynthetisierten Folgestranges vervollständigt. Der Transfer wird durch die Methyltransferase DNMT1 katalysiert, welche als Methyl donor das Substrat S-Adenosylmethionin (SAM) benutzt. Die *de novo*-Methyltransferasen der Dreiergruppe (DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L) sind hingegen nicht für die Aufrechterhaltung der Methylierung nach der Mitose verantwortlich, sondern sind für deren Neuetablierung auf unmethylierter DNA zuständig (vgl. Kapitel 1.1.4.; Meehan, 2003; Edwards und Ferguson-Smith, 2007).

Die Demethylierung der 5-Methylcytosine erfolgt meist passiv durch sukzessiven Verlust der Methylgruppe im Laufe mehrerer DNA-Replikationsrunden, seltener durch aktive enzymatische Modifikation und Eliminierung der Methylgruppe. Der Mechanismus der aktiven Demethylierung der Cytosine war lange Gegenstand kontroverser Diskussion (Wu und Zhang, 2010), wurde jedoch erst kürzlich identifiziert: TET-Proteine katalysieren die Hydroxylierung der 5-Methylcytosine zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), welche wiederum als Substrat für die Thymin-DNA-Glykosylase-vermittelte Basenexzisionsreparatur (BER) zu unmethyliertem Cytosin dient (zusammengefasst bei Kohli und Zhang, 2013).

Etwa 80% aller CpG-Dinukleotide im Genom sind methyliert (Antequera, 2003). Diese befinden sich fast ausschließlich in nicht kodierenden Regionen des Genoms, um beispielsweise die Aktivität von parasitierenden Retrotransposons zu unterdrücken (Yoder *et al.*, 1997b). CpGs kommen aufgrund der spontanen Deaminierung methylierter Cytosine im Genom statistisch deutlich seltener vor als alle anderen 15 Dinukleotide. Ihr Anteil im humanen Genom beträgt mit 1% nur etwa 20% der erwarteten Häufigkeit von ca. 5% (Sved und Bird, 1990). Im Promotorbereich von 60-70% aller Gene finden sich jedoch 0,2 bis 2 kb lange Abschnitte mit überdurchschnittlich hoher CpG-Dichte (>60% GC-Gehalt gegenüber ca. 40% GC im restlichen Genom). Diese Sequenzen werden als CpG-Inseln bezeichnet und weisen viele Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf. Die Promotor-CpG-Inseln sind normalerweise unmethyliert, wodurch die Transkription gewährleistet wird (zusammengefasst bei Antequera, 2003; Weber *et al.*, 2007). Die Methylierung der CpG-Inseln bei der Entstehung von Krankheiten oder in deren Verlauf geht mit der posttranslationalen Modifikation von Histonproteinen einher, welche zu einer lokal kondensierten, inaktiven Chromatinstruktur und damit zum Abschalten der *cis*-regulierten Gene führt.



### 1.1.2. Genomische Prägung

Die genomische Prägung (engl. *genomic imprinting*) ist eine epigenetische Modifikation der DNA zur Regulation von Genen, welche essentiell für die Entwicklung des Fetus und der Plazenta ist (Miozzo und Simoni, 2002; Reik *et al.*, 2003). Sie kommt fast ausschließlich bei höheren Säugetieren (Eutheria) vor, aber auch bei Blütenpflanzen und einigen Insektenarten (Sha, 2008). Ein prominenter Mechanismus der genomischen Prägung ist die DNA-Methylierung dieser Gene, die in einer spezifischen Abschaltung eines der beiden elterlichen (parentalen) Allele resultiert (Reik und Walter, 2001; Kelsey, 2007; Ideraabdullah *et al.*, 2008; Tomizawa und Sasaki, 2012). Die monoallelische Unterdrückung ist streng abhängig von der elterlichen Herkunft, so dass ein Teil der geprägten Gene stets auf dem mütterlichen (maternalen), der andere Teil stets auf dem väterlichen (paternalen) Chromosom geprägt ist (Kelsey, 2007). Die präferenzielle bzw. meist alleinige Expression erfolgt immer vom nicht geprägten Allel. Aufgrund der allelspezifischen Methylierung bezeichnet man die geprägten regulatorischen Loci als differenziell methylierte Regionen (DMRs). Es werden zwei Gruppen von DMRs unterschieden. Bei den primären DMRs wird die DNA-Methylierung bereits in den Keimzellen festgelegt, weshalb man sie auch als Keimzell-DMRs (engl. *germline DMRs*; gDMRs) bezeichnet. Oftmals handelt es sich bei den primären DMRs gleichzeitig um Imprinting-Kontroll-Regionen (ICRs; vgl. Kap. 1.1.2.2.). Die sekundären oder somatischen DMRs erhalten die differenzielle Methylierung dagegen erst nach der Befruchtung und werden von benachbarten ICRs kontrolliert (Tomizawa und Sasaki, 2012).

Die genomische Prägung ist eine reversible Modifikation, die in den Keimzellen jeder Generation neu etabliert werden muss. Die geschlechtsspezifische Markierung erfolgt bereits in den primordialen Keimzellen während der frühen Embryonalentwicklung eines Individuums. Die parentalen Imprints werden dazu vollständig gelöscht und in Abhängigkeit des Geschlechts des Embryos neu etabliert. Die eizell- bzw. spermien-spezifischen Prägungsmuster bleiben auch nach der Fertilisation der reifen Keimzellen in der nächsten Generation erhalten (Kelsey, 2007; Ideraabdullah *et al.*, 2008) und entgehen der fetalen Reprogrammierung (vgl. Kap. 1.1.4.). Bislang wurden 100 bis 200 geprägte Gene bei Säugetieren identifiziert (Jirtle, 2012; Williamson *et al.*, 2012).

### 1.1.2.1. Funktion geprägter Gene

Geprägte Gene spielen eine wichtige Rolle bei der fetalen und plazentalen Entwicklung (Miozzo und Simoni, 2002). Aufgrund ihrer monoallelischen Expression sind die geprägten Gene in der Regel dosissensitiv, da Änderungen im Expressionslevel funktionelle Auswirkungen zeigen. So betreffen Fehlregulationen v.a. die pränatale Wachstumkontrolle, die Entwicklung spezieller Organe und Zelllinien sowie die normale Gehirnfunktion und postnatale Energiehomöostase (Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). Aufgrund ihrer wachstumsregulierenden Rolle haben einige geprägte Gene auch onkogene oder tumorsuppressorische Funktion, so dass eine Änderung der Gendosis durch den Verlust des Imprints mit der Entstehung von Neoplasmen assoziiert wird (zusammengefasst bei Uribe-Lewis *et al.*, 2011).

Erste Hinweise auf genomische Prägung bei Säugetieren liefert das Fehlen der in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreiteten Parthenogenese. Diese auch als Jungfernezeugung bezeichnete Form der eingeschlechtlichen Fortpflanzung erlaubt die Entstehung eines genetisch identischen Nachkommens aus einer unbefruchteten Eizelle, welche ohne die Beteiligung eines Sexualpartners durch hormonelle Aktivierung die Embryogenese startet. Entsprechend der fehlenden natürlichen Parthenogenese bei Säugern führte auch die künstliche Erzeugung von parthenogenetischen Mäuseembryonen zu einer frühen Letalität der Embryonen (Kaufman *et al.*, 1977; Obata und Kono, 2002). Dass ein uniparentales diploides Genom mit dem Leben unvereinbar ist, zeigen auch diandrische Schwangerschaften, die durch Befruchtung einer Eizelle ohne Kern mit einem oder zwei Spermien zwei männliche Genome aufweisen. Aus der diandrischen Zygote entwickelt sich eine hydatiforme Mole, die jedoch lediglich plazentale Strukturen und kein fetales oder embryonales Gewebe enthält.

Spezifischere Hinweise auf genomische Prägung lieferten Experimente mit Mäusen, bei denen Vorkerntransplantationen an befruchteten Eizellen vorgenommen wurden (Barton *et al.*, 1984; McGrath und Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984). Dazu wurden die Eizellen entkernt und entweder mit zwei verschiedenen (biparentalen) weiblichen Vorkernen oder aber zwei männlichen Vorkernen ausgestattet. Trotz eines vorhandenen diploiden Chromosomensatzes entwickelten sich weder die digynischen noch die diandrischen Embryonen über ein frühes Postimplantationsstadium hinaus (McGrath und Solter, 1984). Neben der frühen Letalität wurden außerdem charakteristische morphologische Unterschiede zwischen diandrischen und digynischen Embryonen und deren Trophoblasten beobachtet: Während

das extraembryonale Gewebe bei digynischen Embryonen unterentwickelt blieb, wiesen bei Diandrie umgekehrt die Embryonen selbst eine unzureichende Entwicklung auf. Surani und Barton folgerten daraus, dass das paternale Genom essentiell für die normale Entwicklung der extraembryonalen Gewebe ist, wohingegen das maternale Genom einen wichtigen Beitrag zur korrekten Embryogenese liefert (Barton *et al.*, 1984; Surani *et al.*, 1984). Diese Ergebnisse zeigten erstmals, dass das väterliche und das mütterliche Genom funktionell nicht äquivalent sind und eine biparentale sowie bisexuelle Herkunft der Gameten für eine korrekte Embryonalentwicklung unabdingbar sind.

Die Evolution der genomischen Prägung, wie man sie in Vertebraten nur bei Säugern findet, resultiert vermutlich aus einem Interessenkonflikt um die mütterlichen Ressourcen zwischen dem väterlichen und dem mütterlichen Teil des Genoms und wird als „Geschlechterkonflikthypothese“ bezeichnet (Moore und Haig, 1991). Dieser zufolge regulieren die elterlichen Genome kompetitiv das intrauterine Wachstum mittels unterschiedlichen Sets geprägter Gene. Paternal geprägte Gene fördern den Bezug von möglichst vielen mütterlichen Ressourcen, um ein maximales fetales und postnatales Wachstum des Nachkommens zu gewährleisten. Dagegen wirken die maternal geprägten Gene im Hinblick auf eine Einteilung der Ressourcen für mögliche spätere Schwangerschaften restriktiv auf das Wachstum (Moore und Haig, 1991). Die Notwendigkeit der evolutionären Ausbildung dieses Konkurrenzsystems resultiert aus der extensiven prä- und postnatalen Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Platz, wie sie in der Form nur bei Plazentatieren (Eutheria) zu finden ist. Das bekannteste Beispiel eines geprägten Gens, das regulatorisch auf das fetale Wachstum wirkt, ist der *Insulin-like growth factor 2 (Igf2)*. Bei Verlust der maternalen Prägung (Loss of Imprinting, LOI) kommt es zu einer biallelischen Expression des Gens und zu einem um ca. 30% erhöhten Geburtsgewicht (Leighton *et al.*, 1995a), während umgekehrt die Inaktivierung des normalerweise exprimierten paternalen Allels zu einem um ca. 20% reduziertem Geburtsgewicht führt (Leighton *et al.*, 1995b). Dieses Beispiel stützt die Hypothese, dass geprägte Gene ein genetisch kontrolliertes Gleichgewicht herstellen zwischen einerseits der Versorgung des Fetus mit Nährstoffen aus der Plazenta und dem Rückhalt der mütterlichen Ressourcen für spätere Schwangerschaften. Diese Hypothese macht eine Koevolution von genomischer Prägung und dem Taxon Eutheria sehr wahrscheinlich (Reik *et al.*, 2003).

Da auch in der postnatalen Stillphase ein hoher Bedarf an mütterlichen Ressourcen besteht, ist es nicht verwunderlich, dass sich das Konzept der genomischen Prägung auch auf die

postnatale und adulte Zeit ausdehnen lässt. Obwohl die Expression der meisten geprägten Gene nach der Geburt herunterreguliert wird, spielen einige von ihnen auch eine wichtige Rolle beim postnatalen Wachstum, beim mütterlichen Fürsorgeverhalten sowie der Gehirnentwicklung (Plagge *et al.*, 2004; Kelsey, 2007; Wilkinson *et al.*, 2007). Die gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass die geprägten Gene, welche postnatal hauptsächlich im Gehirn differenziell exprimiert werden, der Kontrolle der Nährstoffressourcen dienen, indem sie zu einer Steuerung der metabolischen Energiehomöostase sowie der Mutter-Kind-Interaktion beitragen (Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). Das maternal geprägte *Paternally expressed gene 3 (Peg3)*, welches u.a. in dieser Arbeit untersucht wurde, spielt beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Versorgung der Neugeborenen durch die Mutter. Es wird stark in der Plazenta und dem sich entwickelnden Embryo sowie im Hypothalamus und dem erwachsenen Gehirn exprimiert (Li *et al.*, 1999). Mutationen des paternalen Allels führten bei Mäusen zu einer Wachstumsretardierung ohne weitere Beeinträchtigungen. Jedoch zeigten mutante Weibchen später ein gestörtes Fürsorgeverhalten im Sinne verminderter Zuwendung und Leckens der Jungtiere sowie eine fehlende Milchproduktion, was zum Tod von über 90% der Nachkommen führte. Die Laktationsdefizienz wurde auf eine reduzierte Ausschüttung des Hormons Oxytocin in Neuronen des Hypothalamus zurückgeführt (Li *et al.*, 1999; Curley *et al.*, 2004). Auch männliche Mäuse zeigten abnormales Verhalten hinsichtlich ihres Sexualverhaltens und der olfaktorischen Erkennung paarungsbereiter Weibchen (Swaney *et al.*, 2008). Das *Peg3*-Genprodukt ist ein großes Zinkfingerprotein, das eine Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose spielt und daher als Tumorsuppressorgen eingestuft wird (Deng und Wu, 2000; Relaix *et al.*, 2000). Es hemmt darüber hinaus den wachstumsfördernden Wnt-Signalweg in der Embryogenese und ist an der Bildung von Gliazelltumoren beteiligt (Jiang *et al.*, 2010).

### **1.1.2.2. Regulation geprägter Gene**

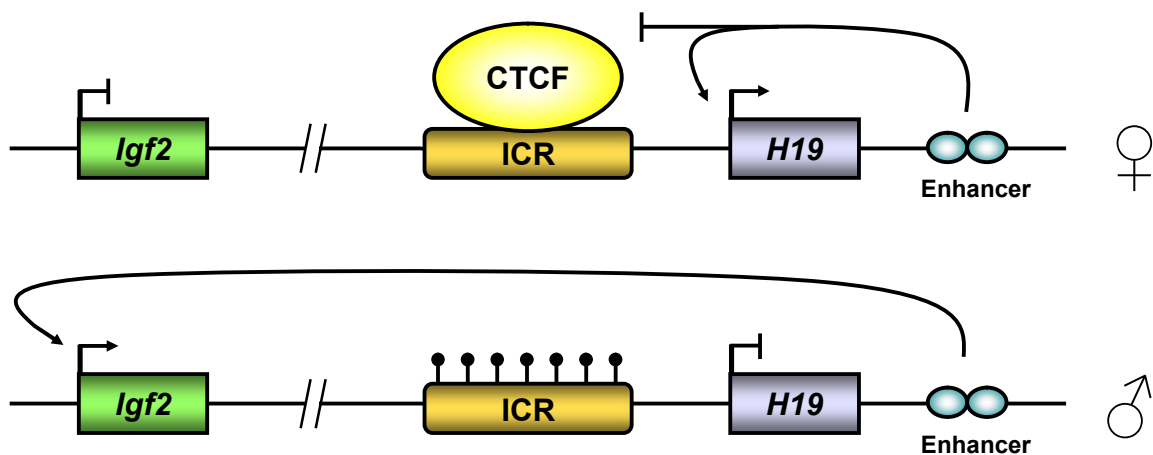
Die meisten bekannten geprägten Gene sind nicht gleichmäßig über das Genom verteilt, sondern clustern zu mehreren in einer jeweils ca. 1 Mb großen Region (Reik und Walter, 2001; Edwards und Ferguson-Smith, 2007; Ideraabdullah *et al.*, 2008; Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). So sind die Gene eines geprägten Clusters in der Regel nicht autonom geprägt, sondern unterliegen einem gemeinsamen *cis*-regulatorischen DNA-Element. Diese, die monoallelische Expression kontrollierende, GC-reiche Region bezeichnet man als Imprinting-Kontroll-Region (engl. *imprinting control region*, ICR) oder seltener als

Imprinting-Kontroll-Element (engl. *imprinting control element*, ICE). Die elternspezifische, differenzielle Methylierung dieser ICRs erfolgt bereits während der Gametogenese (vgl. Kap. 1.1.4.) und bleibt auch in allen somatischen Zellen und Entwicklungsstufen sowie im extraembryonalen Gewebe erhalten (Hudson *et al.*, 2010). Ein Cluster enthält meist maternal als auch paternal exprimierte Gene. Diese können jedoch in den verschiedenen Entwicklungsstufen und differenzierten Geweben unterschiedlich exprimiert werden. Gene, welche nahe der ICR liegen, werden meist ubiquitär in allen somatischen und extraembryonalen Geweben monoallelisch exprimiert, während weiter außen im Cluster liegende Gene nie oder beispielsweise nur in der Plazenta eine geprägte Expression zeigen können (Hudson *et al.*, 2010). Des Weiteren kann die Prägung der Expression auch durch die Zelldifferenzierung aufgehoben werden, wie beispielsweise anhand der biallelischen Expression von *Igf2r* in postmitotischen Neuronen gezeigt wurde (Yamasaki *et al.*, 2005). Die differenzielle Methylierung der ICR selbst bleibt jedoch in allen Entwicklungsstufen und ausdifferenzierten Zellen erhalten.

Die Steuerung der geprägten Expression der ICR-regulierten Gene kann sowohl durch DNA-Methylierung als auch durch andere epigenetische Mechanismen wie repressive Histonmodifikationen, non-coding RNAs (ncRNAs) oder Chromatininteraktionen erfolgen. Eine Möglichkeit ist die direkte monoallelische Stilllegung des Promotors eines geprägten Gens durch differenzielle Methylierung wie beispielsweise im Falle der Gene *SNRPN* (Horsthemke und Wagstaff, 2008) und *Peg3* (Huang und Kim, 2009). Ein verbreiteter Mechanismus der indirekten Kontrolle geprägter Gene stellt dagegen die Expression von ncRNAs dar, deren Transkription häufig in gegenläufiger Richtung mit der eines geprägten Gens interferiert. Ein Beispiel eines solchen Antisense-Transkripts ist *Air*, welches die monoallelische Expression von *Igf2r* sowie der Gene *Slc22a2* und *Slc22a3* reguliert. Der Promotor des *Air*-Transkripts liegt innerhalb eines Introns von *Igf2r* und entspricht einer maternal geprägten, differenziell methylierten ICR. Die Transkription der *Air*-ncRNA auf dem paternalen Chromosom überlappt mit dem *Igf2r*-Promotor und inhibiert so dessen Transkription (Sleutels *et al.*, 2002; Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011).

Das Paradebeispiel einer indirekt über sekundäre Chromatinstrukturen regulierten Prägung der Expression ist der *Igf2/H19*-Lokus auf dem humanen Chromosom 11p15.5 bzw. auf dem distalen Ende des Mausechromosoms 7. Der Imprintingmechanismus dieses Genclusters ist hochgradig konserviert und findet sich auch bei Beuteltieren, die neben den höheren Säugern und den Ursäugern eine Unterklasse der Säugetiere (Mammalia) darstellen. Die

*Igf2/H19*-ICR wird in der männlichen Keimbahn methyliert und stellt damit eine von nur vier bekannten primären DMRs dar, welche paternal geprägt sind (*H19/Igf2*, *Dlk1/Dio3*, *Rasgrf1*, *Zdbf2*; Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). Beim Menschen wird sie speziell als IC1 (Imprinting Center 1) und bei der Maus als DMD (differentially methylated domain) bezeichnet (Jinno *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1997). Die ICR liegt intergenisch zwischen den beiden durch sie geprägten Genen *Igf2* und *H19*, nur wenige kb upstream vom *H19*-Promotor und ca. 90 kb downstream von *Igf2* (Hark *et al.*, 2000). Die Expression von *Igf2* erfolgt vom väterlichen Chromosom, während *H19* vom mütterlichen Chromosom exprimiert wird. Die intergenische ICR wirkt im unmethylierten Zustand als Isolator, indem sie das ubiquitäre Zinkfingerprotein „CTCF“ (CCCTC-binding factor) bindet. Auf dem mütterlichen Chromosom wird so die Interaktion des *Igf2*-Promotors über eine Chromatinschleife mit 3'-stromabwärts von *H19* lokalisierten Enhancer-Elementen physikalisch blockiert. Die Methylierung der ICR auf dem paternalen Chromosom verhindert dagegen eine Bindung des CTCF-Proteins und der *Igf2*-Promotor kann durch die Enhancer aktiviert werden (Abb. 1.1 ; Bell und Felsenfeld, 2000; Hark *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 2006). Die Identifikation der bovinen *Igf2/H19*-ICR war Bestandteil dieser Arbeit.



**Abb. 1.1: Regulation und Struktur der *Igf2/H19*-ICR. Modell der epigenetischen Regulation.** Die ICR liegt auf dem maternalen Chromosom unmethyliert vor. Dies erlaubt die Bindung des CTCF-Proteins an die CTCF-Bindestellen, wodurch die Interaktion der downstream von *H19* gelegenen Enhancer mit dem *Igf2*-Promotor blockiert wird. Die ICR wirkt infolge der CTCF-Bindung als Isolator. Durch die Methylierung der ICR auf dem paternalen Chromosom kann CTCF nicht binden, so dass eine Aktivierung von *Igf2* erfolgen kann.

### **1.1.3. Imprintingkrankungen**

Die monoallelische Expression geprägter Gene stellt ein potentielles Krankheitsrisiko dar, da eventuelle Mutationen des exprimierten Allels nicht durch die zweite Kopie aufgefangen werden können. Krankheiten, die auf einen Verlust der Funktionalität des aktiven Allels eines geprägten Gens zurückzuführen sind, werden entsprechend als Imprintingkrankungen bezeichnet. Sie äußern sich häufig in Wachstumsanomalien, verschiedenen Fehlbildungen, mentaler Retardierung oder Krebs im Kindesalter. Die bekanntesten Imprintingkrankungen sind das Prader-Willi-, Angelman-, Silver-Russell- und Beckwith-Wiedemann-Syndrom sowie der transiente neonatale Diabetes mellitus (TNDM), der Pseudohypoparathyroidismus Typ 1b (PHP-1b) oder das paternale bzw. maternale UPD 14-Syndrom (Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011; Tomizawa und Sasaki, 2012; Diedrich *et al.*, 2013). Die Inzidenzen der meisten Imprintingkrankungen liegen im Bereich von 1 bis 10 Fällen in 100.000 Geburten und sind damit sehr selten (Lidegaard *et al.*, 2006).

Eine mutagene Veränderung im ungeprägten Allel äußert sich als autosomal-dominante Vererbungsform. Die Vererbung von Imprintingfehlern folgt jedoch nicht den Mendel'schen Regeln, nach welchen zufolge die elterlichen Allele unabhängig voneinander segregieren, sondern sie ist abhängig von der jeweiligen parental Transmission (Kelsey, 2007). Imprintingkrankungen sind meist auf chromosomale oder genetische Aberrationen wie Deletionen, Translokationen, Inversionen, Duplikationen und Punktmutationen zurückzuführen, die eine Änderung der Gendosis nach sich ziehen (Tomizawa und Sasaki, 2012). Eine moderate Anzahl von Erkrankungen ist dagegen auf eine uniparentale Disomie (UPD) zurückzuführen, bei welcher ein Chromosom zwar disom vorliegt, aber beide homologen Exemplare vom gleichen Elternteil stammen und somit die gleiche elternspezifische Prägung tragen. UPDs entstehen meist in der Zygote durch einen sogenannten Trisomie-Rescue (das überschüssige Chromosom wird aus der Zygote entfernt) oder einen Monosomie-Rescue (Duplikation des einzelnen Chromosoms; Buiting, 2010; Eggermann, 2010; Yamazawa *et al.*, 2010). Nur selten rührt die Imprintingkrankung von einem tatsächlichen Prägungsdefekt (primäre Epimutation) in der Keimbahn.

#### **1.1.3.1. Der PWS/AS-Genlokus**

Zu den bekanntesten humanen Imprintingkrankungen zählen das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS), welche trotz sehr unterschiedlicher Phänotypen durch Fehlregulation des gleichen geprägten Lokus auf Chromosom 15q11-q13 verursacht

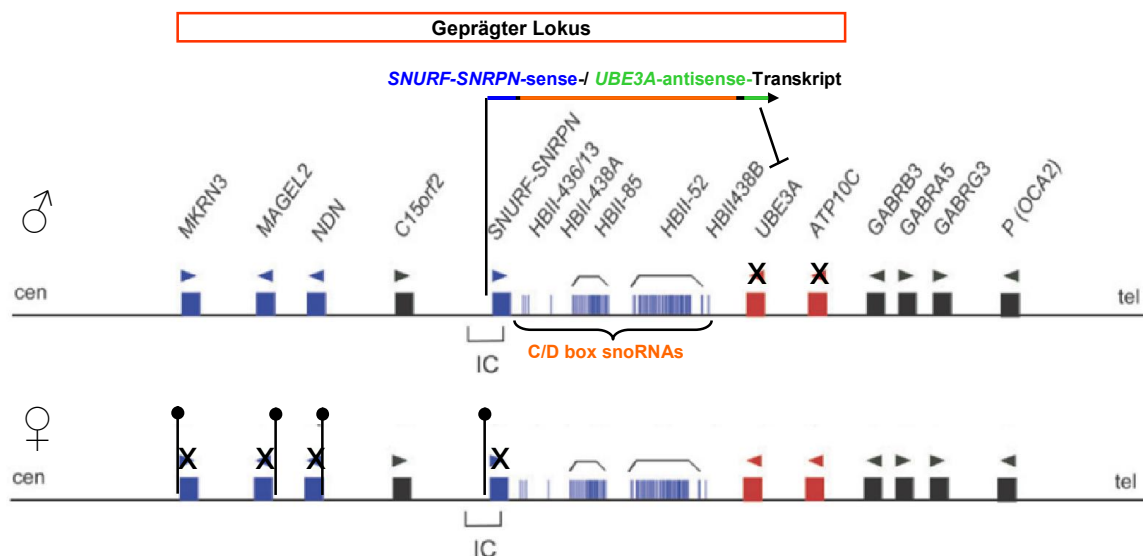
werden (Horsthemke und Wagstaff, 2008). Das PWS zeichnet sich durch Muskelhypotonie des Neugeborenen und eine allgemeine Gedeihstörung aus. Später entwickeln die minderwüchsigen Kinder eine Adipositas aufgrund von Hyperphagie sowie Verhaltensauffälligkeiten. Im Erwachsenenalter begrenzen Adipositas-assoziierte Erkrankungen wie Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Lebenserwartung. Im Gegensatz zum AS leiden PWS-Patienten nur an einer milden bis moderaten mentalen Retardierung und können ihren Alltag selbständig bewältigen. Das AS ist neben der schweren kognitiven Behinderung und fehlender Sprachentwicklung durch ataktische, hyperaktive Bewegungen und unmotivierter Lachanfalle charakterisiert, weshalb es auch gelegentlich als „Happy-Puppet-Syndrom“ bezeichnet wird. Die Kinder leiden in der Regel an Epilepsie (gekennzeichnet durch ein charakteristisches EEG) und Schlafstörungen.

Der geprägte PWS/AS-Lokus enthält zahlreiche Gene, die durch komplexe Mechanismen reguliert werden, darunter *cis*- und *trans*-regulatorische Faktoren und ncRNAs (Horsthemke und Buiting, 2006; Horsthemke und Wagstaff, 2008). Entsprechend vielseitig sind die Ursachen, die entweder zum PWS und AS führen können und werden daher im Folgenden nur in ihren Grundzügen erläutert. Die maternal geprägte ICR des genreichen Clusters liegt im Promotor- und Exon1-Bereich des *Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N-Gens (SNRPN)* und wird speziell als IC (Imprinting Center) bezeichnet (Horsthemke und Buiting, 2006). Das SNRPN-Protein ist ein Polypeptid der snRNP-SMB/SMN-Familie und spielt eine Rolle bei der Prozessierung der prä-mRNA und beim gewebespezifischen alternativen Spleißen (NCBI, 2014: Gene ID: 6638). Das vom väterlichen Chromosom exprimierte *SNRPN*-Transkript ist Teil eines einzigen, über 460 kb langen Transkripts, welches über 70 kleine nukleoläre RNAs (small nucleolar RNAs, snoRNAs) und ein Antisense-Transkript enthält, welche jeweils einzeln durch alternatives Spleißen freigesetzt werden (Horsthemke und Wagstaff, 2008). Das vom *SNRPN*-Promotor ausgehend initiierte Antisense-Transkript hemmt vermutlich die Expression des bei AS-Patienten fehlregulierten *UBE3A*-Gens (Chamberlain und Brannan, 2001; Abb. 1.2).

Ein Verlust der väterlichen Expression des langen Transkriptes etwa durch Deletion oder Methylierung der ICR führt zum PWS, während beim AS ein Verlust der mütterlichen Expression von *UBE3A* vorliegt (Horsthemke und Wagstaff, 2008; Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). Die häufigste Ursache von PWS als auch dem AS mit ca. 70% der Patienten sind *de novo*-Deletionen von 15q11-q13. Die restlichen PWS-Fälle (29%) weisen fast alle eine maternale UPD auf, während beim AS eine paternale UPD nur etwa für 1-2% der Fälle



ursächlich ist. In 10% der AS-Fälle wurde eine trunkierende Punktmutation im maternal vererbten *UBE3A*-Gen gefunden (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 2005; Horsthemke und Wagstaff, 2008). Imprintingdefekte der ICR sind nur in etwa 1% der PWS- und in etwa 3-5% der AS-Patienten für die Erkrankung verantwortlich (Ludwig *et al.*, 2005; Horsthemke und Wagstaff, 2008). Die Untersuchung der Prägung der *SNRPN*-Promotor-ICR ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

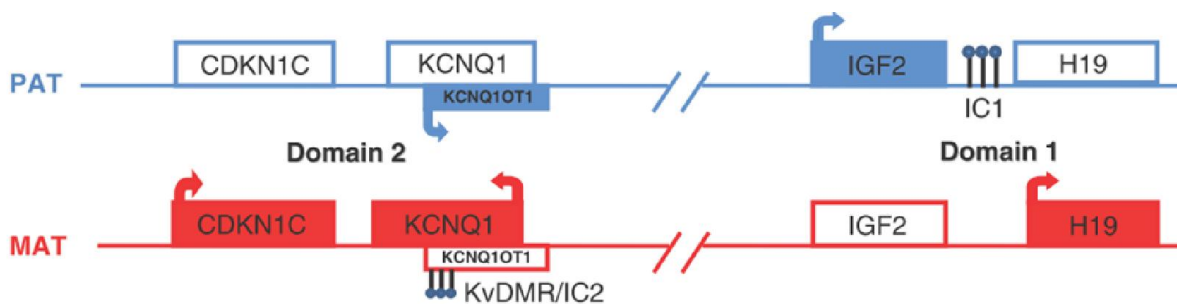


**Abb. 1.2:** Schema des geprägten PWS-/AS-Genlokus auf dem humanen Chromosom 15q11-q13 (modifiziert nach Horsthemke und Buiting, 2006). Blaue Boxen repräsentieren Gene, die nur vom paternalen Chromosom exprimiert werden, rote dagegen nur vom maternalen und schwarze von beiden Chromosomen (ungeprägte Expression). Die Richtung der Transkription ist jeweils durch einen Pfeil dargestellt. Methylierte Promotoren auf dem maternalen Chromosom sind durch schwarz gefüllte Kreise gekennzeichnet. Reprimierte Expression ist durch ein X über der Expressionsrichtung angedeutet. Das vom paternalen Chromosom exprimierte lange Transkript enthält neben dem Sense-Transkript von *SNURF-SNRPN* (blau) auch die C/D box snoRNAs (orange) und das Antisense-Transkript (grün), welches *UBE3A* reprimiert.

### 1.1.3.2. Der SRS/BWS-Genlokus

Die geprägten Gene *Igf2* und *H19* sind Teil eines geprägten Lokus auf dem menschlichen Chromosom 11p15.5, welcher mit den beiden Imprintingkrankungen Silver-Russel- (SRS) und Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) assoziiert wird. Während sich das SRS durch intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung, körperliche Asymmetrie sowie weitere heterogene klinische Merkmale auszeichnet (Eggermann, 2010), zeigt sich beim BWS prä- und postnataler Großwuchs, Makroglossie, neonatale Hypoglykämie und Bauchdecken-defekte sowie ein erhöhtes Tumorrisiko (Weksberg *et al.*, 2010; Tomizawa und Sasaki, 2012).

Die geprägte Region unterteilt sich in zwei Imprinting-Domänen. Die distale Domäne 1 besteht aus den geprägten Genen *Igf2* und *H19* und wird vom paternal methylierten Imprinting Center 1 (IC1) reguliert. Domäne 2 umfasst die geprägten Gene *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* und *CDKN1C*. Die differenziell methylierte IC2 enthält den Promotor von *KCNQ1OT1* (auch bekannt als *LIT1*), welches eine paternal exprimierte ncRNA kodiert und so die Expression der maternal exprimierten Gene *KCNQ1* und *CDKN1C* hemmt (Abb. 1.3). Die IC2 wird auch häufig als KvDMR bezeichnet.



**Abb. 1.3:** Schema des geprägten BWS-/SRS-Genlokus auf dem humanen Chromosom 11p15.5 (übernommen aus Weksberg *et al.*, 2010).

Wie beim PWS und AS sind die Ursachen dieser beiden Erkrankungen vielfältig. Das BWS wird meist durch Hypomethylierung (Verlust der Methylierung) der KvDMR/IC2 auf dem maternalen Chromosom verursacht (50%), aber auch durch paternale UPD (20%), Mutationen im väterlichen Allel von *CDKN1C* (5%), maternale Weitergabe von *de novo*-Translokationen/Inversionen (1%), welche meist das Gen *KCNQ1* unterbrechen, sowie durch paternal entstandene Duplikationen von 11p15.5 (1%; Weksberg *et al.*, 2010). In ca. 5-10% der Fälle ist eine Hypermethylierung der IC1 (*Igf2/H19*-ICR) kausal (Sparago *et al.*, 2004; Eggermann, 2009; Tomizawa und Sasaki, 2012). SRS-Patienten zeigen dagegen in mindestens 44% der Fälle eine Hypomethylierung der IC1 auf dem paternalen Chromosom. Das SRS und BWS weisen somit gegensätzliche klinische Bilder auf, die interessanterweise auf gegensätzliche Epimutationen (Hypermethylierung der IC1 beim BWS und Hypomethylierung beim SRS) zurückführbar sind (Eggermann, 2009).

#### 1.1.4. Epigenetische Genomreprogrammierung

Die genomische Prägung ist ein zyklischer Prozess, der Phasen der Imprintetablierung, der -aufrechterhaltung sowie der -löschung erfordert. Im Laufe dieses Zyklus gibt es zwei Wellen der globalen Demethylierung und Remethylierung, welche als epigenetische Genomreprogrammierung bezeichnet werden (Abb. 1.4). Aufgrund der umfangreichen Datenlage werden die Abläufe und Vorgänge bei der Genomreprogrammierung im Folgenden vorwiegend anhand des Mäusemodells erläutert. Die erste genomweite epigenetische Reprogrammierung findet während der frühen Embryonalentwicklung statt und dient der Tilgung der elterlichen Muster in der noch undifferenzierten Keimbahn. Dieses Zurücksetzen der epigenetischen Modifikationen gewährleistet die Totipotenz der späteren Gameten und verhindert die Vererbung möglicher Epimutationen in die nächste Generation (Hajkova *et al.*, 2008; Smallwood und Kelsey, 2012). Ein Teil der hinteren Epiblastzellen entwickelt sich zu den primordialen Keimzellen (PGCs). Während der Migration der PGCs in die Keimleiste findet eine massive Entfernung der DNA-Methylierung statt (Hackett *et al.*, 2012). Typischerweise gehen der Demethylierung Veränderungen der Histonmodifikationen voraus (Gifford *et al.*, 2013). Bei Mäusen beginnt das Löschen der Imprints an Tag 11.5 und ist an Tag 13.5 dpc (days post concetion) abgeschlossen (Hajkova *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2003). Die Reprogrammierung scheint vorzugsweise an geprägten und ungeprägten Single-Copy-Genen stattzufinden, während die Demethylierung von repetitiven Elementen zeitlich verzögert und unvollständig ist. Dies dient vermutlich dem Schutz vor einer Aktivierung transposabler Elemente, welche durch Fehlregulation benachbarter Gene oder Transposition zu Keimbahnmutationen führen könnten (Hajkova *et al.*, 2002; Allegrucci *et al.*, 2005). Da die Demethylierung der DNA innerhalb nur weniger Stunden erfolgt, muss die schnelle und umfassende Tilgung der Methylgruppen durch aktive Prozesse vermittelt werden und ist nicht auf eine passive Demethylierung durch DNA-Replikation zurückführbar. Ein wahrscheinlicher Mechanismus der aktiven Demethylierung ist der Austausch von Methylcytosinen und Histonen durch die DNA-Reparatur-Maschinerie (Hajkova *et al.*, 2002; Hajkova *et al.*, 2008). Die Demethylierung findet trotz Präsenz der Methyltransferase Dnmt1 statt (Hajkova *et al.*, 2002), welche eine starke Affinität zu hemimethylierter DNA hat und für die Aufrechterhaltung und damit Vererbung der Methylierungsmuster auf Tochterzellen verantwortlich ist (Yoder *et al.*, 1997a).

Im Anschluss an die globale Demethylierung werden die Methylierungsmuster geschlechtsspezifisch neu etabliert (*de novo*-Methylierung). Dies erfolgt in der männlichen

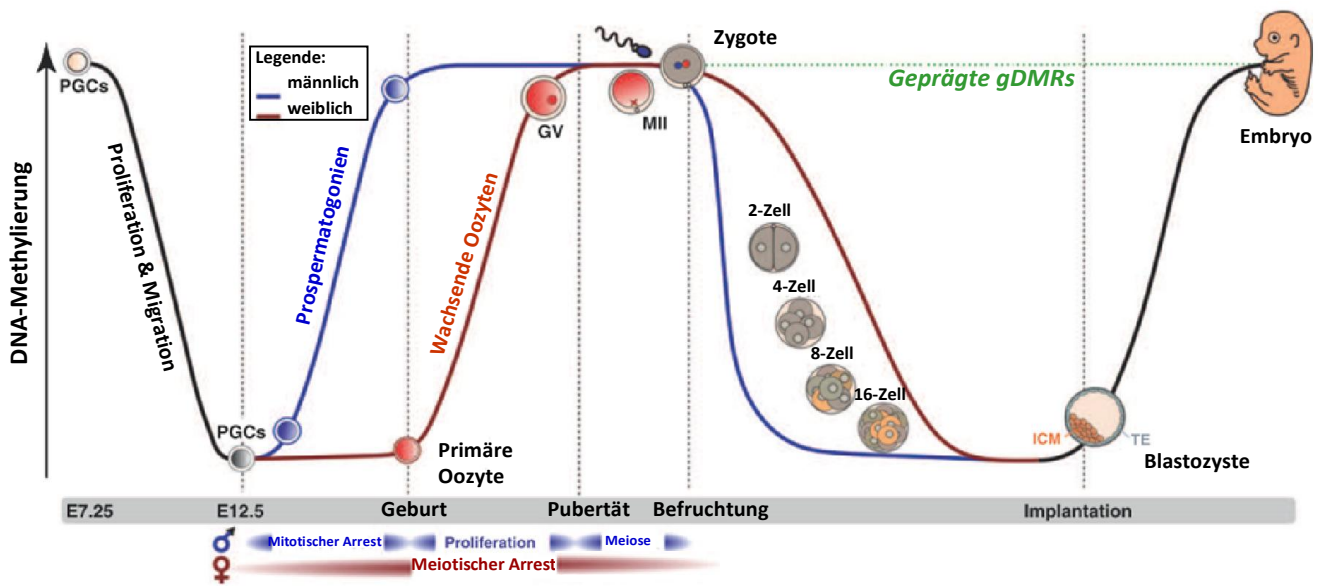
und weiblichen Keimbahn zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die paternale Prägung von *H19* startet in den Spermien von Mäusen bereits vor der Geburt in den Prospermatogonien und ist postnatal im Pachytän-Stadium der Reduktionsteilung (Meiose I) abgeschlossen (Allegrucci *et al.*, 2005). Die Remethylierung in Eizellen erfolgt hingegen erst ab der Geburt in den wachsenden Oozyten. Sie ist für die einzelnen Gene asynchron (genspezifisch) und ist abhängig vom Oozytendurchmesser, nicht aber vom Alter der Oozyte (Obata und Kono, 2002; Lucifero *et al.*, 2004b; Hiura *et al.*, 2006; O'Doherty *et al.*, 2012). So werden beispielsweise die Gene *Ndn* und *Znf127* bereits im primordialen zum primären Follikelstadium methyliert, während *Peg3* und *Igf2r* erst im Sekundärfollikelstadium geprägt werden (Obata und Kono, 2002). Bei einigen Genen wie dem *Impact*-Gen findet die Prägung erst spät bei Erreichen des Antralfollikelstadiums statt (Obata und Kono, 2002). Die meisten maternalen Imprints sind bei Erreichen des Metaphase II-Stadiums in der Oozyte etabliert.

In der weiblichen Keimbahn erfolgt die DNA-Methylierung interessanterweise meist in der Promotorregion geprägter Gene, während Methylierung in der männlichen Keimbahn eher an intergenischen Positionen erfolgt (Bartolomei und Ferguson-Smith, 2011). Die Methylierung der Keimzell-DNA und damit die Prägung der maternalen und paternalen Imprints wird durch die *de novo*-Methyltransferase Dnmt3a und das in Eizellen mit Dnmt3a interagierende Protein Dnmt3L katalysiert (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Kaneda *et al.*, 2004). Die regulatorische Funktion von Dnmt3L bei der maternalen Prägung scheint eng mit der Evolution genomischer Prägung assoziiert zu sein, da es nur bei dem Taxon Theria, einer Unterklasse der Säuger bestehend aus Beuteltieren und höheren Säugern, vorkommt (zusammengefasst bei Edwards und Ferguson-Smith, 2007). Alle drei bekannten Methyltransferasen der 3er-Familie (DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L) werden auch in wachsenden bovinen Oozyten exprimiert. Wie bei der Maus scheint das Zusammenspiel von DNMT3A und DNMT3L für die Etablierung der maternalen Imprints essentiell zu sein, während DNMT3B - obwohl bereits in der Oozyte vorhanden - vermutlich eine Rolle in der späteren Embryonalentwicklung spielt (O'Doherty *et al.*, 2012).

Die zweite Welle genomweiter Reprogrammierung erfolgt nach der Befruchtung und eliminiert die Methylierung mit Ausnahme der parentalen Imprints. Dadurch werden die beiden Keimbahngenome zu einem diploiden somatischen Genom umprogrammiert und erlangen Totipotenz, welche Voraussetzung für die Entwicklung des Embryos ist (Haaf, 2006). Die Demethylierung der DNA in den noch unfusionierten elterlichen Vorkernen der Zygote findet asynchron statt und beginnt mit der aktiven Löschung der Methylierung des

väterlichen Genoms (Mayer *et al.*, 2000a; Oswald *et al.*, 2000; Abb. 1.4). Das maternale Genom bleibt hingegen bei Mäusen bis zum Zweizellstadium stark methyliert und trotz der Auflösung der Vorkernmembranen und der ersten Furchungsteilung topologisch vom paternalen Genom getrennt (Mayer *et al.*, 2000b; Haaf, 2006). Ab dem Zweizellstadium wird es passiv durch wiederholte Replikation und Zellteilung demethyliert. Die replikationsabhängige Demethylierung ist nur möglich, da die Oozyten-spezifische Isoform der Methyltransferase DNMT1 im frühen Embryo aktiv im Zytoplasma zurückgehalten wird und nicht in den Nukleus vordringen kann (Cardoso und Leonhardt, 1999; Howell *et al.*, 2001). Nach dem Achtzellstadium zeigen die paternalen und maternalen Chromosomen schließlich eine vergleichbar niedrige Methylierung (Mayer *et al.*, 2000a). Die globale Methylierung sinkt auf bis zu 15% im Blastozystenstadium (Reik *et al.*, 2001).

Die genomweite *de novo*-Methylierung und damit die somatische Differenzierung des Präimplantationsembryos beginnt bei der Maus im Blastozystenstadium (Abb. 1.4) und beschränkt sich vornehmlich auf die innere Zellmasse, während die Zellen des Trophoblasten weniger stark methyliert werden (Dean *et al.*, 2001; Reik *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002). Beim Rind findet die Remethylierung hingegen bereits im 16-Zellstadium der Morula statt. Obwohl der Zeitpunkt der Remethylierung zwischen verschiedenen Spezies variieren kann, so ist die epigenetische Reprogrammierung nach der Fertilisierung doch stark konserviert (Dean *et al.*, 2001). Die Reprogrammierung im Embryo betrifft auch die PGCs, welche somit vor ihrer Reprogrammierung in der Keimleiste ein geprägtes und weitestgehend somatisches Methylierungsmuster besitzen (Hajkova *et al.*, 2002).



TRENDS in Genetics

**Abb. 1.4: Exemplarische Darstellung der Änderungen der DNA-Methylierung im Laufe der epigenetischen Reprogrammierung in der Keimzellentwicklung der Maus.** Die erste genomweite Demethylierungswelle findet in den primordialen Keimzellen statt und löscht die elterlichen (somatischen/differenziellen) Imprints. Die *de novo*-Methylierung in den Keimzellvorläufern in Spermien und Eizellen findet zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Während die Neu-etablierung der Imprints in den Prospermatogonien bereits im mitotischen G1-Arrest pränatal vollendet wird (blaue Linie), erfolgt die Methylierung in weiblichen Keimzellen (rote Linie) erst postnatal in den wachsenden Oozyten. Nach der Befruchtung wird im Zuge der zweiten genomweiten Reprogrammierung zur Erlangung der nukleären Totipotenz zunächst das paternale Genom in der Zygote durch einen aktiven Prozess demethyliert, gefolgt von der langsameren Demethylierung des maternalen Genoms, welche passiv durch DNA-Replikation und Zellteilung erfolgt. Während in der ersten Welle der epigenetischen Reprogrammierung auch die Imprints gelöscht werden, bleibt die allelspezifische Methylierung der geprägten gDMRs (grün-gestrichelte Linie) in der zweiten Welle erhalten. PGCs: Primordiale Keimzellen, GV: Germinales Vesikulum, MII: Oozyte im Metaphasell-Arrest, gDMRs: Keimzell-DMRs. Abbildung entnommen aus Smallwood und Kelsey (2012) und modifiziert.

## 1.2. Assistierte Reproduktion

Die assistierte Reproduktion (AR) bezeichnet „die ärztliche Hilfe zur Erfüllung des Kinderwunsches eines Paares durch medizinische Hilfen und Techniken“ (Bundesärztekammer, 2006: (Muster)-Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion). Diese Techniken und Methoden werden analog als assistierte Reproduktionstechniken (ARTs) zusammengefasst. Diejenigen ARTs, die außerhalb des Körpers in einer Kulturschale oder auch sprachgebräuchlich „im Reagenzglas“ stattfinden, werden als „*in vitro*“ (lat. für „im Glas“) bezeichnet. Medizinische Indikation assistierter Reproduktion ist das dauerhaft bestehende Ausbleiben einer Schwangerschaft aufgrund eingeschränkter Fertilität (Fruchtbarkeit) des ratsuchenden Paares. Eine vollständige, 100%ige Infertilität (Unfruchtbarkeit) ist eher selten Hintergrund der Kinderlosigkeit. Vielmehr liegen in 80% der Fälle meist mehr oder minder schwere Fertilitätsprobleme von beiden Partnern zugrunde. Lediglich bei den restlichen 20% findet sich die alleinige Ursache entweder beim Mann oder der Frau oder aber der Grund der Zeugungsunfähigkeit bleibt gänzlich unklar (Diedrich *et al.*, 2013). Welche Maßnahme der assistierten Reproduktionstechniken zur Anwendung kommt, entscheidet sich anhand des gründlich erstellten Diagnosebefundes und ist neben der biologischen Ursache der Infertilität auch abhängig von weiteren Faktoren wie beispielsweise dem Alter der Frau und der Dauer des bestehenden Kinderwunsches (Bundesärztekammer, 2006: (Muster)-Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion).

Neben dem Einsatz in der humanen Reproduktionsmedizin finden ARTs auch Anwendung in der Zucht von Nutztieren zur Optimierung der Qualität und Quantität von Fleisch, Milch oder Wolle als auch der Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern, so dass der Übergang zu biotechnologischen Verfahren fließend ist (Rodriguez-Martinez, 2012). Zudem erlauben ARTs auch eine gezieltere und schnellere Ausschöpfung des reproduktiven Potentials ökonomisch wertvoller Tiere. Im Folgenden sollen die gängigsten Methoden der ARTs der humanen als auch der veterinären Reproduktion vorgestellt sowie ihre Risiken und Limitierungen dargelegt werden.

### 1.2.1. Assistierte Reproduktionstechniken beim Mensch

Der Anteil der durch ART gezeugten Neugeborenen in Amerika beträgt heute über 1%. Entsprechend dem vorläufigen Bericht über die klinischen ART-Erfolgsraten der amerikanischen „Centers of Disease Control and Prevention“ (CDC, 2013) wurden im Jahre 2011 allein in den USA etwa 50.000 Lebendgeburten (einschließlich Mehrlingsgeburten) infolge von ART-Zyklen gezählt, aus denen über 60.000 lebendgebore Kinder hervorgingen. Die Ursachen der (eingeschränkten) Infertilität sind vielfältig und können sowohl genetisch als auch erworben sein, z.B. durch Vasektomie, Krebs oder ein erhöhtes Alter der Frau. In den stetig alternden Gesellschaften der westlichen Welt, in welchen der Eintritt ins Familienleben zunehmend später erfolgt, steigen daher der Bedarf und die Nachfrage nach assistierter Reproduktion.

Bei einem ART-Zyklus kommen entsprechend der Definition der amerikanischen CDC (CDC, 2013) stets mehrere ARTs zum Einsatz. Abhängig von der Indikation wird in den meisten Fällen eine **ovarielle Stimulation** der Follikelreifung mit Hilfe von Hormonen herbeigeführt, welche die Reifung und Ovulation einer (Monoovulation) oder mehrerer (Poly- oder Superovulation) Eizellen zum Ziel haben. Die Art und Menge der Hormongabe muss individuell angepasst werden, dient aber stets der indirekten oder direkten Erhöhung des Serum-FSH-Spiegels (FSH: Follikel-stimulierendes Hormon). Das Gonadotropin FSH induziert und propagiert das Wachstum einer Kohorte von Follikeln. Die starke hormonelle Stimulation kann in manchen Fällen zum sogenannten und unter Umständen lebensbedrohlichen, ovariellen Überstimulationssyndrom (OHSS) führen (Diedrich *et al.*, 2013).

Weitere Techniken der AR sind die **artifizielle Insemination (AI)** oder künstliche Besamung durch Einbringen des aufbereiteten Spenderspermas in die Zervix, den Uterus oder die Eileiter (intrazervikale, intrauterine oder intratubare Insemination) sowie Methoden der extrakorporalen, künstlichen Befruchtung im Reagenzglas (**in vitro-Fertilisation** oder **IVF**; Diedrich *et al.*, 2013). Für die IVF wird das Spendersperma mit den durch ovarielle Stimulation und Punktion gewonnenen Oozyten in einem Kulturschälchen mit Kulturmedium zusammengebracht, so dass eine spontane Befruchtung der Eizellen durch den Samen ermöglicht wird. Dieses von Edwards und Steptoe erstmals 1978 erfolgreich praktizierte Verfahren (Steptoe und Edwards, 1978) wurde 2010 mit dem Nobel-Preis prämiert. Eine Sonderform der IVF stellt die sogenannte **intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)** dar. Ein einzelnes Spermium wird mittels einer Mikromanipulationskapillare in eine Eizelle



injiziert (Palermo *et al.*, 1992). Diese Methode ist bei verminderter Spermienqualität im Sinne einer gestörten Motilität (Beweglichkeit) oder reduzierten Spermienanzahl im Ejakulat sowie nach vorhergehender, erfolgloser IVF angezeigt. Nach Aufbereiten des Ejakulats wird ein Spermium nach Motilität und morphologischen Gesichtspunkten ausgewählt und durch Entfernen der Geißel immobilisiert, ehe es injiziert wird (Diedrich *et al.*, 2013).

Nach erfolgreicher Befruchtung und anschließender *in vitro*-Kultur (IVC) der Zygote wird der Embryo zwei Tage nach der IVF bzw. der ICSI in den Uterus der Empfängerin übertragen (**Intrauteriner Embryotransfer; ET**). Er befindet sich sodann im Zwei- bis Achtzellstadium. Um die Chance einer Einnistung zu erhöhen, wird meist mehr als nur ein Embryo transferiert. Man unterscheidet generell den Transfer von einem (Single-Embryo-Transfer, SET), von zwei (Double-Embryo-Transfer, DET) oder drei Embryonen (Bundesärztekammer, 2006: (Muster-)Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion). Um das Risiko einer für Mutter und Kinder gesundheitsgefährdenden Mehrlingsschwangerschaft in Balance zum Risiko eines Implantationsversagens zu setzen, wird in Deutschland üblicherweise die Übertragung von zwei Embryonen empfohlen, nur maximal drei sind erlaubt (Bundesärztekammer, 2006).

Das Einfrieren und die Lagerung von Geweben, lebenden Zellen und Embryonen bei -196 °C wird als **Kryokonservierung** bezeichnet. Die Möglichkeit des reversiblen Einfrierens ohne Schädigung der Zellen gestattet die Konservierung von Sperma sowie von Eizellen von Frauen mit bevorstehender Chemo- bzw. Strahlentherapie oder zurückgestelltem Kinderwunsch. Darüberhinaus können überzählige Embryonen nach IVF für einen eventuellen späteren ART-Zyklus eingelagert werden, was in Deutschland aufgrund des Embryonenschutzgesetzes jedoch nur mit Embryonen im Vorkernstadium möglich ist (Diedrich *et al.*, 2013).

Neben der Reifung und Ovulation von Eizellen im Körper (*in vivo*) besteht auch die Möglichkeit der ***in vitro*-Maturation (IVM)** von unreifen Eizellen. Die *in vitro*-Maturation von Eizellen ist eine vergleichsweise junge Technik, die eine IVF ohne die risikoreiche Hormonbehandlung zur ovariellen Stimulation erlaubt. Unreife Follikel werden durch **transvaginale Follikelpunktion** aus den Ovarien isoliert und in der Kulturschale mit einem Reifungsmedium ausgereift (maturiert), ehe eine herkömmliche IVF oder ICSI durchgeführt werden kann. Da die IVM Gegenstand dieser Arbeit ist, findet eine ausführliche Behandlung in Kap. 1.4. statt.

### 1.2.2. Assistierte Reproduktionstechniken beim Zuchttier

Die Zucht von Wiederkäuern, insbesondere von Rindern, ist weltweit von hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Er ist der wichtigste Standortfaktor in den weitgehend landwirtschaftlich ausgerichteten Entwicklungsländern sowie in den entwickelten Ländern der südlichen Hemisphäre (Rodriguez-Martinez, 2012). Ziel des Einsatzes von ARTs bei Nutztieren, insbesondere beim Rind, ist in erster Linie die Steigerung der Produktivität von Fleisch und Milch, aber auch das Einbringen von Resistenzen gegenüber Krankheitserregern zur Verbesserung der Tiergesundheit. Neben diesen ökonomisch motivierten Aspekten bietet die gezielte Zucht sowie die gentechnische Veränderung der Tiere auch die Chance eines erhöhten Nutzens für den Konsument. Durch die Verbesserung der Tiergesundheit könnten zukünftig gesündere und sicherere Produkte sowie Produkte mit neuen und gesundheitsfördernden Eigenschaften erzeugt werden. Weiterhin ließen sich möglicherweise die Hinterlassenschaften der Tiermassenproduktion reduzieren und damit eine reinere Umwelt geschaffen werden (Laible, 2009).

Alle in Kap. 1.2.1. genannten ARTs kommen auch bei der eigenschaftsorientierten Reproduktion von Nutztieren zum Einsatz. Die artifizielle Insemination ist die meist angewandte und daher bedeutendste Methode bei der Zucht von Rindern (Rodriguez-Martinez, 2012). Dank der deutlich geringeren Restriktionen aus rechtlichen und ethischen Gründen können die Möglichkeiten der ARTs beliebig ausgeweitet werden. Bei den meisten Methoden handelt es sich um Multiplikationstechniken zur „Vervielfältung“ von Tieren mit den gewünschten, durch Zucht oder Gentechnik erworbenen Eigenschaften. So kann beispielsweise im Anschluss an eine IVF ein sogenanntes **Embryosplitting** durchgeführt werden, indem der Embryo im frühen oder späteren Teilungsstadium (2-4-Zell-, Morula- oder Blastozystenstadium) geteilt wird und infolgedessen monozygote Zwillinge entstehen (Rodriguez-Martinez, 2012). Des Weiteren können Embryonen mittels einer Präimplantationsdiagnostik anhand bestimmter genetischer Marker ausgewählt werden (**marker-assisted selection, MAS**), die ein gutes allelisches Profil versprechen (Schrooten *et al.*, 2004). Die kontroverseste aller bei Tieren eingesetzten ARTs ist das reproduktive Klonen durch den Transfer eines somatischen Zellkerns in eine zuvor entkernte Oozyte (**somatic cell nuclear transfer, SCNT**). Erstmals gelungen ist dies bei einem Säugetier 1997 mit dem Schaf Dolly 1997 (Wilmut *et al.*, 1997). Seither konnten 16 Spezies erfolgreich geklont werden (Niemann und Lucas-Hahn, 2012). Die so erzeugten Embryonen werden 5-7 Tage *in vitro* kultiviert und anschließend in den Uterus eines sogenannten Nährmuttertieres transferiert. Die Technik

des SCNT kann neben dem reproduktiven Klonen zum Erhalt wertvoller Zuchtmerkmale und der genetischen Diversität auch zur Herstellung transgener Tiere für die Grundlagenforschung oder zu biomedizinischen Zwecken (Gene-Pharming, Xenotransplantation) herangezogen werden (Niemann und Lucas-Hahn, 2012). Abschließend ist noch die transvaginale Follikelpunktion als essentielle ART bei Zuchttieren zu erwähnen: hierfür hat sich der Begriff des transvaginalen **Ovum Pick-ups (OPU)** etabliert.

### **1.2.3. Assistierte Reproduktion und Inzidenzen von Geburtsdefekten**

Der Eingriff in den natürlichen Reproduktionsablauf durch *in vitro*-Techniken wirft die Frage nach möglichen Risiken der ARTs für den wachsenden Embryo auf. Eine Reihe von Studien untersuchten in den letzten 10 Jahren etwaige Häufungen von Fehlbildungen, Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht und Imprintingkrankungen. Daraus ergaben sich Hinweise auf leicht gesteigerte Fehlbildungsraten (Ludwig und Katalinic, 2002; Katalinic *et al.*, 2004; Bonduelle *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005; Bertelsmann *et al.*, 2008 u.a.) sowie auf ein erhöhtes Risiko der Frühgeburtlichkeit, eines niedrigen Geburtsgewichtes und neonataler Intensivbetreuung (Sutcliffe und Ludwig, 2007; Wisborg *et al.*, 2010). Die Metaanalysen von Hansen und Bertelsmann zeigten beispielsweise ein um 30 bis 40% erhöhtes Risiko für Fehlbildungen nach einer IVF/ICSI-Behandlung (Hansen *et al.*, 2005; Bertelsmann *et al.*, 2008). Ebenfalls wurde eine zwei- bis dreifach erhöhte Inzidenz für ein niedriges bzw. sehr niedriges Geburtsgewicht der nach IVF oder ICSI geborenen Kinder berichtet (Schieve *et al.*, 2002). In den Jahren 2002/2003 erschienen erste Berichte über eine mögliche Assoziation von ARTs mit erhöhten Prävalenzen von sehr seltenen Imprintingkrankungen. So wurde für das Angelman-Syndrom (Cox *et al.*, 2002; Orstavik *et al.*, 2003) und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003) eine 3-6fach gesteigerte Inzidenz nach AR berichtet. Tatsächlich wurden 4% aller BWS-Patienten durch assistierte Reproduktion gezeugt (DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003). Da es sich jedoch um sehr seltene Erkrankungen handelt (1:25.000 bis 1:10.000), bleibt das absolute Risiko auch nach ART immer noch relativ gering (ca. 1:5000; Maher *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2005; Bowdin *et al.*, 2007; Diedrich *et al.*, 2013). Weil die *in vitro*-Manipulationen während den höchst sensitiven Phasen der epigenetischen Genomreprogrammierung der Keimzellreifung und Präimplantationsentwicklung erfolgen (vgl. Kap. 1.1.4.), könnten ARTs die Etablierung von Imprints beeinträchtigen und damit zu Imprintingkrankungen des Kindes führen (Horsthemke und Ludwig, 2005).

Evidenz für ein erhöhtes Epimutationsrisiko durch ARTs kommen aus der *in vitro*-Produktion von Zuchttieren und Mäusen. Zahlreiche Studien fanden aberrante Methylierungs- und Expressionsmuster von *in vitro* produzierten Embryonen und Plazenten, welche auf die *in vitro*-Maturation, Superovulation oder Embryokultur zurückgeführt wurden (Lucifero *et al.*, 2004a; Mann *et al.*, 2004, Niemann *et al.*, 2010; u.a.). Auch die Probleme des somatischen Klonens (SCNT) sprechen für eine unzureichende epigenetische Reprogrammierung des transferierten Zellkerns durch die Eizell-eigenen Faktoren. Einige der *in vitro* erzeugten Rinder, Schafe und Mäuse zeigen eine beeinträchtigte prä- und postnatale Entwicklung, die sich durch eine Reihe von unterschiedlichen Aberrationen manifestiert. Diese werden gemeinhin unter dem „Large-Offspring-Syndrom“ (LOS) zusammengefasst, welches überwiegend bei Wiederkäuern beschrieben wurde und phänotypische Parallelen zum oben genannten Großwuchssyndrom des Menschen, dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, aufweist. Zu den Anomalien des LOS zählen u.a. eine verlängerte Tragezeit, ein Übergrößenwachstum (Makrosomie), Plazentaaberrationen, kardiovaskuläre Probleme, Defekte der Atemwege, Immunschwäche, adulte Adipositas, Fehlfunktionen der Leber und Nieren sowie eine generell gesteigerte Anfälligkeit für neonatale Erkrankungen und damit perinatale Mortalität (zusammengefasst bei Niemann und Lucas-Hahn, 2012). Generell scheint der Ursprung der epigenetischen Defekte meist eine reduzierte Methylierung von normalerweise maternal methylierten Allelen zu sein (Horsthemke und Ludwig, 2005). Beispiele sind die Hypomethylierungen des *SNRPN*-Lokus in geklonten Rinderembryonen (Lucifero *et al.*, 2006) und der intronischen DMR2 von *Igf2r* auf dem maternalen Chromosom bei *in vitro* kultivierten Schafembryonen (Young *et al.*, 2001), sowie beim Menschen die Hypomethylierung des mütterlichen Allels der KvDMR/IC2 beim BWS (Maher *et al.*, 2003; Weksberg *et al.*, 2010) oder des *SNPRN*-Promotors beim AS (El-Maarri *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 2005; Buiting, 2010). Diese und weitere Studien geben Hinweise auf eine falsche Reprogrammierung oder auch fehlende Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern während der Präimplantationsentwicklung.

### 1.3. Oogenese und Oozytenmaturation

Bei Säugetieren ist die Bildung einer Eizelle (Oogenese) und ihre anschließende Reifung (Maturation) ein komplexer Prozess, der sich im Gegensatz zur Spermatogenese über den langen Zeitraum von der Embryonalentwicklung bis zu einem Zeitpunkt in der geschlechtsreifen Phase erstreckt. Daher ist er sehr empfindlich gegenüber äußeren Störungen und Umweltschäden. Das Wachstum und die Reifung der Oozyte und des sie umgebenden Follikels unterliegen *in vivo* einer komplexen hormonellen und transkriptionellen Regulation. Im Folgenden sollen zunächst die allgemeinen Vorgänge während der Oo- und Follikulogenese sowie der abschließenden Oozytenmaturation anhand der humanen Abläufe *in vivo* erklärt werden, um dann auf die Besonderheiten bei der bovinen Follikulogenese zu kommen. Zuletzt wird auf die Oozytenmaturation am Zyklusende und das oozytenspezifische Transkriptom eingegangen, welches für die Maturation sowie die an die Befruchtung anschließende Aktivierung des embryonalen Genoms essentiell ist.

#### 1.3.1. Allgemeine Oogenese und Follikulogenese

Das Oozyten- und Follikelwachstum während der humanen Follikulogenese ist in Abb. 1.5 schematisch dargestellt. Die Oogenese beginnt bereits früh in der Embryonalentwicklung. Die noch diploiden Zellen der Stammzelllinie, die zur Ausdifferenzierung in Keimzellen designiert ist, werden als Urkeimzellen oder primordiale Keimzellen (PGC; engl. *primordial germ cells*) bezeichnet. Sie wandern in der sechsten Woche der humanen Embryonalentwicklung aus der Wand des Dottersackes in die Gonadenanlage ein (Sadler, 2008). Bis zur neunten Woche differenziert sich die Gonadenanlage in die embryonalen Ovarien und die PGCs zu Oogonien (Leidenberger *et al.*, 2009). Die Oogonien durchlaufen eine Reihe mitotischer Proliferationen. Ein Teil der Oogonien differenziert sich ab dem dritten Monat zu den bedeutend größeren primären Oozyten, während sich die anderen Oogonien weiter mitotisch teilen. Die primären Oozyten treten dagegen in die Meiose ein. Nach der Replikation der DNA (diploider Chromosomensatz mit Zwischwesterchromatid-chromosomen:  $4n$ ) und Rekombination durch *Crossing over* arretieren die Oozyten im Diplotän, dem vorletzten von fünf Stadien der Prophase I der 1. Reifeteilung. Die primäre Oozyte ist zu diesem Zeitpunkt von einer Schicht flacher Epithelzellen umgeben, die zusammen mit der Eizelle den Primordialfollikel bilden. Die primären Oozyten verweilen bis zur Pubertät in der so verlängerten Prophase I. Dieses andauernde Ruhestadium wird als Diktyotän und der arretierte Oozytenkern als Keimbläschen oder germinales Vesikel (GV)

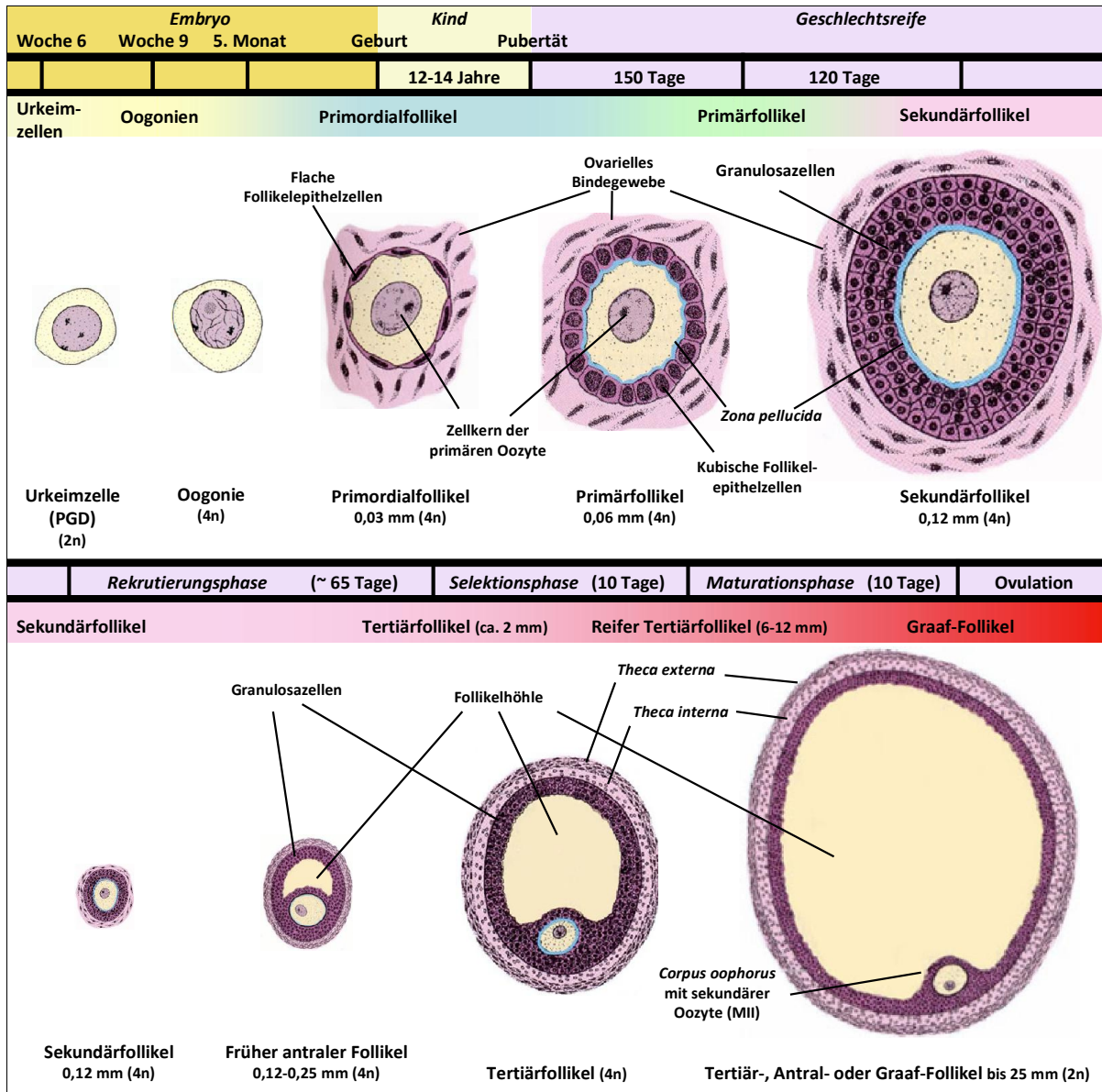
bezeichnet. Im fünften Monat erreicht die Proliferation ein Maximum mit ca. 7 Millionen Oogonien und Primordialfollikeln. Es beginnt die Atresie (Verlust von Oozyten durch nichtovulatorische Prozesse), die sich von der Fetalzeit bis zur Menopause fortsetzt (Leidenberger *et al.*, 2009). Bei der Geburt des weiblichen Fetus ist bereits der Großteil aller Eizellen (80%) zugrunde gegangen. Die Atresie der Oozyten setzt sich bis zur Pubertät weiter fort, zu deren Beginn noch ca. 400.000 übrig sind.

Die Primordialfollikel treten bereits ab der Geburt kontinuierlich in die Follikulogenese (Follikelreifung) ein. Die primäre Oozyte gewinnt an Volumen und die umgebenden Follikelepithelzellen nehmen eine kubische Form an. Diese bilden durch Sezernierung von Glykoproteinen die *Zona pellucida* um die Eizelle des nun entstandenen Primärfollikels. Die Follikelepithelzellen proliferieren weiter und differenzieren sich schließlich zu den endokrinen Granulosazellen des präantralen Sekundärfollikels. Die Reifung und das Wachstum eines Primordialfollikels bis zum Präantralstadium (Primär- oder Sekundärfollikel) dauern beim Menschen ca. 270 Tage (Gougeon, 1986) und sind unabhängig vom hormonellen Zyklus. Erst ab der Pubertät beginnt unter dem Einfluss des von der Hypophyse produzierten follikelstimulierenden Hormons FSH die zyklische Rekrutierung einer Kohorte von Präantralfollikeln, von denen schließlich nur einer nach ca. 85 Tagen und damit einige Menstruationszyklen später zur Ovulation kommt. Somit beträgt die Gesamtdauer der Follikulogenese vom Primordial- bis zum sprungreifen Follikel mehr als ein ganzes Jahr (Gougeon, 1986). Im geschlechtsreifen Ovar kommen die verschiedenen Reifungsstadien der Follikel daher stets parallel vor, was die Punktion unterschiedlicher Stadien für die assistierte Reproduktion ermöglicht.

Während der Rekrutierungsphase entstehen in den Sekundärfollikeln flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, welche die frühen antralen Follikel kennzeichnen und die schließlich zur Follikelhöhle (*Antrum folliculare*) des Tertiärfollikels verschmelzen. Die Höhle weitet sich zunehmend aus, so dass der reife humane Tertiärfollikel eine Größe von 6-12 mm erreicht (Sadler, 2008). Die von der *Theca interna* synthetisierten Östrogene steigern die Sensitivität des Follikels für FSH. Um den sechsten Tag des Ovulationszyklus dominiert schließlich derjenige Follikel mit der höchsten Östrogenproduktion die heranreifende Follikelkohorte (Selektionsphase).

Etwa 36 h vor der Ovulation beginnt unter dem Einfluss der von der Hypophyse ausgeschütteten gonadotropinen Hormone FSH und LH (luteinisierendes Hormon) die präovulatorische Wachstumsphase, in der sich der sprungreife Tertiärfollikel (auch Graaf-

Follikel genannt) bis auf einen Durchmesser von bis zu 25 mm weiter aufbläht (Sadler, 2008; Leidenberger *et al.*, 2009). Am 14. Tag erreicht die östrogenvermittelte LH-Freisetzung ihr Maximum, den sogenannten LH-Peak, der das Platzen des Follikels und damit den Eisprung einleitet, bei dem der Eihügel (*Cumulus oophorus*) mit der Follikelflüssigkeit aus dem Ovar geschwemmt wird.



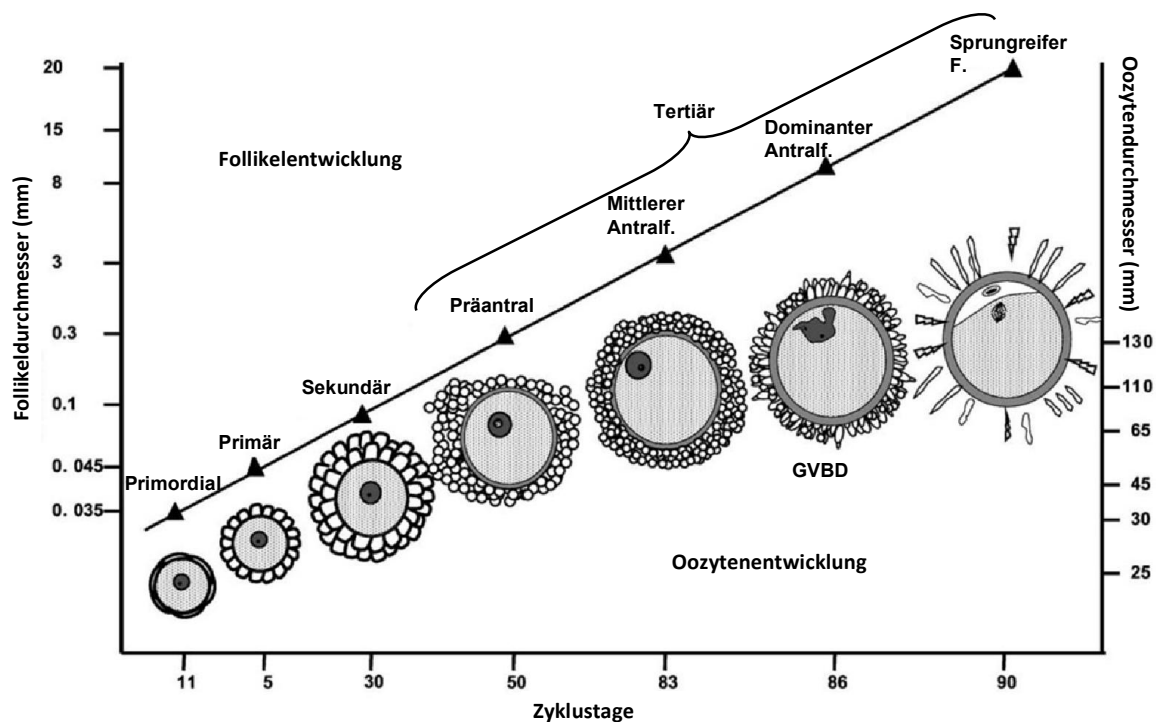
**Abb. 1.5. Humane Follikulogenese.** Schematische Darstellung des Oozyten- und Follikelwachstums im zeitlichen Verlauf der humanen Entwicklung. Die Oogenese und die Follikulogenese beginnen bereits in der Embryonalentwicklung, werden jedoch bis zur zyklisch stattfindenden, hormonellen Rekrutierung ab der Pubertät im Primärfollikelstadium arretiert. Die Dauer der Follikulogenese ab der Follikelrekrutierung bis zum Eisprung beträgt beim Menschen insgesamt ca. 270 Tage (Gougeon, 1986). Zeichnungen übernommen aus Sadler (2008).

### 1.3.2. Oogenese und Follikulogenese beim Rind (*Bos taurus*)

Die bovine und die humane Oogenese und Follikulogenese weisen große Parallelen bezüglich zeitlicher Abfolge und Größenverhältnissen zueinander auf. Die ersten Oogonien treten zwischen Tag 75 und 80 der Pränatalentwicklung in die meiotische Prophase I ein (Erickson, 1966). Sie erreichen schließlich an Tag 170 die finale Phase der Prophase I, das Diplotän, in welcher die nun als primäre Oozyten bezeichneten Eizellen arretiert werden (Baker und Hunter, 1978). Im Unterschied zum Menschen finden sich bereits im pränatalen Ovar des bovinen Fetus Follikel unterschiedlicher Größe bis hin zum Sekundärfollikelstadium: die ersten Primordialfollikel entstehen ab dem 90. Tag der fetalen Entwicklung, Primärfollikel erscheinen ab Tag 140 und Sekundärfollikel ab dem Tag 210 (Russe, 1983). Bei der Geburt sind zwischen 75.000 und 300.000 Oozyten im bovinen Ovar vorhanden, eingebettet in Follikel verschiedener Größe vom Primordialfollikel bis zum Tertiärfollikel mit einer Größe von maximal 5 mm (Erickson, 1966). Der Oozytendurchmesser nimmt während der Wachstumsphase von 30 µm im Primordialfollikel auf über 120 µm im Tertiärfollikel (Antralfollikel; >3 mm) zu (Hyttel *et al.*, 1997). Zwischen der Geburt und der Pubertät tritt wellenförmig eine Kohorte von Follikeln in die Wachstumsphase ein, um schließlich inklusive des ausgebildeten dominanten Follikels artretisch zu werden und zugrunde zu gehen (Armstrong, 2001).

Die endokrine Initiation des Follikelwachstums beginnt bereits kurz nach der Geburt im bovinen Ovar (Evans *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2003). Durch negative Rückkopplung vermutlich durch den LH-Antagonisten Östradiol wird die Ovulation jedoch solange unterdrückt, bis das Kalb die metabolische Reife und eine ausreichende Körpergröße zur erfolgreichen Reproduktion erlangt hat. Der Zeitpunkt der ersten Ovulation ist daher von Kalb zu Kalb sehr verschieden. Es ist wahrscheinlich, dass die Sensitivität der LH-Sekretion für die negative Rückkopplung in den 40 bis 80 Tagen vor der Ovulation sinkt, was zu einer gesteigerten LH-Pulsfrequenz durch die Hypophyse führt und so das Wachstum des dominanten Antralfollikels vorantreibt. Letzterer schüttet wiederum vermehrt Östrogen aus, was schließlich die Ovulation einleitenden LH-Peak auslöst (Rawlings *et al.*, 2003). Der bovine Sexualzyklus mit seinen Follikelstadien und die jeweiligen Größenrelationen von Oozyte und Follikel sind in Abb. 1.6 dargestellt.





**Abb. 1.6: Follikulogenese beim Rind.** Schematische Darstellung der Größenrelationen des Oozyten- und Follikelwachstums in Abhängigkeit von der geschätzten Dauer der Follikulogenese. Abbildung übernommen aus Fair (2003) und modifiziert.

Mit Beginn der Pubertät steigen die Blutplasmakonzentrationen des Wachstumshormons Somatotropin sowie des Wachstumsfaktors IGF1 (insulin-like growth factor 1) im Blut und den Follikeln an. Diese spielen eine gewichtige Rolle bei der Follikelentwicklung (Armstrong *et al.*, 1992; Herrier *et al.*, 1994; Gong, 2002). Weibliche Rinder treten ab ca. 10-12 Monaten in die Pubertät und die damit einhergehende Geschlechtsreife ein (Armstrong, 2001). Sie werden ab der Pubertät bis zur ersten Kalbung als Färsen bezeichnet. Der Brunstzyklus beträgt beim Rind nur 21 statt 28 Tage. Anders als beim Menschen, bei dem zyklisch nur eine Kohorte von Follikeln das Wachstum aufnimmt, zeichnet sich der Sexualzyklus beim Rind durch 2-3 aufeinanderfolgende Wellen follicularen Wachstums aus (Rekrutierungsphase). Jeder Welle geht ein Anstieg der FSH-Konzentration im Blutserum voraus. Die Eizellen und Follikel der aktivierten Kohorte nehmen parallel zueinander an Größe zu, bis der Oozytendurchmesser ab einem Follikeldurchmesser von ca. 3 mm bei 120-130  $\mu\text{m}$  stagniert. Die Follikel wachsen jedoch weiter, ehe sich der erste Follikel mit einer Größe von ca. 8 mm zum dominanten Follikel durchsetzt (Selektionsphase). Der sprungreife Follikel besitzt schließlich einen Durchmesser von 15-20 mm (zusammengefasst bei Fair, 2003).

### 1.3.3. Oozytenmaturation

Die Reifung der primären Eizelle im dominanten Follikel wird beim Rind wie auch beim Menschen einen Tag vor der Ovulation mit Erreichen des LH-Maximums induziert, wodurch das Diaktyotän beendet und die Meiose fortgeführt wird. Fehlt die LH-Spitze geht der dominante Follikel zugrunde und rekrutiert eine neue Welle follikularen Wachstums (Fair, 2003). Die finale Maturation der Rindereizelle zeichnet sich durch zahlreiche verschiedene ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen aus, die größtenteils schon vor dem LH-Anstieg in der sogenannten Prämaturationsphase beginnen: Im Zytoplasma der Oozyte steigt der Lipidgehalt, der Golgi-Apparat wird abgebaut und die kortikalen Granula positionieren sich an der Innenseite der Plasmamembran für den späteren Polyspermieblock. Diese Vorgänge, bei der die Oozyte weitere Entwicklungskompetenz zur Aufrechterhaltung der Embryogenese erlangt, werden auch als „Kapazitation“ bezeichnet (Hyttel *et al.*, 1997). Durch die Kondensation des Chromatins in der letzten Phase der Prophase I, der Diakinese, wird die Transkription endgültig eingestellt und die Nukleusmembran löst sich zur physikalischen Fortführung der Meiose I auf. Aufgrund dieser letztgenannten, mikroskopisch erkennbaren Veränderung wird die Reaktivierung des Reifeprozesses im germinalen Vesikel auch als „Germinal Vesicle Breakdown“ (GVBD) bezeichnet. Weiterhin werden die Kontakte zwischen der Oozytenmembran und den Zellen der innersten Granulosazellschicht (*Corona radiata*-Zellen) unterbrochen sowie der Perivitellinspalt zwischen *Zona pellucida* und dem *Oolemma* gebildet. Infolge der ersten Reifeteilung, bei der sich der Chromosomensatz halbiert (haploid mit zwei Schwesterchromatid-Chromosomen), entsteht der erste Polkörper. Er besitzt wenig Zytoplasma und haftet der Eizelle unterhalb der *Zona pellucida* im perivitellinen Spalt an. Er kennzeichnet die sprungreife und befruchtungsfähige Eizelle, welche nun als sekundäre Oozyte bezeichnet wird. Kurz vor der Ovulation wird die zweite Reifeteilung abermals arretiert, die Eizelle befindet sich sodann in der Metaphase II. Die Maturation gipfelt in der Follikelruptur und der Ovulation der in Granulosazellen („Kumuluszellen“) eingebetteten Eizelle (zusammengefasst bei Fair, 2003). Die im Ovar zurückgebliebenen Granulosazellen des gesprungenen Follikels bilden LH-vermittelt Östrogen und Progesteron, wodurch sich die Granulosazellen in den Gelbkörper (*Corpus luteum*) umwandeln und die Gebärmutterschleimhaut für die Implantation vorbereitet wird. Die Oozyte vollendet die Meiose erst unmittelbar nach der Befruchtung mit einem Spermium. Der zweite Polkörper wird ausgestoßen und der Oozytenkern liegt als haploider, weiblicher Vorkern in der Zygote vor. Die physiologische Trennung des weiblichen und

männlichen Genoms wird erst nach getrennt verlaufener DNA-Replikation und Vorkernauflösung im Zuge der ersten Furchungsteilung aufgehoben (Sadler, 2008).

Die Erlangung der Kompetenz zur nukleären Maturation findet in der Oozyte bereits beim Übergang vom präantralen zum antralen Follikel statt (Eppig, 2001), also ab der Bildung einer Follikelhöhle. Die präantrale Eizelle besitzt keine Reifungskompetenz und bleibt daher unter *in vitro*-Bedingungen bzw. außerhalb des follikulären Milieus im Diplotän der Prophase I arretiert. Dagegen sind Eizellen aus Antralfollikeln, welche *in vitro* zur Wiederaufnahme der Meiose fähig sind, nicht notwendigerweise auch in der Lage, die Kernreifung bis zur Metaphase II abzuschließen. So sind Oozyten aus frühen Antralfollikeln zwar kompetent genug, den GVBD zu starten und die Meiose wieder aufzunehmen. Sie arretieren aber bereits wieder in der Metaphase I, während Eizellen aus größeren Antralfollikeln bis zur Metaphase II vorschreiten können (Eppig, 2001; Wrenzycki *et al.*, 2007). Während des Antralfollikelwachstums scheinen die mit der Oozyte in physischen Kontakt stehenden Granulosazellen die Fortführung der Meiose und damit die Maturation zu inhibieren. Dies zeigten sehr frühe Experimente, bei denen die ausgewachsenen Oozyten, welche aus dem Milieu des umgebenden Antralfollikels isoliert wurden, *in vitro* eigenständig nach kurzer Zeit und ohne Gonadotropinreiz die Meiose und damit die nukleäre Reifung wieder aufnahmen (Pincus und Enzmann, 1935).

#### **1.3.4. Oozyten-spezifische Faktoren**

Während der Follikulogenese findet ein reger Austausch zwischen den somatischen Granulosazellen und der darin eingebetteten Oozyte statt. Diese als „*oocyte-granulosa cell regulatory loop*“ bezeichnete Interaktion ist essentiell für die gegenseitige Wachstums- und Entwicklungskontrolle im Laufe der Follikulogenese und der Maturation (Eppig, 2001). Der dominante, richtungsweisende Partner ist dabei wohl die Eizelle, die die Differenzierung und Funktion der Granulosazellen vorgibt (Eppig, 2001). Sie synthetisiert während der Wachstumsphase der Oogenese große Mengen von mRNA, Ribosomen und Proteinen (v.a. Transkriptionsfaktoren), welche im Zytoplasma angereichert und gespeichert werden und essentiell für die Befähigung zur Fertilisation und Ausführung der frühen Embryogenese sind (Hyttel *et al.*, 1997). Die Akkumulation der maternalen mRNA-Moleküle wird beim Rind im Sekundärfollikel aktiviert und bis zu einer Eizellgröße von ca. 110 µm beim Übergang vom präantralen zum antralen Tertiärfollikel (Follikel: 2-3 mm) aufrechterhalten, dann jedoch stark heruntergefahren (Hyttel *et al.*, 1997; Fair, 2003). Dies ist der Zeitpunkt, ab dem die

Oozyte die Kompetenz zur nukleären Maturation erlangt (vgl. Kap. 1.3.3.). Die Entwicklungskompetenz von Eizellen nimmt in der weiteren Wachstumsphase des Antralfollikels in Abhängigkeit von der Follikelgröße weiter zu und befähigt sie mit Größerwerden des Follikels zur Durchführung der Befruchtung, der frühen Embryogenese bis hin zum Blastozystenstadium und darüber hinaus (Lonergan *et al.*, 1994; Hyttel *et al.*, 1997; Machatkova *et al.*, 2004; Kauffold *et al.*, 2005). Da die Transkription in der Oozyte infolge des GVBDs vollständig arretiert wird (Eppig, 2001), erfolgt die Kontrolle der maternalen Faktoren nur noch auf posttranskriptioneller Ebene durch differenziellen Abbau, Stabilisierung und Speicherung von maternalen Transkripten sowie durch mRNA-Protein-Interaktion zur Translationsinitiation (Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002). Die schließlich bis zur nukleären Maturation ins Zytoplasma eingelagerten maternalen Faktoren (mRNA, rRNA, Polypeptide und Lipide) spielen eine elementare Rolle bei der Fortführung und Kontrolle der Meiose sowie bei der Regulation der Fertilisation und dem Übergang vom Oozytenprogramm zum Zygotenstadium (MET; engl. *maternal to embryo transition*), weshalb man auch von einer Erlangung der zytoplasmatischen Reife der Eizelle spricht (Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002; Sylvestre *et al.*, 2013). Im Zuge der Präimplantationsentwicklung werden die gespeicherten maternalen Transkripte der Eizelle nach und nach aufgebraucht. Ab seiner Aktivierung übernimmt das embryonale Genom schließlich die transkriptionelle Kontrolle (Niemann und Wrenzycki, 2000; Wrenzycki *et al.*, 2007), welche beim Rind im 8- bis 16-Zellstadium, beim Menschen im 4- bis 8-Zellstadium stattfindet (Telford *et al.*, 1990; Wrenzycki *et al.*, 2007).

Das Oozyten-Transkriptom und besonders diejenigen oozytenspezifischen Genprodukte, die in die frühe Embryonalentwicklung involviert sind, sind zwischen verschiedenen Vertebratenspezies (Maus, Frosch, Mensch und Rind) hochgradig konserviert (Sylvestre *et al.*, 2013). Kreuzhybridisierungsversuche mit boviner RNA und humaner cDNA ergaben zudem weitgehend identische Genexpressionsprofile von Mensch und Rind in Eizellen und Blastozysten (Adjaye *et al.*, 2007). Über 400 Gene, welche sowohl in Oozyten als auch dem Präimplantationsembryo vorkommen, sind durch Remodellierung von Chromatin in die epigenetische Regulation der Transkription während der MET involviert (Adjaye *et al.*, 2007). Generell sind Gene, die mit der Entwicklungskompetenz von Eizellen und des späteren Embryos assoziiert werden, beteiligt an den verschiedensten Funktionen. Dazu gehören die Regulation von Transkription und Translation, posttranslationale Proteinmodifikationen, das (Glukose-) Transportsystem, die Zellzykluskontrolle, die Follikulogenese, die Stressabwehr, die Histonzusammensetzung, die Prostaglandinsynthese, die Verständigung über

Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakte (Rezeptoren, Gap Junctions), die die extrazelluläre Matrix abbauenden Komponenten und der Metabolismus. Die Transkriptmenge dieser ungeprägten entwicklungsrelevanten Gene kann durch *in vitro*-Manipulationen positiv oder negativ beeinflusst werden, so dass die Qualität der Oozyten und resultierenden Embryonen beeinträchtigt sein kann (Wrenzycki *et al.*, 2007). Aus dem großen Pool dieser entwicklungsrelevanten Gene wurden drei ausgewählt, um sie im Zuge dieser Arbeit auf mögliche epigenetische Veränderungen nach *in vitro*-Maturation von bovinen Eizellen zu untersuchen: *SLC2A1*, *PRDX1* und *ZAR1*.

*SLC2A1*, das zur Gen-Familie „*solute carrier family 2*“ gehört, kodiert mit sieben weiteren Genen dieser Gruppe (*SLC2A7* bis *SLC2A8*) für die energieabhängigen Glukosetransportermoleküle GLUT1 bis 8, welche für die Versorgung der Eizelle und des Präimplantationsembryos mit Glukose essentiell sind (Augustin *et al.*, 2001). Die Glukoseaufnahme steigt im bovinen Embryo ab dem 8- bis 16-Zellstadium stark an, ab welchem die Aktivierung des embryonalen Genoms, die Kompaktierung und Blastulation beginnt (Telford *et al.*, 1990; Khurana und Niemann, 2000). Das Natrium-unabhängige Kanalprotein GLUT1 (*SLC2A1*) wurde entsprechend in Oozyten und dem Präimplantationsembryo nachgewiesen (Morita *et al.*, 1992). Obwohl die *SLC2A1*-mRNA bereits in unreifen bovinen Eizellen vorliegt (Lequarre *et al.*, 1997), findet der Glukoseumsatz als auch eine gesteigerte GLUT1-Synthese erst ab der Befruchtung statt (Morita *et al.*, 1992). Das GLUT1-Level nimmt in Blastozysten aufgrund des hohen Energiebedarfs der frühen Embryogenese um das 20fache gegenüber dem Gehalt in Oozyten zu, was sich ebenfalls in der erhöhten Menge der aufgenommenen Glukose äußert (Morita *et al.*, 1992).

Neben der Energieversorgung ist auch der Schutz der Eizelle und des späteren Embryos von hoher Bedeutung. Peroxidasen schützen die Zelle vor besonders in der *in vitro*-Reifung und -Kultur häufig auftretenden reaktiven Sauerstoffradikalen (engl. *reactive oxygen species*; ROS), welche die DNA oxidieren und somit schädigen können. Das mRNA-Vorkommen der Peroxidase Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*) konnte bei bovinen Oozyten aus verschiedenen Follikelstadien und IVM-Medien mit der Entwicklungskompetenz der resultierenden Embryonen assoziiert werden (Mourot *et al.*, 2006).

Schließlich wurde in dieser Arbeit auch das Maternale-Effekt-Gen „Zygotic arrest 1“ (*ZAR1*) untersucht, welches als oozytenspezifische Komponente in die MET und frühe Embryonalentwicklung involviert ist. Bei Mäusen beschränkt sich die Expression von *ZAR1* auf wachsende Oozyten, die Zygote und wird dann im Embryo bis zum 4-Zellstadium des

Embryos abgebaut (Wu *et al.*, 2003). Beim Rind beginnt die Expression im Präantralfollikel (Pennetier *et al.*, 2004) und bleibt im Embryo im Gegensatz zur Maus bis zum Blastozystenstadium bestehen (Brevini *et al.*, 2004). Das *ZAR1*-Level ist in allen Entwicklungsstadien konstant, steigt jedoch im 4-Zellstadium vor der Aktivierung des embryonalen Genoms deutlich an (Brevini *et al.*, 2004). *ZAR1*<sup>-/-</sup>-Knockout bei befruchteten weiblichen Mäusen bewirkt eine Arretierung der Zygote nach der DNA-Synthese im 1-Zellstadium und verhindert so die Vereinigung der parentalen Vorkerne (Wu *et al.*, 2003). Damit spielt dieses Gen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und der Reprogrammierung des embryonalen Genoms.

### **1.4. *In vitro*-Maturation von Eizellen**

Unter *in vitro*-Maturation (IVM) versteht man die unter Laborbedingungen stattfindende extrakorporale Reifung einer immaturren Eizelle vom Stadium des Germinalen Vesikels im Prophase I-Arrest zur befruchtungsfähigen Metaphase II-Oozyte. Erstmals gelang die Fertilisierung einer humanen *in vitro* gereiften Eizelle im Jahre 1969 (Edwards *et al.*, 1969). Jedoch erst 1991 konnte eine Schwangerschaft erfolgreich nach IVM von unreifen folliculären Oozyten aus entnommenem ovariellem Gewebe erzielt werden (Cha *et al.*, 1991). Drei Jahre später erfolgte die erste Schwangerschaft einer Frau mit polyzystischem Ovar durch Befruchtung einer *in vitro*-maturierten Eizelle, die zuvor durch transvaginale Follikelpunktion isoliert wurde (Trounson *et al.*, 1994). Seit 2005 wird die IVM auch in Deutschland an den universitären Frauenkliniken Heidelberg und Lübeck angewendet (Diedrich *et al.*, 2013).

#### **1.4.1. Chancen und Schwierigkeiten der IVM zur humanen Reproduktion**

Die Reifung humaner Oozyten für die künstliche Befruchtung (IVF oder ICSI) findet zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch fast ausschließlich *in vivo* durch hormonelle Stimulation des Follikelwachstums und transvaginale Punktion statt, durch welche ca. 5 bis 15 Oozyten gewonnen werden können (Diedrich *et al.*, 2013). Die Entwicklungskompetenz der Eizellen kann jedoch aufgrund des durch das supraphysiologische Hormonlevel oftmals vorzeitig hervorgerufenen LH-Peaks herabgesetzt sein, wodurch die Eizellen nicht völlig ausgereift sind (Loumaye, 1990). Zudem stellt sich die hormonelle Stimulation sehr kostenintensiv dar, da sowohl die Medikamente als auch die medizinische Überwachung über den gesamten

Behandlungszeitraum von 3-5 Wochen sehr teuer sind. Einer der Vorteile einer IVM von humanen Eizellen wäre somit zum Einen die enorme Kostensenkung der Eizellgewinnung. Zum Anderen könnten die negativen gesundheitlichen Effekte der intensiven Hormonstimulation wie dem ovariellen Überstimulationssyndrom (OHSS) umgangen oder minimiert werden. Dies ist insbesondere wichtig für Patientinnen mit dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS), welche im Zuge der Kinderwunschbehandlung besonders häufig und schwer von einem OHSS betroffen sind und daher die Hauptindikationsgruppe für IVM darstellen (Smitz *et al.*, 2010; Fadini *et al.*, 2013). Gleichzeitig erweitert die IVM den Pool an verfügbaren Eizellen für ARTs, so dass auch im Falle von fehlgeschlagenen IVF-Versuchen genügend Oozyten für Folgezyklen vorhanden sind. Weitere Indikationen zur Durchführung einer IVM sind eine bestehende hochgradige Überstimulation durch die hormonelle Behandlung vor IVF oder ICSI sowie seltener eine idiopathische Infertilität oder ein Nichtansprechen auf die hormonelle Eierstockstimulation („Non-/Low-Responder“; Diedrich *et al.*, 2013; Fadini *et al.*, 2013). In Kombination mit einer Kryokonservierung des ovariellen Gewebes oder einzelner Eizellen eröffnen sich zudem neue Möglichkeiten zum Erhalt der weiblichen Fertilität beispielsweise im Falle von drohendem Fruchtbarkeitsverlust durch eine anstehende zytotoxische Chemo- oder Strahlentherapie im Zuge einer Krebsbehandlung, die auch junge Mädchen vor der Geschlechtsreife betreffen können (Nisker *et al.*, 2006; Smitz *et al.*, 2010).

Trotz der vielversprechenden Möglichkeiten hat sich die IVM bei der Mehrheit der europäischen und amerikanischen Infertilitätszentren noch nicht als Methode etablieren können (Fadini *et al.*, 2013), da die Schwangerschaftsraten (ca. 20%) im Vergleich zur hormonellen Standardmethode (ca. 50%) sehr niedrig sind (Gremeau *et al.*, 2012; Diedrich *et al.*, 2013). Bislang wurden erst um die 2500 Kinder nach IVM geboren (Fadini *et al.*, 2013). Die Gründe für die niedrige Effizienz der IVM sind noch weitgehend unklar. Eine mögliche Ursache könnte das Ausbleiben der Ovulation und das Fehlen des *Corpus luteums* sein, welcher die Frühschwangerschaft aufrechterhält. Durch den resultierenden Mangel an Progesteron kann die Endometriumsproliferation unzureichend und damit die Implantation der IVM-Blastozysten erschwert sein. Aus diesem Grund ist nach der Oozytenpunktion eine hormonelle Vorbereitung des Endometriums mit Östrogenen und Progesteron parallel zur IVM angezeigt (zusammengefasst bei Diedrich *et al.*, 2013). In der Praxis lässt sich bislang bei der Auswahl der gereiften Eizellen für IVF oder ICSI die Entwicklungskompetenz der IVM-Eizellen nur anhand morphologischer Kriterien erahnen. Reife, entwicklungskompetente

Eizellen haben den ersten Polkörper extrudiert und weisen in der Regel einen kompakten, mehrschichtigen Kumulus-Oozyten-Komplex (KOK), einen Mindestoozytendurchmesser (Rind:  $\geq 115 \mu\text{m}$ ) und einen möglichst großen Follikel auf (Wrenzycki *et al.*, 2007).

### 1.4.2. Stand der IVM bei Tiermodellen

Im Unterschied zur humanen AR ist die IVM von Rinderoozyten ein wesentlicher Bestandteil der gängigen IVP-Protokolle. Dennoch ist die IVM-Erfolgsrate auch beim Rind ähnlich gering, nur etwa 30% der *in vitro* gereiften Eizellen erreichen das Blastozystenstadium. Die IVF von *in vivo* gereiften Eizellen erzielt zum Vergleich Blastozystenraten von bis zu 60% (Rizos *et al.*, 2002; Wrenzycki *et al.*, 2007). Während bei Mäusen die Zucht von Nachkommen durch *in vitro*-Kultur und IVM von Primordialfollikeln schon vor fast 20 Jahren erfolgreich gelungen ist (Eppig und O'Brien, 1996), bedarf es bei Rind und Mensch einer Mindestfollikelgröße zur IVM (Menezo und Herubel, 2002). Verschiedene Studien beim Rind (Eckert *et al.*, 1998; Knijn *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2006; Wrenzycki *et al.*, 2007) und an der Maus (van de Sandt *et al.*, 1990) zeigten außerdem, dass auch das Maturationsmedium, seine Zusätze und die *in vitro*-Bedingungen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit des Embryos und die physiologische Expression oozytenspezifischer mRNA-Transkripte nimmt. IVM von bovinen Eizellen erfolgt normalerweise in einer 20%-igen Sauerstoffatmosphäre. Dies ist deutlich höher als die Sauerstoffkonzentration in der physiologischen Mikroumgebung im KOK *in vivo* (4-14%; Redding *et al.*, 2006) und kann daher zu einer übermäßigen Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen in der *in vitro* gereiften Eizelle führen (Kruip *et al.*, 2000), was wiederum in einer höheren Stressanfälligkeit resultiert (Redding *et al.*, 2006; de Castro und Hansen, 2007). Unter niedriger Sauerstoffzufuhr hingegen ist die ATP-Produktion aufgrund der Hemmung der mitochondrialen Atmung und dem Übergang zur anaeroben Glykolyse reduziert, so dass die Glukosekonzentration im Medium erhöht werden sollte, um eine Glukoseauszehrung zu vermeiden (Hashimoto *et al.*, 2000; Oyamada und Fukui, 2004). Das Ausmaß des Sauerstoffeinflusses auf die Entwicklungskompetenz nach IVM ist letztlich selbst abhängig vom Medium und seinen Zusätzen (Hashimoto, 2009).



### **1.4.3. IVM und Imprinting**

Bislang fehlen infolge der niedrigen Zahl an IVM-Kindern Langzeitstudien zu möglichen Beeinträchtigungen der Kindesgesundheit und -entwicklung durch die IVM. Alle bisherigen Studien mit geringen Fallzahlen fanden keine Hinweise auf ein erhöhtes Fehlbildungsrisiko oder neurophysiologische Schädigungen (zusammengefasst bei Diedrich *et al.*, 2013). Denkbar sind jedoch Störungen der Genomreprogrammierung in der Eizelle durch die IVM, da sich die genspezifische Etablierung der Imprints postnatal über den gesamten Zeitraum vom Germinalen Vesikel bis zur reifen MII-Eizelle erstreckt (vgl. Kap. 1.1.4.). Möglich ist auch eine Störung der zweiten Genomreprogrammierungswelle, welche unmittelbar nach der Befruchtung stattfindet und die abhängig von den während des Maturationsprozesses angereicherten oozytenspezifischen Faktoren ist. Hinweise auf Reprogrammierungsfehler durch *in vitro*-Maßnahmen gibt es aus Tierexperimenten am Rind. Es konnten Unterschiede im Methylierungsprofil von verschiedenen erzeugten Embryonen (*in vitro*, *in vivo* oder SCNT) gezeigt werden, zu deren IVP auch IVM eingesetzt wurde (Lucifero *et al.*, 2006; Curchoe *et al.*, 2009; Niemann *et al.*, 2010). Ebenfalls unterscheidet sich die mRNA-Expression signifikant zwischen *in vivo* und *in vitro* (IVM + Embryokultur) erzeugten Embryonen (Wrenzycki *et al.*, 2007), was möglicherweise auf Methylierungsfehler zurückführbar sein könnte. So ist nicht auszuschließen, dass beispielsweise die beschleunigte Kinetik der IVM die Etablierung von Imprints beeinträchtigen könnte (Anckaert *et al.*, 2013). Fehler der Genomreprogrammierung könnten sodann für die niedrige Erfolgsrate der IVM verantwortlich sein oder aber auch die Inzidenz seltener Imprintingerkrankungen bei durch IVM gezeugten Nachkommen erhöhen.

### **1.5. Das Hausrind (*Bos taurus*) als Modellorganismus der humanen Reproduktion**

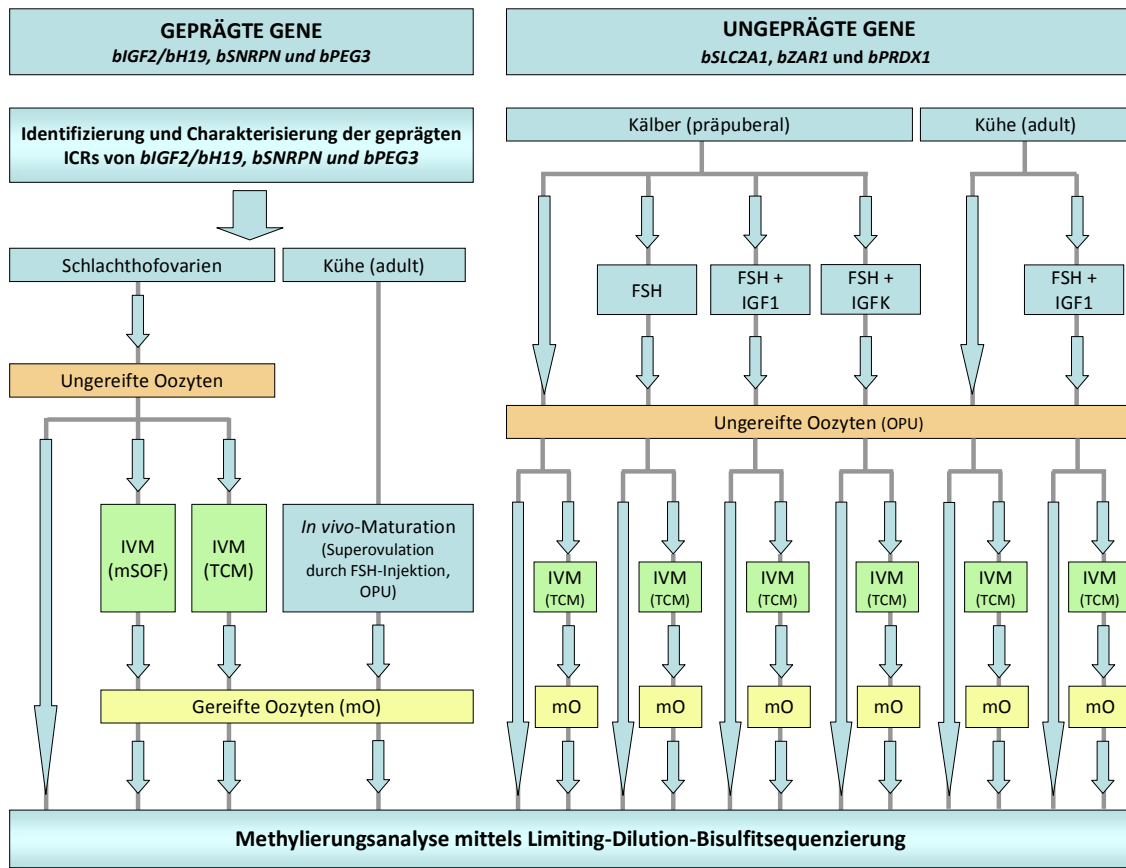
Das Studium der menschlichen Fortpflanzung und der epigenetischen Veränderungen in den Keimzellen und Embryonen im Verlauf einer assistierten Reproduktion ist ethisch und rechtlich stark reglementiert und limitiert, in Deutschland in Form des im Jahr 2011 novellierten Embryonenschutzgesetzes von 1990 (ESchG, 1990). Abgesehen von der strengen Gesetzgebung gestaltet sich auch die Verfügbarkeit von humanen Oozyten für Forschungszwecke sehr schwierig, da gegen eine Eizellspende neben ethisch-moralischen Bedenken auch gesundheitliche Risiken (ovarielles Überstimulationssyndrom) eine Rolle spielen. Das Studium der Fortpflanzung beim Hausrind als Modellorganismus der humanen

Reproduktion bietet dagegen den großen Vorteil, dass die Methoden der *in vitro*-Produktion (IVP) beim Rind (*Bos taurus*, BTA) weit fortgeschritten sind. Die Verfügbarkeit von bovinen Oozyten ist kein limitierender Faktor, da diese durch IVM von unreifen Eizellen aus Schlachthofovarien gewonnen werden können. Ebenso können *in vivo* entwickelte Blastozysten leicht durch einen nicht-chirurgischen Eingriff aus dem Uterus gespült werden. Im Gegensatz zur Maus stellt das Rind daher einen in vielerlei Hinsicht geeigneten Modellorganismus für die menschliche Reproduktion dar. Wie der Mensch (*Homo sapiens*, HSA) ist BTA bis auf wenige Ausnahmen monoovulatorisch und damit unipar, das heißt oder mit nur einem Nachkommen pro Geburt einzelgebärend. Die Tragezeit beträgt wie beim Menschen neun Kalendermonate (283 Tage; zum Vergleich: 21 Tage bei Mäusen). Auch im Hinblick auf die bovine Keimzell- und Präimplantationsentwicklung erweist sich das Rind als das besser geeignete Modell als die Maus (Menezo und Herubel, 2002; Wrenzycki *et al.*, 2005). So haben Mensch und Rind eine ähnliche Zellteilungsrate in der Präimplantationsentwicklung, welche langsamer ist als die von Mäusen. Des Weiteren ist das für die Maturation der Eizellen und den Übergang zum Embryonalstadium (MET) notwendige maternale Transkriptom zwischen Mensch und Rind evolutionär stärker konserviert als zwischen Maus und Mensch (Sylvestre *et al.*, 2013). Die Endstadien der Oozytenreifung unterliegen bei BTA und HSA einer präzisen Regulation gekennzeichnet durch feinabgestimmte mRNA-Polyadenylierungsprozesse und es bedarf anders als bei der Maus einer Mindestfollikelgröße, damit die Maturation auch *in vitro* abgeschlossen werden kann (Menezo und Herubel, 2002). Hingegen konnten bemerkenswerterweise murine Eizellen aus primordialen und präantralen Follikeln erfolgreich *in vitro* gereift, befruchtet und ausgetragen werden. Menschliche und bovine Präimplantationsembryonen weisen außerdem Ähnlichkeiten in Biochemie und ihren intrinsischen Faktoren zur maternalen und paternalen Regulation auf (Menezo und Herubel, 2002). Schließlich machen auch die im Kap. 1.2.3. beschriebenen großen symptomatischen Gemeinsamkeiten vom LOS bei Rindern mit dem humanen BWS das Rind zu einem interessanten Modellorganismus zum Studium ART-bedingter Erkrankungen und Effekte.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der guten Etablierung und Verfügbarkeit der ARTs beim Rind, zeigen sich wie beim Menschen Schwierigkeiten bei der *in vitro*-Maturation (IVM) von Eizellen, die die Weiterentwicklung der Methoden auch im Hinblick auf eine Verbesserung der assistierten humanen Reproduktion limitieren (Rodriguez-Martinez, 2012). Da bereits in früheren Studien Einflüsse assistierter Reproduktionstechniken auf die Epigenetik und Genese von Imprintingkrankungen festgestellt wurden, liegt der Verdacht nahe, dass die niedrige Effizienz der IVM auf eine Beeinträchtigung epigenetischer Profile zurückzuführen sein könnte (Kap. 1.4. und 1.4.3.). Aufgrund der Restriktionen im Umgang mit humanen Eizellen und Embryonen sowie aufgrund der in Kapitel 1.5 dargelegten Parallelen von *Bos taurus* und *Homo sapiens* hinsichtlich ihrer Reproduktionsabläufe und -biochemie, sollte daher in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der IVM auf die DNA-Methylierung anhand des bovinen Modells vorgenommen werden. Der Versuchsaufbau der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist im Flussdiagramm von Abb. 1.7 dargestellt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener IVM-Medien auf die DMRs dreier geprägter Loci (*SNRPN*, *PEG3* und *IGF2/H19*) untersucht. Zu diesem Zwecke mussten zunächst die beim Rind weitgehend uncharakterisierten DMRs identifiziert und hinsichtlich ihrer differentiellen DNA-Methylierung vordefiniert werden. Die Identifikation und Charakterisierung dieser drei DMRs erlaubte dann den epigenetischen Vergleich unreifer Eizellen aus Tertiärfollikeln mit *in vivo*- und *in vitro*-gereiften bovinen Eizellen. Dabei wurden zwei verschiedene IVM-Systeme mit unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit miteinander verglichen, das kommerzielle Tissue Culture Medium 199 (TCM; ca. 20% O<sub>2</sub>) und das modifizierte Synthetic Oviduct Fluid (mSOF; 5% O<sub>2</sub>). Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Rolle des Oozytenalters (aus präpuberalen und geschlechtsreifen Kühen) sowie der Einfluss Follikelwachstum-stimulierender Hormone (FSH, IGF1) untersucht. Dazu wurden die Promotor-Methylierungsmuster der maternalen Oozytenfaktoren *SLC2A1*, *ZAR1* und *PRDX1* von unreifen und *in vitro* gereiften Eizellen aus hormonell behandelten und unbehandelten präpuberalen und adulten Tieren verglichen.



**Abb. 1.7: Flussdiagramm des dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsaufbaus.** FSH: Follikel-stimulierendes Hormon; IGF1: insulin-like growth factor 1; IGF K: Essigsäure-Kontrolle; mO: maturierte (gereifte) Oozyten; IVM: *in vitro*-Maturation; TCM: Tissue Culture Medium; mSOF: modifiziertes synthetisches Oviduktfluid; OPU: Ovum Pick-up (ultraschallgeleitete transvaginaler Follikelpunktion).



## 2. MATERIAL UND METHODEN

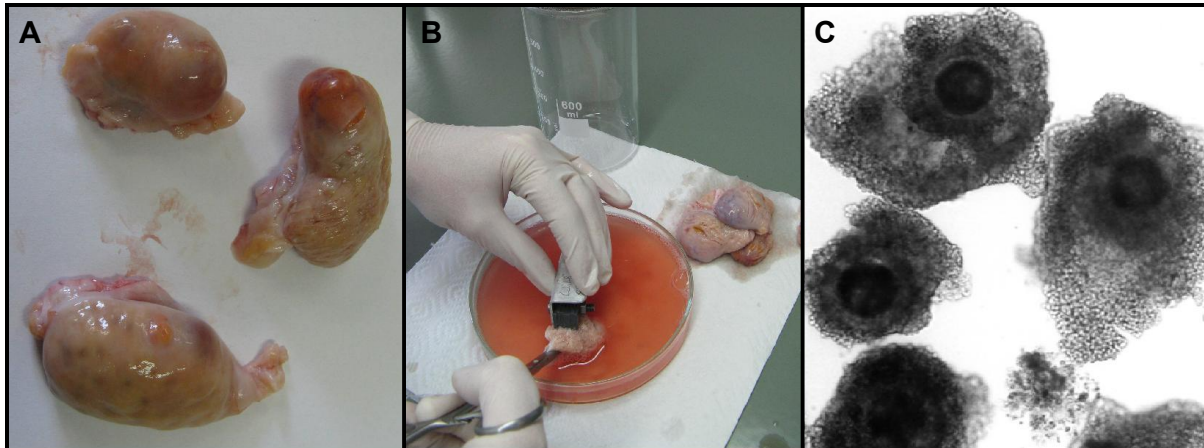
### 2.1. Biologisches Material

Das biologische Material wurde vom Friedrich-Löffler-Institut für Nutztiergenetik in Mariensee/Hannover bereitgestellt. Die Isolation, Präparation und Reifung der Eizellen sowie die Erzeugung parthenogenetischer Embryonen wurden dort von Mitarbeitern des Forschungsbereichs Biotechnologie um Prof. Dr. Heiner Niemann durchgeführt.

#### 2.1.1. Präparation unreifer Eizellen aus Tertiärfollikeln

Die bovinen Eizellen zur IVM wurden wie bereits früher beschrieben (Eckert und Niemann, 1995; Wrenzycki *et al.*, 2001) aus Schlachthofovarien präpariert und gesammelt (Abb. 2.1 A). Dazu wurden die Ovarien dreimal mit 0,9%iger, Penicillin und Streptomycin enthaltender NaCl-Lösung gewaschen. Die Komplexe aus unreifer Oozyte und ihren anhaftenden Kumuluszellen (KOKs) wurden durch vorsichtiges Schneiden („Slicen“) der Ovarien in Dulbecco's 1 x PBS-Medium (Sigma-Aldrich, München) isoliert (Abb. 2.1 B), welches mit 0,33 mM Natriumpyruvat (Sigma-Aldrich), 5,56 mM D-Glukose (Roth, Karlsruhe), 0,9 mM Kalziumchloriddihydrat (Fluka, Buchs, Schweiz), 50 µg/ml Streptomycinsulfat (AppliChem, Darmstadt), 6 µg/ml Penicillin G (AppliChem), 4 IU/l Heparin und 1 mg/ml BSA fraction V (Sigma-Aldrich) versetzt war. Die KOKs wurden unter einem Stereomikroskop bei 50 x Vergrößerung betrachtet und entsprechend ihrer Morphologie ausgewählt. Als entwicklungsfähig wurden solche KOKs beurteilt, welche ein homogenes, gleichmäßig granuliertes Zytoplasma und kompakte Kumuluszelllagen (KOKs der Klasse I-II nach Looney *et al.*, 1994; Goodhand *et al.*, 1999) aufwiesen (Abb. 2.1 C). Die KOKs wurden einem Hyaluronidaseverdau unterzogen. Dazu wurden sie für 5 min bei 39 °C in 1 x PBS mit 1 mg/ml BSA fraction V und 0,1% Hyaluronidase (aus Rinderhoden; Sigma-Aldrich) inkubiert und anschließend für 5 min bei 1.400 rpm gevortext. Verbliebene, anhaftende Kumuluszellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren entfernt. Die unreifen Eizellen wurden zunächst dreimal in TCM-air pH 7,2 bestehend aus TCM199 (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml Gentamycinsulfat (Sigma-Aldrich), 0,2 mM Natriumpyruvat, 4,2 mM Natriumhydrogencarbonat (Roth) und 1 mg/ml BSA-FAF (Sigma-Aldrich) gewaschen. Es folgten drei weitere Waschschrte in 1 x PBS mit 0,1% Polyvinylalkohol (PVA). Anschließend wurden die Eizellen zu je 10 Stück mit einem möglichst geringen Flüssigkeitsvolumen in ein

0,2 µl- oder 0,5 µl-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Methylierungsanalyse bei -80 °C tiefgefroren. Die Oozyten wurden über einen Zeitraum von 15 Monaten gesammelt, um saisonale Effekte auszuschließen.

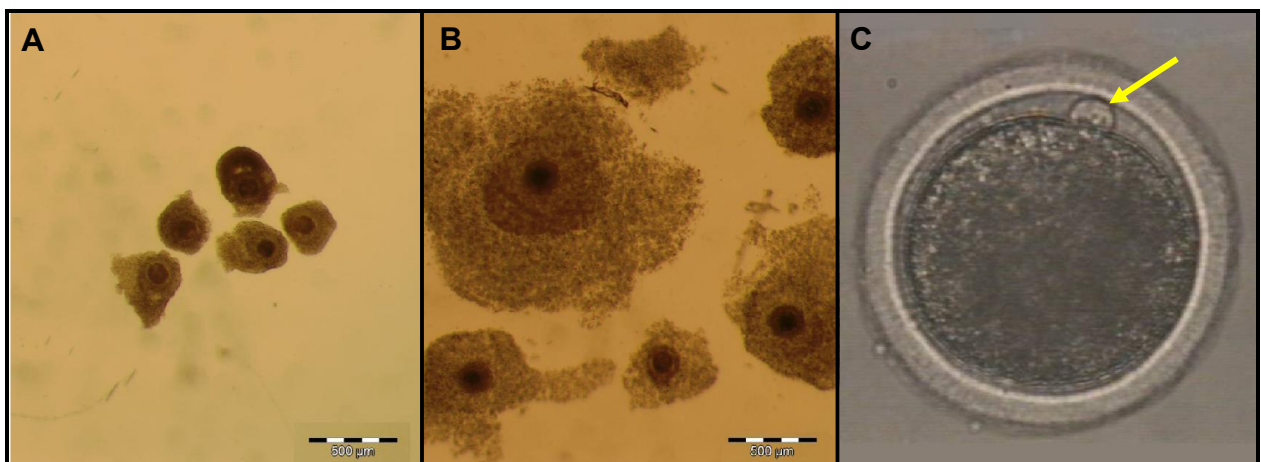


**Abb. 2.1: Präparation boviner Eizellen.** (A) Isolierte Schlachthofovarien. (B) Slicen der Ovarien mit Hilfe eines Mehrfachmessers bestehend aus 7-10 parallelen Kürschnerklingen. (C) Auswahl der Kumulus-Eizell-Komplexe unter einem Stereomikroskop.

### 2.1.2. IVM boviner Eizellen

Zur *in vitro*-Reifung wurden unreife Eizellen aus Schlachthofmaterial verwendet und die KOKs wie in Kap. 2.1.1. beschrieben aus den Ovarien präpariert (Abb. 2.2 A). Die KOKs wurden zunächst im 38 °C warmen Grundmedium TCM-air (s. Kap. 2.1.1.) gesammelt, ehe sie in die eigentlichen Reifungsmedien („TCM“ oder „mSOF“) überführt wurden. Das TCM (Tissue Culture Medium) beinhaltete TCM199 (pH 7,4), 0,2 mM Natriumpyruvat, 25 mM Natriumhydrogencarbonat und 1 mg/ml BSA-FAF. Das alternative Medium mSOF (modifiziertes synthetisches Oviduktfluid) enthielt neben 4 mg/ml BSA-FAF (SOFAa, Wrenzycki *et al.*, 2001) 1 mM L-Glutamin (Applichem) und 10 mM D-Glukose (Roth). Beiden Medien wurden 10 IU/ml equines Choriongonadotropin (PMSG) und 5 IU/ml humanes Choriongonadotropin (Suigonan<sup>®</sup>, Intervet, Unterschleißheim) zugesetzt. KOKs, die zur Reifung im mSOF-Medium bestimmt waren, wurden kurz in SOFAa voräquiliбриert. Jeweils 15 KOKs wurden in einem 100 µl-Tropfen des jeweiligen Mediums unter Silikonöl (Serva, Heidelberg) in einem Inkubator bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 24 h gereift. Bei Reifung im mSOF-Medium wurde außerdem der O<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre auf 5% gesenkt. Die im Verlauf der Reifung expandierten KOKs (Abb. 2.2 B) wurden nach 24 h wie in Kap. 2.1.1. beschrieben einer Hyaluronidasebehandlung unterzogen, um die

anhaftenden Kumuluszellen von den Oozyten abzulösen. Der Ausschluss des ersten Polkörperchens wurde als Zeichen der erfolgreichen Reifung gewertet (Abb. 2.2 C). Nach der Inkubation mit Hyaluronidase wurden die in TCM gereiften Eizellen zunächst dreimal in TCM-air, die in mSOF gereiften dagegen in 1 x PBS mit 1% New Born Calf Serum (NBCS, PAA Laboratories GmbH, Coelbe) gewaschen. Abschließend wurden die Eizellen dreimal mit 1 x PBS/ 0,1% Polyvinylalkohol (PVA) gewaschen und zu je 10 Stück wie unter Kap. 2.1.1. beschrieben bis zur Methylierungsanalyse bei -80 °C eingefroren.



**Abb. 2.2: Morphologie der Kumulus-Eizell-Komplexe vor und nach IVM. (A)** Ungereifte Eizelle mit kompaktem Kumuluszellverbund. **(B)** Expandierter Kumulus einer gereiften Oozyte nach 24 h IVM. **(C)** Entkumulierte, reife Eizelle mit extrudiertem Polkörper (gelber Pfeil) nach Hyaluronidase-Behandlung.

### 2.1.3. *In vivo*-Reifung boviner Eizellen

Die *in vivo*-gereiften Eizellen wurden aus 26 Holstein-Friesian-Kühen mittels ultraschallgeleiteter transvaginaler Follikelpunktion (ultrasound guided ovum pick up, OPU) gewonnen (Oropeza *et al.*, 2004; Zaraza *et al.*, 2010). Dazu wurden die Kühe zunächst im Behandlungsstand fixiert, anästhesiert und der dominante Follikel zwischen Tag 9 und 14 des aktuellen östrischen Zyklus transvaginal punktiert. Anschließend wurden die Tiere durch mehrmalige Injektion von FSH (Stimufol<sup>®</sup>, bereitgestellt durch J.F. Beckers, Universität Liege, Belgien) superovuliert. Die Injektionen in die Sitzbeinmuskulatur erfolgten 50 h, 74 h, 98 h und 122 h nach Punktion des dominanten Follikels. Zur Luteolyse (Abbau des Gelbkörpers) wurde Prostaglandin F<sub>2α</sub> (Estrumate<sup>®</sup>, Intervet) 106 und 146 h nach Beginn der Behandlung gespritzt. 40 h nach der ersten Prostaglandin-Injektion wurde Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH, Receptal<sup>®</sup>, Intervet) intravenös verabreicht. Die OPU der gewachsenen Follikel konnte 20 h nach GnRH-Injektion durchgeführt werden (Bordignon *et al.*, 1997; van



de Leemput *et al.*, 1999; Rizos *et al.*, 2002). Die KOKs wurden durch Filtration (Porengröße 50 µm) von der Punktionsflüssigkeit getrennt und dreimal mit einer Lösung aus 1 x PBS, 1% New Born Calf Serum und 0,05 g/l Na-Heparin gewaschen. Es folgte eine Hyaluronidase-Behandlung und anschließende Aufreinigung entsprechend dem Protokoll aus Kap. 2.1.1. Oozyten mit extrudiertem Polkörper wurden zu je 10 Stück bei -80 °C eingefroren.

#### **2.1.4. Eizellen aus hormonell stimulierten präpuberalen und adulten Spendertieren**

Neben dem Vergleich von unreifen, *in vitro*-gereiften und *in vivo*-gereiften Eizellen aus Tertiärfollikeln wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem der Einfluss Follikelwachstumsstimulierender Hormone auf bestimmte Methylierungsmuster bei präpuberalen und adulten Tieren untersucht. Dazu wurden unreife Eizellen mittels OPU aus insgesamt 105 präpuberalen Kälbern zwischen sechs und neun Monaten sowie aus 43 adulten Kühen aus der Versuchsherde des Mariensee-Instituts gewonnen. Alle Tiere wurden vorab gynäkologisch untersucht, so dass nur gesunde Tiere mit adäquat entwickeltem Reproduktionstrakt in die Studie eingeschlossen wurden.

Die Kälber wurden nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen eingeteilt. Während die Kälber der Gruppe 1 keine hormonelle Behandlung erhielten, wurde allen Tieren der übrigen drei Gruppen 48 h vor jeder OPU-Sitzung 65 µg FSH (Stimufol<sup>®</sup>) intramuskulär injiziert, wodurch das Follikelwachstum angeregt wurde. Gruppe 3 erhielt zusätzlich intraovarielle Injektionen von 6 µg in Essigsäure gelöstem rhIGF1 (R&D Systems, Wiesbaden) an zwei verschiedenen Stellen jedes Ovars. Gruppe 4 diente als Lösungsmittelkontrolle zu Gruppe 3, indem anstatt rhIGF1 nur 0,01 M Essigsäure injiziert wurde. Die adulten Kühe wurden hingegen in zwei Gruppen, einer unbehandelten Kontroll- und einer mit 100 µg FSH behandelten Versuchsgruppe eingeteilt. Die intramuskuläre Gabe des FSH (Stimufol<sup>®</sup>) erfolgte wie bei den Kälbern jeweils 48 h vor jeder OPU. Die Versuche begannen vier Tage nach der Punktion des dominanten Follikels und liefen über einen Zeitraum von jeweils 3 Wochen mit OPU-Intervallen von 3-4 Tagen (Zaraza *et al.*, 2010). Die OPUs der 5-17 mm großen Follikel wurden wie unter Kap. 2.1.3. beschrieben durchgeführt. Die genauen technischen Details und die Methodik der OPU sind in der Dissertationsarbeit von Mike Diederich, 2011, nachzulesen. Eine Übersicht über die sechs verschiedenen Versuchsgruppen ist in Tab. 2.1 gegeben.

Die nach der OPU gefilterten und gewaschenen KOKs wurden unter einem Stereomikroskop mit 50-facher Vergrößerung entsprechend Looney *et al.* (1994) und Goodhand *et al.* (1999)

klassifiziert. KOKs der Klasse I und II wurden in 50 µl-Tropfen TCM-air-Medium gesammelt. Ein Teil der KOKs wurde wie in Kap. 2.1.1. beschrieben direkt einer Hyaluronidasebehandlung zum Entfernen der Kumuluszellen unterzogen, gefolgt von je dreimaligem Waschen in TCM-air und PBS/PVA. Je zehn entkumulierte, ungeriffte Eizellen einer Versuchsgruppe wurden gepoolt und bis zur Methylierungsanalyse bei -80 °C gelagert. Der andere Teil der KOKs wurde entsprechend dem Protokoll aus Kap. 2.1.2. einer IVM in TCM-Reifungsmedium unterzogen, so dass sich die in Tab. 2.1 dargestellten sechs Versuchsgruppen noch einmal in „ungeriff“ und „*in vitro*-geriff“ unterteilen und folglich insgesamt zwölf Versuchsgruppen bilden.

**Tab. 2.1: Überblick über das experimentelle Design und die Versuchsgruppen zur hormonellen Stimulation präpuberaler und adulter Follikel.**

Gruppe*	Kontrolle	FSH	FSH + IGF1	FSH + IGF K**
Kalb (Alter: 6-9 Monate)	+	+	+	+
Kuh (≥ 2. Laktation)	+	+	-	-

\* Von jeder der sechs Versuchsgruppen wurden jeweils ungeriffte und *in vitro*-geriffte Eizellen untersucht.

\*\* IGF K = Essigsäure-Kontrolle

### 2.1.5. Parthenogenetische Rinderembryonen

Parthenogenetische Embryonen wurden durch chemische Aktivierung von unbefruchteten Rindereizellen (Tertiärfollikelstadium) erzeugt (Wrenzycki *et al.*, 2002). Die aus Schlachthof-ovarien gewonnenen Oozyten (vgl. Kap. 2.1.1.) wurden dazu 22-25 h bei 39 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre *in vitro* gereift. Das Reifungsmedium hatte folgende Zusammensetzung: TCM199-Medium (Sigma-Aldrich, München), pH = 7.4, 0,2 mM Natriumpyruvat, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mg/ml BSA-FAF (Sigma-Aldrich), 10 IU/ml PMSG und 5 IU/ml humanes Choriongonadotropin (Suigonan<sup>®</sup>, Intervet). Anschließend wurden anhaftende Kumuluszellen entfernt, indem die Oozyten in Kalzium- und Magnesium-freiem PBS mit 0,1%iger Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) für 2 min bei 39 °C inkubiert wurden. Die chemische Aktivierung erfolgte für 5 min in TCM199-Medium mit 5 µM Ionomycin (Sigma-Aldrich), gefolgt von einer 3-4stündigen Inkubation bei 37 °C in 2 mM 6-Dimethylaminopyridin (6-DMAP; Sigma-Aldrich). Die aktivierten Oozyten wurden acht Tage in synthetischem Oviduktfluid mit 4 mg/ml BSA-FAF kultiviert (SOFAa, Wrenzycki *et al.*, 2001). Innerhalb dieses

Zeitraumes entwickelten sich expandierte oder bereits aus der *Zona pellucida* schlüpfende Blastozysten bestehend aus ca. 100 Zellen. Eine längere Kultur hingegen führte zum Absterben. Die Embryonen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

### 2.1.6. Gewebeproben und Spermien

Das Plazentagewebe wurde infolge einer natürlichen Geburt eines durch künstliche Befruchtung gezeugten Holstein-Friesian-Kalbes gewonnen. Das Gewebe wurde in erbsengroße Stücke geschnitten und bis zur Verwendung in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -80 °C tiefgefroren. Die viszerale Gewebe (Herz, Leber und Niere) stammten von unterschiedlichen Tieren und wurden aus Schlachtabfällen eines örtlichen Schlachthofs bezogen. Auch diese wurden portionsweise in 50 ml-Falcons bei -80 °C gelagert.

Das Rindersperma stammte von einem Zuchtbullen, der häufig zur künstlichen Besamung eingesetzt wurde. Es wurde bis zur Verwendung in dünnen langen Plastikhalmen, den sogenannten „Straws“ (engl. Strohalm), bei -80 °C tiefgefroren. Jeder Straw fasste 200 µl Ejakulat, welches mit einem Tris-Eidotter-Verdüner gepuffert war und insgesamt ca. 20 Millionen Spermien enthielt.

## 2.2. Puffer und Medien

Alle für diese Arbeit hergestellten Puffer und Medien sind im Folgenden alphabetisch gelistet. In den Spalten „Zusammensetzungen“ und „Hinweise zur Bereitung und Lagerung“ sind die Endkonzentrationen durch einen vorangehenden Folgepfeil gekennzeichnet.

<u>Puffername</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hinweise zur Bereitung und Lagerung</u>
Ammonium-Puffer (10 x) (100 ml) (für Puffer B)	100 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,8 (→ 750 mM) 3,52 g Ammoniumsulfat (→ 200 mM) 133,33 µl Tween20 (→ 0,1%) Aqua dest. ad 100 ml	TRIS-HCl-Volumen genau einwiegen (Feinwaage) autoklavieren 4 ml Aliquots in 50 ml-Falcons Lagerung: -20 °C

<u>Puffername</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hinweise zur Bereitung und Lagerung</u>
LB-Medium (1 L)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl Aqua dest. ad 1 L pH 7,0-7,5 mit 1 N NaOH	autoklavieren 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) dazugeben → 50 mg/l Lagerung: 4 °C
LB-Agar für Blau-Weiß- Selektion (500 ml)	5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 7,5 g Bactoagar Aqua dest. ad 500 ml pH 7,0-7,5 mit 1 N NaOH	autoklavieren → Vor dem Aushärten Zugabe von: 500 µl Ampicillin (50 mg/ml) (→ 50 mg/l) 700 µl X-Gal (60 mg/ml → 84 mg/l) 100 µl IPTG (60 mg/ml → 12 mg/l) Ca. 15-20 ml Agarmedium/Petrischale Lagerung in sterilen Folien: 4 °C
NaCl (5 M) (500 ml)	146,1 g NaCl Aqua dest. ad 450 ml → lösen Aqua dest. ad 500 ml	Lagerung: RT
NaOH (0,2 M) (1 L)	8 g NaOH-Plätzchen Aqua dest. ad 1 L → lösen	Lagerung: RT
SOC-Medium (100 ml)	2 g Trypton 0,5 g Hefeextrakt 0,06 g NaCl (→ 10 mM) 0,02 g KCl (→ 2,5 mM) 0,5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> (→ 10 mM) 0,12 g MgSO <sub>4</sub> (→ 10mM) Aqua dest. ad 100 ml	autoklavieren → Zugabe von: 0,36 g Glucose (→ 10 mM) Lagerung als 2 ml Aliquots bei -20 °C
TAE (50 x) (1 L)	242 g TRIS 57,1 ml reine Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 Aqua dest. ad 1 L	autoklavieren Lagerung: RT Verwendung als 1 x TAE: 200 ml TAE (50 x) + 9800 ml Aqua dest.

<u>Puffername</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hinweise zur Bereitung und Lagerung</u>
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0 oder 8,8 (1 L)	12,11 g TRIS Aqua dest. ad 70 ml → lösen konzentrierte HCl bis pH 8,8 oder 8,0 Aqua dest. ad 100 ml	autoklavieren Lagerung: RT
Puffer B (33,28 ml)	4 ml 10 x Ammonium-Puffer (→ 1,2 x) je 80 µl 100 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP → jeweils 240 µM) 8 ml 10 x PCRx Enhancer Solution (→ 2,4 x) 1,76 ml 50 mM MgSO <sub>4</sub> (→ 0,26 mM) 19,2 ml Reinstwasser	Die genauen Mengen des Ammonium-Puffers und des Reinstwassers mit Feinwaage einwiegen! Aliquotieren (jeweils 1,5 ml) Lagerung: -20 °C
Puffer X (10 ml) (Isolation der Spermien-DNA)	1 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,0 (→ 100 mM) 200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (→ 10 mM) 1 ml 5 M NaCl (→ 500 mM) 1 ml 10% SDS (→ 1%) 200 µl β-Mercaptoethanol (→ 2%) Aqua dest. ad 10 ml	Lagerung: 4 °C
Waschpuffer (1 L) (Pyro- sequenzierung)	1,21 g TRIS (→ 10 mM) Aqua dest. ad 1 L 4 M Essigsäure bis pH 7,6	Lagerung: RT

### 2.3. Kommerzielle Kits und Enzyme

Im Folgenden sind alle verwendeten kommerziellen Kits und Enzyme sowie ihre Bezugsquellen alphabetisch aufgelistet. Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich um den jeweiligen Firmensitz in Deutschland.

Produkt	Firma	Sitz
BigDye <sup>®</sup> v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems/ Life Technologies	Darmstadt
CEQ <sup>™</sup> DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter	Krefeld
CleanDTR Magnetic Beads	GCbiotech	Alphen aan den Rijn, Niederlande
DNeasy <sup>®</sup> Blood and Tissue Kit	Qiagen	Hilden
100 mM dNTP Set, PCR Grade	Invitrogen/ Life Technologies	Darmstadt
EpiTect <sup>®</sup> Bisulfite Kits	Qiagen	Hilden
ExoSAP-IT <sup>®</sup>	Affymetrix	Santa Clara, CA/USA
EZ DNA Methylation-Direct <sup>™</sup> Kit	Zymo Research	Freiburg
FastStart <i>Taq</i> DNA Polymerase-System	Roche Diagnostics	Mannheim
Hi-Di <sup>™</sup> Formamide	Applied Biosystems/ Life Technologies	Darmstadt
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit	Machery-Nagel	Düren
PCRx Enhancer System (10 x PCRx Enhancer Solution + 50 mM MgSO <sub>4</sub> )	Invitrogen/ Life Technologies	Darmstadt
pGEM <sup>®</sup> -T-Vektor Systems II	Promega	Mannheim
Platinum <sup>®</sup> - <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen/ Life Technologies	Darmstadt
PureSperm <sup>®</sup> 40/80 Kit	Nicadon	Möln dal, Schweden
PyroGold <sup>®</sup> SQA Reagent Kit	Qiagen	Hilden
SacI-HF, SacII-HF, Puffer 4	New England Biolabs	Frankfurt

## **2.4. Isolation genomischer DNA**

### **2.4.1. Spermien**

Zur Isolation der Spermien-DNA wurde ein Straw bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und dessen Inhalt durch Abschneiden beider Enden in ein 1,5 ml-fassendes Reaktionsgefäß überführt. Um die Samenflüssigkeit, abnormale spermatogene Zellen sowie mögliche Kontaminationen mit Bakterien oder somatischen Zellen zu entfernen, wurden die Spermien zunächst mit dem PureSperm<sup>®</sup> 40/80 Kit (Nicadon, Mölndal, Schweden) über Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Dazu wurden 2 ml PureSperm<sup>®</sup> 80 in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und darüber 2 ml PureSperm<sup>®</sup> 40 geschichtet. Die Samenflüssigkeit eines Straws wurde auf die zwei Schichten PureSperm<sup>®</sup> pipettiert und bei 300 x g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen Pasteurpipette entfernt. Die übrigen ca. 0,5 ml der unteren, die aufgereinigten Spermien enthaltende Phase wurden anschließend in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Spermien wurden 0,5 ml des Puffers X (Zusammensetzung s. Kap. 2.2.) dazugegeben. Nach erfolgter Zugabe von 100 µl Proteinase K fand eine vierstündige Inkubation bei 56 °C statt. Zur Unterstützung der Spermienlyse wurde die Probe gelegentlich innerhalb des Inkubationszeitraumes gevortext sowie nach den ersten zwei Stunden weitere 20 µl Proteinase K dazugegeben. Die eigentliche DNA-Isolation erfolgte mit dem DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden; s. Kap. 2.4.2.). Hierbei war zu beachten, dass der Puffer AL (400 µl) zuerst gründlich mit dem 56 °C-warmen Lysat gemischt wurde, bevor das 96-100%ige Ethanol (400 µl) dazugegeben wurde. Das gesamte Volumen wurde in mehreren Zentrifugationsschritten auf eine DNeasy<sup>®</sup> Mini Spin Säule geladen und entsprechend dem Herstellerprotokoll weiterbehandelt.

### **2.4.2. Gewebe**

Genomische DNA aus Plazenta, Herz, Niere und Leber wurde mit dem DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dazu wurden bis zu 25 mg Gewebe mit einem sterilen Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Darauf wurden 180 µl Puffer ATL sowie 20 µl Proteinase K pipettiert und gründlich gevortext. Zur vollständigen Lyse des Gewebes wurde die Probe über Nacht unter sanftem Schütteln (ca. 150 rpm) auf einem Thermomixer bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat gründlich für 15 s gevortext, je 200 µl Puffer AL und 96-100%iger Ethanol zugegeben und erneut gevortext. Das Gemisch wurde auf eine DNeasy<sup>®</sup> Mini Spin Säule pipettiert und 1 min

bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 2 ml Sammelgefäß gesetzt und mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen (1 min Zentrifugation bei 8000 rpm). Es folgte ein zweiter Waschschrift mit 500 µl Puffer AW2 unter dreiminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm zur Trocknung der Membran und Entfernung von Ethanolrückständen. Abschließend wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und die Membran mit 200 µl Puffer AE beschichtet. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde die genomische DNA durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min eluiert.

### **2.5. Polymerasekettenreaktion**

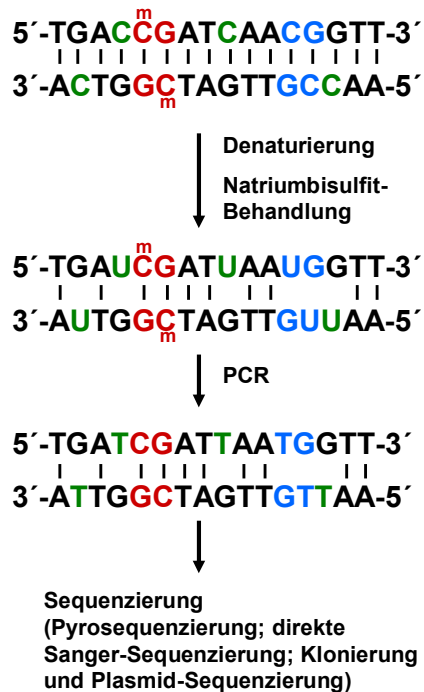
Die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs folgten einem Standardprotokoll bestehend aus einer Anfangsdenaturierung für 4-5 min, 28-35 Zyklen (30 s Denaturierung, 30 s Annealing und 45 s Elongation), sowie einer Abschlusselongation bei 72°C für 5-7 min. Wenn nicht anders vermerkt, wurde das FastStart *Taq* DNA Polymerase-System (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl 10 x PCR-Puffer/20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, jeweils 1,0 µl (10 pmol) des 100 µM Forward- und Reverse-Primers, 0,2 µl (1 U) *Taq*-Polymerase, 18,8 µl Reinstwasser und 1 µl (~100 ng) Matrizen-DNA. Für PCRs, in deren Reaktionsgemisch mehrere verschiedene Amplikons gleichzeitig vervielfältigt wurden (Multiplex-PCRs), wurde der Anteil des Wassers entsprechend um das Mehrvolumen der zusätzlichen Primer verringert. Die Primersequenzen sowie spezifischen PCR-Bedingungen sind in Kap. 2.9. aufgeführt. Alle PCRs wurden mit dem „DNA Engine Tetrad 2 Thermal Cycler“ (Bio-Rad, München) durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde mittels einem 1,5%igem Agarose-Gel in einem 1 x TRIS-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer (TAE, Zusammensetzung s. Kap. 2.2.) überprüft.

### **2.6. Natriumbisulfitbehandlung der DNA**

Die chemische Modifikation genomischer DNA mittels Natriumbisulfit (auch: Natriumhydrogensulfit, NaHSO<sub>3</sub>) ist die in der Epigenetik meist angewandte Methode zur Analyse von DNA-Methylierung. Sie führt aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität von Cytosin und 5-Methylcytosin zu einer methylierungssensitiven Änderung der Basensequenz, die durch PCR fixiert und durch Sequenzierung nachvollzogen werden kann (Abb. 2.3). Sie ist



mittlerweile integraler Teil vieler weiterer Techniken zur Analyse der DNA-Methylierung (MS-PCR, HRM, RRBS u.a.).



**Abb. 2.3: Konvertierung der Basensequenz durch Natriumbisulfitbehandlung.**

Ursprünglich methylierte CpG-Dinukleotide sind rot, unmethylierte blau und Nicht-CpG-Cytosine grün markiert. Infolge einer Hitzedenaturierung wird die DNA einzelsträngig und somit zugänglich für die chemische Veränderung durch Natriumbisulfit. Alle unmethylierten Cytosine werden durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil konvertiert. Letzteres wird bei einer Amplifikation mittels PCR durch Thymin ersetzt. Die ursprünglich komplementären DNA-Stränge sind infolge der Bisulfitkonvertierung der Sequenz nicht mehr komplementär zueinander.

Unter physiologischen Bedingungen (*in vivo*) kommt es in der Zelle mehrmals täglich zu einer spontanen Abspaltung der Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>) von der DNA-Base Cytosin, der so genannten hydrolytischen Desaminierung. Dadurch wird Cytosin zu der RNA-Base Uracil konvertiert. Ohne die Korrektur durch die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie würde das Uracil bei der nächsten DNA-Replikation mit Adenin paaren und es käme so effektiv zu einem potentiell mutagenen Basenaustausch von C zu T, einer sogenannten Transition. Durch chemische Behandlung denaturierter, genomischer DNA mit einer Natriumbisulfit-Salzlösung lässt sich *in vitro* die Konvertierung unmethylierten Cytosins zu Uracil herbeiführen. Während unter physiologischen Bedingungen auch 5-Methylcytosin spontan desaminieren kann, bleibt dieses jedoch auch nach Natriumbisulfit-Behandlung erhalten. Infolge der Konvertierung aller unmethylierten Cytosine sind der Sense- und Antisense-Strang nicht mehr komplementär zueinander, weshalb die DNA nach der Bisulfitbehandlung auch bei Raumtemperatur einzelsträngig vorliegt (Abb. 2.3).

Chemisch betrachtet katalysiert Natriumbisulfit die in wässrigem Milieu nur langsam voranschreitende hydrolytische Desaminierung unmethylierten Cytosins zu Uracil (Abb. 2.4). In einem ersten, reversiblen Sulphonierungsschritt bindet das Sulfit-Anion an das

Kohlenstoffatom 6 des Cytosins und bildet so das instabile Cytosinsulphonat-Derivat. Anschließend erfolgt aufgrund der wässrigen Umgebung eine hydrolytische Desaminierung am Kohlenstoffatom 4, bei der ein Ammoniak-Molekül abgespalten wird und durch Tautomerisierung des entstehenden Enols eine Ketogruppe hinterlässt. Im alkalischen Milieu desulphoniert das entstandene Uracilsulphonat weiter zum Uracil. Die Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) am Kohlenstoffatom 5 verhindert hingegen die Sulfonierung am Kohlenstoffatom 6. Dadurch wird die hydrolytische Desaminierung um zwei Größenordnungen verlangsamt, so dass 5-Methylcytosin auch nach mehrstündiger Inkubation mit Natriumbisulfit stabil bleibt (Hayatsu, 2008).

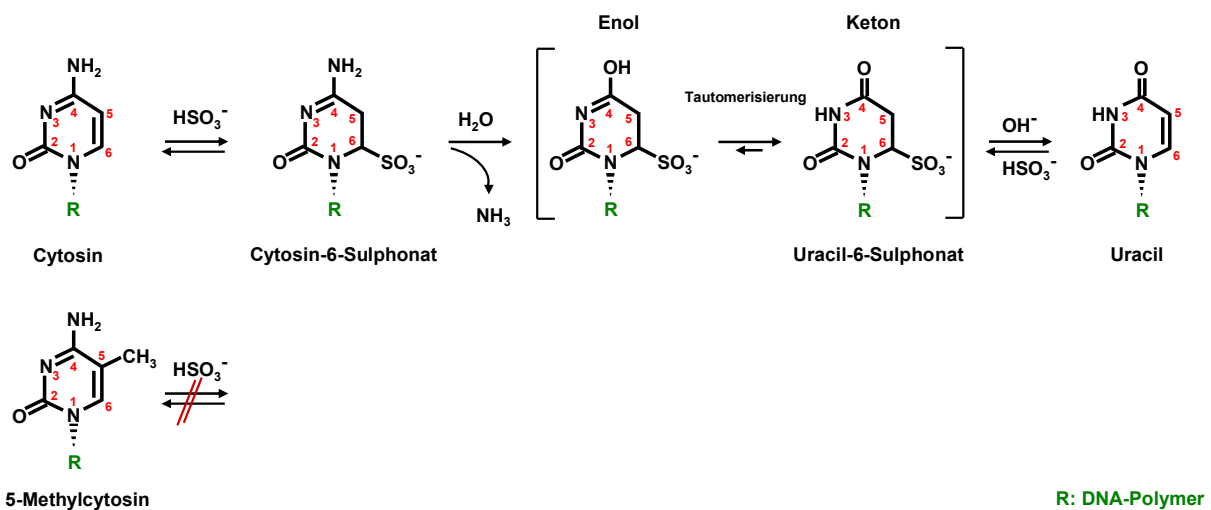


Abb. 2.4: Chemische Reaktion der Natriumbisulfit-Konvertierung der DNA (modifiziert nach Hayatsu, 2008).

### 2.6.1. Eizellen und parthenogenetische Embryonen

Zur Bisulfitkonvertierung der DNA von bovinen Eizellen und parthenogenetischen Embryonen wurde das EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research, Freiburg) verwendet, welches auch zur Behandlung von sehr geringen DNA-Mengen geeignet ist. Das Zellmaterial kann nach einem kurzem Verdau mit Proteinase K direkt konvertiert werden, so dass Verluste durch eine vorhergehende DNA-Extraktion vermieden werden können. Es wurden stets zehn Eizellen beziehungsweise ein parthenogentischer Embryo (ca. 100 Zellen) in einem 0,2 oder 0,5 ml Reaktionsgefäß aufgetaut, kurz abzentrifugiert und mit dem Reaktionsansatz bestehend aus 10 µl M-Digestion Buffer, 1 µl Proteinase K und 6-9 µl Reinstwasser auf ein Endvolumen von 20 µl beschichtet. Dabei wurden die Volumina an die

Gefäßwand pipettiert, so dass ein Verlust von Zellen über die Pipettenspitze ausgeschlossen werden konnte. Die Komponenten wurden durch ein kurzes Abzentrifugieren gemischt und der Ansatz zum Verdau für 20 min in einem Thermocycler bei 50 °C inkubiert. Zur Bisulfitkonvertierung wurden 130 µl des CT Conversion Reagents dazupipettiert, erneut durch leichtes Schnippen und kurze Zentrifugation gemischt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren und 8 min bei 98 °C gefolgt von 3,5 h bei 64 °C inkubiert. Anschließend konnte der Ansatz bis zu 20 h bei 4 °C gelagert werden, ehe die Aufreinigung erfolgen musste. Dazu wurden zunächst 300 µl des M-Binding Puffers auf eine Zymo-Spin™ IC Column vorgelegt. Mit einer speziell beschichteten und daher besonders flüssigkeitsabweisenden 200 µl-Pipettenspitze (TipOne® RPT Graduated Filter Tip Serie, Starlab, Hamburg) wurde der Reaktionsansatz auf die Säule überführt und durch Auf- und Abpipettieren mit dem M-Binding Puffer gemischt. Das leere Reaktionsgefäß wurde mit weiteren 300 µl M-Binding Puffer gewaschen, welche ebenfalls mit einer beschichteten Pipettenspitze auf die Säule überführt wurden. Auf diese Weise wurde Sorge getragen, dass die DNA-Verluste durch den Volumentransfer auf ein Minimum beschränkt blieben. Durch Zentrifugation der Säule wurde die DNA an die Membran gebunden. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Maximalgeschwindigkeit für 30 s. Das 2 ml-Auffanggefäß wurde bei Bedarf geleert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss an einen ersten Waschschrift mit 100 µl M-Wash Puffer folgte eine 15-20 minütige Inkubation der Säule bei RT mit 200 µl M-Desulphonation Puffer zur alkalischen Desulfonierung. Anschließend wurde zweimal mit 200 µl M-Wash Puffer gewaschen. Die bisulfitkonvertierte DNA wurde schließlich mit 10 µl M-Elution Puffer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert, welches ebenfalls aus einem speziellen Polymer zur Minimierung von DNA-Verlusten durch Anhaften an der Gefäßwand bestand (LoBind Serie, Eppendorf, Hamburg). Die DNA-Proben konnten bis zu 3 Monaten bei -20 °C gelagert werden.

### **2.6.2. Spermien und Gewebe**

Die Bisulfitkonvertierung der Spermien- und Gewebe-DNA wurde mit dem Standardprotokoll des EpiTect® Bisulfite Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Vorab wurden die DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben mit dem NanoDrop® 1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen) bestimmt und das benötigte Volumen, das der Einsatzmenge von etwa 1-2 µg DNA entsprach, berechnet. Der Reaktionsansatz für die Bisulfitkonvertierung wurde in einem 200 µl-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Es konnten maximal 20 µl Probe

eingesetzt werden, so dass bei höher konzentrierter genomischer DNA (> 50 ng/μl) das Probenvolumen mit Reinstwasser auf 20 μl gebracht wurde. Anschließend wurden 85 μl gelösten Bisulfit-Mixes und 35 μl DNA Protect Puffers dazupipettiert und alle Komponenten durch Invertieren des Gefäßes gemischt. Die ca. fünfstündige Konvertierung fand im Thermocycler mit dem folgenden Programm statt:

Denaturierung	5 min	95 °C
Inkubation	25 min	60 °C
Denaturierung	5 min	95 °C
Inkubation	85 min	60 °C
Denaturierung	5 min	95 °C
Inkubation	175 min	60 °C
Pause	unbegrenzt	20 °C

Zur Aufreinigung der konvertierten DNA wurde das Reaktionsgemisch zunächst in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 560 μl Puffer BL dazugegeben, gevortext und kurz abzentrifugiert. Das gesamte Volumen wurde auf eine EpiTect<sup>®</sup> Spin Säule pipettiert und zur Bindung der DNA an die Membran zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden im Anschluss an jede Puffer-Zugabe bei Maximalgeschwindigkeit (12.000 rpm) und 1 min durchgeführt und der Durchlauf nach jeder Zentrifugation verworfen. Auf die DNA-Bindung folgte ein Waschschritt mit 500 μl Puffer BW. Zur Desulfonierung wurde die Säule mit 500 μl Puffer BD beschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 500 μl Puffer BW gewaschen. Zur Entfernung von Restflüssigkeit in der Membran wurde die Säule in ein neues 2 ml-Auffanggefäß gesetzt und noch einmal trocken zentrifugiert. Um auch die letzten Rückstände des im Waschpuffer BW enthaltenen Ethanol zu entfernen, wurde die Säule mit offenem Deckel in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min in einem Heizblock bei 56 °C inkubiert. Schließlich wurde die Säule erneut in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA mit 20-30 μl Elutionspuffer EB eluiert. Die mit dem EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite Kit konvertierte DNA kann bis zu 3 Jahre ohne Qualitätsverluste bei -20 °C gelagert werden.

## 2.7. Methoden der Bisulfitsequenzierung

Alle hier vorgestellten Bisulfitsequenzierungen basieren auf der Amplifikation der DNA mit Primern, welche spezifisch für die bisulfitkonvertierte Sequenz sind. Da der Sense- und Antisense-Strang infolge der Konvertierung nicht mehr komplementär zueinander sind (vgl. Kap. 2.6.), müssen die Primer strangspezifisch designt werden. Des Weiteren ist bei der Wahl der Primer darauf zu achten, dass diese nicht an, sondern zwischen CpG-Positionen an die DNA binden, um sowohl (ursprünglich) methylierte als auch unmethylierte Moleküle gleichzeitig zu amplifizieren. In Tab. 2.2 ist ein Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Bisulfitsequenzierung gegeben. In den folgenden Unterkapiteln werden die Techniken mit ihren Vor- und Nachteilen im Detail vorgestellt und auf die Punkte in Tab. 2.2 einzeln eingegangen.

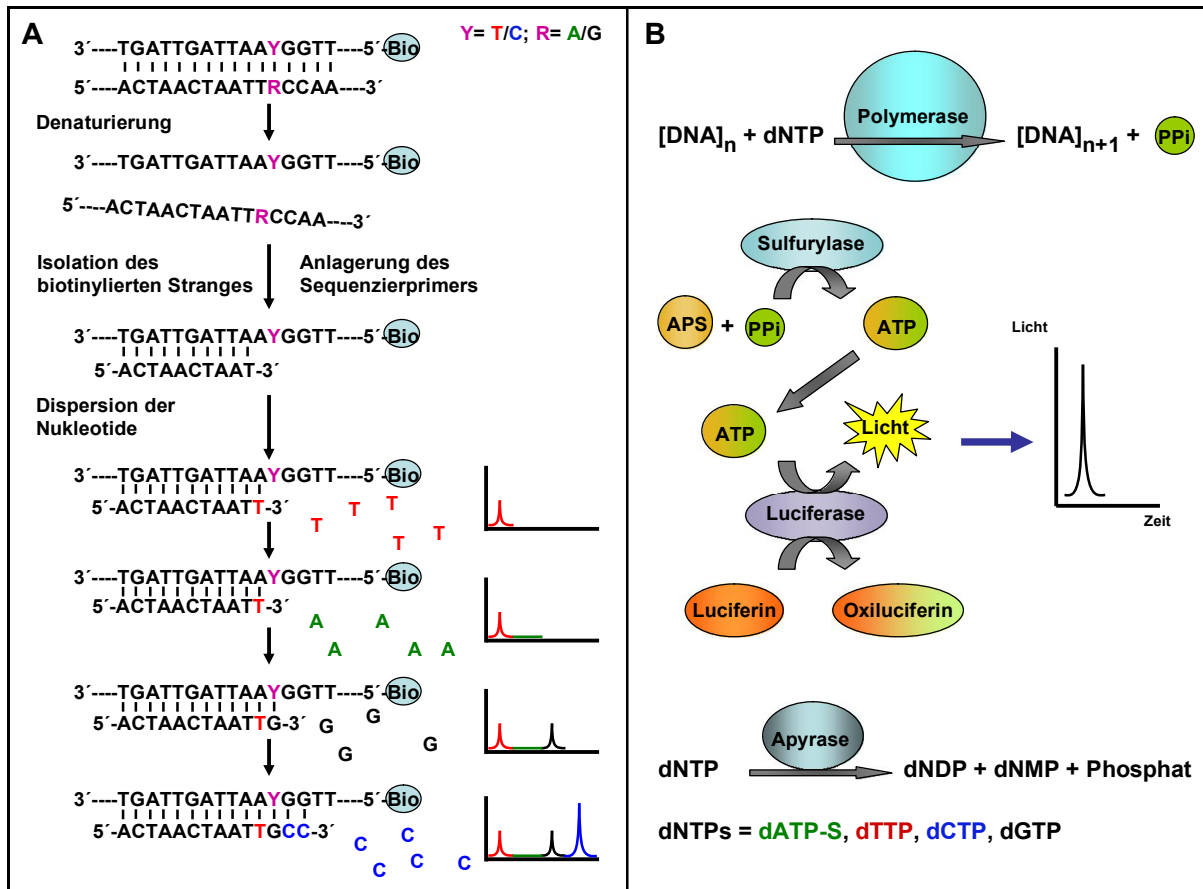
**Tab. 2.2: Überblick über die verwendeten Methoden zur Bisulfitsequenzierung.**

Vor- und Nachteile	Pyrosequenzierung	Klassische Bisulfitsequenzierung	Direkte Sequenzierung
Zahl der gleichzeitig prozessierbaren Proben	96	1-2	96
Sequenzierprobleme aufgrund von Homopolymeren	x	-	x
Maximale Länge der analysierbaren Sequenz	70 bp	1000 bp	300 bp
Quantifizierung der $\phi$ -Methylierung	+++	++	+
Zeitaufwand	+	+++	+
Methylierung einzelner DNA-Moleküle	-	x	-

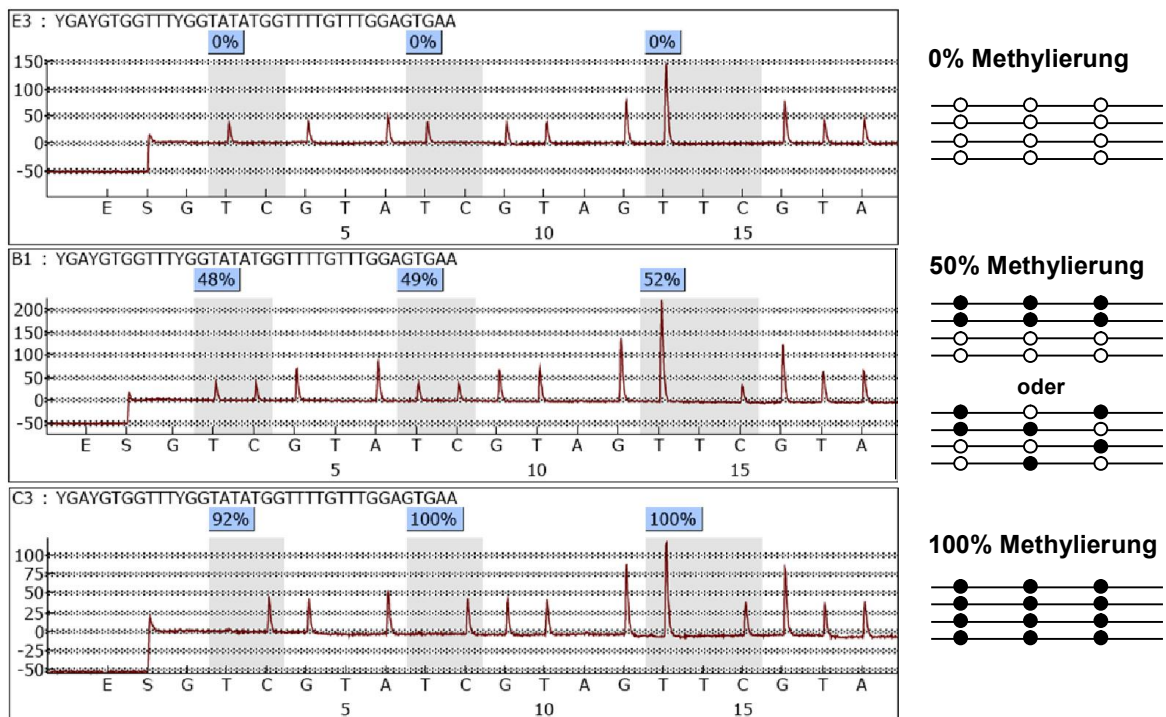
### 2.7.1. Bisulfit-Pyrosequenzierung

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung ist eine sehr akkurate Hochdurchsatz-Methode, mittels welcher die DNA-Methylierung innerhalb kurzer definierter DNA-Bereiche quantitativ bestimmt werden kann. Ein aufwendiges Klonieren und Sequenzieren zahlreicher Plasmide zur Quantifizierung der durchschnittlichen DNA-Methylierung einer einzelnen Probe kann so vermieden und ein genaueres Ergebnis erzielt werden. Die Limitierungen dieser Technik bestehen jedoch in einer kurzen Sequenzierlänge von nur ca. 70 bp und einer Ungenauigkeit der Signalerfassung bzw. -auswertung bei längeren Homopolymeren, insbesondere bei den durch die Bisulfitkonvertierung bedingt sehr häufigen T-Stretchen.

Die Methode der Bisulfit-Pyrosequenzierung zur Methylierungsanalyse setzt die Kenntnis der DNA-Sequenz voraus und basiert auf der Quantifizierung von Lichtemissionen, die simultan mit dem Einbau eines spezifischen Nukleotids in die synthetisierte DNA entstehen. Der Sequenzierung geht eine PCR-Amplifikation der bisulfitkonvertierten DNA mit Bisulfitprimern (Primer, die spezifisch für die konvertierte, nicht aber für die Original-Sequenz sind) voraus, von denen entweder der Forward- oder Reverse-Primer am 5'-Ende biotinyliert ist. Über die Bindung des Biotins an Sepharose-Beads kann anschließend der jeweils markierte DNA-Einzelstrang aus dem Amplifikat isoliert werden. Zur Sequenzierung lagert sich ein Sequenzierprimer an den biotinylierten Strang an, welcher durch eine DNA-Polymerase und sequenzielle Zugabe der einzelnen Nukleotide entsprechend der vorgegebenen Basenabfolge komplementiert wird (Abb. 2.5 A). Beim Einbau eines Nukleotids (dNTPs) wird jeweils ein Pyrophosphatrest (PPi) abgespalten, welcher von der im Enzymmix vorhandenen ATP-Sulfurylase dazu verwendet wird, aus Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu generieren (Abb. 2.5 B). Dieses wiederum nutzt die Luciferase zur Umsetzung des Substrats Luciferin zu Oxiluciferin, wobei Energie in Form von sichtbarem Licht frei wird. Dieses lässt sich mit einer im Sequenziergerät integrierten CCD-Kamera detektieren und als Ausschlag (engl. *peak*) in einem sogenannten Pyrogramm darstellen. Die Menge an generiertem Licht und damit die Höhe des Ausschlags sind proportional zu der Menge an ATP, welches wiederum in equimolarer Menge zu der Anzahl der eingebauten dNTPs vorliegt. Nicht eingebaute Nukleotide werden parallel zu den anderen enzymatischen Reaktionen durch das Enzym Apyrase abgebaut und das nächste Nukleotid kann dispensiert werden. Anstatt des natürlichen dATPs wird Desoxyadenosin- $\alpha$ -thiotriphosphat (dATP $\alpha$ S) als Nukleotid für die Integration in die DNA verwendet, da es effizient von der DNA-Polymerase, jedoch nicht von der Luciferase umgesetzt werden kann. Variable Positionen wie SNPs oder CpG-Stellen werden in der zu analysierenden Sequenz angegeben (z.B. Y = C oder T). Während des Sequenziervorganges werden die beiden alternativen Nukleotide nacheinander dispensiert. Das Verhältnis beider Varianten kann anschließend anhand der Ausschläge berechnet werden und spiegelt die Relation der vorhandenen DNA-Moleküle wieder. Abb. 2.6 zeigt Beispielpyrogramme vollständig unmethylierter (0%), vollständig methylierter (100%) und 50% methylierter DNA, wie sie beispielsweise bei geprägten Genen vorliegt.



**Abb. 2.5: Prinzip der Pyrosequenzierung.** (A) Sequenzierreaktion und zeitgleiche, quantitative Detektion der eingebauten Nukleotide. (B) Enzymatische Prozesse während einer dNTP-Dispersion unter Beteiligung der vier Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase (Abbildung wurde entsprechend <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/spotlight/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/> [aufgerufen am 22.01.2014] erstellt).



**Abb. 2.6: Beispielpyrogramme unterschiedlich methylierter DNA.** Von oben nach unten: Pyrogramme 0%, 50% und 100% methylierter DNA (links). Grau hinterlegte Peaks entsprechen jeweils einer spezifischen CpG-Stelle. Die Prozentzahl in der blauen Box gibt den Cytosin-Anteil an dieser Stelle an, also die Höhe der Methylierung. Zur Veranschaulichung sind rechts die im pyrosequenzierten Gemisch vorhandenen DNA-Moleküle und ihre mögliche Verteilung der DNA-Methylierung in Form von Lollipopdiagrammen dargestellt: jede Linie stellt ein DNA-Molekül dar, jeder Kreis eine CpG-Stelle. Gefüllte/schwarze Kreise entsprechen methylierten, leere/weiße unmethylierten CpGs. Bei 50% Methylierung sind die einzelnen CpG-Stellen jeweils auf 50% aller im PCR-Produkt vorhandenen DNA-Moleküle methyliert bzw. unmethyliert. Die Pyrosequenzierung liefert nur die quantitative Durchschnittsmethylierung aller DNA-Moleküle (links) und nicht die Muster der einzelnen DNA-Moleküle (rechts).

Die Pyrosequenzierungen zur Methylierungsanalyse wurden mit dem PyroMark<sup>®</sup> Q96 MD System (Qiagen, Hilden; ehemals PSQ96MA Pyrosequencing System, Biotage, Uppsala, Schweden) und dem PyroGold<sup>®</sup> SQA Reagent Kit (Biotage/Qiagen) durchgeführt (Tost *et al.*, 2003). Sequenzierprimer und Pyroassays wurden mit der PyroMark<sup>®</sup> Assay Design 2.0 Software (Biotage/Qiagen) generiert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Pyro Q-CpG Programm (Biotage/Qiagen). Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte des Standardprotokolls kurz dargestellt werden.

1. 10 µl der jeweiligen DNA-Probe (PCR-Produkt) wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ohne Rand vorgelegt. Die Anordnung auf der Platte wurde im Pyro Q-CpG Programm eingegeben.



2. Auf jede Probe wurden 2 µl Streptavidin Sepharose High Performance Beads (GE Healthcare, München), 40 µl Binding-Puffer (Biotage/Qiagen) und 28 µl Reinstwasser pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, und bei 14.000 rpm (Stufe 5 auf VortexGenie) für 5 min gevortext. Dies erlaubte die Bindung des Biotins an die Sepharose-Beads.
3. Auf die PyroMark<sup>®</sup> Q96 HS Pyrosequenzierplatte (Biotage/Qiagen) wurden pro DNA-Probe 11,5 µl Annealing-Puffer (Biotage/Qiagen) und 0,5 µl des jeweiligen Sequenzierprimers entsprechend der Anordnung der PCR-Produkte auf der Mikrotiterplatte pipettiert.
4. Die Mikrotiterplatte wurde auf Position 1 der PyroMark<sup>®</sup> Q96 Vacuum Workstation (Biotage/Qiagen) gesetzt und der Kopf des Geräts unter Anlegen des Vakuums für einige Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Kopf in die Mikrotiterplatte überführt und die Flüssigkeit aufgesaugt. Die Sepharose-Beads mit der gebundenen DNA wurden dabei an den Membranen der Saugstifte festgesaugt.
5. Der Vakuumkopf wurde vorsichtig aus der Mikrotiterplatte gehoben, ohne die Beads am Rand der Platte abzustreifen, und anschließend für 10 s in 70%igem Ethanol gewaschen.
6. Es folgte eine zehnsekündige Denaturierung der DNA in 0,2 M NaOH-Lösung (s. Kap. 2.2.). In diesem Schritt wurde der unbiotinylierte DNA-Strang gelöst und aufgesaugt, während der biotinylierte Einzelstrang weiterhin an die Sepharose-Beads gebunden blieb.
7. Anschließend wurde der Vakuumkopf für ca. 20 s in Waschpuffer (s. Kap. 2.2.) gewaschen.
8. Schließlich wurde der Kopf in Position über die Pyrosequenzierplatte mit den Sequenzierprimern gebracht und nach Abschalten des Vakuums ganz in die selbige gesetzt. Die Sepharose-Beads samt der gebundenen DNA wurden unter sanftem Rütteln des Vakuumkopfes in die Sequenzierplatte überführt.
9. Die Sequenzierplatte wurde 2 min bei 80 °C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließendes Abkühlenlassen für 5 min erlaubte die spezifische Bindung des Sequenzierprimers an die Ziel-DNA.
10. Die Dispensierküvette wurde mit dem Enzymmix (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase), dem Substrat (APS und Luciferin) und den einzelnen

Nukleotiden (PyroGold<sup>®</sup> SQA Reagent Kit) entsprechend der vom Pyro Q-CpG Programm berechneten Menge befüllt.

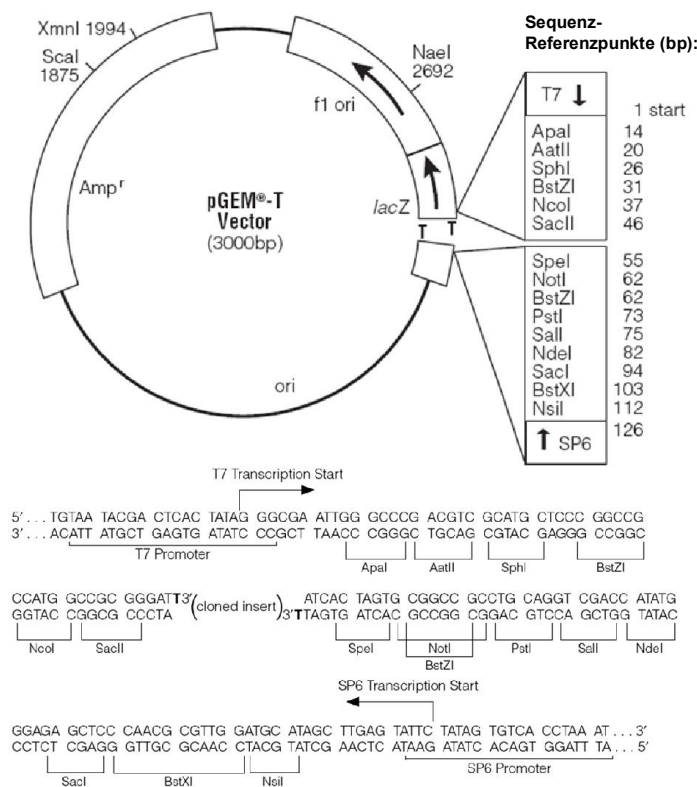
11. Küvette und Sequenzierplatte wurden in das PyroMark<sup>®</sup> Q96 MD Sequenziergerät überführt und der Sequenzierlauf gestartet.

### 2.7.2. Klassische Bisulfitsequenzierung nach Klonierung

Die Klonierung der bisulfitkonvertierten, amplifizierten DNA in *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämmen und die anschließende Sanger-Sequenzierung der einzelnen Klone/Plasmide erlaubt die Analyse der Methylierungsmuster einzelner Allele oder DNA-Moleküle. Dies ist insofern von Vorteil, dass dadurch im Gegensatz zur Pyrosequenzierung die Methylierung einzelner CpG-Stellen genau nachvollzogen werden kann. Bei der Pyrosequenzierung können hingegen nur Durchschnittswerte einzelner CpGs erhoben werden, die keine Aussage über die Verteilung der methylierten CpGs auf den einzelnen DNA-Molekülen erlauben (vgl. Abb. 2.6). Ein weiterer Vorteil der klassischen Bisulfitsequenzierung ist die Toleranz gegenüber Homopolymeren. Durch die zelleigene Fehlerkorrektur während der Replikation im Bakterium werden die inserierten DNA-Fragmente inklusive ihrer Homopolymerstretche exakt amplifiziert, so dass während der Sangersequenzierung keine Überlagerungen aufgrund unterschiedlicher Amplikonlängen auftreten. Die Amplifikation der DNA unter physiologischen Bedingungen ermöglicht somit eine Größe des zu analysierenden DNA-Abschnitts von bis zu 1000 bp. Nachteilig stellen sich dagegen die Länge des Protokolls und die Limitierung der Probenanzahl dar. Während mit der Pyrosequenzierung bis zu 96 PCR-Produkte gleichzeitig sequenziert werden können, müssen bei der klassischen Bisulfitsequenzierung allein für ein PCR-Produkt mehrere Plasmide sequenziert werden. Um ein repräsentatives Bild der durchschnittlichen Methylierung einer Probe zu erhalten, muss darüber hinaus eine ausreichend hohe Zahl an Plasmiden analysiert werden.

Die Klonierung und Bisulfitsequenzierung der in dieser Arbeit untersuchten *bIGF2/bH19*-intergenischen ICR wurde mittels des pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor Systems II (Promega, Mannheim) durchgeführt. Der linearisierte Vektor verfügt an beiden 3'-Enden des Doppelstranges über einen Thymidin-Überhang. Dieser verhindert die Rezirkulation des Vektors während der Ligation. Die FastStart *Taq* sowie viele andere thermostabile DNA-Polymerasen ergänzen das PCR-Produkt mit einem Adenosin-Überhang, welcher perfekt mit dem Thymidin-Überhang des Vektors komplementiert und damit zu einer gesteigerten Effizienz der Ligation führt (TA-Klonierung). Des Weiteren trägt der pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor neben einer Ampicillin-Resistenz das

Reporter gen *lacZ* (Abb. 2.7). Dieses kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase. Wird der Vektor in die *E.coli*-Zelle transformiert, ist diese in der Lage  $\beta$ -Galactosidase zu synthetisieren und Lactose zu spalten.



**Abb. 2.7: Vektorkarte und Sequenz-Referenzpunkte des pGEM<sup>®</sup>-T-Vektors** (übernommen aus der technischen Anleitung: „pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems“; Promega, 2010). Sie zeigt die Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen sowie die detaillierte Sequenz im Bereich der Insertionsstelle. In dieser Arbeit wurde das Plasmid zur Kontrolle der Insertgröße mit SacI und SacII verdaut. Als Sequenzierprimer dienten die M13-Bindungsstellen (Sequenz-Referenzpunkte: M13 Forward: 2941–2957, M13 Reverse 161–177).

Innerhalb des *lacZ*-Gens befindet sich auch die Multi-Cloning Site (MCS), an welcher das PCR-Produkt ins Plasmid integriert wird. Durch den Einbau kann das Bakterium keine  $\beta$ -Galactosidase synthetisieren und Lactose nicht verstoffwechseln. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, um Kolonien ohne Insert von Kolonien mit Insert zu unterscheiden: Bei der sogenannten Blau-Weiß-Selektion enthält die Kulturschale das farblose Lactose-Analogon X-gal, welches bei einer Hydrolyse durch die  $\beta$ -Galactosidase blaue Dimere formt. Dadurch erscheinen Bakterienkolonien, die ein intaktes Plasmid ohne eingebautes PCR-Produkt enthalten, blau, während Kolonien mit eingebautem Produkt weiß bleiben und somit selektiert werden können. Der dem LB-Agar ebenfalls zugesetzte Stoff Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) wirkt als Induktor auf das *lac*-Operon und steigert so die Expression des *lacZ*-Gens.

### Ligation und Transformation:

Die jeweiligen PCR-Produkte der *bIGF2/bH19*-Region (Primer s. Kap. 2.9.1.) wurden zunächst mit der T4-DNA-Ligase in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde folgendermaßen in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

5 µl 2x Rapid Ligationspuffer

1 µl pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (50 ng)

3 µl PCR-Produkt

1 µl T4-DNA-Ligase

Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und eine Stunde bei RT inkubiert. 2 µl der Ligation wurden anschließend in ein eisgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, 50 µl kompetenter, auf Eis aufgetauter JM109-Zellen dazupipettiert und mittels sanften Schnipsens gemischt. Zellen und Vektor wurden für 20 min auf Eis inkubiert, was die Anlagerung der Plasmid-DNA an die Bakterienzelloberfläche ermöglichte. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 s in einem 42 °C-warmen Wasserbad. Nach zweiminütiger Abkühlung der Zellsuspension auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und das Reaktionsgefäß für 1,5 h auf einem Thermomixer bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf einer vorgewärmten LB-Platte zur Blau-Weiß-Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Zusammensetzungen des SOC-Mediums und LB-Agars sowie des LB-Mediums zur Übernachtkultur (ÜNK, siehe unten) sind in Kap. 2.2. angegeben.

### Übernachtkultur und Plasmidextraktion

Am Folgetag wurden einzelne weiße Kolonien mit Hilfe steriler 10 µl-Pipettenspitzen von der ca. 100 Kolonien zählenden Selektionsplatte gepickt und jeweils in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 3 ml LB-Medium transferiert. Die Klone wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler mit 180 rpm und mit nicht ganz geschlossenem Deckel weiter hochgezogen. Die Plasmid-DNA der einzelnen Klone wurde am nächsten Tag mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit (Machery-Nagel, Düren) isoliert. Dazu wurden die Bakterienzellen aus der 3 ml-ÜNK durch zweimaliges Abzentrifugieren (11.000 x g, 30 s) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß pelletiert und der LB-Medium-Überstand verworfen. Zur Zelllyse wurden zunächst 250 µl Puffer A1 auf das Pellet gegeben und durch kräftiges Vortexen

resuspendiert. Unter anschließender Zugabe von 250 µl Puffer A2 und 6-8-maligem Invertieren erfolgte die Lyse der Bakterienzellen, erkennbar an einem Klarwerden der Suspension. Es wurden 300 µl Puffer A3 auf das Lysat pipettiert, unter 6-8-maligem Invertieren gemischt und schließlich 10 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin® Plasmid Säule transferiert und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1 min, 11.000 x g) an die Membran gebunden. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Puffer A4 gewaschen (1 min, 11.000 x g). Zum Trocknen der Membran wurde die Säule in einem leeren 2 ml-Auffanggefäß für weitere 3 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Zum Schluss wurde die DNA nach 1 min Inkubation mit 50 µl Puffer AE bei RT in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert (1 min, 11.000 x g).

#### Restriktionsverdau und Sequenzierung der Plasmide

Um festzustellen, ob die Klone das gewünschte PCR-Produkt trugen, wurde die Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen SacI und SacII (New England Biolabs, Frankfurt) unterzogen. Diese schneiden den pGEM®-T-Vektor vor bzw. nach der MCS. Es wurden je Klon 3 µl Plasmid-DNA mit je 0,2 µl SacI und SacII, 2 µl Puffer 4 und 14,6 µl Reinstwasser zusammenpipettiert, gut gemischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. 10 µl des Restriktionsverdaus wurden mit 2 µl 6 x Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel in 1 x TAE-Elektrophoresepuffer geladen und aufgetrennt. Die richtige Insertgröße für das 300 bp lange *bIGF2/bH19*-PCR-Produkt betrug 348 bp (300 bp + 48 bp flankierende Plasmidsequenz, vgl. Abb. 2.3). Plasmide, die das richtige Insert trugen, wurden anschließend mit M13-Primern an einem Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld) sequenziert. Für die Sanger-Sequenzierreaktion nach der Kettenabbruchmethode wurden 2 µl Plasmid-DNA mit 2 µl Quickstart-Mix (CEQ™ DTCS Quick Start Kit, Beckman Coulter, Krefeld), 0,5 µl M13-Forward- oder Reverse-Primer und 5,5 µl Reinstwasser in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit folgendem Programm in einem Thermocycler linear amplifiziert:

1. Schritt	96 °C	20 s
2. Schritt	50 °C	20 s
3. Schritt	60 °C	4 min
35 Zyklen der Schritte 1-3		
Pause	4°C	

Die Produkte wurden mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Dazu wurden die gesamten 10 µl des Sequenzieransatzes mit 10 µl Reinstwasser in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 1:1 verdünnt und 5 µl Stopp-Lösung dazugeben. Diese bestand je Probe aus 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 (Sigma-Aldrich, Steinheim), 2 µl 100 mM EDTA pH 8 (1:5 Verdünnung von 0,5 M EDTA pH 8, Sigma-Aldrich) und 1 µl Glykogen (CEQ™ DTCS Quick Start Kit). Es wurden weiterhin 60 µl 100%iges Ethanol (-20 °C) zugegeben, gründlich gevortext und 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet unter fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C mit 100 µl 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 8 min getrocknet, anschließend in 30 µl Sample Loading Solution (SLS, CEQ™ DTCS Quick Start Kit) gelöst und unter Mineralölbeschichtung im Beckman Coulter CEQ™ 8000 Sequenziergerät separiert.

Die Auswertung der SCF-Dateien erfolgte mit den Programmen Chromas Lite (visuelle Inspektion) und BioEdit (Alignierung der Sequenzen mit der Original-Bisulfitsequenz). Zur Darstellung der Methylierung wurden mit Microsoft-Powerpoint sogenannte Lollipop-Diagramme erstellt. In der genomischen DNA ehemals vorhandene CpG-Dinukleotide werden darin als Kreis dargestellt (vgl. Abb. 2.6). Gefüllte/schwarze Kreise entsprechen ursprünglich methylierten CpGs (nach der Bisulfitkonvertierung in der Sequenz als „CG“ erhalten), unausgefüllte/weiße CpGs waren hingegen unmethyliert (nach der Bisulfitkonvertierung in der Sequenz zu „TG“ konvertiert). Die Abstände der Kreise auf der die DNA darstellenden Linie entsprechen qualitativ den Basenabständen der CpGs innerhalb der DNA-Sequenz.

### **2.7.3. Direkte Bisulfitsequenzierung**

Im Zuge dieser Promotionsarbeit wurde ein Protokoll entwickelt, dass die direkte Sangersequenzierung der PCR-Produkte aus der Limiting Dilution (s. Kap. 2.8.) ohne vorherige Klonierung ermöglichte. Da es sich bei den PCR-Produkten um Amplifikate einzelner Allele handelte, war weder die langwierige und teure Klonierung einzelner DNA-Moleküle noch eine Quantifizierung mittels Pyrosequenzierung notwendig. Zudem konnten mit Hilfe der direkten Sequenzierung im Gegensatz zur ebenfalls schnellen Pyrosequenzierung längere DNA-Fragmente von bis zu 300 bp und damit mehr CpG-Stellen analysiert werden. Schwierigkeiten der direkten Bisulfitsequenzierung ergaben sich jedoch anfänglich aus der redundanten Komplexität der bisulfitkonvertierten DNA-Sequenz. Zum

Einen enthält diese sehr häufig längere T- (Forward-Strang) und A-Stretche (Reverse-Strang), über welche die *Taq*-Polymerase während der Amplifikation dieser Homopolymere leicht ins Stolpern gerät. Dies führt zu einer Mischung unterschiedlich langer DNA-Moleküle, welche sich in Folge der Auftrennung im automatisierten Sequenzierer überlagern. Zur Vermeidung überlagerter und damit unauswertbarer Sequenzen mussten die Primer für diese Arbeit deshalb so gewählt werden, dass die Amplikons keine längeren Homopolymere von mehr als 7 bp enthielten. Ein weiteres technisches Problem stellte der Mangel an C- (Forward-Strang) bzw. G-Nukleotiden (Reverse-Strang) im PCR-Produkt dar. Der niedrige GC-Gehalt führte in der Sanger-Sequenzierung stets zu einem enormen C- oder G-Hintergrundrauschen, was starke Auswirkungen auf die Qualität und Interpretierbarkeit der Sequenzen hatte. Durch Anhängen eines G- bzw. C-reichen Anhangs an die Primer der zweiten PCR (Singleplex-PCR; vgl. Kap. 2.9.), welcher mindestens 50% Cytosine (Forward-Primer) oder Guanine (Reverse-Primer) enthielt, konnte das Basenmissverhältnis ausgeglichen und die Sequenzierqualität verbessert werden (Han et al., 2006). Eine weitere Optimierung im Laufe dieser Arbeit gelang durch die zusätzliche Verlängerung dieses sogenannten „Stuffers“ um eine M13-Sequenz, wodurch die Gesamtlänge der Singleplex-Primer etwa 50 bp betrug. Die Verwendung der 36 bp langen M13/Stuffer-Sequenz als universeller Sequenzierprimer erhöhte die Bindungsspezifität während der Sequenzierreaktion und konnte so die Qualität der Sequenzen enorm steigern.

Zur Aufreinigung wurden die Limiting-Dilution-Produkte vor der Sequenzierreaktion einem ExoSAP-Verdau unterzogen. Dabei wurden überschüssige Primer durch die Exonuklease I (Exo) abgebaut, während die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) die nicht eingebauten dNTPs spaltete. In einer PCR-Platte wurden zu je 1 µl PCR-Produkt 0,5 µl ExoSAP-IT<sup>®</sup> (Affymetrix, Santa Clara, CA/USA) und 5,5 µl Reinstwasser gegeben. Der Verdau fand in einem Thermocycler bei 37 °C für 30 min statt, gefolgt von 85 °C für 15 min und 95 °C für 2 min. Für die Sequenzierreaktion wurde ein Mastermix bestehend aus 1 µl Sequenzierprimer (M13/Stuffer-Forward oder -Reverse), 2 µl 5 x Sequenzierpuffer und 1 µl BigDye<sup>®</sup> v1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) gemischt und je Probe 4 µl Mastermix auf das aufgereinigte PCR-Produkt dispensiert. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

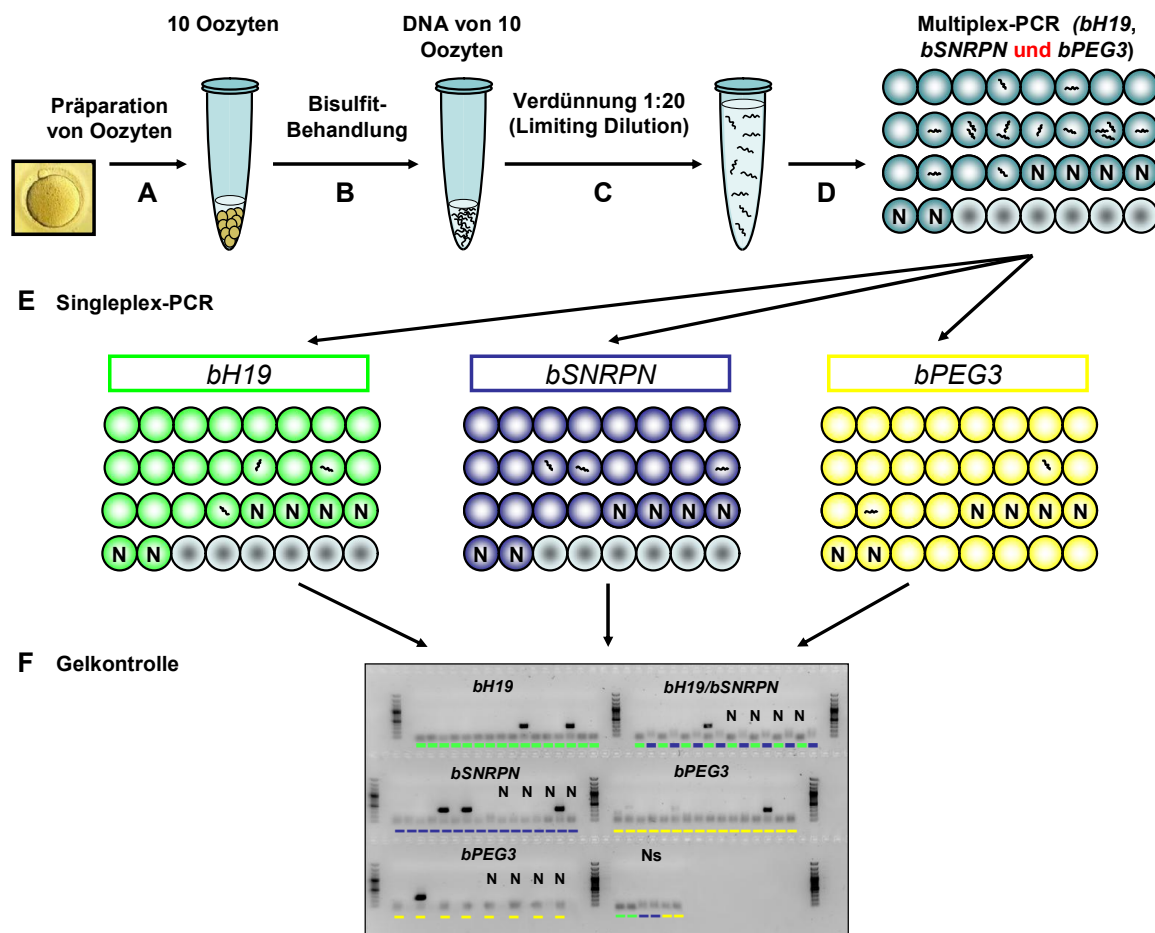
1. Schritt	96 °C	2 min
2. Schritt	96 °C	20 s
3. Schritt	58 °C	20 s
4. Schritt	60 °C	3 min
25 Zyklen der Schritte 2-3		
5. Schritt	60 °C	3 min
Pause	10 °C	

Nach einer Ethanolfällung (85%) mit den CleanDTR Magnetic Beads (GCbiotech, Alphen aan den Rijn, Niederlande) am Pipettierroboter (JANUS<sup>®</sup> Automated Workstation, Perkin Elmer, Rodgau) wurde die DNA in 40 µl Hi-Di<sup>™</sup>-Formamid (Applied Biosystems) gelöst und auf einem ABI 3730 oder ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert.

### 2.8. Limiting Dilution

Zur Methylierungsanalyse der bovinen Eizellen wurde die Limiting-Dilution-Methode (LD) eingesetzt (Trapphoff *et al.*, 2010; El Hajj *et al.*, 2011; Heinzmann *et al.*, 2011). Diese wurde speziell zur Einzelzellanalyse entwickelt und erlaubt die Untersuchung der Methylierungsmuster einzelner Allele oder DNA-Moleküle. Durch starke Verdünnung der bisulfitkonvertierten DNA einiger weniger Zellen und anschließender Verteilung über mehrere Wells einer PCR-Platte wird die Separation einzelner DNA-Moleküle erreicht (Abb. 2.8). Mittels einer mehrere Gene enthaltenden Multiplex-PCR (MP-PCR) und einer anschließenden zweiten, genspezifischen Singleplex-PCR (SP-PCR; vgl. Kap. 2.9.) wird die Single-Copy-DNA stark hochamplifiziert. Zusätzlich lässt man sechs Wasser-/Negativkontrollen mitlaufen, um mögliche niedrige Kontaminationen des Mastermixes zu detektieren. Das anschließende Auftragen der PCR-Produkte auf ein Gel liefert eine binäre Information über das Vorhandensein der spezifischen Ziel-DNA in den jeweiligen Wells (entweder kein PCR-Produkt oder ein PCR-Produkt), was deshalb auch als digitale PCR bezeichnet wird (Vogelstein und Kinzler, 1999). Die Methylierungsmuster der einzelnen DNA-Moleküle/Allele können durch direkte oder Pyrosequenzierung der PCR-Produkte aus den PCR-Produkt-positiven Wells ermittelt werden (El Hajj *et al.*, 2011). Das Prinzip der Limiting Dilution ist anhand des in dieser Arbeit behandelten geprägten „Gensets 1“ in Abb. 2.8. dargestellt.





**Abb. 2.8: Prinzip der Limiting Dilution am Beispiel des Gensets 1.** (A) Unreife oder gereifte Oozyten werden aus dem Ovar oder der Kulturschale präpariert und zu je 10 Stück gepoolt. (B) DNA-Isolation und Bisulfitkonvertierung. (C) 1:20-Verdünnung der konvertierten Oozyten-DNA. (D) Multiplex-PCR mit Primern aller zu untersuchenden Gene: Die Verdünnung wird dazu über 20 Wells einer PCR-Platte verteilt, wobei folglich nicht jedes Well DNA enthält (DNA-Moleküle = geschwängelte Linien). Zusätzlich werden sechs Negativkontrollen (N) pipettiert. (E) Singleplex-PCR: je 1  $\mu$ l des Multiplex-PCR-Produkts wird in eine neue PCR-Platte überführt und die DNA in einer zweiten (*nested*) PCR mit genspezifischen Primern (gekennzeichnet durch verschiedene Farben) weiter amplifiziert. (F) Durch Auftragen der Singleplex-PCR-Produkte können DNA-positive Wells zur Sequenzierung (direkte Sequenzierung oder Pyrosequenzierung) identifiziert werden.

Die Methode der Limiting Dilution bietet einige Vorteile gegenüber konventionellen Protokollen zur Methylierungsanalyse. So können erstmalig einzelne Allele und DNA-Moleküle ohne vorherige zeit- und kostenintensive Klonierung des PCR-Produktes analysiert werden. Des Weiteren sind nur wenige Zellen als Ausgangsmaterial notwendig (hier Pools von 10 Eizellen) und erspart dadurch langes Sammeln von kostbaren Zellen. Zudem kommt es bei DNA-Gemischen aus wenigen 100 Zellen leicht zu einer präferentiellen Amplifikation einzelner DNA-Moleküle (PCR-Bias), was zu einer Verzerrung der durchschnittlichen Methylierung einer augenscheinlich homogenen Zellpopulation führen kann. Ein PCR-Bias ist

um so wahrscheinlicher, je weniger Ausgangsmaterial eingesetzt wird und je mehr Amplifikationsrunden stattfinden. Durch die zufällige Anreicherung können Epimutationen häufiger oder seltener in einem bestimmten Untersuchungsmaterial erscheinen, als sie tatsächlich sind. Zumeist bleiben seltene Veränderungen einzelner Zellen unerkannt und durch die Überzahl der „normalen“ Zellen maskiert, wodurch die sogenannte „Nadel im Heuhaufen“ verborgen bleibt. Die LD liefert hingegen ein umfassendes, verlustfreies und repräsentatives Bild der Methylierung einzelner Allele einer bestimmten Zellpopulation.

In dieser Arbeit wurden Pools von je 10 Eizellen verwendet. Da die reifen Oozyten (2 n) noch über den Polkörper (2 n) verfügten, hatten diese nahezu die gleiche DNA-Menge wie die in der Prophase der Meiose I arretierten, ungerreifen Eizellen (4 n). Somit enthielt jede Eizelle bzw. jeder Eizell-Polkörper-Komplex insgesamt 4 Allele eines Gens, von denen jeweils zwei identisch waren. Folglich befand sich bei einer 1:20-Verdünnung von 10 Oozyten ( $10 \times 4 n = 40 n$ ) in jedem der 20 PCR-Ansätze theoretisch die Hälfte der DNA einer Eizelle (2 n) oder aber zwei Allele eines speziellen Gens. Da es jedoch während der Bisulfitbehandlung und Aufreinigung zu einem Verlust und einer Degradierung der DNA kommt, war eine Verdünnung von 1:20 der DNA ausreichend. So befanden sich in den meisten einzelnen Reaktionsgefäßen daher keine Allele, selten ein Allel und sehr selten zwei Allele.

### **2.8.1. Limiting Dilution mit Genset 1**

Das Genset 1 umfasste die geprägten Gene *bH19*, *bSNRPN* und *bPEG3*. Der MP-Mastermix war ausreichend für insgesamt 28 einzelne PCR-Reaktionen zu je 15 µl und bestand aus 70 µl 10 x PCR-Puffer/20 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 µl 10 mM dNTP-Mix, 28 µl von jedem äußeren Primer (Forward und Reverse; 10 µM), 5,6 µl FastStart *Taq* (Roche Diagnostics, Mannheim) und 106,4 µl Reinstwasser. Die bisulfitkonvertierte DNA von je 10 Oozyten (10 µl) wurde zunächst mit 190 µl Reinstwasser auf 200 µl (1:20) verdünnt, mit 300 µl MP-Mastermix versetzt und durch einminütiges Auf- und Abpipettieren mit einer beschichteten 200 µl-Pipettenspitze (TipOne<sup>®</sup> RPT Graduated Filter Tip Serie, Starlab, Hamburg) gründlich gemischt, um eventuelles Zusammenhängen der DNA-Moleküle zu lösen. Unter Verwendung der gleichen Spitze wurde die verdünnte DNA über 20 PCR-Reaktionsgefäße bzw. 20 Wells einer PCR-Platte verteilt (je 25 µl). Zudem wurden sechs Negativkontrollen (je 15 µl MP-Mastermix + 10 µl Reinstwasser) in separate Wells pipettiert und sogleich verschlossen. Für die *Nested*-PCRs der einzelnen Gene wurde jeweils ein SP-Mastermix mit einem 28-fachen der in Kap. 2.5. angegebenen Mengen pipettiert, je Well 24 µl über die PCR-Platte verteilt

und 1 µl des Produkts der MP-PCR dazupipettiert. Primer und PCR-Programme der MP- und SP-PCR sind in Kap. 2.9.2. dargestellt.

### **2.8.2. Limiting Dilution mit Genset 2**

Das Genset 2 beinhaltet die ungeprägten Gene *bSLC2A1*, *bPRDX1* und *bZAR1*. Zur Erhöhung der Bindespezifität der Bisulfitprimer wurde für die MP-PCR anstatt des FastStart-*Taq*-DNA Polymerase-Systems (Roche) die Platinum<sup>®</sup>-*Taq*-Polymerase (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt) und ein speziell zusammengestelltes Puffer-System (Puffer B, Zusammensetzung s. Kap. 2.2.) verwendet. Der MP-Mastermix für insgesamt 28 Reaktionen bestand aus 644 µl Puffer B, 8,4 µl von jedem äußeren Primer (33 µM) und 5,6 µl Platinum<sup>®</sup>-*Taq*-Polymerase. 10 µl der bisulfitkonvertierten Oozyten-DNA wurden mit 520 µl des PCR-Mastermixes verdünnt und mit einer beschichteten 200 µl-Pipettenspitze (TipOne<sup>®</sup> RPT Graduated Filter Tip Serie, Starlab) durch einminütiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurde die direkt mit dem PCR-Mastermix verdünnte DNA zu je 26 µl über 20 Wells einer PCR-Platte verteilt. Zusätzlich wurden 6 x 26 µl Mastermix ohne DNA als Negativkontrollen in die Platte pipettiert. Die SP-PCRs der einzelnen Gene wurden wie für Genset 1 beschrieben wieder mit dem FastStart-*Taq*-Polymerase-System durchgeführt. Primer und PCR-Programme der MP- und SP-PCR sind in Kap. 2.9.3. dargestellt.

## **2.9. Primersequenzen und PCR-Bedingungen**

Die durch die Bisulfitkonvertierung entstandene Redundanz der DNA-Sequenz führt häufig dazu, dass Primer oftmals mehrfach im Genom binden. Um die Spezifität der Amplifikation zu gewährleisten, empfiehlt sich eine stufenweise Vervielfältigung der DNA mittels zweier separater, aufeinander folgender PCRs. Dabei binden die Primer der zweiten PCR innerhalb des Amplikons der ersten PCR. Man nennt dies eine „*nested*“ (engl. eingeschachtelt) PCR“. Die Primer der ersten PCR werden als äußere, die der zweiten als innere Primer bezeichnet. Bereits die Variation von nur einem der beiden Primer (Forward oder Reverse) zwischen dem ersten und dem zweiten Lauf kann die Spezifität effektiv erhöhen und wird als „*semi-nested*“ bezeichnet. Wird nur ein PCR-Produkt mittels eines Primerpaares generiert, wird dies als Singleplex-PCR (SP) bezeichnet. Unter Verwendung mehrerer Primerpaare können jedoch auch mehrere Gene gleichzeitig in ein und demselben Reaktionsgefäß amplifiziert werden, was im Gegenzug als Multiplex-PCR (MP) bezeichnet wird. Zur weiteren, genspezifischen

Amplifikation kann dann in einer zweiten (*nested*) SP-PCR eines der Gene gezielt weiteramplifiziert werden (siehe Genset 1 und 2 der Limiting Dilution). Für die LD mussten die Primer aufgrund der starken Degradierung der DNA so gewählt werden, dass die Amplikonlänge des MP-PCR-Produkts 300 bp nach Möglichkeit nicht oder nur geringfügig überschritt. Bei größeren Amplikonlängen erhöhte sich dagegen die Wahrscheinlichkeit einer Fragmentierung innerhalb der Ziel-DNA und damit des Verlusts von potentiellen PCR-Produkten.

### **2.9.1. DMR-Charakterisierung von *bIGF2/bH19*, *bSNRPN* und *bPEG3***

Zur erstmaligen Identifizierung der *bIGF2/bH19*-ICR mittels klassischer Bisulfitsequenzierung wurden Primer entwickelt, die eine *semi-nested* Amplifikation des zu klonierenden Fragmentes erlaubten. Die Charakterisierung der übrigen fünf Regionen (CTCF-Bindungsstellen der *bIGF2/bH19*-ICR und die Keimzell-DMRs von *bSNRPN* und *bPEG3*) erfolgte durch Pyrosequenzierung infolge einer *nested* (CTCF 1, 4 und 7) beziehungsweise *semi-nested* PCR (*bSNRPN* und *bPEG3*). Alle Primersequenzen zur Amplifikation sowie zur Pyrosequenzierung sind in Tab. 2.3 angegeben. Für die CTCF-Bindestelle 1 wurden die inneren Primer des Klonierungsfragmentes als äußere Primer verwendet. Die chromosomale Lokalisation der amplifizierten Bereiche wurde mit Ausnahme von *bSNRPN* entsprechend der Ensembl-Version 58 (Mai 2010) angegeben. Die Lokalisation von *bSNRPN* auf Chromosom 21 war 2010 noch nicht bekannt (Btau\_4.0, Juli 2010: Un.004.45:727-24.176:-1) und wird daher entsprechend der neueren Ensembl-Version 66 (Februar 2012) angegeben. Für die Amplikons der ersten PCR ist zusätzlich die NCBI Zugangsnummer angegeben (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Sequenzen und chromosomale Lokalisation der Bisulfitprimer zur Charakterisierung boviner geprägter Regionen.

Gen/ Region	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon- länge (bp)	Chromosomale Lokalisation in bp (Ensembl-Version)	Anzahl der CpG-Stellen
<b><i>bIGF2/bH19</i></b> ICR Klonierungs- fragment	Cloning OF	GATAGGAGATTAGGTTTAGAGGG	386	BTA29: 51.358.389-51.358.774:+1 (58) NW001494547.2: 3.718.453-3.718.838	25
	Cloning OIR	ATAAAAATCCCTCAATATCCC			
	Cloning IF	TGATTTTTAGTTTTATTGTTTTTG	300	BTA29: 51.358.475-51.358.774:+1 (58)	23
	Cloning OIR	ATAAAAATCCCTCAATATCCC			
<b><i>bIGF2/bH19</i></b> ICR CTCF 1	Cloning IF	TGATTTTTAGTTTTATTGTTTTTG	300	BTA29: 51.358.475-51.358.774:+1 (58)	23
	Cloning OIR	ATAAAAATCCCTCAATATCCC			
	Pyro IF	AGAGGTTGTGGGTGTGGAGATA	230	BTA29: 51.358.512-51.358.741:+1 (58)	20
	Pyro IR Bio	TCCTCTCCACCTCAACAA			
Pyro S	GGGTTTGTATATTATAGGAT			<b>9</b>	
<b><i>bIGF2/bH19</i></b> ICR CTCF 4	Pyro OF	TTTTAAAATAGGTTGTGTGGTTGT	285	BTA29: 51.359.843-51.360.127:+1 (58) NW001494547.2: 3.719.907-3.720.191	22
	Pyro OR	CCAAACATAAAAATCCCTCAATATC			
	Pyro IF Bio	AAAATAGGTTGTGTGGTT	85	BTA29: 51.359.847-51.359.931:+1 (58)	6
	Pyro IR	ACCACCTTAATAATAATACATAAACCTAC			
	Pyro S	AATAATAATACATAAACCTACACT			
<b><i>bIGF2/bH19</i></b> ICR CTCF 7	Pyro OF	ATTTTAGATAGGTTGAGAGTTGT	294	BTA29: 51.361.210-51.361.503:+1 (58) NW001494547.2: 3.721.274-3.721.567	19
	Pyro OR	CCAAACATAAAAATCCCTCATTATC			
	Pyro IF	GAGGTTGTGGGTGTGGAGAT	187	BTA29: 51.361.227-51.361.413:+1 (58)	15
	Pyro IR Bio	ATAACTTAAACAATATCCCATCCCC			
	Pyro S	GTGGGTGTGGAGATA			
<b><i>bSNRPN</i></b>	Pyro OF	GGGTGGGGTAGATATTATTTT	356	BTA21: 25.761-26.116:-1 (66) NW001501801.1: 23.926-24.281 bp	31
	Pyro OR	CCCAAATCCCAATAAAT			
	Pyro IF	GGTTTTTTGTTTGAGAGAG	334	BTA21: 25.761-26.094:-1 (66)	31
	Pyro IR Bio	CCCAAATCCCAATAAAT			
	Pyro S	GGTTTTTTGTTTGAGAGA			
<b><i>bPEG3</i></b>	Pyro OF	GATATGTTATTTTGGTTGTTGG	280	BTA18: 64,374,680-64,374,959:-1 (58) NW001493639.2: 537,812-538,091	23
	Pyro OR	ACCCTAATCCCAAACCTCAACTAACC			
	Pyro IF Bio	GTGTGGGGTATTAGAGTTTGT	235	BTA18: 64.374.680:64.374.914:-1 (58)	19
	Pyro IR	ACCCTAATCCCAAACCTCCA			
	Pyro S	CCCACTAACCAAAT			

Die Orientierung auf dem (+)- oder (-)-Strang ist mit +1 beziehungsweise -1 angegeben. BTA+Zahl = Nummer des *Bos taurus*-Chromosoms, OF = äußerer Forward-Primer, OR = äußerer Reverse-Primer, OIR = zugleich äußerer und innerer Reverse-Primer, IF = innerer Forward-Primer, IR = innerer Reverse-Primer, S = Sequenzierprimer, Bio = Biotinylierung am 5'-Ende des Primers. Die Anzahl der mit den Pyrosequenzierprimern analysierten CpG-Stellen ist fett gedruckt.

Die PCRs zur Charakterisierung der DMRs von *bIGF2/bH19*, *bPEG3* und *bSNRPN* verliefen alle mit einer vierminütigen Anfangsdenaturierung bei 95 °C, 30-35 Zyklen und einer Abschlussdenaturierung von 7 min bei 72 °C. Die ausführlichen und genspezifischen Programme sind in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: PCR-Programme zur Charakterisierung geprägter Regionen beim Rind.

		<i>bIGF2/bH19</i> ICR Klonierungs- fragment		<i>bIGF2/bH19</i> CTCF 1		<i>bIGF2/bH19</i> CTCF 4		<i>bIGF2/bH19</i> CTCF 7		<i>bSNRPN</i>		<i>bPEG3</i>	
Amplifikations- schritte	Dauer	1.PCR	2.PCR	1.PCR	2.PCR	1.PCR	2.PCR	1.PCR	2.PCR	1.PCR	2.PCR	1.PCR	2.PCR
1) Anfangs- denaturierung	4 min	95 °C											
2) Denaturierung	30 s	95 °C											
3) Annealing	30 s	55 °C	55 °C	55 °C	57 °C	58 °C	56 °C	58 °C	58 °C	55 °C	55 °C	59 °C	60 °C
4) Elongation	45 s	72 °C											
5) Abschluss- elongation	7 min	72 °C											
Zykluszahl (Wiederholungen der Schritte 2-4)		30	30	30	35	30	30	30	30	32	32	30	32

### 2.9.2. Limiting Dilution mit Genset 1

Für den Vergleich der Methylierung ungereifter, *in vitro* und *in vivo* gereifter Eizellen aus Tertiärfollikeln wurde das „Genset 1“ mit drei geprägten Regionen entwickelt. Aus der in dieser Arbeit charakterisierten, intergenischen Region zwischen den Genen *bIGF2* und *bH19* wurde ein die CTCF-Bindestelle 1 enthaltender Sequenzabschnitt zur Analyse mittels Limiting Dilution ausgewählt (vgl. Kap. 3.1.1.2.). Des Weiteren wurde der für das Prader-Willi-Syndrom relevante Bereich von *bSNRPN* (Promotor und Exon 1; El-Maarri *et al.*, 2001) anhand der bereits bei Lucifero *et al.* (2006) publizierten bovinen Region sowie die bei Liu *et al.* (2008) beschriebene Promotor-DMR von *bPEG3* untersucht. Alle Sequenzen der Limiting-Dilution-Primer für die MP- und SP-PCRs sowie die Sequenzen der Sequenzierprimer sind in Tab. 2.5 angegeben. Die geprägten Gene wurden direkt sequenziert. Zu diesem Zweck trugen die inneren SP-Primer am 5'-Ende jeweils die M13/Stuffer-Forward- oder Reverse-Sequenz, welche als Zielsequenz für die universellen M13/Stuffer-Sequenzierprimer dienen konnte (vgl. Kap. 2.7.3.). Die chromosomalen Lokalisationen der untersuchten Bereiche wurden entsprechend der NCBI Veröffentlichung von Btau\_4.0, Juli 2010 bzw. der EnSEMBL-Version 58 (Mai 2010) angegeben. Die Lokalisation von *bSNRPN* auf Chromosom 21 war 2010 noch nicht bekannt (Btau\_4.0, Juli 2010: Un.004.45: 727-24.176:-1) und wird daher wie schon in Kap. 2.9.1. entsprechend der neueren EnSEMBL-Version 66 (Februar 2012) sowie mit der NCBI-Zugangsnummer angegeben.

Tab. 2.5: Bisulfitprimersequenzen und chromosomale Lokalisation des Limiting-Dilution-Gensets 1.

Gen/ Region	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon- länge (bp)	Chromosomale Lokalisation in bp (EnSEMBL-Version)	Anzahl der CpG-Stellen
<i>bIGF2/bH19</i> ICR	MP OF	TGATTTTTTAGTTTTATTGTTTTG	300	BTA29: 51.358.475-51.358.774:+1 (58)	23
	MP OR	ATAAAAATCCCTCAATATCCC			
	SP IF	<sup>a</sup> AGAGGTTGTGGGTGTGGAGATA	230 (302)	BTA29: 51.358.512-51.358.741:+1 (58)	<b>20</b>
	SP IR	<sup>b</sup> TCCTCTCCACCTCAACAA			
<i>bSNRPN</i>	MP OF	GGGGTGGGGTAGATATTATTTT	299	BTA21: 25.819-26.117:-1 (66) NW001501801.1: 23.984-24.282 bp	31
	MP OR	AAAAAAAAAAAAATATTACCCACCACAC			
	SP IF	<sup>a</sup> GGTTTTTTTGTGGAGAGAG	276 (348)	BTA21: 25.819- 26.094:-1 (66)	<b>30</b>
	SP IR	<sup>b</sup> AAAAAAAAAAAAATATTACCCAC			
<i>bPEG3</i>	MP OF	GATATGTTTATTTTGGTTGTTGG	280	BTA18: 64.374.680-64.374.959:-1 (58)	23
	MP OR	ACCCTAATCCCAAACCTCAACTAACC			
	SP IF	<sup>a</sup> GTGTGGGGGTATTAGAGTTTGT	235 (307)	BTA18: 64.374.680-64.374.914:-1 (58)	<b>19</b>
	SP IR	<sup>b</sup> ACCCTAATCCCAAACCTCA			
Direkt- Sequenzier- Primer	<i>M13/Stuffer</i> Forward S	TGTA AACGACGGCCAGTCCACTCACTCACCACCC			
	<i>M13/Stuffer</i> Reverse S	CAGGAAACAGCTATGACCGGGTGGGAGGTGGGAGGG			

MP = Multiplex, SP = Singleplex, OF = äußerer Forward-Primer, OR = äußerer Reverse-Primer, OIF = zugleich äußerer und innerer Forward-Primer, IF = innerer Forward-Primer, IR = innerer Reverse-Primer, S = Sequenzierprimer, Bio = Biotinylierung am 5'-Ende des Primers. <sup>a</sup>Trägt am 5'-Ende die M13/Stuffer-Forward-Sequenz. <sup>b</sup>Trägt am 5'-Ende die M13/Stuffer-Reverse-Sequenz. Amplikonlänge in Klammern = tatsächliche Länge des Amplikons (genomische Länge + M13/Stuffer-Sequenz). Die Orientierung auf dem (+)- oder (-)-Strang ist mit +1 beziehungsweise -1 angegeben. BTA+Zahl = Nummer des *Bos taurus*-Chromosoms. Die Anzahl der per direkter Sequenzierung analysierten CpG-Stellen ist fett gedruckt.

In einer Multiplex-PCR wurden zunächst alle drei Gene (*bIGF2/bH19*, *bPEG* und *bSNRPN*) gleichzeitig amplifiziert, ehe aus dem MP-Produkt jedes Gen einzeln in einer Singleplex-PCR angereichert wurde. Alle PCRs verliefen mit einer vierminütigen Anfangsdenaturierung bei 95 °C, 30-35 Zyklen und einer Abschlussdenaturierung von 7 min bei 72 °C. Die ausführlichen und genspezifischen Programme sind in Tab. 2.6 dargestellt.

Tab. 2.6: PCR-Programme der Limiting Dilution mit Genset 1.

Amplifikationsschritte	Dauer	Multiplex-PCR	<i>bIGF2/bH19</i> ICR	<i>bSNRPN</i>	<i>bPEG3</i>
1) Anfangsdenaturierung	4 min	95 °C			
2) Denaturierung	30 s	95 °C			
3) Annealing	30 s	54 °C	65 °C	57 °C	57 °C
4) Elongation	45 s	72 °C			
5) Abschlusselongation	7 min	72 °C			
Zyklenzahl (Wiederholungen der Schritte 2-4)		35	32	30	30

### 2.9.3. Limiting Dilution mit Genset 2

Zum Vergleich des Methylierungsmusters gereifter und ungereifter präpuberaler und adulter Rindereizellen wurde das die ungeprägten Gene *bSLC2A1*, *bPRDX1* und *bZAR1* enthaltende Genset 2 entwickelt. Alle drei Gene wurden mit den M13/Stuffer-Primern (vgl. Kap. 2.7.3. und 2.9.2.) direkt sequenziert. Wie im Genset 1 wurden deshalb die inneren Primer der SP-PCR um die M13/Stuffer-Sequenzen verlängert. Alle Primer für die MP- und SP-PCR sind in Tab. 2.7 dargestellt. Die chromosomalen Lokalisationen der untersuchten Bereiche wurden entsprechend der NCBI Veröffentlichung von Btau\_4.0, August 2010 bzw. der Ensembl-Version 59 (August 2010) angegeben.



Tab. 2.7: Bisulfiteprimersequenzen und chromosomale Lokalisation des Limiting-Dilution-Gensets 2.

Gen/ Region	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikon- länge (bp)	Chromosomale Lokalisation in bp (Ensembl-Version 59)	Anzahl der CpG-Stellen
<i>bSLC2A1</i>	MP OF	GTTTTATAGGATTTAGTTATTGGTTAG	239	BTA3: 110.220.764-110.221.002:-1	14
	MP OR	AAAAATCACACAACCAAAAAATTCTC			
	SP IF	<sup>a</sup> GTTTTATAGGATTTAGTTATTGGTTAG	213 (285)	BTA3: 110.220.790-110.221.002:-1	14
	SP IR	<sup>b</sup> AAAACCAAAAAAAAAATAAAAAATCC			
<i>bPRDX1</i>	MP OF	TTGTTTTATATTTATTAGTTTTATTGAAATAG	307	BTA3: 107.467.332-107.467.638:-1	24
	MP OR	AAAAATTAATAAAACCCCTCAAAC			
	SP IF	<sup>a</sup> TTTTATATTTATTAGTTTTATTGAAATAGGAT	220 (292)	BTA3: 107.467.415-107.467.634:-1	17
	SP IR	<sup>b</sup> CCCCCAACAAAAAAAAAAC			
<i>bZAR1</i>	MP OF	AAAGTTTTTTTTGTAGATTATTTAAGAAT	276	BTA6: 69.751.593- 69.751.868:+1	21
	MP OR	AAAACAACCATCAATATACCCCTA			
	SP IF	<sup>a</sup> GGGTGTGGAATATTTTATATTAAGGT	230 (302)	BTA6: 64.374.680-64.374.914:+1	18
	SP IR	<sup>b</sup> AAAACAACCATCAATATACCCCTAC			
Direkt- Sequenzier- Primer	M13/Stuffer Forward S	TGTA AACGACGGCCAGTCCACTCACTCACCCACCC			
	M13/Stuffer Reverse S	CAGGAAACAGCTATGACCGGGTGGGAGGTGGGAGGG			

MP = Multiplex, SP = Singleplex, OF = äußerer Forward-Primer, OR = äußerer Reverse-Primer, IF = innerer Forward-Primer, IR = innerer Reverse-Primer, S = Sequenzierprimer. <sup>a</sup>Trägt am 5'-Ende die M13/Stuffer-Forward-Sequenz. <sup>b</sup>Trägt am 5'-Ende die M13/Stuffer-Reverse-Sequenz. Amplikonlänge in Klammern = tatsächliche Länge des Amplikons (genomische Länge + M13/Stuffer-Sequenz). Die Orientierung auf dem (+)- oder (-)-Strang ist mit +1 beziehungsweise -1 angegeben. BTA+Zahl = Nummer des *Bos taurus*-Chromosoms. Die Anzahl der per direkter Sequenzierung analysierten CpG-Stellen ist fett gedruckt.

In einer Multiplex-PCR wurden zunächst alle drei Gene (*bSLC2A1*, *bPRDX1* und *bZAR1*) gleichzeitig amplifiziert, ehe aus dem MP-Produkt jedes Gen einzeln in einer SP-PCR angereichert wurde. Alle PCRs verliefen mit einer vierminütigen Anfangsdenaturierung bei 95 °C, 31-35 Zyklen und einer Abschlussdenaturierung von 5 min bei 72 °C. Die ausführlichen und genspezifischen Programme sind in Tab. 2.8 dargestellt.

Tab. 2.8: PCR-Programme der Limiting Dilution mit Genset 2.

Amplifikationsschritte	Dauer	Multiplex- PCR	<i>bSLC2A1</i>	<i>bPRDX1</i>	<i>bZAR1</i>
1) Anfangsdenaturierung	4 min	95 °C			
2) Denaturierung	30 s	95 °C			
3) Annealing	30 s	54 °C	58 °C	54 °C	58 °C
4) Elongation	45 s	72 °C			
5) Abschlusselongation	5 min	72 °C			
Zyklenzahl (Wiederholungen der Schritte 2-4)		35	31	32	31

### **2.10. Computerprogramme und Datenbanken**

Alle DNA-Sequenzen wurden aus den Genomdatenbanken des EnSEMBL Genome Browsers (<http://www.ensembl.org/index.html>) und des National Centers for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Zur Prognose von CpG-Inseln innerhalb von DNA-Sequenzen wurde das MethPrimer Programm verwendet (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>; Li and Dahiya, 2002). Es wurden die Standardeinstellungen verwendet. Sequenzvergleiche und -Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies wurden mit Hilfe von mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) unter Verwendung des LAGAN-Algorithmus (Brudno *et al.*, 2003) ermittelt. CTCF-Bindungsstellen wurden mit CTCFBSDB (CTCF-binding site database; <http://insulatordb.uthsc.edu/>) vorhergesagt (Bao *et al.*, 2008). Die visuelle Betrachtung und Qualitätskontrolle der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem frei erhältlichen Programm Chromas Lite ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)). Zur Alignierung von DNA-Sequenzen im FASTA-Format wurde das Programm BioEdit 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) verwendet (Hall, 1999). Darüber hinaus wurde Microsoft-Office 2003 zur Textverarbeitung, Datenerfassung und zur Erstellung von Abbildungen herangezogen.



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Charakterisierung der differenziell methylierten Regionen von drei geprägten Genen beim Rind

Zum Studium der ART-vermittelten Auswirkungen auf die DNA-Methylierung geprägter Gene am bovinen Modellorgansimus mussten die zu untersuchenden Sequenzbereiche vorab identifiziert und ihr differenzieller Methylierungsstatus nachgewiesen (*bIGF2/bH19*) bzw. validiert (*bSNRPN*, *bPEG3*) werden. Dies geschah durch eingehende Analyse der bestehenden Literatur sowie durch klassische Bisulfitsequenzierung und quantitative Pyrosequenzierung. Die folgenden Ergebnisse der DMR-Charakterisierungen wurden in der Fachzeitschrift „*Cytogenetic and Genome Research*“ veröffentlicht (Hansmann *et al.*, 2011).

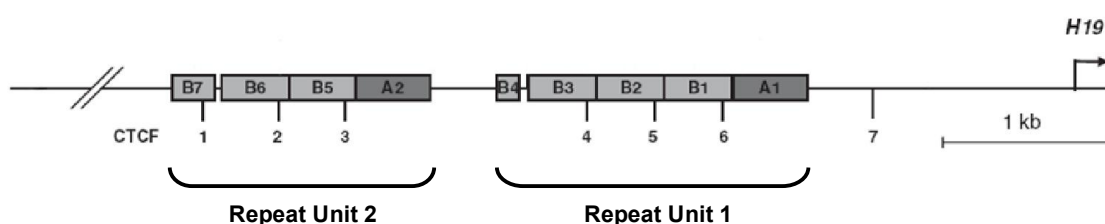
##### 3.1.1. Identifizierung und Charakterisierung der bovinen, intergenischen *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion

Die Existenz und Lage der intergenischen Imprintingkontrollregion *IGF2/H19* im Rind war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht nachgewiesen oder veröffentlicht worden. Aufgrund der hohen Relevanz dieser geprägten Region für das fetale Wachstum von Mensch und Maus (Leighton *et al.*, 1995a; Leighton *et al.*, 1995b; Eggermann, 2009; Weksberg *et al.*, 2010) war jedoch anzunehmen, dass auch *Bos taurus* einen orthologen, entsprechend geprägten Bereich zwischen den Genen *bIGF2* und *bH19* besitzt. Durch Vergleich der Sequenzkonservierung zwischen Mensch und Rind bzw. Maus und Rind wurde daher zunächst eine geeignete Kandidatenregion identifiziert, welche dann mittels klassischer Bisulfitsequenzierung überprüft und als geprägt (differenziell methyliert) bestätigt wurde.

##### 3.1.1.1. *In silico*-Recherche zur Identifizierung einer Kandidatenregion beim Rind

Um die Lage der intergenischen *IGF2/H19*-ICR beim Rind zu identifizieren, musste vorab durch ausführliche Literaturrecherche eine genomische Sequenz in der humanen oder murinen IC1/DMD definiert werden, welche als Ausgangspunkt für die Vergleiche mit dem bovinen Genom dienen konnten und deren differenzielle Methylierung bekannt war. Da die evolutionäre Distanz zwischen Mensch und Rind geringer ist als die von Rind und Maus, lag der Fokus hierbei auf der humanen IC1. Sie umfasst beim Menschen eine Serie von direkten Repeats, welche strukturell in zwei Einheiten, die Repeat Units 1 und 2, eingeteilt werden.

Die Repeat-Folge beginnt etwa -2 kb vor dem *H19*-Transkriptionsstartpunkt (TSS) und erstreckt sich über weitere 3,3 kb bis -5,3 kb upstream (Frevel *et al.*, 1999b). Die Region enthält insgesamt sieben potentielle CTCF-Bindestellen (Hark *et al.*, 2000; Bell und Felsenfeld, 2000). Jede Repeat-Einheit besteht aus je zwei verschiedenen direkten Repeat-Typen, dem 450 bp langen A-Repeat und dem 400 bp langen B-Repeat. Die A-Sequenz liegt pro Einheit nur in einer Kopie vor, während das B-Repeat 3,5 mal in Einheit 1 bzw. 2,5 mal in Einheit 2 vorkommt. Beide Repeat-Einheiten sind durch 387 bp spezifischer Sequenz voneinander getrennt (Abb. 3.1; Frevel *et al.*, 1999b).

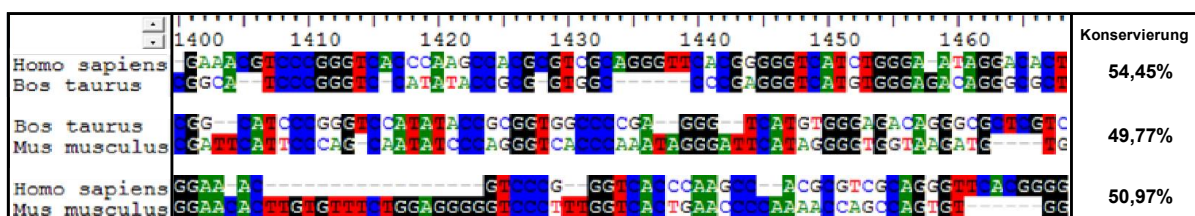


**Abb. 3.1: Struktur der humanen *Igf2/H19*-ICR.** Die ICR liegt ca. 2 kb upstream der *H19*-Transkriptionsstartstelle und ist eingeteilt in zwei Einheiten direkter Repeats (Repeat Unit 1 und 2; Abb. übernommen. aus Sparago *et al.*, 2004, und modifiziert).

Für die direkten Repeats B1 und B2 konnte eine Enhancer-blockierende Aktivität und die Bindung des CTCF-Proteins im B1-Repeat (Bindungsstelle 6) nachgewiesen werden (Hark *et al.*, 2000). Verlust der CTCF-Bindungsstellen 2 und 3 resultiert in einer Hypermethylierung der *Igf2/H19*-DMR, insbesondere der CTCF-Bindungsstelle 6, und führt so zu einem Verlust des Imprintings und biallelischer Expression von *Igf2* sowie zur Herunterregulierung der *H19*-Expression (Sparago *et al.*, 2004). Die Studienergebnisse lassen auf eine Beteiligung beider Repeateinheiten an der Regulation des humanen *Igf2/H19*-Lokus und auf eine gewichtige Rolle der humanen CTCF-Bindestelle 6 schließen. Bezüglich des Methylierungsstatus der CTCF-Bindestellen lieferte die Literatur jedoch widersprüchliche Aussagen: Während Takai *et al.* (2001) von den insgesamt sieben potentiellen CTCF-Bindestellen nur für die im Repeat B1 lokalisierte CTCF-Stelle 6 eine differenzielle Methylierung in normalem Embryonalgewebe ermittelten, konnten Sparago *et al.* (2004) jedoch auch für die CTCF-Stelle 4 elternspezifische Methylierung bei gesunden Personen nachweisen. Da eine differenzielle Methylierung somit nur für das humane Repeat-Unit 1 beschrieben wurde, wurde zur Identifizierung einer orthologen und möglicherweise geprägten Region im Rind die Sequenz der humanen Repeat Unit 1 verwendet (Repeats B3-A1; NCBI Build 37.1: GenBank-Zugangsnummer AF125183, 6841-8521 bp oder Contig NT009237.18 des Chromosoms HSA11: 2.020.592-2.022.331 bp).

Die Repeateinheit wurde mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST; Altschul *et al.*, 1990) mit dem *Bos taurus*-Genom (Version Btau 4.0, August 2008) verglichen. Der Datenbankabgleich („BLAST-Suche“) ergab mehrere kurze Sequenzübereinstimmungen innerhalb einer 3,4 kb großen Region auf dem BTA-Chromosom 29 (51.358.400-51.361.800 bp) zwischen den bovinen Genen *IGF2* und *H19* (Abb. 3.3 A, B).

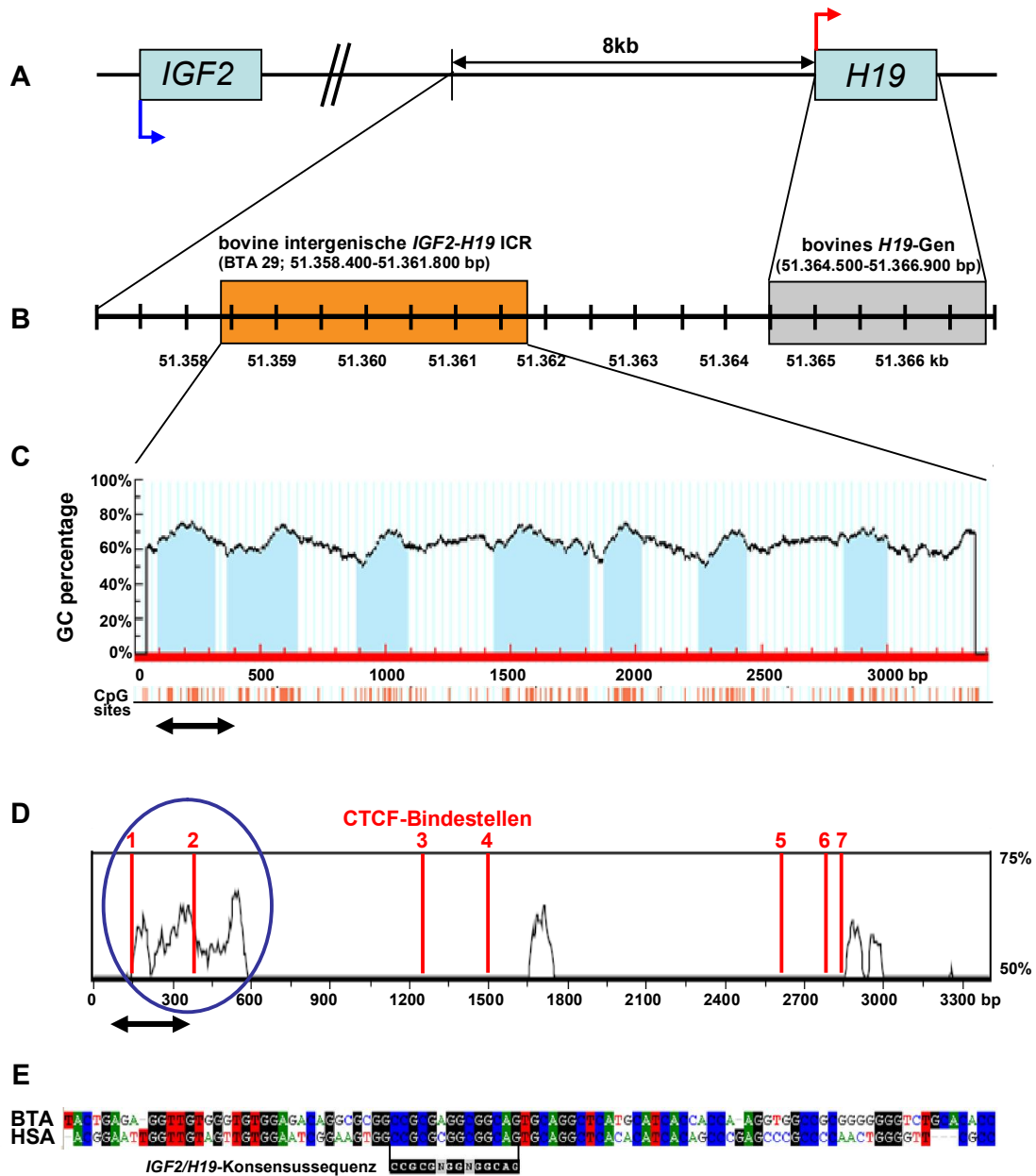
In einem nächsten Schritt wurde die Sequenzkonservierung dieses Abschnitts zwischen Mensch, Maus und Rind ermittelt, um einen Eindruck der generellen evolutionären Konservierung der ICR1 zu gewinnen. Die Sequenzkonservierung der intergenischen *IGF2/H19* IC1 war jedoch auch bei Beachtung der unterschiedlichen Sequenzlängen zwischen allen drei Spezies relativ gering (Mensch - Maus: 51%, Mensch – Rind: 54%, Maus – Rind: 50%; Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Exemplarische Darstellung der Sequenzkonservierung der intergenischen *IGF2/H19*-DMR zwischen Mensch, Maus und Rind.** Mit dem Programm BioEdit wurden die Sequenzen der humanen Repeat Unit 1 (NCBI Build 37.1: GenBank-Zugangsnummer AF125183, 6841-8521 bp oder Contig NT009237.18 des Chromosoms HSA11: 2.020.592-2.022.331 bp), der DMD der Maus (NCBI Build 37.1: Contig NT039437.7 auf MMU7: 149.766.048-149.768.048bp) und 3,4 kb der intergenischen bovinen Region (BTA29: 51.358.400-51.361.800 bp, Btau 4.0) aligniert.

Aus diesem Grund wurde die 3,4 kb lange bovine Region durch weitere *in silico*-Recherchen auf typische Sequenzmotive, welche eine Rolle bei der Prägung des *IGF2/H19*-Genclusters spielen, untersucht. Das Onlineprogramm MethPrimer identifizierte mehrere CpG-Inseln in dieser Region, welche sich innerhalb eines Bereichs von 3,1 kb befanden und sich über einen Bereich von -6,1 kb bis -3 kb upstream der *H19*-TSS erstreckten (Abb. 3.3 C). Die evolutionäre Konservierung der bovinen 3,4 kp-Sequenz mit der 1,68 kb langen humanen Repeat Unit 1 (AF125183, 6841-8521 bp) wurde durch Alignierung mit Hilfe des mVISTA-Programms ermittelt und ist in Abb. 3.3 D als sogenannter Identity-Plot dargestellt. Ein 450 bp-Segment, welches die ersten beiden CpG-Inseln einschließt, zeigte dabei die größte Sequenzübereinstimmung nach Alignierung mit der humanen IC1 (blauer Kreis). Dieses Segment (BTA29: 51.358.550-51.359.000 bp) war etwa -6 kb upstream vom *H19*-Promoter lokalisiert. Da die humane IC1 als Isolator durch Bindung des Enhancer-blockierenden CTCF-Proteins

fungiert (Bell und Felsenfeld, 2000; Hark *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 2006; vgl. Kap. 1.1.2.2.), wurde die 3,4 kb lange bovine Region auf das Vorhandensein von potentiellen CTCF-Bindestellen untersucht. Das Online-Prädiktionsprogramm CTCFBS-Database identifizierte sieben CTCF-Bindestellen (Abb. 3.3 D). Innerhalb der ersten CpG-Insel mit dem evolutionär konservierten 450 bp-DNA-Segment befand sich eine Bindestelle mit der Konsensussequenz 5'-GCGGCCGCGAGGCGGCAGTG-3' (CTCF-Stelle 1, Abb. 3.3 D). Sie ist der humanen Sequenz der CTCF-Bindestelle 6 im Repeat B1 des Repeat Unit 1 ortholog, welche differenziell auf dem paternalen Chromosom methyliert ist (Frevel *et al.*, 1999b; Takai *et al.*, 2001) und *in vitro* eine Enhancer-blockierende Funktion ausübt (Hark *et al.*, 2000). Die Sequenz dieser sechsten CTCF-Stelle, welche von Frevel *et al.*, 1999a erstmals beschrieben wurde, ist hochgradig konserviert zwischen Mensch, Maus und Ratte (Bell und Felsenfeld, 2000). Dementsprechend wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine starke Konservierung zwischen Mensch und Rind nachgewiesen (Abb. 3.3 E). Die Sequenzen der bovinen CTCF-Bindestellen 4 und 7 erwiesen sich als identisch mit der Sequenz der bovinen CTCF-Stelle 1, sie liegen jedoch innerhalb von generell weniger stark konservierten DNA-Bereichen.

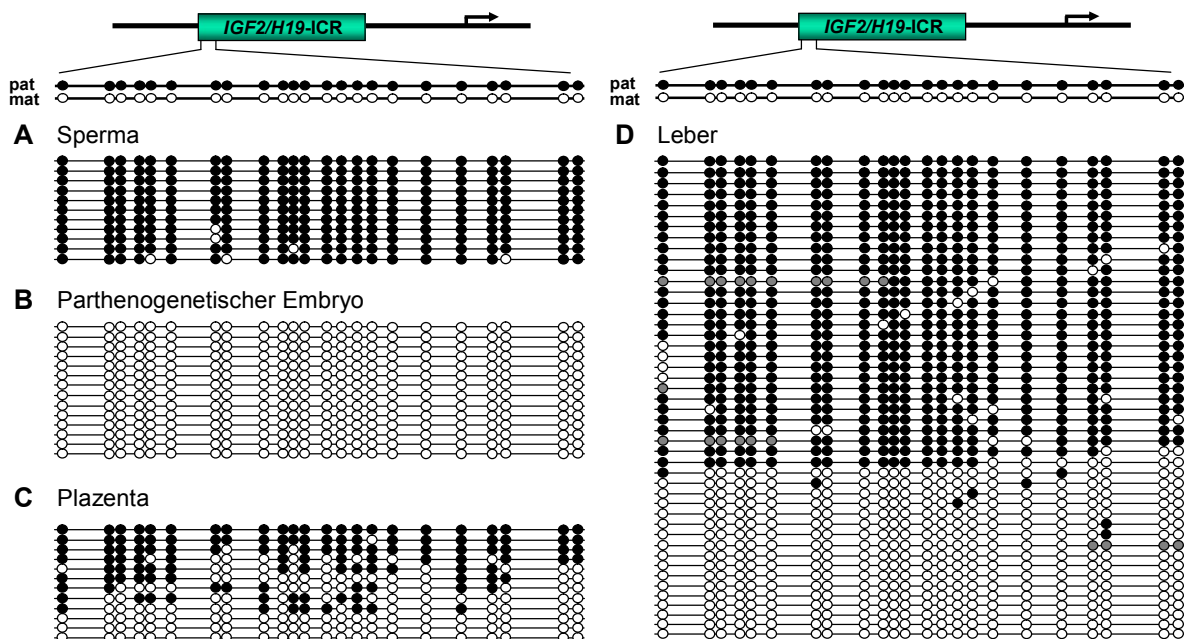


**Abb. 3.3: Identifizierung der bovinen *IGF2/H19*-ICR.** (A) Schematische Darstellung der bovinen *IGF2/H19*-Region. Das *IGF2*-Gen wird vom paternalen Chromosom transkribiert (blauer Pfeil), *H19* vom maternalen Chromosom (roter Pfeil). (B) Ergebnis der BLAST-Suche der humanen IC1-Sequenz gegen das *B. taurus*-Genom. BLAST-Treffer verteilen sich über eine 3,4 kb große Region (BTA29: 51.358.400-51.361.800 bp, Btau 4.0), gekennzeichnet durch die orange Box -6,4 kb bis -3 kb upstream der *H19*-TSS. (C) GC-Anteil und Verteilung der CpG-Inseln (hellblaue Bereiche) innerhalb der 3,4 kb langen, zur humanen IC1 orthologen Region. Die Doppelpfeile in (C) und (D) markieren die Lokalisation des 300 bp-Amplikons zur Bisulfidsequenzierung. (D) Alignment der bovinen 3,4 kb-Sequenz mit der humanen IC1-Sequenz (NT009237.18, AF125183). Die stärkste Sequenzübereinstimmung befindet sich in der am weitesten upstream-gelegenen Region (blauer Kreis). CTCF-Bindestellen 1-7 sind durch rote vertikale Linien gekennzeichnet. (E) Sequenzkonservierung zwischen der bovinen CTCF-Bindestelle 1 und der humanen Bindestelle 6. Die hochkonservierte *IGF2/H19*-Konsensussequenz (Bell und Felsenfeld, 2000) ist unterhalb des Alignments an entsprechender Stelle angegeben.



### 3.1.1.2. Elternspezifische Methylierung der bovinen *IGF2/H19-ICR*

Die Bisulfitsequenzierung von einzelnen Plasmiden ist die Standardmethode zur erstmaligen Methylierungsanalyse bislang uncharakterisierter DNA-Regionen. Sie gestattet Einblick in die Verteilung der Methylierung über einzelne Allele und DNA-Moleküle und kann eine große Anzahl von CpG-Stellen erfassen. Zur Untersuchung der allelspezifischen Methylierung der in Kap. 3.1.1.1. durch *in silico*-Recherche ermittelten potentiellen bovinen *IGF2/H19-DMR* wurde ein 300 bp langes Amplikon mittels einer *semi-nested*-PCR amplifiziert. Dieses Amplikon enthielt die erste CpG-Insel mit der CTCF-Bindestelle 1 sowie insgesamt 23 CpG-Stellen (Doppelpfeil in Abb. 3.3 C und D). Wie für die geprägte *IGF2/H19-ICR* erwartet lag die analysierte Region in der bovinen Spermien-DNA vollständig methyliert vor (>98%, Abb. 3.4 A). Die einzelnen unmethylierten Stellen in den elf sequenzierten DNA-Molekülen wurden als stochastische Methylierungsfehler ohne funktionelle Konsequenz gewertet. Im Gegensatz zum Spermia war der parthenogenetische Embryo, welcher mit zwei maternalen Genomen ausgestattet ist, vollständig unmethyliert (100%, Abb. 3.4 B).



**Abb. 3.4:** Methylierungsstatus der identifizierten bovinen intergenischen *IGF2/H19-ICR* in DNA von Spermien (A), einem parthenogenetischen Embryo (B), Plazenta (C) und Leber (D). Die analysierte Region enthält 23 CpG-Stellen. Jede Linie repräsentiert ein einzelnes Plasmid oder DNA-Molekül des Ausgangsmaterials. Schwarze Kreise entsprechen methylierten und weiße Kreise unmethylierte CpG-Stellen. Graue Kreise entsprechen CpG-Stellen, die aufgrund einer schlechten Sequenzqualität nicht analysiert werden konnten.

In der Plazenta und der Leber waren 46% bzw. 60% der analysierten CpG-Stellen methyliert (Abb. 3.4 C und D). Dies entspricht einer differenziellen Methylierung der paternalen und maternalen Allele. In der Plazenta zeigten 3 von 12 sequenzierten Allelen ein nahezu vollständig methyliertes (paternales) Muster, während 3 Allele ein vollständig unmethyliertes (maternales) Muster aufwiesen (Abb. 3.4 C). Die Methylierung der restlichen 6 Plazentaallele war hingegen gemischt und keinem eindeutigen Methylierungsstatus (ursprünglich methyliert oder unmethyliert) zuweisbar. In der Leber zeigten 28 Allele ein paternales, 17 Allele ein maternales, aber nur ein Allel ein intermediäres Methylierungsmuster (Abb. 3.4 D).

### **3.1.2. Quantitativer Nachweis der differenziellen Methylierung der geprägten Gene *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3* in unterschiedlichen bovinen Zelltypen**

Zur Analyse entwicklungsrelevanter Gene in Rinderoozyten mussten vorab die noch teilweise unbekannt DMRs der untersuchten Gene identifiziert und ihr DMR-Status bestätigt werden. Mit Hilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung lässt sich die Methylierung eines oder vieler PCR-Produkte relativ schnell und einfach quantifizieren, ohne diese vorher aufwendig klonieren und anschließend einzelne Plasmide sequenzieren zu müssen. Dadurch gestaltet sich die Pyrosequenzierung weniger kostenintensiv und wesentlich schneller als die klassische Bisulfitsequenzierung und erlaubt das schnelle quantitative Screening von bisulfitkonvertierter DNA. In Hinblick auf die Charakterisierung sowie eine mögliche Hochdurchsatzanwendung zur quantitativen Methylierungsanalyse geprägter Rindergene wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Pyrosequenzierungsassays für die neu identifizierte bovine *IGF2/H19*-ICR sowie je ein Assay für die bereits beschriebenen Promotor-DMRs von *bSNRPN* (Lucifero *et al.*, 2006) und *bPEG3* (Liu *et al.*, 2008) entworfen. In der *IGF2/H19*-ICR wurden mittels Pyrosequenzierung insgesamt 19 CpGs im Bereich der CTCF-Bindestellen 1, 4 und 7 quantifiziert, 2 CpGs im Promotorbereich von *bSNRPN* und 3 im Promotor von *bPEG3* (vgl. Tab. 2.3). Die durchschnittlichen Methylierungswerte aller analysierten CpGs der drei bovinen DMRs in Sperma, parthenogenetischen Embryonen, Plazenta und drei somatischen Geweben (Herz, Niere und Leber) sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Die CTCF-Bindestellen 1, 4 und 7 zeigten alle drei elternspezifische Methylierungsmuster: Die paternal geprägte *IGF2/H19*-DMR war in der Spermien-DNA deutlich hypermethyliert (88-98%), vollständig unmethyliert in parthenogenetischen Embryonen (1-2%) und differenziell methyliert (45-55%) in der Plazenta und den somatischen Geweben. Im Gegensatz dazu waren die maternal geprägten

Gene *SNRPN* und *PEG3* wie erwartet in Sperma unmethyliert (3-4%), in den parthenogenetischen Embryonen komplett methyliert (98-99%) sowie differenziell methyliert in der Plazenta und den drei viszeralen Geweben (47-56%).

**Tab. 3.1: Methylierungslevel der *IGF2/H19*-, *SNRPN*- und *PEG3*-DMRs in verschiedenen bovinen Geweben, ermittelt durch Pyrosequenzierung.**

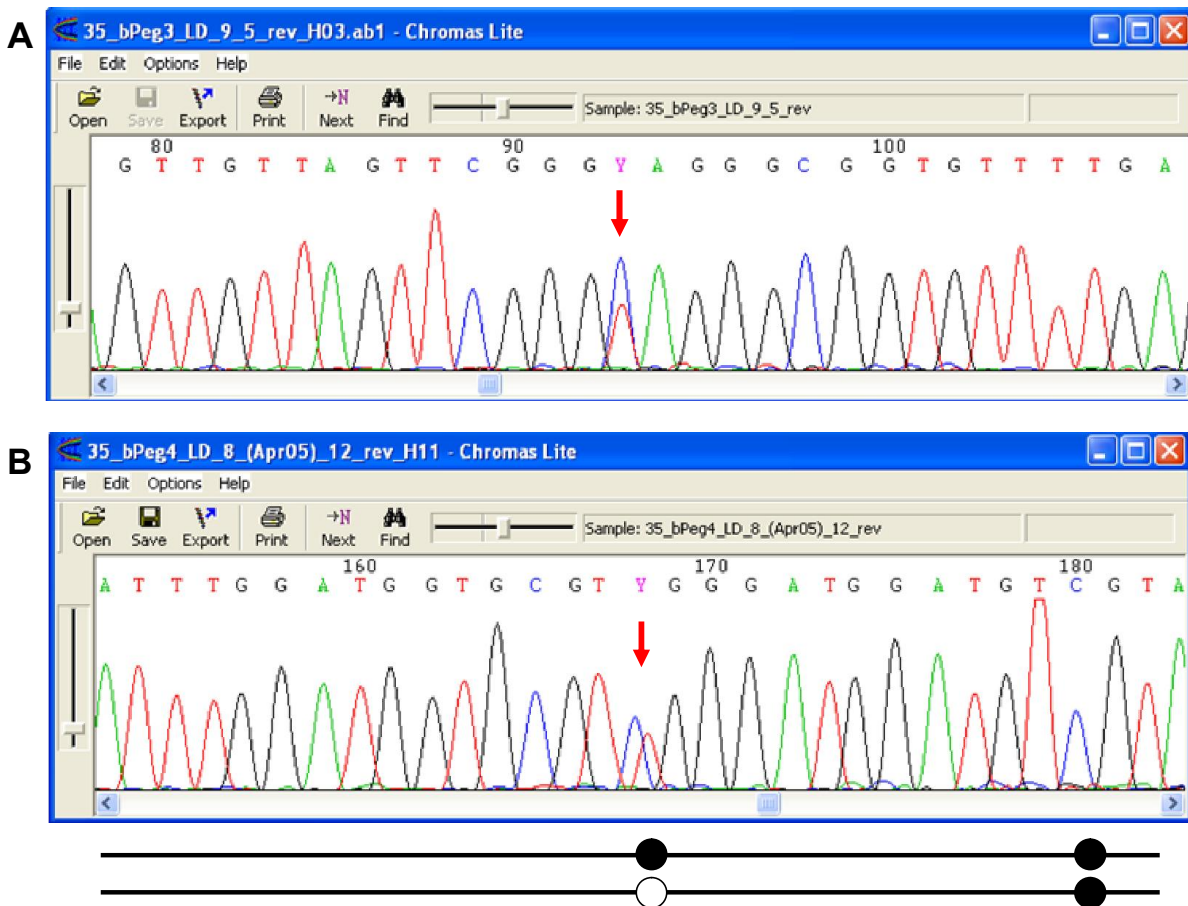
Gewebe-/Zelltyp	Methylierungslevel (%)				
	<i>IGF2/H19</i>			<i>SNRPN</i>	<i>PEG3</i>
	CTCF 1	CTCF 4	CTCF 7		
Sperma	97	88	98	4	3
Parthenogenetische Embryos	1	1	2	98	99
Plazenta	47	51	51	47	49
Herz	47	55	51	56	50
Niere	45	49	53	54	51
Leber	47	52	51	52	50

### 3.2. Limiting Dilution und Methylierungsanalyse von bovinen Oozyten

Im Anschluss an die Charakterisierung der Methylierungsmuster dreier entwicklungsrelevanter, geprägter DMRs sowie der Promotoren dreier ungeprägter Gene im bovinen Organismus sollte in einem nächsten Schritt der mögliche Einfluss assistierter Reproduktionstechniken auf die Methylierung von Rindereizellen untersucht werden. Dabei war zunächst der Effekt der *in vitro*-Maturation (IVM) in unterschiedlichen Medien im Vergleich zu ungereiften und *in vivo*-gereiften, adulten Oozyten von Interesse (Kap. 3.2.1.). Im Hinblick auf eine erfolgreiche Blastozystenproduktion standen hier die geprägten und potentiell krankheitsverursachenden Gene/DMRs *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3* im Blickpunkt. In Kap. 3.2.2. wurde neben der IVM außerdem der Einfluss des Alters sowie der Effekt hormoneller Stimulation des Follikelwachstums auf die Methylierungsprofile von Rindereizellen untersucht. Hier lagen die für das Follikelwachstum und die Eizell-Zygoten-Transition relevanten ungeprägten Gene im Focus.

Die Amplifikation und direkte Sangersequenzierung nach Limiting Dilution (LD) von 10 Eizellen erlaubte die Analyse einzelner DNA-Moleküle und damit einzelner Eizellen ohne Gefahr einer Ergebnisverfälschung durch einen zufälligen Amplifikations- oder Klonierungs-

Bias (vgl. Kap. 2.8.). Da sich der Imprintingstatus der einzelnen Oozytenallele aus der beobachteten Methylierung der durch die LD separierten DNA-Moleküle ableiten lässt, wird im Folgenden von der Methylierung der einzelnen „Allele“ anstatt der Methylierung der hochamplifizierten DNA-Moleküle gesprochen. Gelegentlich wurden bei der Auswertung Sequenzen mit heterozygotem Charakter erhalten, welche auf ein Vorhandensein von mindestens zwei DNA-Molekülen zurückschließen lassen. Sie waren meist erkennbar an unkonvertierten Nicht-CpG-Cytosinen oder an CpG-Stellen, die sowohl ein T und ein C an der C-Position aufwiesen. Diese Sequenzen wurden deshalb als zwei Allele in die Auswertung aufgenommen. Zwei Beispiele einer derartigen Sequenz ist in Abb. 3.5 dargestellt.



**Abb. 3.5: Sequenzbeispiele für LD-Produkte mit mindestens zwei Allelen.** Anhand nicht konvertierter Cs wird das Vorhandensein mehrerer Allele identifizierbar. Derartige Sequenzen wurden als zwei Allele gewertet, welche sich an der mit dem roten Pfeil markierten Stelle unterschieden. **(A)** Unkonvertiertes Nicht-CpG-Cytosin. **(B)** Methylierte und unmethylierte CpG-Stelle und ihre Darstellung als zwei Allele im Lollipop-Diagramm.

### 3.2.1. DNA-Methylierungsprofile der geprägten Gene in ungereiften, *in vitro*- und *in vivo*-gereiften adulten Rindereizellen

Anhand des Rindermodells wurden die möglichen Effekte der IVM auf die Methylierungsmuster der drei geprägten Loci *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3* untersucht. Die aus Tertiärfollikeln gewonnen Rinderoozyten für die IVM wurden in zwei unterschiedlichen Reifungsmedien, TCM (Tissue Culture Medium 199) und mSOF (modifiziertes synthetisches Oviduktfluid), *in vitro*-gereift. Zum Vergleich wurden auch die Methylierungsmuster *in vivo*-gereifter und ungereifter Oozyten betrachtet. Pro Gruppe wurden insgesamt jeweils 14 Pools zu je 10 Oozyten analysiert. Lediglich für die *in vivo*-Gruppe standen nur sieben Pools zur Verfügung, da die Eizellen nur durch OPU nach Superovulation aus lebenden Spendertieren gewonnen werden konnten.

Die zehn Oozyten enthielten ungeachtet ihres Maturationsstatus theoretisch insgesamt 40 Kopien eines Gens oder DNA-Lokus. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die ungereiften Oozyten, welche in der verlängerten Prophase I arretiert sind, ein infolge der DNA-Replikation doppeltes diploides Genom mit Zweischwesterchromatidchromosomen enthalten. Die gereiften Eizellen sind hingegen nach der ersten Reifeteilung haploid, besitzen jedoch weiterhin die Doppelchromosomen. Zudem haftet der extrudierte Polkörper mit der zweiten Hälfte des ursprünglichen Genoms der Eizelle unterhalb der *Zona pellucida* an. Im Falle der drei untersuchten Loci entspricht dies demnach einem Maximum von insgesamt 120 Allelen oder DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial in der MP-PCR (vgl. Kap. 2.8.). Infolge der Limiting Dilution von 10 Eizellen wurden durchschnittlich insgesamt 14,5 von 120 möglichen Allelen aus ungereiften, 15,2 Allele aus TCM-gereiften, 15,4 aus mSOF-gereiften und 11,1 aus *in vivo*-gereiften Oozyten in Form eines PCR-Produkts gewonnen (Tab. 3.2). Dies entsprach etwa 10% der DNA-Moleküle des Ausgangsmaterials und ist durch die hohe DNA-Verlustrate und Fragmentierung durch die Bisulfitbehandlung zu erklären. Die Ausbeute der Limiting Dilution war deshalb auch abhängig von der Amplikonlänge und somit genspezifisch.

Durchschnittlich wurden pro Gen und Pool 6,58 Allele für *IGF2/H19*, 3,7 Allele für *SNRPN* und 3,8 für *PEG3* erhalten. Hierbei ergaben die IVM- und ungereiften Eizellen jedoch mehr Allele als die *in vivo*-gereiften, nämlich im Schnitt pro 10er-Pool 4,1 Allele für *SNRPN* und 4,0 für *PEG3* sowie 6,9 für *H19* (Werte in Tabelle nicht gezeigt). Aus den *in vivo*-gereiften Oozyten wurden dagegen nur 5,6 Allele für *H19*, 2,3 für *SNRPN* und 3,3 für *PEG3* gewonnen, was leicht unter der Zahl der anderen drei Gruppen lag (Tab. 3.2). Dies ist vermutlich auf ein

stochastisches Ungleichgewicht aufgrund der geringeren Anzahl von untersuchten Pools in der *in vivo*-Gruppe zurückzuführen.

Tab. 3.2: Übersicht über die Anzahl der durch Limiting Dilution erhaltenen Allele (Genset 1).

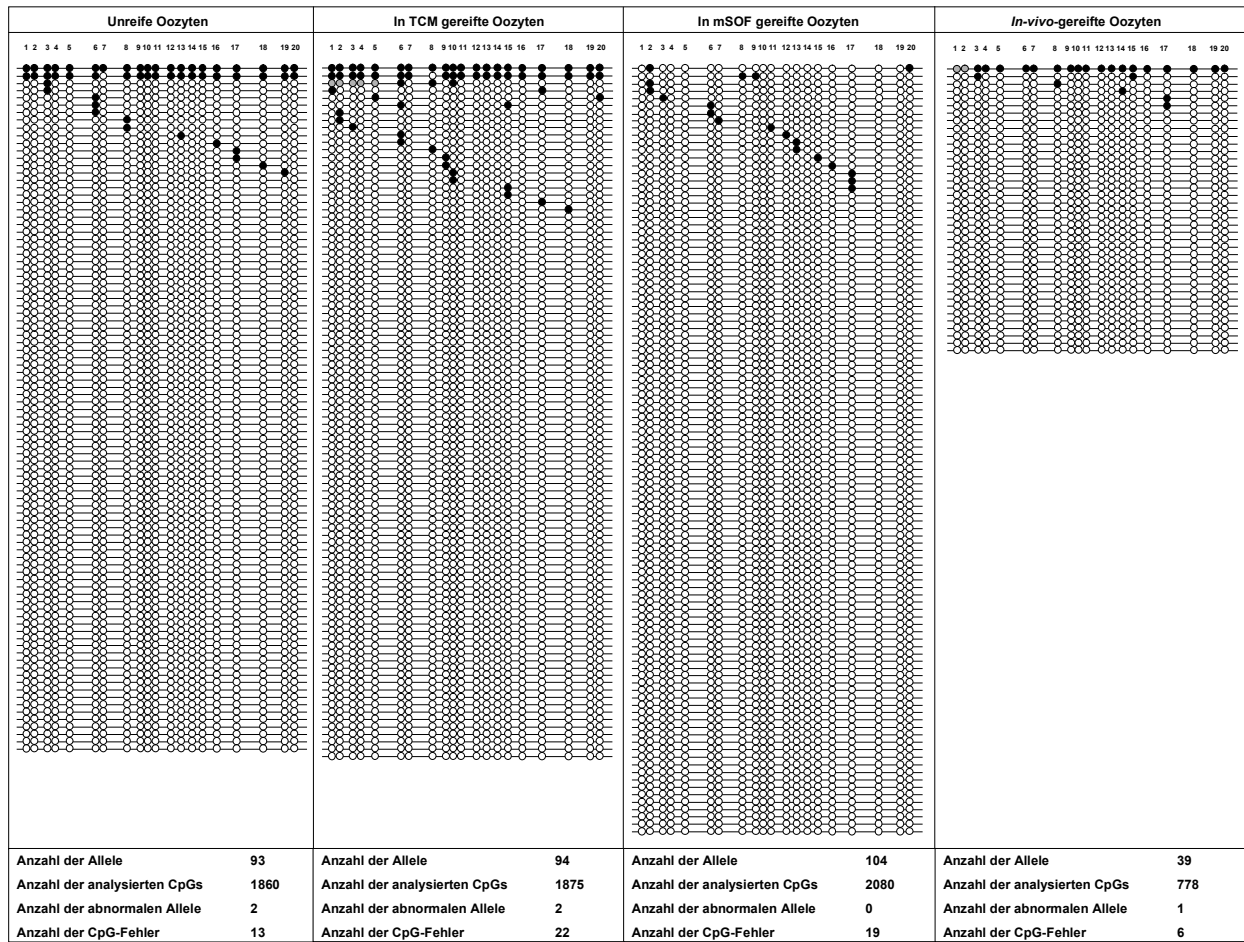
		<i>IGF2/H19</i>		<i>SNRPN</i>		<i>PEG3</i>		Gesamtzahl der Allele pro Gruppe	
Gruppe	Anzahl der Pools	Allele	Allele/Pool	Allele	Allele/Pool	Allele	Allele/Pool	$\Sigma$ Allele	$\Sigma$ Allele/Pool
Ungereift	14	93	6,6	56	4,0	54	3,9	203	14,5
TCM	14	94	6,7	64	4,6	55	3,9	213	15,2
mSOF	14	104	7,4	54	3,9	57	4,1	215	15,4
<i>in vivo</i>	7	39	5,6	16	2,3	23	3,3	78	11,1
$\emptyset$	12,25	82,5	<b>6,58</b>	47,5	<b>3,7</b>	47,25	<b>3,8</b>	177,25	<b>14,05</b>

Die direkte Bisulfidsequenzierung der amplifizierten Allele gab Einblick in den Methylierungsstatus von je 20 CpG-Stellen in der *IGF2/H19*-, 30 in der *SNRPN*- und 19 in der *PEG3*-DMR. Das *PEG3*-Amplikon enthielt einen C/T-SNP an der CpG-Position 17, welche daher von der Analyse ausgeschlossen wurde. Die paternal geprägte *IGF2/H19*-ICR sollte in Oozyten vollständig unmethyliert vorliegen, während die maternal geprägten Promotor-DMRs von *SNRPN* und *PEG3* methyliert sein sollten. Imprintingmutationen sind abnormale DMR-Methylierungsmuster, welche eine nicht dem Keimzelltyp und der damit verbundenen parentalen Herkunft entsprechende Methylierung aufweisen. Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Eizellen wurde als Imprintingmutation gewertet, wenn mehr als 50% der CpG-Stellen eines analysierten Allels eine aberrante, also paternale Methylierung aufwiesen. Dieser Grenzwert begründet sich auf der Annahme, dass ein Gen in Abhängigkeit von der Dichte der methylierten CpGs in seiner *cis*-regulatorischen Region „ein- und ausgeschaltet“ wird und die Methylierung weniger einzelner CpGs dabei keine funktionale Rolle spielt (Sontag *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2007). Alle der in dieser Arbeit als Imprintingmutationen eingestuft Allele zeigten stets bei mindestens 80% der CpG-Stellen abnormale Methylierung.

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Abb. 3.6 bis Abb. 3.8 dargestellt und in Tab. 3.3 und Tab. 3.4 zusammengefasst. In jeder Gruppe wies der Großteil (95-100%) der Allele aller drei DMRs das korrekte oozytenspezifische (maternale) Methylierungsmuster auf. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit abnormal methylierter

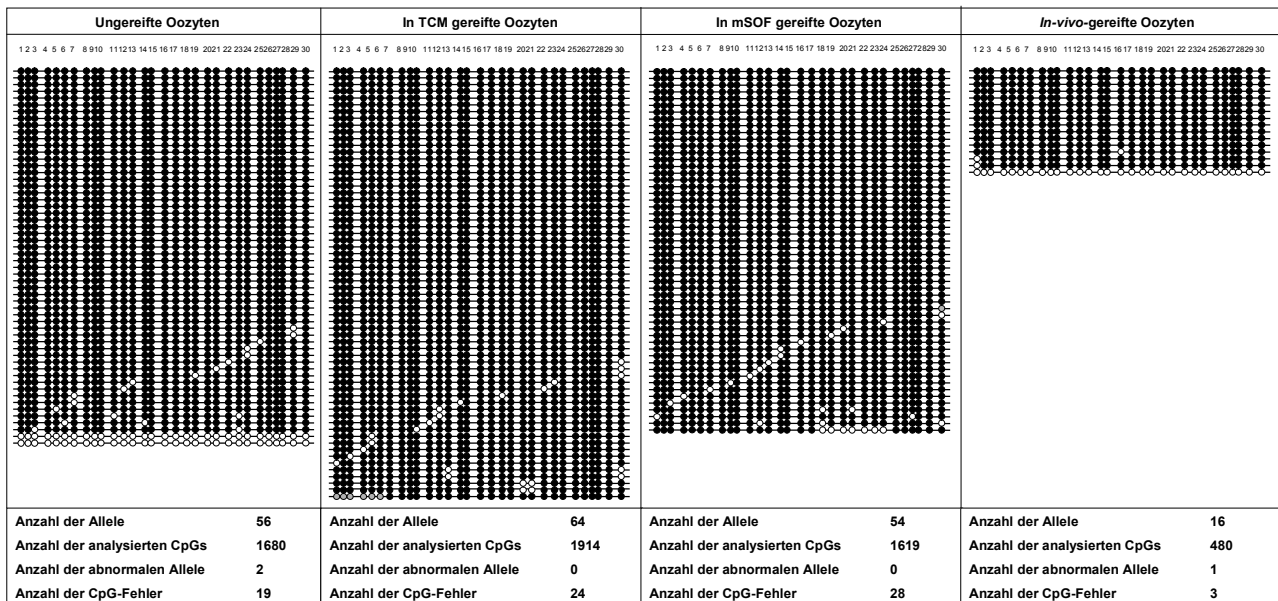
Allele zwischen den beiden verschiedenen IVM-Eizellgruppen (TCM und mSOF) und den *in vivo*-gereiften Eizellen ausgemacht werden (Tab. 3.3): in den beiden Gruppen der *in vivo*- und TCM-gereiften Oozyten wurden jeweils nur 2 Imprintingmutationen identifiziert. Hingegen zeigte keines der 215 Allele aus in mSOF-Medium gereiften Eizellen eine Imprintingmutation. Lediglich ein *SNRPN*-Allel besaß eine partielle aberrante Demethylierung von sieben aufeinanderfolgenden CpG-Stellen. Da somit nur 23% der CpG-Stellen betroffen waren, lag dies weit unter dem bei 50% gesetzten Grenzwert der Definition einer Imprintingmutation. Die höchste Anzahl von Imprintingmutationen (7/203; 3,5%) wurde in der Gruppe der ungereiften Eizellen nachgewiesen, welche mit 3,5% signifikant höher war ( $p = 0,02$ , Chi<sup>2</sup>-Test) als die Häufigkeit aberranter Allele in der mSOF-Gruppe (0/215). Gegenüber den TCM- und *in vivo*-gereiften Eizellen wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede auf Ebene der einzelnen Gene ermittelt (Tab. 3.3). Diese Ergebnisse indizieren, dass die IVM und die unterschiedlichen Medien keine gesteigerte Rate von Imprintingmutationen in bovinen Oozyten bewirkt.

Einzelne abnormal methylierte CpG-Stellen wie beispielsweise vereinzelte methylierte CpGs innerhalb der in Eizellen normalerweise durchweg unmethylierten *IGF2/H19*-ICR (Abb. 3.6) stellen stochastische oder zufällige Methylierungsfehler dar, die keine Auswirkungen auf die jeweils geprägte Genregulation haben. Die Anzahl der CpG-Fehler der geprägten Gene sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Stochastische Methylierungsfehler an ein oder zwei CpG-Stellen innerhalb eines Allels traten bei insgesamt 15-30% aller analysierten Allele und unabhängig von der Untersuchungsgruppe auf. Die Gesamtzahl der CpG-Fehler aller drei DMRs war in der TCM-Gruppe signifikant höher als in den ungereiften Oozyten ( $p = 0,04$  im Fisher's- als auch Chi<sup>2</sup>-Test). Auf Ebene der einzelnen Gene konnte nur für *PEG3* ein signifikanter Unterschied der CpG-Fehlerrate zwischen TCM- (2,7%) und mSOF-gereiften Eizellen (1,4%;  $p = 0,04$ , Fisher's Test) gefunden werden. Auch die ungereiften Oozyten wiesen eine CpG-Fehler-Rate von 1,4% auf, jedoch erreichte der Vergleich mit der TCM-Gruppe keine statistische Signifikanz ( $p = 0,06$ ). Für *H19* und *SNRPN* gab es dagegen keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. 3.4).

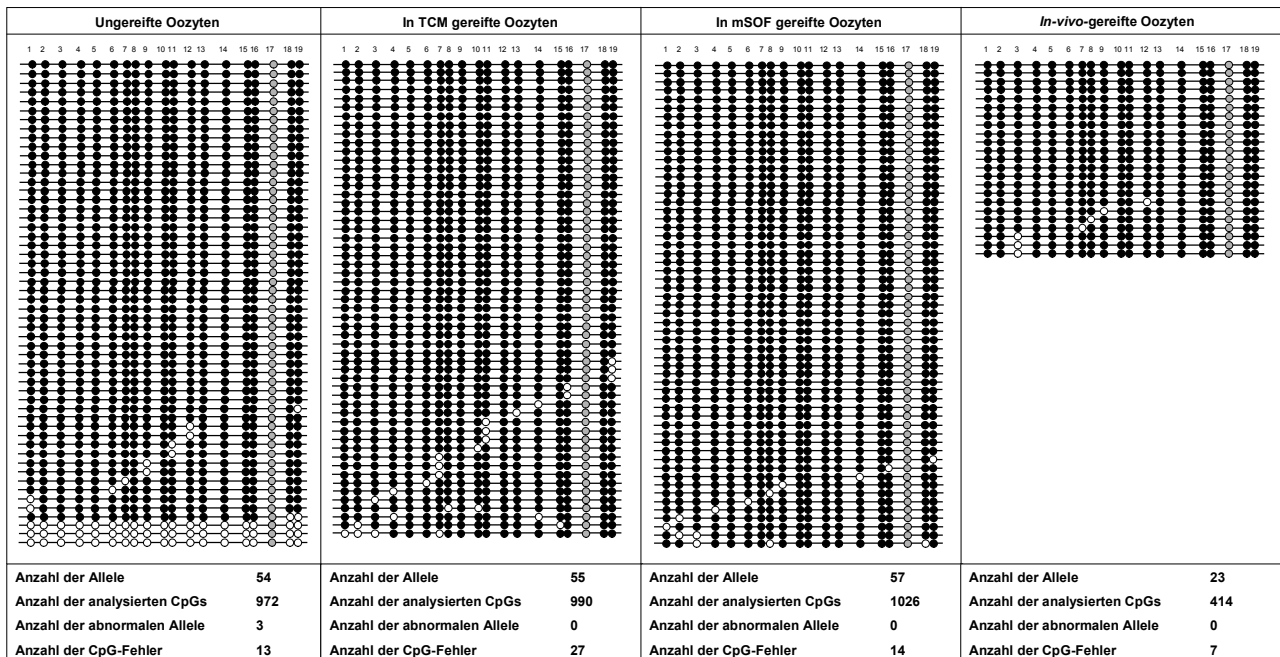


**Abb. 3.6: Methylierungsmuster der *IGF2/H19*-ICR von ungereiften, *in vivo*- und *in vitro*-gereiften Oozyten.** Die untersuchte Region enthält 20 CpG-Stellen. Jede Linie repräsentiert ein durch Limiting Dilution erhaltenes, einzelnes Allel (DNA-Molekül). Schwarze Kreise entsprechen methylierten CpG- und weiße Kreise unmethylierten CpG-Stellen. Graue Kreise stellen CpG-Stellen dar, welche nicht analysiert werden konnten. Die ungereiften und TCM-gereiften Oozyten zeigen zwei Imprintingmutationen (vollständig methylierte Allele mit paternalem Keimbahn-Methylierungsmuster), während die Gruppe der *in vivo*-gereiften Eizellen nur eine enthält. Die mSOF-Oozyten weisen lediglich stochastische Methylierungsfehler (einzelne methylierte CpG-Stellen) auf.





**Abb. 3.7: Methylierungsmuster der *SNRPN*-DMR von ungereiften, *in vivo*- und *in vitro*-gereiften Oozyten.** Die untersuchte Region enthält 30 CpG-Stellen. Jede Linie repräsentiert ein durch Limiting Dilution erhaltenes, einzelnes Allel (DNA-Molekül). Schwarze Kreise entsprechen methylierten CpG- und weiße Kreise unmethylierten CpG-Stellen. Graue Kreise stellen CpG-Stellen dar, welche nicht analysiert werden konnten. Die ungereiften Oozyten zeigen zwei, die *in vivo*-gereiften Eizellen nur eine Imprintingmutation. Dabei handelt es sich um vollständig unmethylierte Allele mit paternalem Keimbahn-Methylierungsmuster. Die TCM und mSOF-gereiften Oozyten weisen lediglich stochastische Methylierungsfehler (einzelne unmethylierte CpG-Stellen) auf.



**Abb. 3.8: Methylierungsmuster der PEG3-DMR von ungereiften, *in vivo*- und *in vitro*-gereiften Oozyten.** Die untersuchte Region enthält 19 CpG-Stellen. CpG-Stelle 17 wurde aufgrund eines häufigen C/T-SNP von der Analyse ausgeschlossen (graue Kreise). Jede Linie repräsentiert ein durch Limiting Dilution erhaltenes, einzelnes Allel (DNA-Molekül). Schwarze Kreise entsprechen methylierten CpG- und weiße Kreise unmethylierten CpG-Stellen. Die ungereiften Oozyten weisen drei Imprintingmutationen auf. Dabei handelt es sich um vollständig unmethylierte Allele mit paternalem Keimbahn-Methylierungsmuster. Die gereiften Oozyten (IVM und *in vivo*) weisen alle lediglich stochastische Methylierungsfehler (einzelne unmethylierte CpG-Stellen) auf. Die Anzahl der einzelnen CpG-Fehler ist in der TCM-Gruppe signifikant höher als in mSOF-Gruppe ( $p = 0,04$ ), jedoch nicht bzw. noch nicht signifikant im Vergleich zu den *in vivo*- ( $p = 0,34$ ) und ungereiften Eizellen ( $p = 0,06$ ).

**Tab. 3.3: Imprintingmutationen in den geprägten Genen *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3* nach IVM boviner Oozyten.** Imprintingmutationen (mehr als 50 % abnormal methylierte CpGs) des paternal geprägten Locus *IGF2/H19*-ICR und der maternal geprägten Gene *SNRPN* und *PEG3* in ungereiften, *in vitro*-gereiften (TCM und mSOF) und *in vivo*-gereiften Oozyten. Die statistischen Gruppenvergleiche wurden mit dem Chi<sup>2</sup>- und Fisher's Test durchgeführt. Werte mit statistisch signifikanten Unterschieden sind fettgedruckt und tragen verschiedene Indizes innerhalb derselben Spalte (p≤0.05).

	Gruppe	<i>IGF2/H19</i>	<i>SNRPN</i>	<i>PEG3</i>	Summe
<b>Gesamtzahl der Allele</b> (abnormale Allele eingeschlossen)	Ungereift	93	56	54	203
	TCM	94	64	55	213
	mSOF	104	54	57	215
	<i>in vivo</i>	39	16	23	78
<b>Anzahl der abnormalen Allele</b>	Ungereift	2	2	3	7
	TCM	2	0	0	2
	mSOF	0	0	0	0
	<i>in vivo</i>	1	1	0	2
<b>Anteil (%)</b>	Ungereift	2.15	3.57	5.56	<b>3.45<sup>a</sup></b>
	TCM	2.13	0	0	0.94
	mSOF	0	0	0	<b>0<sup>b</sup></b>
	<i>in vivo</i>	2.56	6.25	0	2.56

**Tab. 3.4: Vergleich der Anzahl der einzelnen CpG-Fehler zwischen den Versuchsgruppen (Genset 1).** Die CpGs der abnormalen Allele (Imprintingmutationen) wurden hier nicht gezählt. Die statistischen Gruppenvergleiche wurden mit dem Chi<sup>2</sup>- und Fisher's Test durchgeführt. Werte mit statistisch signifikanten Unterschieden sind fettgedruckt und tragen verschiedene Indizes innerhalb derselben Zeile (p≤0.05).

		Ungereift	TCM	mSOF	<i>in vivo</i>
<b><i>IGF2/H19</i></b> <b>(20 CpGs)</b>	∑ CpGs	1820	1835	2080	760
	# CpG-Fehler	13	22	19	6
	Anteil (%)	0.71	1.20	0.91	0.79
<b><i>SNRPN</i></b> <b>(30 CpGs)</b>	∑ CpGs	1620	1914	1619	450
	# CpG-Fehler	19	24	28	3
	Anteil (%)	1.17	1.25	1.73	0.67
<b><i>PEG3</i></b> <b>(18 CpGs, ohne SNP)</b>	∑ CpGs	918	990	1026	414
	# CpG-Fehler	13	27	14	7
	Anteil (%)	1.42	<b>2.73<sup>a</sup></b>	<b>1.36<sup>b</sup></b>	1.29
<b>Gesamtzahl aller Gene</b>	∑ CpGs	4358	4739	4725	1624
	# CpG-Fehler	45	73	61	16
	Anteil (%)	<b>1.03<sup>b</sup></b>	<b>1.54<sup>a</sup></b>	1.29	0.99

### 3.2.2. DNA-Methylierungsprofile ungeprägter Gene in ungereiften und *in vitro*-gereiften präpuberalen und adulten Rindereizellen

In dieser Arbeit wurde die Promotormethylierung der drei für das Follikelwachstum und die Eizellreifung bedeutenden Gene *SLC2A1*, *PRDX1* und *ZAR1* in den verschiedenen Oozytenstadien präpuberaler und adulter Tiere sowie der mögliche Einfluss der hormonellen Behandlung der Spendertiere untersucht. Dazu wurden unreife Eizellen mittels OPU aus unbehandelten und mit FSH und IGF1 stimulierten Kälbern und Kühen gewonnen und entweder direkt oder nach *in vitro*-Reifung per Limiting-Dilution-Bisulfitsequenzierung analysiert. Insgesamt wurden in der Kontrollgruppe unbehandelter Kühe („Kuh“) 9 Pools zu je 10 Oozyten (4 ungerieft/5 IVM), 8 in „Kuh FSH“ (4/4), 5 Pools in der Gruppe „Kalb“ (1/4), 9 in „Kalb FSH“ (5/4), 7 Pools in der Gruppe „Kalb FSH+IGF1“ (3/4) und 6 Pools in der Gruppe „Kalb FSH+IGF K“ (3/3) analysiert. Im Durchschnitt wurden für die ungereiften Eizellen von den 120 möglichen Allelen bzw. spezifischen DNA-Molekülen 12,9 Moleküle pro untersuchtem Pool und Gruppe erhalten sowie durchschnittlich 12,3 Moleküle für die *in vitro*-gereiften Eizellen (Tab. 3.5). Im Detail ergab die Limiting Dilution ungeriefter Oozyten gemittelt pro Pool 19,8 Allele in der Gruppe „Kuh“, 12,5 in der Gruppe „Kuh FSH“, 16 in Gruppe „Kalb“, 11 in Gruppe „Kalb FSH“, 11,3 in Gruppe „Kalb FSH+IGF1“ und 8,0 in der Gruppe „Kalb FSH+IGF K“. Dagegen wurden aus den *in vitro*-gereiften Eizellen durchschnittlich 15,8 Allele pro Pool in der Gruppe „Kuh“, 15,5 in der Gruppe „Kuh FSH“, 13,3 in Gruppe „Kalb“, 5,8 in Gruppe „Kalb FSH“, 10,3 in Gruppe „Kalb FSH+IGF1“ und 12,7 in der Gruppe „Kalb FSH+IGF K“ gewonnen (Tab. 3.5). Das *SLC2A1*-Amplikon zur direkten Bisulfitsequenzierung enthielt 14 CpG-Stellen, das von *PRDX1* 17 und das von *ZAR1* 18 CpGs. Die im Promotorbereich lokalisierten CpG-Stellen der drei Gene *SLC2A1*, *PRDX1* und *ZAR1* sollten erwartungsgemäß unmethyliert vorliegen, da sie zum Einen nicht geprägt sind und bisher keine Regulation ihrer Expression durch Methylierung beschrieben wurde. Auch in den in dieser Arbeit untersuchten präpuberalen und adulten Oozytenstadien konnte weder in den ungereiften noch in den *in vitro*-gereiften Eizellen eine erhöhte Methylierung oder gar Hypermethylierung (>50%) im Sinne einer Epimutation nachgewiesen werden. Ähnlich früherer Limiting-Dilution-Experimente (El Hajj *et al.*, 2011; Heinzmann *et al.*, 2011) belief sich die Rate sporadischer DNA-Methylierung einzelner CpG-Stellen auf geringe 0% bis 2.4% innerhalb der einzelnen Gruppen und Gene (Tab. 3.6). Dementsprechend lieferte der Gruppenvergleich mit dem Chi<sup>2</sup>- und Fisher's-Test keine signifikanten Unterschiede (p>0.05)

zwischen den Oozytengruppen. Die ausführlichen Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Form von Lollipop-Diagrammen in Abb. 3.9 bis Abb. 3.11 dargestellt.

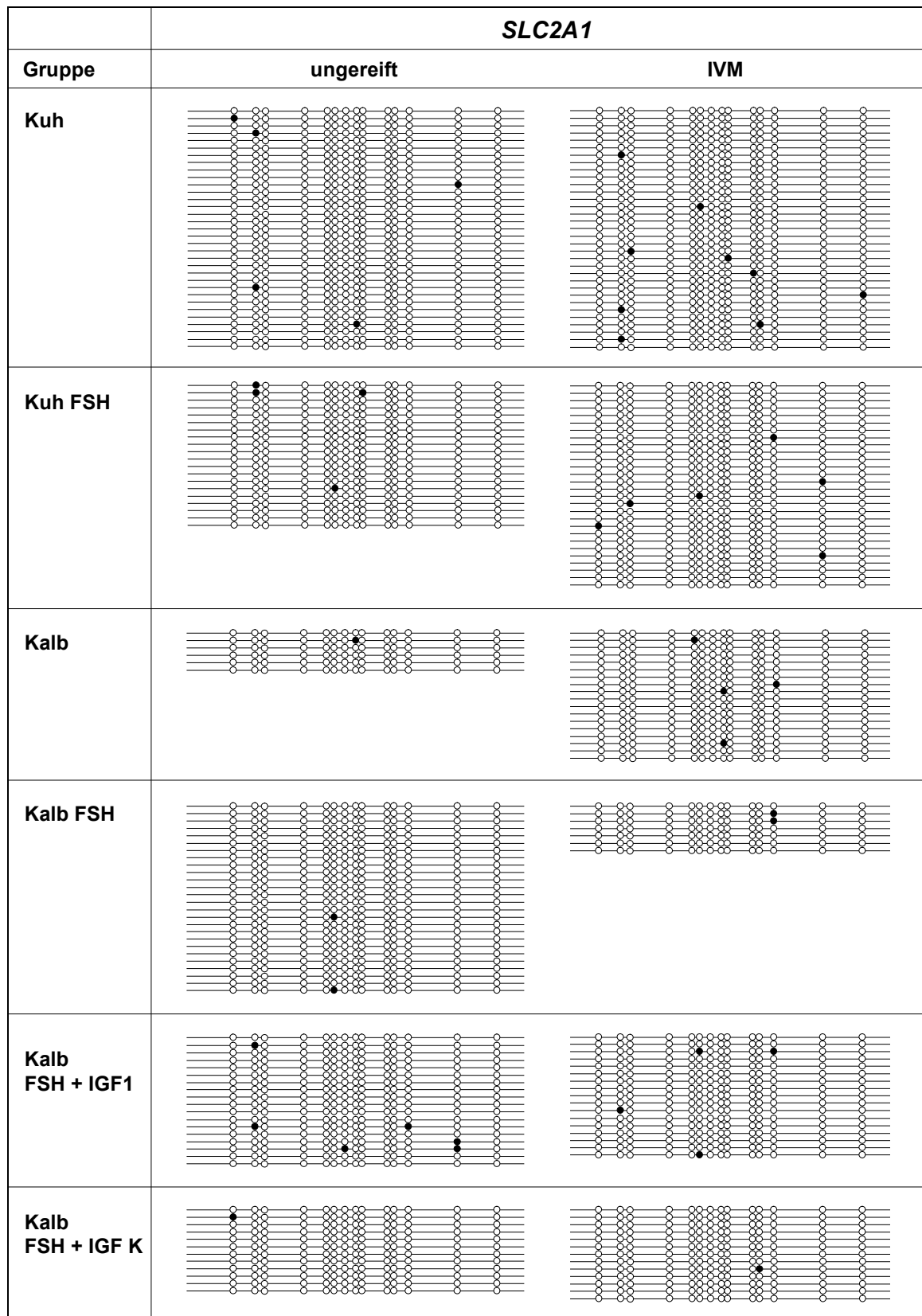
**Tab. 3.5: Übersicht über die Anzahl der durch Limiting Dilution erhaltenen Allele (Genset 2).** Es wurden keine Imprintingmutationen (Allele mit einer prozentualen Methylierung >50% aller CpGs) nachgewiesen.

			<i>SLC2A1</i>		<i>PRDX1</i>		<i>ZAR1</i>		Gesamtzahl der Allele pro Gruppe	
	Gruppe	Anzahl der Pools	Allele	Allele/Pool	Allele	Allele/Pool	Allele	Allele/Pool	Σ Allele	(Σ Allele)/Pool
ungereift	Kuh	4	33	8,25	18	4,5	28	7	79	19,75
	Kuh FSH	4	20	5	10	2,5	20	5	50	12,5
	Kalb	1	6	6	7	7	3	3	16	16
	Kalb FSH	5	26	5,2	16	3,2	13	2,6	55	11
	Kalb FSH+IGF1	3	18	6	5	1,67	11	3,67	34	11,33
	Kalb FSH+IGF K	3	12	4	1	0,33	11	3,67	24	8
	∅ ungereift	3,33	19,17	5,76	9,5	2,85	14,33	4,30	43	<b>12,9</b>
gereift	Kuh	5	33	6,6	18	3,6	28	5,6	79	15,8
	Kuh FSH	4	28	7	10	2,5	24	6	62	15,5
	Kalb	4	18	4,5	10	2,5	25	6,25	53	13,25
	Kalb FSH	4	7	1,75	5	1,25	11	2,75	23	5,75
	Kalb FSH+IGF1	4	17	4,25	6	1,5	18	4,5	41	10,25
	Kalb FSH+IGF K	3	13	4,33	10	3,33	15	5	38	12,67
	∅ gereift	4	19,33	4,83	9,83	2,46	20,17	5,04	49,33	<b>12,33</b>
∅ alle	3,67	19,25	5,25	9,67	2,64	17,25	4,70	46,17	12,59	

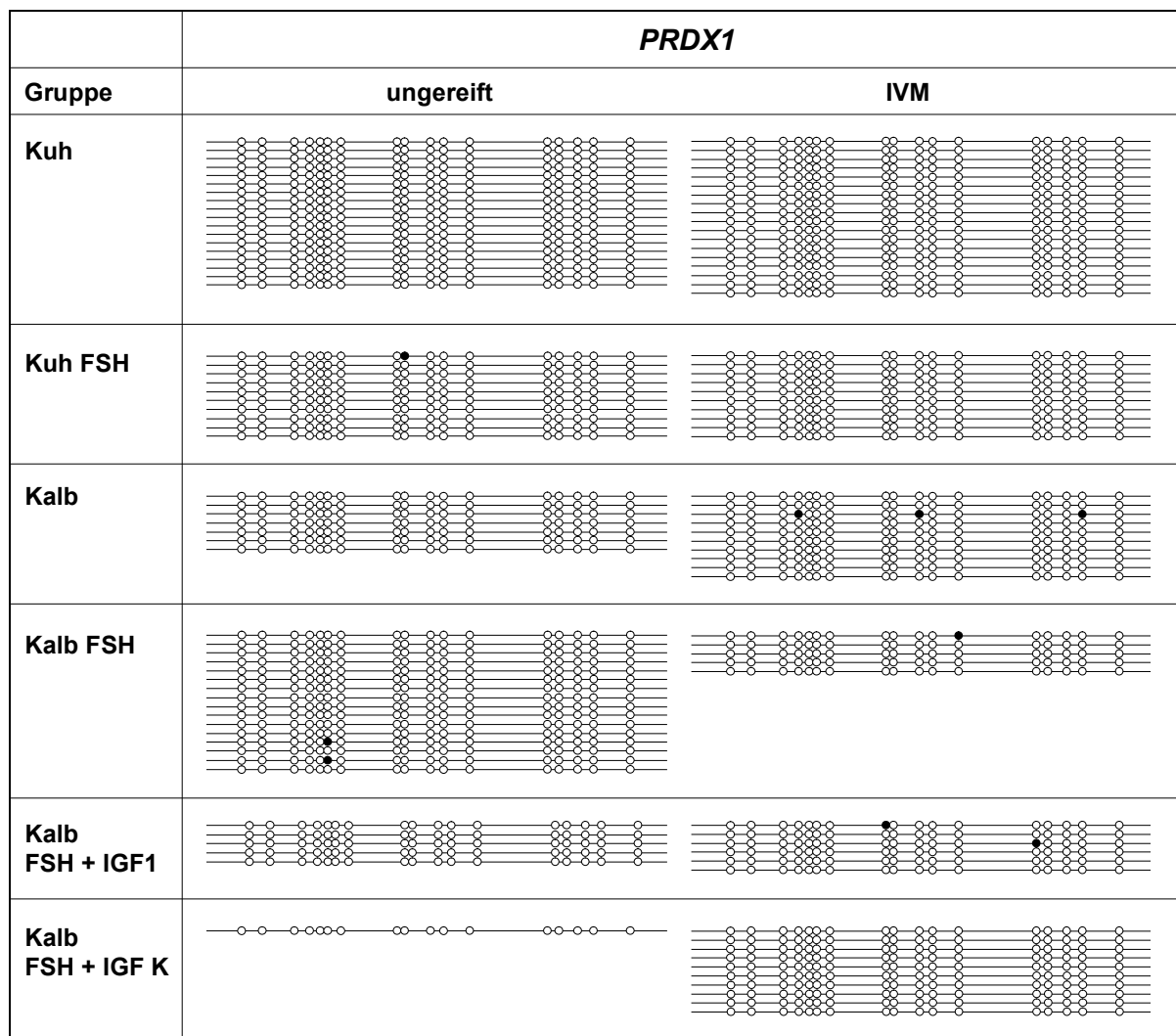
Tab. 3.6: Vergleich der Anzahl der einzelnen CpG-Fehler zwischen den sechs Versuchsgruppen (Genset 2).

	Gruppe	<i>SLC2A1</i>		<i>PRDX1</i>		<i>ZAR1</i>		Summe	
		ungereift	gereift	ungereift	gereift	ungereift	gereift	ungereift	gereift
Methylierung-%	Kuh	1,1% (5/462)	1,9% (9/462)	0% (0/306)	0% (0/306)	1,2% (6/504)	1,0% (5/504)	<b>0,9%</b> <b>(1/1272)</b>	<b>1,1%</b> <b>(14/1272)</b>
	Kuh FSH	1,4% (4/280)	1,5% (6/392)	0,6% (1/170)	0% (0/170)	1,4% (5/360)	1,2% (5/432)	<b>1,2%</b> <b>(0/810)</b>	<b>1,1%</b> <b>(11/994)</b>
	Kalb	1,2% (1/84)	2% (4/252)	0% (0/119)	1,8% (3/170)	0% (0/54)	0,9% (4/450)	<b>0,4%</b> <b>(1/257)</b>	<b>1,3%</b> <b>(11/872)</b>
	Kalb FSH	0,5% (2/364)	2% (2/98)	0,7% (2/272)	1,2% (1/85)	0% (0/234)	1,0% (2/198)	<b>0,5%</b> <b>(4/870)</b>	<b>1,3%</b> <b>(5/381)</b>
	Kalb FSH+IGF1	2,4% (6/252)	1,7% (4/238)	0% (0/85)	2,0% (2/102)	0% (0/198)	0,6% (2/324)	<b>1,1%</b> <b>(6/535)</b>	<b>1,2%</b> <b>(8/664)</b>
	Kalb FSH+IGF K	0,6% (1/168)	0,5% (1/182)	0% (0/17)	0% (0/170)	1,5% (3/198)	0,4% (1/270)	<b>1,0%</b> <b>(4/383)</b>	<b>0,3%</b> <b>(2/622)</b>

In Klammern: Anzahl methylierter CpG-Stellen/Gesamtzahl aller pro Gruppe analysierten CpG-Stellen.

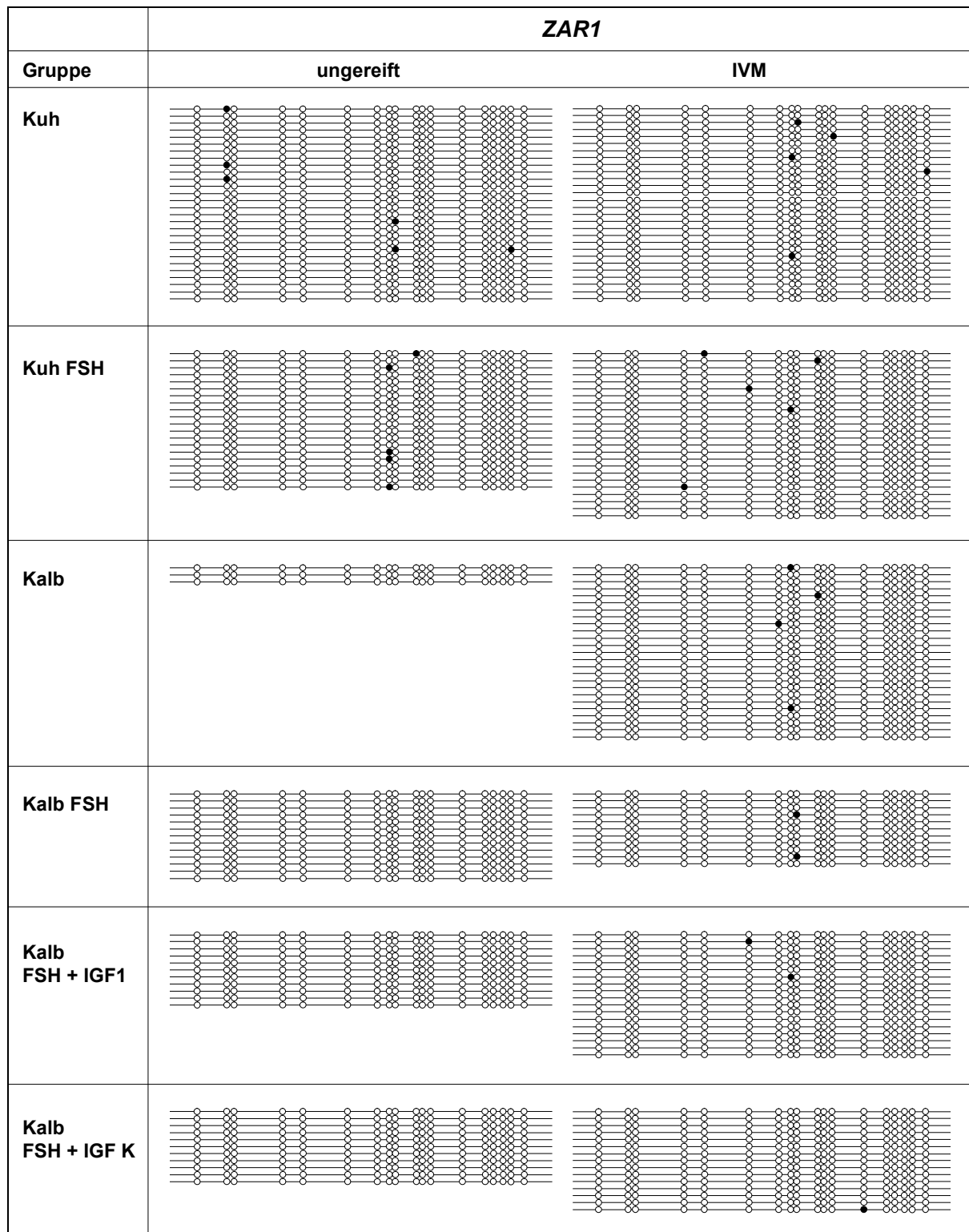


**Abb. 3.9: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des *SLC2A1*-Promotors.** Bis auf einzelne methylierte CpG-Positionen liegt die Promotor-CpG-Insel bei allen Gruppen unmethyliert vor und ist damit unabhängig vom Oozytenalter oder der hormonellen Behandlung.



**Abb. 3.10: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des *PRDX1*-Promotors.** Bis auf einzelne methylierte CpG-Positionen liegt die Promotor-CpG-Insel bei allen Gruppen unmethyliert vor und ist damit unabhängig vom Oozytenalter oder der hormonellen Behandlung.





**Abb. 3.11: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des ZAR1-Promotors.** Bis auf einzelne methylierte CpG-Positionen liegt die Promotor-CpG-Inselle bei allen Gruppen unmethyliert vor und ist damit unabhängig vom Oozytenalter oder der hormonellen Behandlung.

#### 4. DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurde in vielen, teilweise sehr alarmierenden Studien ein möglicher Zusammenhang von Techniken zur assistierten Reproduktion von Säugern mit epigenetischen Aberrationen und den damit einhergehenden Auswirkungen auf die fetale, plazentale und adulte Entwicklung sowie auf das Risiko für Imprintingkrankungen untersucht. Die epidemiologischen Studien und Fallberichte am Menschen sowie Experimente an Tiermodellen lieferten Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung der Expression von entwicklungsrelevanten Genen sowie der Etablierung und dem Erhalt von Imprintingmustern in der Gametogenese und der frühen Embryonalentwicklung (Niemann *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2005; Horsthemke und Ludwig, 2005). Bei Wiederkäuern wurden die ARTs mit fetalem und plazentalem Großwuchs und folglich mit vermehrten Abgängen und erhöhter Perinatalsterblichkeit in Verbindung gebracht (Farin *et al.*, 2006). Die aberrante Expression und Methylierung des paternal geprägten *IGF2R*-Gens wurde in einem Schaf mit dem Large-Offspring-Syndrom (LOS) beobachtet, welches viele Parallelen mit dem humanen Großwuchssyndrom BWS aufweist (Young *et al.*, 2001). Viele weitere Studien am Rind lassen vermuten, dass die IVP von Embryonen sowie das somatische Klonen (engl. *somatic cell nuclear transfer*; SCNT) einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die globalen, aber auch genspezifischen Methylierungs- und Genexpressionsmuster von bovinen Embryonen haben (Cezar *et al.*, 2003; Kues *et al.*, 2008; McHughes *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Niemann *et al.*, 2010).

Beim Menschen wurde eine 3-6fache Inzidenzerhöhung durch ARTs für das Großwuchssyndrom BWS (DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003; Hiura *et al.*, 2012) sowie für das AS (Cox *et al.*, 2002; Orstavik *et al.*, 2003) berichtet. Auch könnte ein Zusammenhang des SRS mit assistierter Reproduktion bestehen (Azzi *et al.*, 2010; Hiura *et al.*, 2012). Die Ursache des AS und BWS scheint meist die abnormale Methylierung maternal geprägter Loci im Sinne einer Hypomethylierung des mütterlichen Allels zu sein (Horsthemke und Ludwig, 2005). Diese Beobachtungen lassen eine Fehlregulation der Imprintetablierung oder Aufrechterhaltung in den Oozyten als Ursache vermuten. Jedoch bleiben all diese statistikbasierten epidemiologischen Studien und Fallberichte am Menschen den kausalen Zusammenhang zwischen der beobachteten erhöhten Rate von Imprintingkrankungen und den ARTs, insbesondere einer bestimmten ART, schuldig (Vermeiden und Bernardus, 2013). Da Studien an humanen Eizellen und Embryonen

aufgrund der ethischen Unvertretbarkeit und des rechtlichen Verbots schwierig sind, wird die Frage nach Kausalität auch in Zukunft schwer zu beantworten sein (Vermeiden und Bernardus, 2013). Aus diesen Gründen bedarf es valider Tiermodelle, um die mögliche Einflussnahme der ARTs auf die Entstehung von epigenetisch bedingten Geburtsfehlern und Krankheiten zu belegen oder zu widerlegen. Obwohl *in vitro*-Maßnahmen einen erheblichen Einfluss auf die fetale Entwicklung, DNA-Methylierung und Genexpression von Mäusen nehmen (Khosla *et al.*, 2001b; Shi und Haaf, 2002), so gibt es zwischen Nagern und Menschen dennoch große Unterschiede in der Gametogenese und der embryonalen Entwicklung, die keine generelle Extrapolation der Studienergebnisse von der Maus auf den Menschen erlauben. Die immanenten Ähnlichkeiten zwischen der bovinen und der humanen Entwicklung gestatten hingegen einen plausiblen Rückschluss auf die Begebenheiten und Risiken des Menschen. Die Keimzell- und Embryonalentwicklung im Rind erfreut sich daher zunehmender Akzeptanz als Model für das Studium humaner Reproduktion (Niemann und Wrenzycki, 2000; Menezo und Herubel, 2002; Wrenzycki *et al.*, 2005).

Die essentielle Rolle oozytenspezifischer geprägter und ungeprägter Gene für die fetale Entwicklung macht sie zu wichtigen Ansatzpunkten beim Studium ART-assoziiierter Entwicklungsstörungen und medizinischer Auffälligkeiten. In der vorliegenden Arbeit wurden daher der Einfluss und die Auswirkungen der *in vitro*-Maturation (IVM) auf die Methylierungsmuster von geprägten als auch ungeprägten Genen untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der Oogenese, Befurchtung und Entwicklung des frühen Embryos spielen. Im Vergleich zu anderen ARTs wie beispielsweise der IVF weist die IVM noch eine geringe Erfolgsrate auf. Zunächst wurden die zur Analyse ausgewählten geprägten Bereiche im Rindergenom identifiziert und deren Methylierungsstatus in verschiedenen Zellen und Geweben charakterisiert. Mit Hilfe der Limiting-Dilution-Methode konnte anschließend der Einfluss unterschiedlicher Medien sowie der hormonellen Wachstumsstimulation juveniler (präpuberaler) und adulter Follikel mit anschließender IVM auf die Methylierung und Entwicklungsrate der Eizellen ermittelt werden.

#### **4.1. Identifizierung und Charakterisierung der bovinen, intergenischen *IGF2/H19*-Imprintingkontrollregion**

Die intergenische *IGF2/H19*-ICR gehört zu den am besten untersuchten geprägten DNA-Regionen bei Mensch und Maus. Eine aberrante Methylierung der humanen *IGF2/H19*-ICR wurde mit den Imprintingerkrankungen Silver-Russell- und Beckwith-Wiedemann-Syndrom assoziiert, welche durch fetale Wachstumsretardierung (SRS) bzw. somatischen Größenwuchs (BWS) gekennzeichnet sind (Cooper *et al.*, 2005; Gicquel *et al.*, 2005). Eine Hypermethylierung der paternal geprägten ICR1 von *IGF2* und *H19* verursacht zwischen 2% und 10% aller sporadischen BWS-Fälle sowie über 38% aller SRS-Erkrankungen (Brown *et al.*, 1996; Eggermann, 2009; Weksberg *et al.*, 2010). Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keine Informationen bezüglich der Existenz der *IGF2/H19*-ICR in Form einer DMR und ihrer genauen genomischen Lokalisation beim Rind vor. Alle Studien des *IGF2/H19*-Genclusters am Rindermodell beschränkten sich auf die Expression der Gene *IGF2* und *H19* oder deren Promotormethylierung. Lediglich Curchoe *et al.* (2009) charakterisierten etwa zeitgleich drei Bereiche einer jeweiligen Länge von 200 bis 400 bp innerhalb CpG-reicher Regionen upstream des *H19*-Gens. Nur eine der drei in dieser Studie analysierten DNA-Bereiche („R1“) zeigte differenzielle Methylierung und konnte somit als DMR und potentielle ICR identifiziert werden. Ein Vergleich der beschriebenen Region mit der in dieser Arbeit identifizierten ICR konnte jedoch nicht gezogen werden, da die Angaben zu Primern und CTCF-Bindestellen aufgrund unzureichender Angaben nicht nachvollzogen werden konnten.

##### **4.1.1. Lokalisation und Konservierung der bovinen *IGF2/H19*-ICR**

Die zur Identifizierung durchgeführte BLAST-Suche ergab eine Lokalisierung der potentiellen bovinen *IGF2/H19*-ICR in einem ca. 3 kb großen Bereich, welcher wiederum etwa 3 kb upstream der *H19*-Transkriptionsstartstelle (TSS) beginnt. Die evolutionäre Konservierung dieser intergenischen Sequenz zwischen Maus, Mensch und Rind betrug durchschnittlich lediglich ~50%, während die Konservierung von Gensequenzen meist weit über 80% liegt. Dennoch konnten drei kurze Abschnitte identifiziert werden, welche eine für nicht codierende Bereiche verhältnismäßig starke Konservierung aufwiesen. Die Existenz einer elternspezifisch differenziell methylierten CpG-Insel innerhalb der ca. 6 kb upstream gelegenen konservierten Region deutet darauf hin, dass das klonierte Amplikon (-6,1 kb bis -5,7 kb upstream der *H19*-TSS) Teil der bovinen intergenischen *IGF2/H19*-ICR ist. Zudem enthielt die CpG-Insel eine CTCF-Bindestelle (CTCF 1), welche der humanen CTCF-

Bindestelle 6 ortholog ist (Frevel *et al.*, 1999a; Takai *et al.*, 2001). Ihre interspezifisch starke Konservierung innerhalb eines nicht codierenden DNA-Bereichs konnte bereits in einem früheren Vergleich von Mensch, Maus und Ratte festgestellt werden (Bell und Felsenfeld, 2000), welche für ihre Bedeutung als wichtiges regulatorisches Element spricht. Im angrenzenden Segment (-5.7 kb bis -3 kb) konnten weitere sechs CTCF-Bindestellen und kürzere konservierte CpG-Inseln identifiziert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass sich die bovine *IGF2/H19*-ICR über eine mindestens 3,1 kb lange Region zwischen -6,1 kb bis -3 kb upstream der *H19*-TSS erstreckt. Die Länge der potentiellen bovinen ICR ähnelt mit 3,1 kb der humanen *IGF2/H19*-IC1, welche 3,3 kb misst und von -5,3 kb bis -2kb reicht (Frevel *et al.*, 1999b). Dagegen ist die *IGF2/H19*-DMD der Maus (-4 kb bis -2 kb) mit ca. 2 kb deutlich kürzer (Tremblay *et al.*, 1997). Weiterhin findet sich auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Längen der *IGF2/H19*-ICRs eine stärkere Konservierung der Gesamtsequenz zwischen Mensch und Rind (54%) als zwischen Mensch und Maus (51%) bzw. Rind und Maus (50%). Die gefundenen Ähnlichkeiten bezüglich Sequenz und Organisation der *IGF2/H19*-ICR zwischen Rind und Mensch weisen auf eine starke Konservierung der Kontrolle und Funktion der geprägten DMRs hin.

#### **4.1.2. Differenzielle Methylierung der bovinen *IGF2/H19*-ICR**

Der geprägte Zustand der *in silico* identifizierten bovinen *IGF2/H19*-ICR wurde anhand differenzieller Methylierung in verschiedenen bovinen Geweben und Zellen mittels Pyrosequenzierung und klassischer Bisulfitsequenzierung nach Klonierung bestätigt. Die drei über 3 kb verteilten CTCF-Bindestellen (CTCF 1, CTCF 4 und CTCF 7) zeigten mittels Pyrosequenzierung eine 50%ige Methylierung, was auf einen geprägten Status der gesamten Region hinweist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass manche der nicht untersuchten CpG-Inseln bzw. die übrigen vier CTCF-Bindestellen eine von 50% abweichende Methylierung aufweisen können, da die ICR nicht zwingend durchgehend differenziell methyliert vorliegen muss. So könnten die von Curchoe *et al.* (2009) beschriebenen ungeprägten Bereiche upstream von *H19* in der Nachbarschaft der hier definierten geprägten Sequenzen lokalisiert und dennoch nicht differenziell methyliert sein.

Die klassische Bisulfitsequenzierung der klonierten CpG-Insel (CTCF 1) bestätigte weiterhin den DMR-Status der untersuchten intergenischen Region von *IGF2/H19* anhand einzelner DNA-Moleküle. Die paternal geprägte ICR zeigte entsprechend in Rinderspermien eine deutliche Hypermethylierung aller Allele, während der parthenogenetische Embryo nur

unmethylierte Moleküle aufwies. Obgleich die Plazenta neben jeweils 3 vollständig methylierten und unmethylierten DNA-Molekülen auch 6 Allele mit intermediärer Methylierung zeigte, lag ihre durchschnittliche Methylierung insgesamt bei 46%. Das Vorkommen intermediär methylierter Allele deutet auf eine unzureichende Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung in der Plazenta hin. Dies könnte darin begründet sein, dass die Prägung in der Plazenta eher von Histonmodifikationen als von DNA-Methylierung aufrechterhalten wird (Lewis *et al.*, 2004). Außerdem könnte der direkte Kontakt der Plazenta mit Umwelteinflüssen die Anfälligkeit der Plazenta für Veränderungen der DNA-Methylierung erhöhen (Fortier *et al.*, 2008).

Während die anderen viszerale Gewebe eine 50%ige Methylierung aufwiesen, zeigten in der Leber etwa 60% der DNA-Moleküle (28/46) ein paternales (methyliertes) Methylierungsmuster. Abweichungen von der bei geprägten Genen erwarteten 50%igen Methylierung wurden schon in früheren Studien beobachtet (Curchoe *et al.*, 2009, Lucifero *et al.*, 2006; Long und Cai, 2007) und sind auf technisch bedingte Variationen der Sensitivität der klassischen Bisulfidsequenzierung zurückzuführen. So wurde bereits früher beobachtet, dass es in einem Gemisch aus unmethylierter und methylierter DNA zu einer sequenzspezifischen, präferenziellen Amplifikation entweder der methylierten oder der unmethylierten Moleküle kommen kann (Warnecke *et al.*, 1997; Warnecke *et al.*, 1998).

Insgesamt zeigte die erstmals detailliert beim Rind charakterisierte ICR von *IGF2/H19* ein durchgehend differenzielles Methylierungsprofil, sowohl quantitativ mittels Pyrosequenzierung als auch absolut mittels klassischer Bisulfidsequenzierung. Zusätzlich konnte die bereits in früheren Studien beim Rind berichtete differenzielle Methylierung der geprägten Gene *SNRPN* und *PEG3* (Lucifero *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008) für die in dieser Arbeit untersuchten Bereiche mittels Pyrosequenzierung bestätigt werden und sie für die erstmalige Untersuchung der Auswirkungen verschiedener IVM-Bedingungen auf Rindereizellen qualifizieren.

#### 4.2. Einfluss der IVM auf die DNA-Methylierung geprägter Gene

*In vitro*-Maturation von Eizellen gehört bereits zu den Standardmethoden der künstlichen Reproduktion von Rindern. Dennoch entwickeln sich nur ca. 30% der bovinen IVM-Oozyten nach Befruchtung bis ins Blastozystenstadium (Wrenzycki *et al.*, 2007), während es bei IVF nach *in vivo*-Reifung 60% sind (Rizos *et al.*, 2002). Diese Problematik gibt Hinweise auf einen starken Einfluss der Maturationsbedingungen, insbesondere der IVM-Medienzusammensetzung und dessen Zusätze auf die Entwicklungsfähigkeit von Oozyten. Die IVM humaner Eizellen ist daher aufgrund der niedrigen Effektivität im Vergleich zur hormonellen Behandlung mit IVF noch kein Standardverfahren (Suikkari und Soderstrom-Anttila, 2007; Hashimoto, 2009), obgleich sie schon mancherorts bei bestimmten Patientengruppen wie Frauen mit PCOS angewendet wird (Diedrich *et al.*, 2013).

Geprägte Gene spielen eine elementare Rolle bei der fetalen und plazentalen Entwicklung. Aufgrund ihrer monoallelischen Expression und ihrer komplexen epigenetischen Regulation sind sie besonders anfällig für epigenetische Veränderungen (Dolinoy *et al.*, 2007). Während Methylierungsmuster geprägter Gene extensiv in bovinen Präimplantationsembryonen untersucht worden sind, fehlt es noch weitgehend an Studien zu einem möglichen Einfluss der Reifungsbedingungen auf die Methylierung geprägter Gene in reifenden Eizellen. Die DNA-Methylierung wird während der Bildung der primordialen Keimzellen (PGDs) im frühen Embryo global gelöscht, um die somatischen Muster der embryonalen Zellen, aus welchen die PGDs hervorgehen, zu beseitigen und damit einen äquivalenten epigenetischen Zustand von paternaler und maternaler Keimzelllinie herzustellen (Reik *et al.*, 2001; Haaf, 2006; Smallwood *et al.*, 2011). Studien mit verschiedenen Mäusestämmen hatten gezeigt, dass die maternalen Imprints erst postnatal in den späten Stadien der Follikulogenese etabliert werden. Die *De novo*-Methylierung von *Snrpn*, *Peg3* sowie *Mest* und *Igf2r* ist in frühen Präantralfollikeln noch nicht vollständig vorhanden, sondern erfolgt in einer genspezifischen, asynchronen Abfolge während dem Oozytenwachstum im Primordialfollikel- bis zum Antralfollikelstadium (Lucifero *et al.*, 2004b; Hiura *et al.*, 2006; Anckaert *et al.*, 2009a). Wie bei der Maus findet die Etablierung der DNA-Methylierung auch in Rinderoozyten asynchron an verschiedenen Stellen im Genom und in Abhängigkeit von der Oozytengröße statt (O'Doherty *et al.*, 2012). Aufgrund der sukzessiven *De novo*-Methylierung in Eizellen könnte die IVM insbesondere diejenigen geprägten Gene beeinträchtigen, deren Prägung erst spät in der Follikulogenese stattfindet wie beispielsweise im Falle des *Impact*-Gens bei Mäusen (Obata und Kono, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Friedrich-Löffler-Institut (FLI) für Nutztiergenetik (Mariensee) erstmals der Einfluss zweier unterschiedlicher Maturations-systeme (TCM und mSOF), welche routinemäßig für die IVP von Rindern verwendet werden, auf die Methylierungsmuster der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten Keimzell-DMRs (gDMRs) der geprägten Gene *PEG3*, *SNRPN* und *IGF2/H19* in Rindereizellen untersucht (Heinzmann *et al.*, 2011). Frühere Studien hatten gezeigt, dass die Methylierungsmuster dieser Gene in Embryonen durch *in vitro*-Verfahren (IVP oder SCNT) beeinflusst werden können (Curchoe *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Niemann *et al.*, 2010).

#### **4.2.1. Vergleich *in vitro*- und *in vivo*-gereifte Oozyten**

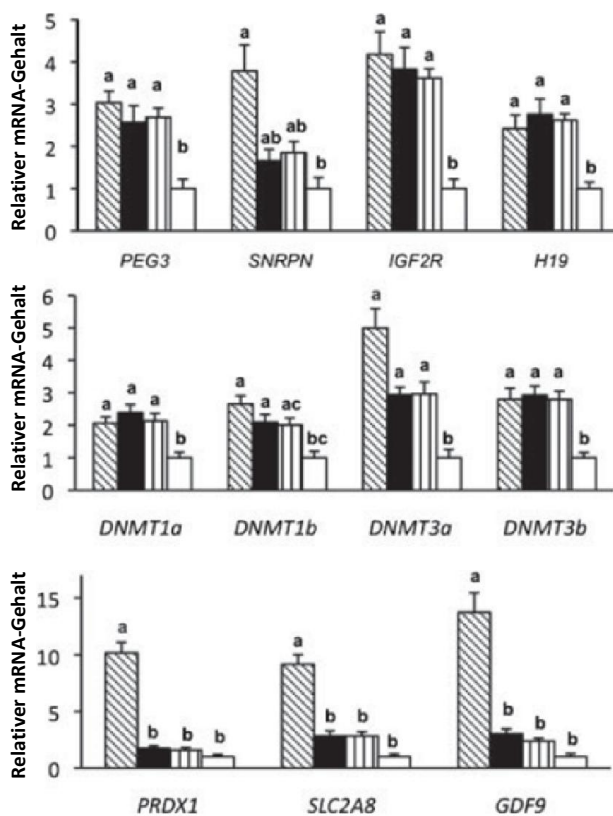
Der Vergleich *in vivo*- und *in vitro*-gereifter Oozyten lieferte keine signifikant erhöhten Raten von Imprintingmutationen im Sinne einer Hypomethylierung der maternal geprägten Loci *SNRPN* und *PEG3* oder einer Hypermethylierung der paternal geprägten intergenischen DMR *IGF2/H19* von jeweils mehr als 50% aller untersuchten CpGs. Entgegen der Erwartungen wiesen jedoch unreife Oozyten signifikant mehr aberrant methylierte Allele auf als mSOF-gereifte Eizellen ( $p = 0,02$ ). Mögliche Erklärungen sind eine unvollständige Demethylierung während der Löschung der Imprints in den PGDs (*IGF2/H19*) sowie eine unvollständige oder falsche Imprint-Etablierung während der Oozytenentwicklung (*SNRPN*, *PEG3*). Es ist daher anzunehmen, dass die aberranten Imprints ein Kennzeichen von Unreife oder von Oozyten mit verminderter Qualität sind, die wiederum aus Follikeln verminderter Qualität stammen, welche wohl nicht auf den physiologischen Ovulationsstimulus reagiert hätten (Heinzmann *et al.*, 2011). Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die ovarielle Stimulation möglicherweise Oozyten rekrutiert, welche epigenetische Defekte aufweisen oder nicht zur korrekten Imprintetablierung fähig sind (Ludwig *et al.*, 2005; Khoueiry *et al.*, 2008). Die Rate der Imprintingmutationen war jedoch in den ungerreifen Eizellen nur im Vergleich zu den mSOF-gereiften, nicht aber zu den TCM- und *in vivo*-gereiften Oozyten signifikant erhöht.

Obwohl die Methylierungsmuster der in dieser Arbeit untersuchten geprägten und ungeprägten Gene keine Evidenz für eine Beeinträchtigung der Epigenetik durch die IVM-Kulturbedingungen lieferten, zeigten dennoch die am FLI in Mariensee durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen einige Unterschiede zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-gereiften Versuchsgruppen. Im Verlauf der Eizellreifung kommt es zu einer generellen Reduktion von verfügbaren Poly(A)<sup>+</sup>-mRNAs, welche die infolge des Transkriptionsstopps auftretende Degradation und Speicherung der Transkripte als deadenylierte Form widerspiegelt. Diese



werden bis zu ihrer Reaktivierung im Verlauf der Maturation, Fertilisation oder frühen Embryogenese im Zytoplasma gelagert (Niemann und Wrenzycki, 2000; Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002; Thelie *et al.*, 2007; Katz-Jaffe *et al.*, 2009). Die geprägten Gene *H19*, *PEG3* und *IGF2R* wiesen in den *in vitro*-gereiften Eizellen eine signifikante Hochregulation der Transkriptmenge im Vergleich zu den *in vivo*-gereiften Oozyten auf. Dieser Trend war zwar auch bei *SNRPN* erkennbar, wobei der Unterschied jedoch keine Signifikanz erreichte (Abb. 4.1; Heinzmann *et al.*, 2011). Ähnlich verhielt es sich mit den Transkriptmengen der *De novo*-Methyltransferasen *DNMT3A*- und *DNMT3B*, welche bei den beiden IVM-gereiften Eizellgruppen im Vergleich zu den *in vivo*-gereiften Oozyten ebenfalls signifikant hochreguliert und auf einem ähnlich hohen Niveau wie die ungereiften Oozyten blieben (Heinzmann *et al.*, 2011). Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer Studie, welche die Transkriptome boviner MII-Oozyten nach IVM und *in vivo*-Maturation per Array-Analyse und quantitativer Realtime-PCR verglichen. Die Studie ermittelte signifikante Unterschiede der mRNA-Mengen einiger Gene, darunter die geprägten Gene *IGF2R*, *PEG3* und *SNRPN* zwischen IVM- und *in vivo*-gereiften Eizellen (Katz-Jaffe *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Reife nach IVM noch nicht vollständig erreicht ist, da die Expressionsmuster der geprägten Gene noch sehr denen unreifer Eizellen ähneln. Die *in vitro* beschleunigte Maturation könnte möglicherweise zu einer unvollständigen Speicherung und Degradation der Poly(A)<sup>+</sup>-mRNAs und damit zu einer verzögerten zytoplasmatischen Reife mit erhöhten mRNA-Leveln führen (vgl. Kap. 4.4.). Das erhöhte Expressionsniveau der Methyltransferasen in IVM-Eizellen könnte wiederum die Etablierung aberranter Methylierungsmuster in IVP- und SCNT-Embryonen begünstigen (Niemann *et al.*, 2010).

Die Transkriptmengen von *GDF9*, *SLC2A8* und *PRDX1* waren hingegen in den IVM-Oozyten im Vergleich zu den *in vivo*-gereiften Eizellen nur leicht erhöht (Heinzmann *et al.*, 2011). Eine erhöhte *GDF9*-Transkriptmenge wird mit einer schlechten Entwicklungskompetenz reifer Rindereizellen assoziiert: Lonergan *et al.* zeigten eine positive Korrelation der *in vitro*-Expositionsdauer mit dem *GDF9*-mRNA-Level und der Minderung der Entwicklungsfähigkeit zum Blastozystenstadium (Lonergan *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 2003). Da der von der Rindereizelle und den Granulosazellen ab dem Primärfollikelstadium exprimierte Wachstumsfaktor eine globale Rolle bei der Follikulogenese spielt (Thelie *et al.*, 2007), könnten die generell in IVM-Oozyten erhöhten Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA-Level ein Ungleichgewicht der Wachstumsfaktoren und damit eine herabgesetzte Entwicklungsfähigkeit zum Blastozystenstadium widerspiegeln (Lonergan *et al.*, 2003).



**Abb. 4.1: Relative Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA-Gehalte von 11 entwicklungsrelevanten Genen in bovinen Eizellen.** Die Daten basieren auf Einzelzellpräparationen von 8-15 Oozyten pro Gruppe: Ungereifte (gestreifter Balken), mSOF-Medium gereifte (schwarz), TCM-gereifte (vertikale Linien) und *in vivo*-gereifte Eizellen (weiß). Dargestellt wird die relative Expression im Verhältnis zum durchschnittlichen mRNA-Wert in *in vivo*-gereiften Eizellen. Balken mit verschiedenen Indizes (a,b,c) weisen signifikante Unterschiede zueinander auf ( $p < 0,05$ ). Zwischen den beiden IVM-Medien TCM und mSOF wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Die Abbildung wurde aus Heinzmann *et al.* (2011) entnommen und modifiziert.

Da trotz der insgesamt erhöhten mRNA-Menge in IVM-Oozyten in keinem der drei untersuchten geprägten Gene eine erhöhte Rate von Imprintingmutationen ermittelt werden konnte, implizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass die Stilllegung der Transkription in reifenden Antralfollikeln durch andere epigenetische Mechanismen als die DNA-Methylierung gesteuert wird (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Heinzmann *et al.*, 2011). Dies ist insofern plausibel, da die DNA-Methylierung obwohl reversibel dennoch eine generell stabile Modifikation darstellt. In Anbetracht der hohen Dynamik der Transkriptionsprozesse im Laufe der Oozytenentstehung und Maturation verlangt es nach anderen Mechanismen, die eine schnelle Änderung des Expressionsstatus erlauben. Denkbar wäre die Repression durch Transkriptionsfaktoren oder durch Änderungen des Chromatinstatus, etwa durch reprimierende Histonmodifikationen wie Histonacetylierung oder Dimethylierung des Lysin-4-Restes des Histons 3 (H3K4; Fournier *et al.*, 2002). So konnte gezeigt werden, dass in MI- und MII-Oozyten im Laufe der Maturation eine Abnahme der Histon-4-Acetylierung am Lysinrest 12 (H4K12ac) stattfindet, welche Chromatin mit aktiver Expression kennzeichnet und sonst nur im Germinalen Vesikel bis zum germinalen Vesikel-Breakdown (GVBD) vorkommt (Racedo *et al.*, 2009). Auch könnte DNA-Methylierung innerhalb eines Gens, der sogenannten „Gene-body-methylation“, Einfluss auf die Expression nehmen. Beispielsweise

wird im Falle des humanen *SHANK3*-Lokus die gewebe- und zelltypspezifische Expression intragener, alternativer Transkripte durch DNA-Methylierung reguliert (Maunakea *et al.*, 2010). Die große Studie von Maunakea *et al.* hatte gezeigt, dass sich der Großteil methylierter CpG-Inseln in intragenen oder intergenen chromosomalen Bereichen befindet, während nur weniger als 3% der CpG-Inseln in 5'-Promotoren methyliert vorliegen. Weiterhin könnte wiederum die Etablierung der Gene-body-Methylierung durch RNA-Interferenz (RNAi) mit nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs) ausgelöst werden, welche eine Rolle bei der Bildung von Heterochromatin spielen (Flanagan und Wild, 2007). Inaktive Gene können auch unmethyliert in einer aktiven (offenen) Chromatinstruktur vorkommen: die Anreicherung von H3K4-Methylierung in diesen inaktiven Genpromotoren mit vorwiegend hoher CpG-Dichte scheint eine Methylierung zu verhindern. Dies räumt der Chromatinstruktur eine weitere funktionelle Rolle bei der Genregulation ein (Weber *et al.*, 2007).

#### **4.2.2. Einfluss der IVM-Medien mSOF und TCM auf bovine Oozyten**

Die bei der normalerweise unter Atmosphärendruck stattfindenden IVM im TCM unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentration von 20% steht unter dem Verdacht, eine Anreicherung von DNA-fragmentierenden Radikalen und Peroxiden in der reifen Eizelle zu begünstigen (Kruip *et al.*, 2000). Um die Auswirkungen einer reduzierten Sauerstoffkonzentration zu testen, fand die Maturation im mSOF-Medium bei einer verminderten O<sub>2</sub>-Konzentration von 5% statt. Hingegen erfolgte die herkömmliche Reifung im TCM-Medium in Luftatmosphäre.

Der Vergleich der beiden Medien und Sauerstoffbedingungen lieferte keine Unterschiede in der DNA-Methylierung der drei geprägten gDMRs (Heinzmann *et al.*, 2011). Die insgesamt niedrige Rate der Methylierungsfehler an einzelnen CpG-Stellen sowie ganzer Allele lässt auf eine generelle Stabilität der DNA-Methylierung schließen. Es wurde lediglich in TCM-gereiften Oozyten eine leicht erhöhte Gesamtrate einzelner CpG-Fehler im Vergleich zu ungerreifen Eizellen beobachtet. Das Gen *PEG3* wies dabei relativ viele CpG-Fehler in TCM-gereiften Oozyten auf, deren Häufung jedoch nur gegenüber den mSOF-gereiften Eizellen das Signifikanzniveau erreichte. Die Ergebnisse geben möglicherweise Hinweise darauf, dass das TCM-Medium bei einigen Genen zu einer geringfügig erhöhten Rate von stochastischen Methylierungsfehlern einzelner CpGs führen und daher im Vergleich zum mSOF-Medium suboptimal sein könnte. Es ist allerdings nicht anzunehmen, dass Methylierungsfehler

einzelner CpG-Stellen die Genexpression verändern können. Obwohl die Methylierung einer CpG-Position in Einzelfällen die Genregulation beeinträchtigen kann, beispielsweise wenn dadurch eine Transkriptionsfaktorbindestelle blockiert wird (Griswold und Kim, 2001), bedarf es in der Regel einer hohen Dichte methylierter CpGs im Promotor eines Gens, um dieses abzuschalten. Entsprechend zeigten Weber *et al.* (2007), dass eine geringe Methylierung von ca. 4-7% aller CpGs in einem Promotor mit hoher CpG-Dichte nicht mit dessen Aktivität interferiert.

Die vereinzelt CpG-Fehler könnten aufgrund der langen Verweildauer der Oozyte im Diktyotän durch zufällige *De novo*-Methylierung entstehen. Entsprechend einer Simulationsstudie zur genomischen Verteilung und Dynamik der DNA-Methylierung wird der DNMT1-Methyltransferase in somatischen Zellen eine geringe Fähigkeit zur *de novo*-Methylierung zugeschrieben, welche in hypomethylierten und damit metastabilen Bereichen im Laufe der Zellteilungen einzelne CpG-Stellen methyliert (Sontag *et al.*, 2006). So könnte die somatische DNMT1-Methyltransferase auch in Oozyten stochastische CpG-Fehler einführen, da sie bei Mäusen erst kürzlich in geringen Mengen im Oozytenkern nachgewiesen wurde (Cirio *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 2008). Analog könnte die oozytenspezifische Isoform DNMT1o, welche zwar vorwiegend im Zytoplasma für den späteren Einsatz bei der Aufrechterhaltung der Imprints im sich teilenden Präimplantationsembryo gespeichert wird (Cardoso und Leonhardt, 1999; Howell *et al.*, 2001), in geringen Mengen auch im Zellkern agieren. Schließlich könnten die einzelnen CpG-Fehler ebenso technische Artefakte repräsentieren, welche auf eine unvollständige Bisulfitkonvertierung zurückzuführen sind.

Wie die Methylierungsanalysen zeigten auch die am FLI in Mariensee durchgeführten Expressionsanalysen keine nennenswerten Unterschiede der mRNA-Mengen dieser drei geprägten Gene *H19*, *SNRPN* und *PEG3* zwischen den Medien (Heinzmann *et al.*, 2011; Abb. 4.1, Kap. 4.2.1.). Zusätzlich wurde die Expression von acht weiteren, für die Entwicklungskompetenz von Oozyten relevanten Genen untersucht: das mit dem LOS in Verbindung stehende paternal geprägte Gen *IGF2R*, die *de novo*-Methyltransferasen DNMT1A, DNMT1B, DNMT3A und DNMT3B sowie die entwicklungsrelevanten Gene *GDF9*, *SLC2A8* und *PRDX1*. Von hohem Interesse waren insbesondere die Auswirkungen der Maturationsmedien auf die Expressionslevel der beiden Gene *PRDX1* und *SLC2A8*. Aufgrund der Reifung in einer 20%igen Sauerstoffatmosphäre wurde zum Einen eine erhöhte Expression des Markergens für oxidativen Stress *PRDX1* in TCM-gereiften gegenüber mSOF-gereiften Oozyten erwartet. Zum

Anderen steigt unter der niedrigen Sauerstoffzufuhr in der *in vitro*-Kultur im mSOF-Medium wegen der Umstellung der Zellatmung auf die anaerobe Glykolyse der Glukoseverbrauch (Hashimoto *et al.*, 2000; Oyamada und Fukui, 2004), was einen Anstieg der Expression des in den Glukosemetabolismus und –Transport involvierten Gens *SLC2A8* annehmen ließ. Die Expressionsanalysen der beiden Gene *PRDX1* und *SLC2A8* lieferten jedoch keinerlei Unterschiede der mRNA-Level zwischen den beiden IVM-Medien (Heinzmann *et al.*, 2011). Dies mag insofern nicht weiter verwunderlich sein, da der Verbrauch von Glukose und Sauerstoff während der Reifung hauptsächlich durch die Kumuluszellen erfolgt und in Eizellen generell gering ist (zusammengefasst bei Harvey, 2007). Während laut früheren Angaben die Transkriptmenge von *PRDX1* in Eizellen mit mutmaßlich hoher Entwicklungs-kompetenz aus Follikeln >8 mm ansteigt (Mourot *et al.*, 2006), konnte hier in Übereinstimmung mit anderen Berichten (Thelie *et al.*, 2007) keine Zunahme der Transkriptmenge festgestellt werden.

#### **4.2.3. Effekte des Kulturmediums in Embryo- und Follikelkultursystemen**

Die Methylierungsanalysen dieser Arbeit sowie die ergänzenden mRNA-Untersuchungen des FLI lassen vermuten, dass die beiden Medien mSOF und TCM gleichwertig zur IVM verwendet werden können. In den vergangenen Jahren berichteten jedoch zahlreiche Studien negative Effekte der *in vitro*-Verfahren auf die Entwicklung und das Wachstum des Postimplantationsembryos von Mensch, Wiederkäuern oder Mäusen (zusammengefasst bei Khosla *et al.*, 2001b). Die Embryokultur bei Rindern und Schafen führte zu einem gesteigerten Geburtsgewicht, fetaler und perinataler Sterblichkeit, verlängerter Tragezeit und Abnormitäten des Skeletts und der Organe (Thompson *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1996; Kruij und den Daas, 1997; Farin *et al.*, 2006). Speziell die Zugabe von Serum in die Kulturmedien wurde mit aberrantem Wachstum und dem LOS in Verbindung gebracht (Sinclair *et al.*, 1999; Khosla *et al.*, 2001a). Bei Schafen mit dem LOS konnte eine verminderte Methylierung der *IGF2R*-ICR mit einhergehender reduzierter Expression beobachtet werden (Young *et al.*, 2001). Auch in der *in vitro*-Kultur von Mausembryonen zeigte sich, dass das Kulturmedium einen Einfluss auf die Expression und Methylierung geprägter Gene und das Geburtsgewicht haben kann (Khosla *et al.*, 2001b). Doherty *et al.* (2000) fanden zudem Unterschiede in der Suszeptibilität der murinen *Igf2/H19*-ICR für verschiedene *in vitro*-Kulturmedien: nur eines der getesteten Medien führte zu einer deutlichen Hypomethylierung der ICR und folglich zur Expression des paternal geprägten Allels von *H19*. Die

Autoren schlossen auf eine selektive Wirkung verschiedener Medien auf die DNA-Methylierung (Doherty *et al.*, 2000). Da sich keine anderen geprägten Gene von einer Hypomethylierung betroffen zeigten, könnte die *Igf2/H19*-ICR möglicherweise hypersensibel für Umweltänderungen sein (Doherty *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen aus Embryokultursystemen wiesen Mausoozyten aus *in vitro*-Follikelkultur trotz Zugabe von fetalem Kälberserum ins Medium keine Beeinträchtigungen der DNA-Methylierung geprägter Loci auf (Anckaert *et al.*, 2009a; Trapphoff *et al.*, 2010; El Hajj *et al.*, 2011). Des Weiteren scheinen verschiedene Behandlungen und suboptimale Bedingungen in der *in vitro*-Follikelkultur von Mäusen wie beispielsweise eine Ammoniumanreicherung durch die Mineralölbeschichtung keinerlei Auswirkungen auf die Imprintetablierung zu haben (Obata und Kono, 2002; Anckaert *et al.*, 2009a; Anckaert *et al.*, 2009b). Demnach scheinen die umgebenden Granulosazellen einen protektiven und physiologischen Einfluss auf die Eizelle auszuüben. Insgesamt erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass die Etablierung der DNA-Methylierung in Oozyten ein weitgehend robuster Prozess ist, während die Aufrecht-erhaltung der Methylierung im Präimplantationsembryo hingegen anfällig gegenüber kulturinduzierten Imprintingfehlern zu sein scheint (Anckaert *et al.*, 2013).

#### **4.2.4. Geringes Epimutationsrisiko der IVM?**

Bislang gibt es nur wenige Studien bei Tier und Mensch, welche den Einfluss der IVM auf Methylierungsmuster geprägter Gene untersucht haben. Auch bei der Maus gibt es praktisch keine Studien zur reinen IVM von Oozyten ohne vorherige Follikelkultur, was in der Schwierigkeit der Follikelpunktion aus Mausovarien begründet sein mag. Die IVM von murinen Eizellen in Follikelkultur lieferte keine Hinweise auf abnormales Imprinting (Anckaert *et al.*, 2009a; Anckaert *et al.*, 2009b; Trapphoff *et al.*, 2010; El Hajj *et al.*, 2011). Die wenigen Studien an großen Tiermodellen wie dem Rind konnten bisher ebenfalls keine Auswirkungen der IVM auf die DNA-Methylierung feststellen. *In vitro*-gereifte Schafoozyten zeigten keine Beeinträchtigung der Imprints der *H19*-DMR und *IGF2R*-DMR2 (Colosimo *et al.*, 2009). Auch unterscheidet sich die globale Methylierung des Genoms nicht zwischen *in vivo*- und *in vitro*-gereiften Rindereizellen (Racedo *et al.*, 2009). In drei Studien an humanen IVM-Oozyten konnten hingegen Imprintingaberrationen der mit dem BWS assoziierten DMRs von *H19* und *KCNQ1OT1* detektiert werden, sowohl in Form einer Hypermethylierung der paternal geprägten CTCF-Bindestelle der *H19*-DMR (Borghol *et al.*, 2006) als auch in Form

eines Verlustes der Methylierung der KvDMR1 des maternal geprägten Gens *KCNQ1OT1* (Khoueiry *et al.*, 2008; Al-Khtib *et al.*, 2011). Während die beiden älteren Studien deutliche Änderungen der erwarteten Methylierung fanden, wurden in der neueren Studie nur sehr wenige Imprintingmutationen von *H19* und *KCNQ1OT1* in humanen IVM-Oozyten festgestellt (Al-Khtib *et al.*, 2011). Die geringere Epimutationsrate im Vergleich zu den früheren beiden Studien wurde auf die Verlängerung der IVM-Dauer von 26-28 auf 36 Stunden zurückgeführt, die der physiologischen *in vivo*-Dauer entspricht (Al-Khtib *et al.*, 2011). Die beschleunigte Kinetik bei einer IVM-Dauer von nur 24 h könnte demnach die Etablierung der maternalen Imprints beeinträchtigen (Al-Khtib *et al.*, 2011; Anckaert *et al.*, 2013). Trotz früher Berichte, dass die Methylierung am *SNRPN*-Lokus in humanen Eizellen erst während oder nach der Fertilisation stattfindet (El-Maarri *et al.*, 2001), scheint die *SNRPN*-Imprintetablierung beim Menschen (Geuns *et al.*, 2003), der Maus (Lucifero *et al.*, 2002; Obata und Kono, 2002) und beim Rind (Lucifero *et al.*, 2006; O'Doherty *et al.*, 2012) jedoch schon im Germinalen Vesikelstadium in der postnatalen Wachstumsphase der Oozyten zu erfolgen. Es ist also fraglich, ob die Maturationsbedingungen die zu Beginn der Reifung wohl weitgehend etablierte Prägung maternaler Gene noch verändern kann oder ob die beobachteten Imprintingaberrationen in humanen Oozyten stattdessen auf die in diesen Studien durchgeführte ovarielle Stimulation zurückzuführen sind (Anckaert *et al.*, 2013; vgl. Kap. 4.3.2.).

Insgesamt liefern die bisherigen Untersuchungen der bovinen und ovinen IVM sowie die *in vitro*-Kultur-Modelle der Maus beruhigende Resultate bezüglich der Stabilität bzw. Neueta-blierung der DNA-Methylierung an geprägten Genen in Oozyten (Anckaert *et al.*, 2009a; Colosimo *et al.*, 2009; Racedo *et al.*, 2009; Trapphoff *et al.*, 2010; El Hajj *et al.*, 2011; Heinzmann *et al.*, 2011). Die Studie von Al-Khtib *et al.* konnte außerdem zeigen, dass auch die Vitrifikation der GV-Eizellen vor der IVM keine erhöhte Rate von Imprintingfehlern in MII-Eizellen induziert, was in Übereinstimmung mit den Resultaten von vitrifizierten und *in vitro*-gereiften murinen Eizellen bei Trapphoff *et al.* (2010) ist. Die Möglichkeit der epigenetisch risikoarmen Vitrifikation und der anschließenden IVM von unreifen Eizellen, welche entweder aus natürlichen Zyklen oder durch chirurgische Sektion ovariellen Gewebes gewonnen werden könnten, sind für die mögliche Konservierung der Fertilität von Frauen mit Krebsdiagnose oder erhöhtem Risiko von hoher Bedeutung (Al-Khtib *et al.*, 2011).

#### **4.3. Einfluss des Oozytenalters und der hormonellen Stimulation des Follikelwachstums auf die Epigenetik präpuberaler und adulter Kühe**

Trotz der Entdeckung ovarieller Stammzellen, welche durch stetige Proliferation der postnatalen Eizellatresie partiell entgegenwirken (Johnson *et al.*, 2004), gilt das bei Geburt vorhandene Oozytenrepertoire von Säugetieren dennoch nach wie vor als weitgehend erschöpflich, da es im Laufe des Alterungsprozesses kontinuierlich durch Atresie sowie durch die ab der Pubertät zyklisch stattfindende Ovulation abnimmt. Die Verwendung von Eizellen aus Kälbern für die IVP birgt aufgrund des verkürzten Generationsintervalls ein hohes Potential für eine beschleunigte Verbesserung der genetischen Eigenschaften von Zuchttieren (Lohuis, 1995; Armstrong *et al.*, 1997). Auch im Hinblick auf eine mögliche Konservierung der Fruchtbarkeit bei präpuberalen Krebspatientinnen vor einer anstehenden Chemo- oder Strahlentherapie ist diese „stille Reserve“ an Eizellen von hoher Bedeutung. Eine erfolgreiche *in vitro*-Produktion von Nachkommen ausgehend aus Primordialfollikeln ist bislang jedoch nur bei Mäusen gelungen (Eppig und O'Brien, 1996). Beim Rind und beim Menschen bedarf es dagegen einer Mindestfollikel- bzw. Eizellgröße zur Fortführung der in der Prophase I arretierten Meiose und damit zur erfolgreichen IVM (Menezo und Herubel, 2002). Diese kritische Follikelgröße beträgt beim Rind ca. 2-3 mm und geht mit dem Erwerb der Fähigkeit zur Wiederaufnahme und Vollendung der Meiose und damit der nukleären Maturation einher (zusammengefasst bei Fair, 2003).

Präpuberale Eizellen von Kälbern können nicht-invasiv mittels OPU über transvaginale Follikelaspiration aus dem Ovar gewonnen werden, mit oder ohne vorherige Stimulation mit Gonadotropinen (Oropeza *et al.*, 2004). Trotz der Verfügbarkeit juveniler Rindereizellen scheinen die daraus gezüchteten Embryonen weniger robust und weniger tolerant gegenüber suboptimaler Behandlung wie einer *in vitro*-Kultur zu sein (Armstrong, 2001). Sie weisen eine deutlich eingeschränkte Entwicklungskompetenz im Vergleich zu Oozyten aus adulten Tieren auf, welche sich in einer reduzierten Durchschnittsrate lebensfähiger Blastozysten äußert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erlangen *in vitro* nur ca. 10-15% der präpuberalen Eizellen im Vergleich zu 30-45% der Oozyten aus Adulttieren das Blastozystenstadium (Presicce *et al.*, 1997; Oropeza *et al.*, 2004; Zaraza *et al.*, 2010). Zudem weisen präpuberal erzeugte Blastozysten eine erhöhte Apoptoserate auf (Zaraza *et al.*, 2010). Daher wurde eine mögliche Rolle epigenetischer Faktoren wie der DNA-Methylierung entwicklungsrelevanter Gene beim Erwerb der vollen Entwicklungskompetenz von bovinen



präpuberalen Oozyten vorgeschlagen, welche bislang noch weitgehend unerforscht ist (Oropeza *et al.*, 2004; Zaraza *et al.*, 2010).

Obwohl die Stimulation mit IGF1 und FSH vielversprechend für eine Effizienzsteigerung der Nutztierreproduktion ist, so ist doch ihr Einfluss auf die epigenetische Oozytenqualität und deren Auswirkungen unbekannt. Die hormonelle Stimulation präpuberaler Oozyten könnte zu einer fehlerhaften Etablierung von DNA-Methylierungsmustern im regulatorischen Promotorbereich und damit zu einer Inaktivierung von Genen führen, welche für die Erlangung der vollen Entwicklungskompetenz notwendig sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig der Effekt des Oozytenalters (präpuberale im Vergleich zu adulten Kühen) und der hormonellen Stimulation der Spendertiere mit FSH und IGF1 auf die Promotormethylierung und in Zusammenarbeit mit dem Friedrich-Löffler-Institut (Mariensee) auf die Expression der entwicklungsrelevanten Gene *SLC2A1*, *PRDX1* und *ZAR1* untersucht. Es wurden vier Gruppen präpuberaler Kälber verglichen: eine unbehandelte Gruppe zur Kontrolle, eine Gruppe, dessen Follikelstimulation allein mit FSH angeregt wurde, eine Gruppe, welche neben FSH zusätzlich den Wachstumsfaktor IGF1 verabreicht bekam und schließlich eine Gruppe zur IGF1-Lösungsmittelkontrolle durch Injektion von FSH und Essigsäure. Verglichen wurden die präpuberalen Versuchsgruppen mit zwei Gruppen adulter Kühe, einer unbehandelten Kontrolle und einer Gruppe mit FSH stimulierter Adulttiere, welche aufgrund ihrer Geschlechtsreife ein physiologisch erhöhtes IGF1-Level besitzen. Aus jeder der genannten sechs Gruppen wurden sowohl ungeriffte als auch *in vitro*-gereifte Eizellen untersucht. Da vor der Geschlechtsreife keine Reifung bis zur Ovulation erfolgt, konnten im Unterschied zur vorherigen Analyse geprägter Gene keine *in vivo*-Vergleiche mit präpuberalen Kälbern durchgeführt, sondern nur verschiedene IVM-Modelle verglichen werden.

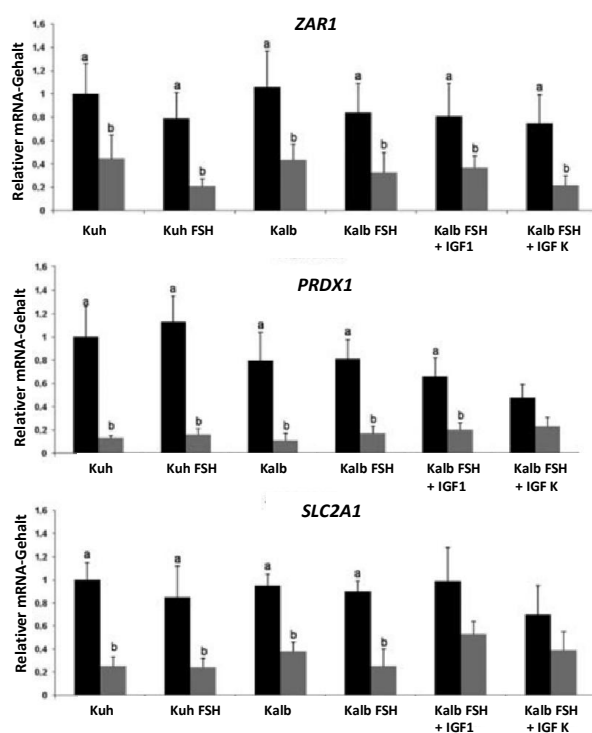
#### **4.3.1. Einfluss des Alters auf die Promotormethylierung oozytenspezifischer Gene**

Eine Methylierung der 5'-*cis*-regulatorischen Bereiche von Genen (der Promotor und/oder das erste Exon) wird mit der Inaktivierung des jeweiligen Gens assoziiert (Bird und Wolffe, 1999). DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus und seine dynamischen Veränderungen im Laufe der Oogenese wurden entsprechend mit einer schlechten Entwicklungsfähigkeit juveniler Eizellen in Verbindung gebracht (Oropeza *et al.*, 2004; Zaraza *et al.*, 2010). Indizien für diese Annahme kommen aus zahlreichen Studien, welche der DNA-Methylierung eine gewichtige Rolle bei der Gametogenese und der Embryonalentwicklung

zuschreiben, vorwiegend über ihre Rolle bei der genomischen Prägung (Miozzo und Simoni, 2002; Tomizawa *et al.*, 2012). Jedoch wurden auch modifizierte Methylierungsmuster nicht geprägter Loci nach *in vitro*-Manipulation beobachtet sowie aberrante Expression von Genen beschrieben, welche an der Ausführung der Genomreprogrammierung beteiligt sind (Katari *et al.*, 2009; Milroy *et al.*, 2011; Linke *et al.*, 2013). Bei Säugern finden sich potentielle Zentren der DNA-Methylierung in 60-70% aller Genpromotorbereiche, welche in Form von CpG-Inseln in der Regel unmethyliert vorliegen und damit transkribierbar sind (Neumann und Barlow, 1996; Antequera, 2003; Weber *et al.*, 2007). Interessanterweise werden in somatischen Zellen im Zuge der Differenzierung nahezu alle keimzellspezifischen Gene durch Promotor-Methylierung abgeschaltet (Weber *et al.*, 2007). Dies impliziert, dass die molekularen Voraussetzungen für den Erwerb von DNA-Methylierung in diesen Bereichen grundsätzlich vorhanden sind und eine Regulation der Expression durch Methylierung somit möglich ist. Die Methylierungsmuster aller drei bovinen Oozytengene blieben jedoch bei allen sechs Behandlungsgruppen ungeachtet des Alters oder des Maturationsstatus (ungereift oder *in vitro*-gereift) deutlich hypomethyliert und zeigten nur vereinzelte methylierte CpG-Stellen. Wie bereits früher erwähnt stellen die einzelnen CpG-Stellen entweder technische bedingte Artefakte im Sinne einer unvollständigen Bisulfitkonvertierung dar oder es handelt sich um stochastische biologische Methylierungsfehler der Zelle, welche in einem ansonsten großflächig unmethylierten Bereich keine funktionelle Konsequenz haben (Diederich *et al.*, 2012; vgl. Kap. 4.2.2.). Es ist jedoch auch hier anzumerken, dass die Untersuchung von drei Genen nur einen sehr begrenzten Einblick in die Epigenetik präpuberaler Eizellen liefert.

Die genspezifische Imprintetablierung erfolgt in wachsenden Oozyten von Mäusen unterschiedlichen Alters gleichschnell und in Abhängigkeit vom Oozytendurchmesser (Hiura *et al.*, 2006). Dies legt nahe, dass weniger das Alter der Oozyten bzw. Tiere ausschlaggebend für den Zeitpunkt der Imprintetablierung ist, sondern lediglich die Oozytengröße, welche infolge hormoneller Rekrutierung zunimmt (Hiura *et al.*, 2006). Kürzlich wurde auch beim Rind gezeigt, dass der Erwerb der DNA-Methylierung an den maternal geprägten DMRs von *SNRPN*, *MEST*, *IGF2R*, *PEG10* und *PLAGL1* in Abhängigkeit von der Eizellgröße erfolgt (O'Doherty *et al.*, 2012). Es ist daher anzunehmen, dass die Imprintetablierung auch in präpuberalen bovinen Oozyten während den wellenförmig einsetzenden Oozytenwachstumsphasen stattfindet, selbst, wenn diese vor Beginn der Pubertät nicht mit einer Ovulation abgeschlossen werden (Armstrong, 2001).

Die am FLI in Mariensee durchgeführten korrespondierenden Expressionsanalysen der untersuchten oozytenspezifischen Gene *SLC2A1*, *PRDX1* und *ZAR1* zeigten ebenfalls keine grundlegenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen in ungereiften bzw. IVM-Eizellen hinsichtlich ihres Alters oder ihrer Behandlung (Abb. 4.2). Jedoch konnte wie zuvor bei den geprägten Genen (Kap. 4.2.) eine Reduktion der relativen Transkriptmenge in *in vitro*-gereiften Oozyten beobachtet werden, die bei fast allen Gruppen zwischen ungereiften und *in vitro*-gereiften Eizellen signifikant war (Abb. 4.2, Diederich *et al.*, 2012).



**Abb. 4.2: Relativer mRNA-Gehalt maternalen, nicht geprägter Transkripte in ungereiften und *in vitro*-gereiften Oozyten präpuberaler und adulter Tiere.** Schwarze Balken repräsentieren ungeriffte Eizellen, graue Balken IVM-Eizellen. Balken mit verschiedenen Indizes (a,b) weisen signifikante Unterschiede zueinander auf ( $p < 0,05$ ). Abbildung entnommen aus Diederich *et al.* (2012) und modifiziert.

Die Degradation der Transkripte von *PRDX1* und *ZAR1* in gereiften gegenüber ungereiften Eizellen wurde schon in früheren Studien beschrieben (Thelie *et al.*, 2007). Aufgrund der relativ zu *in vivo*-gereiften Eizellen erhöhten Transkriptmenge nach IVM (Thelie *et al.*, 2007; Heinzmann *et al.*, 2011) scheint das *PRDX1*-Level in der späten Follikulogenese und Maturation besonders anfällig gegenüber Umwelteinflüssen zu sein, welche die gesteigerte oxidative Abwehr reaktiver Moleküle in IVM-Oozyten reflektieren könnte (Thelie *et al.*, 2007).

Dass die Ursache der schlechten Entwicklungskompetenz juveniler Oozyten zum Blastozystenstadium wohl nicht im Kern zu finden ist, sondern aus dem Zytoplasma hervorgeht, zeigten Experimente, bei denen ein Austausch des Nukleus zwischen adulten

und präpuberalen Oozyten durchgeführt wurde (Salamone *et al.*, 2001). Als mögliche Ursachen wurden eine reduzierte Eizellgröße, ein eingeschränkter Metabolismus, eine ineffiziente oder fehlende Zytoplasmamaturation sowie eine veränderte Proteinsynthese genannt (Lonergan *et al.*, 1994; Gandolfi *et al.*, 1998; Steeves *et al.*, 1999; de Paz *et al.*, 2001; Salamone *et al.*, 2001; Kauffold *et al.*, 2005). Kälbereizellen zeigten weiterhin zytoplasmatische Auffälligkeiten im Sinne veränderter Ultrastrukturen ihrer Zellorganellen wie eine verzögerte Migration und Ungleichverteilung der kortikalen Granula unterhalb der Plasmamembran sowie eine abnorme Form und Größe derselbigen, als auch abnormale Chromatin- und Mikrotubuli-Konfigurationen, eine dünne *Zona pellucida* und eine verringerte Größe anderer intrazytoplasmatischer Organellen (zusammengefasst bei Armstrong, 2001). Die schlechte Entwicklungskompetenz der präpuberalen Eizellen könnte somit ebenfalls wie zuvor die der *in vitro*-gereiften Oozyten (Kap. 4.2.1.) auf eine unzureichende zytoplasmatische Reife zurückzuführen sein (Armstrong, 2001; Kauffold *et al.*, 2005).

### **4.3.2. Einfluss der ovariellen Stimulation auf die Promotormethylierung oozyten-spezifischer Gene**

Eine hormonelle Superstimulation von Kälbern mit Gonadotropinen wie FSH ermöglicht die Isolation von Eizellen aus Kälbern ab einem Alter von nur 2 Wochen (Armstrong, 2001). Stimulierte Jungtiere weisen eine *in vitro*-Morula- bzw. Blastozystenrate von 10-39% auf, während gleichaltrige, aber unstimulierte Kälber eine Erfolgsquote von lediglich 0-10% aller gewonnen Eizellen zeigen ( $p < 0,05$ ; Presicce *et al.*, 1997). Der Metabolismus von Oozyten und Embryonen aus Kälbern zeichnet sich durch eine verzögerte Aufnahme von Glukose und Pyruvat sowie durch eine unzureichende Proteintranslation aus (Gandolfi *et al.*, 1998; Steeves *et al.*, 1999; Salamone *et al.*, 2001). Es wird daher angenommen, dass die schlechte Entwicklungskompetenz präpuberaler Eizellen u.a. auf eine mangelhafte Expression von Glukosetransportermolekülen wie GLUT1 (*SLC2A1*) zurückführbar ist. Eine intraovarielle (i.o.) Injektion des Wachstumsfaktors IGF1 konnte die Entwicklungskompetenz der Eizellen durch eine gesteigerte GLUT1-Expression und Glukoseaufnahme zumindest teilweise verbessern, speziell wenn die Tiere kurz vor der Pubertät standen (Oropeza *et al.*, 2004). Die so erzeugten Embryonen wiesen ein ähnliches Entwicklungspotential und ähnliche mRNA-Expressionsprofile entwicklungsrelevanter Gene auf wie Embryonen adulter Kühe (Oropeza *et al.*, 2004). Der Wachstumsfaktor IGF1 spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle beim

Follikelwachstum ab der Pubertät (Armstrong *et al.*, 1992; Herrier *et al.*, 1994; Gong, 2002) und ist involviert in die Selektion des dominanten Follikels (Ginther *et al.*, 2004).

Wie bereits das Oozytenalter (Kap. 4.3.2.) zeigte jedoch auch die hormonelle Behandlung mit FSH und IGF1 weder einen Einfluss auf die Methylierungsmuster noch auf die mRNA-Menge der untersuchten Gene. Die Promotoren von *PRDX1*, *SLC2A1* und *ZAR1* wiesen in allen Behandlungsgruppen eine eindeutige Hypomethylierung auf, die sich nicht zwischen den unterschiedlich stimulierten Tieren unterschied. Eine Steigerung der Entwicklungskompetenz der Eizellen durch IGF1-Injektion, welche in der Studie von Oropeza *et al.* (2004) aufgrund verbesserter *SLC2A1*-Transkriptmengen in 2-4-Zell-Embryonen von IGF1-behandelten Kälbern postuliert wurde, konnte in dieser Arbeit anhand der *SLC2A1*-mRNA-Level nicht bestätigt werden (Diederich *et al.*, 2012). Auch die Tatsache, dass keine Unterschiede zwischen der Lösungsmittelkontrolle „Kalb mit FSH und Essigsäure (IGF K)“ und der mit IGF1-behandelten Gruppe zu verzeichnen waren, lassen keinen positiven Effekt von IGF1 auf die Entwicklungskompetenz von juvenilen Eizellen erkennen. Die Studie von Zaraza *et al.* (2010) erzielte ebenfalls keine Verbesserung durch IGF1. Allerdings konnten in ergänzenden Experimenten am FLI Unterschiede in der Methylierung der Satellitensequenz BTS („bovine testis satellite I“), einer Repeatsequenz, in Abhängigkeit vom Oozytenalter, der Art der Behandlung und dem Maturationsstatus nachgewiesen werden (Diederich *et al.*, 2012): *in vitro*-gereifte Eizellen von mit FSH und IGF1 stimulierten Kälbern zeigten eine ähnliche Zunahme der Methylierung dieser Sequenzen wie unbehandelte Adulttiere. Folglich könnte die Stimulation von Kälbern mit FSH und IGF1 dem epigenetischen Zustand der über das Genom verteilten Repeatsequenzen dem von erwachsenen unbehandelten Tieren am Nächsten kommen.

Ogleich die Ergebnisse dieser Arbeit insgesamt kaum Hinweise auf eine Verbesserung der Kompetenz von Oozyten durch i.o.-Injektion mit IGF1 liefern konnten, so ist nicht völlig auszuschließen, dass IGF1 ihre Entwicklungskompetenz positiv beeinflusst. So zeigte erst kürzlich eine weitere Studie des FLI in Mariensee mit adulten Tieren, dass selbst die kurzzeitige *in vivo*-Exposition der Eizellen gegenüber einer supraphysiologischen IGF1-Mikroumgebung zu einer gesteigerten Proliferation der ICM-Zellen von *in vitro*-produzierten Blastozysten führt (Velazquez *et al.*, 2012). Da aufgrund der sehr langwierigen Sammlung von bovinen Oozyten mittels OPU nicht ausreichend viele Oozyten zur Verfügung standen, konnte ein möglicher positiver Effekt von IGF1 auf die Blastozystenentwicklung speziell von präpuberalen Kühen nicht ermittelt werden.

#### **4.3.3. Epigenetische Risiken der ovariellen Stimulation und ihre Implikationen für die humane assistierte Reproduktion**

Beim Menschen birgt die standardmäßig durchgeführte künstliche Induktion des Follikelwachstums durch hormonelle Stimulation des Ovars diverse Risiken in sich. Die prominenteste Manifestation ist das ovarielle Hyperstimulationssyndrom (OHSS), welches in schwerwiegenden Fällen lebensbedrohlich werden kann. Besonders häufig und stark sind Frauen mit dem polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) betroffen, welche ein besonders hohes Risiko für das OHSS tragen. Des Weiteren wurde ein verringertes Geburtsgewicht der Neugeborenen aus IVF- oder ICSI-induzierten Einlingsschwangerschaften mit der ovariellen Stimulation assoziiert (Keizer *et al.*, 2004; Mitwally *et al.*, 2004). So könnten die allgemein niedrigen Blastozystenraten und Erfolgsraten einzelner ART-Zyklen von ca. 30% auf eine Beeinträchtigung der physiologischen Abläufe in der Oozyte oder im Präimplantations-embryo durch die vorangegangene ovarielle Stimulation zurückzuführen sein. Eine Erklärung für die verminderte Oozytenqualität und Entwicklungskompetenz nach ovarieller Stimulation könnte die Rekrutierung unreifer Eizellen liefern, welche nicht in der Lage sind, die Imprintetablierung vollständig auszuführen (Khoueiry *et al.*, 2008). Ebenso könnten durch die Superovulation auch Eizellen mit defekter Epigenetik gewonnen werden, welche unter normalen Umständen nicht zur Ovulation gekommen wären. Schließlich könnte auch die bei der hormonellen Stimulation beschleunigte Eizellreifung Fehler der Methylierungsetablierung verursachen (Ludwig *et al.*, 2005). Tatsächlich wurde die ovarielle Stimulation humaner Oozyten zu IVF/ICSI-Zwecken in verschiedenen Untersuchungen als eine mögliche Ursache für beobachtete Epimutationen der Gene *H19*, *KCNQ1OT1* und *MEST (PEG1)* in humanen IVM-Oozyten deklariert, neben dem oftmals erhöhten maternalen Alter oder der zugrunde liegenden Subfertilität (Borghol *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007; Khoueiry *et al.*, 2008; Al-Khtib *et al.*, 2011). Eine weitere Fallkontrollstudie konnte zwar keinen Zusammenhang des BWS mit einer speziellen ART, dem mütterlichen Alter oder dem Infertilitätshintergrund feststellen (Chang *et al.*, 2005). Jedoch war die einzige Gemeinsamkeit der ART-gezeugten BWS-Kinder die Medikation zur ovariellen Stimulation der BWS-Mütter. Die Autoren postulierten daher, dass möglicherweise jegliche Art von Manipulation der Oogenese oder Follikulogenese das Timing geprägter Gene verändern und zu kongenitalen Fehlbildungen führen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten hingegen keinen oder nur wenig Einfluss der hormonellen Stimulation bzw. Superovulation auf die DNA-Methylierung geprägter und

ungeprägter Gene von bovinen adulten oder präpuberalen Eizellen ermitteln (Heinzmann *et al.*, 2011; Diederich *et al.*, 2012). Entsprechend fanden auch die Studien von Denomme *et al.* (2011) und Geuns *et al.* (2007) keine Störung der Imprintetablierung in superovulierten Oozyten. Vielmehr scheint die Superovulation jedoch die spätere Präimplantationsentwicklung zu beeinträchtigen, indem sie die Produkte der maternalen Effektgene verändert, welche nach der Befruchtung für den Erhalt der Prägungsmuster während der Reprogrammierungswelle in der Zygote von Bedeutung sind (Denomme *et al.*, 2011). Bestätigt wird diese Annahme durch die Beobachtung fehlerhafter Methylierung von sowohl maternal wie auch paternal geprägten Genen (*Snrpn*, *Peg3*, *Kcnq1ot1* und *H19*) in Blastozysten (Market-Velker *et al.*, 2010) sowie durch die Herunterregulation der Expression der an der fetalen Reprogrammierung beteiligten Gene *Apex1*, *Polb* und *Mbd3* in Morulae nach Superovulation von normal fertilen Mäusen (Linke *et al.*, 2013). Somit scheint der Verlust maternaler Imprints nicht schon während der Methylierungsakquisition in Oozyten stattzufinden, sondern erst nach der Befruchtung durch fehlerhafte Aufrechterhaltung der Imprints (Denomme *et al.*, 2011). Aufgrund der umstrittenen Auswirkungen der ovariellen Stimulation auf die Imprintingmuster und das Geburtsgewicht der gezeugten ART-Kinder könnte die IVM unreifer Eizellen aus unstimulierten Zyklen daher eine vielversprechende Alternative zu den konventionellen Protokollen darstellen, welche möglicherweise die mit der Superstimulation verbundenen Risiken für Mutter und Kind deutlich zu reduzieren vermag (Cha *et al.*, 1991; Trounson *et al.*, 1994; Khoueiry *et al.*, 2008).

#### **4.4. Die Bedeutung der zytoplasmatischen Reife für die Entwicklungskompetenz von Eizellen**

In dieser Arbeit konnten beim Rind in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten an humanen und murinen Oozyten (Geuns *et al.*, 2007; Denomme *et al.*, 2011) keine Hinweise auf eine direkte Störung der Imprinting- bzw. Methylierungsmuster der untersuchten Gene durch die IVM-Bedingungen, das Alter oder die hormonelle Stimulation des Follikelwachstums gefunden werden. Die beobachteten Unterschiede der mRNA-Gehalte von *in vivo*- und *in vitro*-gereiften Eizellen (Heinzmann *et al.*, 2011) sprechen jedoch für einen negativen Einfluss der Maturationsbedingungen auf die Entwicklungskompetenz der Eizellen, wobei die Art des Mediums eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Insbesondere die Blastozystenrate von nur 25% (TCM) und 31% (mSOF) spiegelt die verminderte Qualität der

IVM-Oozyten wieder (Heinzmann *et al.*, 2011). Ihre schlechte Entwicklungsfähigkeit und Qualität könnte sich erst im frühen Embryo durch ein Scheitern der normalen Präimplantationsentwicklung äußern, dessen Ursache jedoch schon in der Oogenese und Follikulogenese begründet ist (Denomme *et al.*, 2011). Eine Erklärung der niedrigen Blastozystenrate und der erhöhten mRNA-Level von *in vitro*-gereiften Oozyten könnte dieser Theorie zufolge eine verminderte zytoplasmatische Reife der Eizellen sein. Diese zeichnet sich durch eine stetige Akkumulation maternaler Faktoren im Zytoplasma der Eizelle aus, welche essentiell für die nukleäre Oozytenreifung sowie für die Ausführung und Steuerung der embryonalen Frühentwicklung und Reprogrammierung sind (Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002; Sylvestre *et al.*, 2013). Die Anreicherung maternaler Komponenten (mRNA, rRNA, Proteine, Lipide) ist somit verantwortlich für die zur Follikelgröße proportionale Zunahme der Entwicklungskompetenz im Laufe des Antralfollikelwachstums. Die volle zytoplasmatische Reife wird kurz vor der Fortführung der nukleären Maturation bzw. der Ovulation erlangt (Lonergan *et al.*, 1994; Hyttel *et al.*, 1997; Machatkova *et al.*, 2004; Kauffold *et al.*, 2005). Beim Rind beginnt die Erlangung der zytoplasmatischen Reife und der Entwicklungskompetenz ab einer Follikelgröße von 2-3 mm und steigt beträchtlich ab der Dominanzphase im Follikel einer Größe von >8 mm (Hyttel *et al.*, 1997). Sie nimmt möglicherweise sogar noch im 13 mm großen Follikel weiter zu (Kauffold *et al.*, 2005).

Hinweise für eine beeinträchtigte zytoplasmatische Maturation lieferten die IVM-Versuche mit Rindereizellen von Dielemann *et al.* (2002): Obwohl der Oozytenkern bereits ab einer Follikelgröße von ca. 3 mm fähig ist, die LH-vermittelte Fortführung der Meiose bis zum MII-Stadium durch GVBD einzuleiten (Wrenzycki *et al.*, 2007), zeigten bovine IVM-Eizellen aus dominanten Follikeln (ca. 8 mm) trotzdem eine verminderte postkonzeptionelle Entwicklungskompetenz im Vergleich zu *in vivo*-gereiften Eizellen. Die reduzierte Fähigkeit, sich zu qualitativ hochwertigen Blastozysten und darüberhinaus zu entwickeln, war ausdrücklich nicht auf die mRNA-Ausstattung der Eizelle zurückzuführen (Dieleman *et al.*, 2002). Dielemann *et al.* (2002) folgerten, dass die im dominanten Follikel bis zum präovulatorischen Follikel differenziell exprimierten und an der Maturation beteiligten Proteine zwar entsprechend Eichenlaub-Ritter und Peschke (2002) zur Erlangung weiterer Entwicklungskompetenz und voller zytoplasmatischer Reife beitragen. Ihre Expression und postranslatorischen Modifikationen könnten unter *in vitro*-Bedingungen außerhalb des Körpers jedoch suboptimal verlaufen. Das Eingreifen in den natürlichen Ablauf der Oogenese könnte zu einer Beeinträchtigung der Produkte der maternalen Effektgene führen, die nach



der Befruchtung in einer Störung der Präimplantationsentwicklung und der Reprogrammierung oder Aufrechterhaltung der Prägungsmuster resultiert (Denomme *et al.*, 2011).

Eine mangelhafte Akkumulation maternaler Faktoren und damit eine unzureichende zytoplasmatische Maturation der Eizelle könnte auch durch das Fehlen des ausgeklügelten Hormonzusammenspiels und der Interaktion der Eizelle mit den sie umgebenden Granulosazellen bedingt sein. Des Weiteren ist die IVM mit einer Dauer von nur ca. 24 h gegenüber der Maturation *in vivo* (30-36 h) um ein paar Stunden beschleunigt (Anckaert *et al.*, 2013), was die Erlangung der zytoplasmatischen Reife wohl zusätzlich erschwert. Die präovulatorischen Follikel waren deshalb möglicherweise nicht lange genug dem hormonellen Milieu und den Wachstumsfaktoren *in vivo* ausgesetzt, um die zytoplasmatische Maturation im Sinne einer Anreicherung und Speicherung maternaler Poly(A)<sup>+</sup>-mRNAs und Proteine vollständig abzuschließen (Dieleman *et al.*, 2002). Die Resultate der Studie von Lonergan *et al.* (2003) zeigten weiterhin, dass der kurze Zeitraum von 24 h zwischen dem LH-Peak bis zur Ovulation offenbar sehr anfällig gegenüber äußeren Einflüssen und Störungen durch die IVM ist. Damit scheint er der entscheidende, kritische Zeitraum für die Erlangung der zytoplasmatischen Reife und Entwicklungskompetenz von Eizellen zu sein. In unserer Studie könnte sich die verminderte zytoplasmatische Reife in den hohen mRNA-Werten der IVM-Oozyten sowie möglicherweise in der Einführung einzelner CpG-Fehler in der TCM-gereiften Oozytengruppe äußern, welche im Vergleich zu ungereiften Eizellen signifikant erhöht waren. Schließlich mag auch die niedrige Entwicklungskompetenz präpuberaler Oozyten, wie bereits in Kapitel 4.3.1. erörtert, auf eine reduzierte Zytoplasmareife zurückführbar sein (Armstrong, 2001; Kauffold *et al.*, 2005; vgl. Kap. 4.4.), welche jedoch teilweise durch hormonelle Stimulation und Wachstumsfaktoren wie IGF1 verbessert werden kann (Oropeza *et al.*, 2004; Velazquez *et al.*, 2012).

#### 4.5. Effizienz der Limiting Dilution-Methode zum Studium von einzelnen Zellen

Während der chemischen Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit findet eine starke Fragmentierung der DNA statt. Die infolge der Behandlung einzelsträngig vorliegende DNA unterliegt auch weiterhin einer schnellen Degradation, beispielsweise durch wiederholte Auftau- und Einfrierprozesse. Aus diesem Grund mussten zum Studium der Epigenetik von Eizellen in der Vergangenheit stets große Pools von Oozyten untersucht werden (Lucifero *et al.*, 2002; Hiura *et al.*, 2006; Anckaert *et al.*, 2009a). Die Beschaffung einer großen Anzahl von Eizellen ist jedoch sehr langwierig und aufwendig. Des Weiteren besteht in einem Gemisch mit nur wenigen tausend Allelen eines Gens die Gefahr eines Amplifikationsvorteils einiger weniger DNA-Moleküle durch die Polymerasekettenreaktion. Mögliche seltene Epimutationen könnten folglich verdeckt und übersehen werden. Die starke Verdünnung auf das Niveau einzelner DNA-Moleküle pro Reaktionsansatz (Limiting Dilution) erlaubt hingegen die individuelle Amplifikation und Analyse einzelner Allele von Einzelzellen und Embryonen und umgeht so das Risiko der präferenziellen Amplifikation und der damit einhergehenden Ergebnisverzerrung.

Von den in jedem 10er-Pool mutmaßlich angenommenen 40 Allelen je Gen (Eizelle + Polkörper) wurden durch die LD durchschnittlich 4 bis 5 Allele pro Gen gewonnen und analysiert, für *IGF2/H19* waren es sogar 6-7 Allele. Damit betrug die Effizienz der Limiting-Dilution-Methode in dieser Arbeit etwa 10% der ursprünglich angenommenen Menge an Allelen. Da die DNA der extrudierten Polkörper möglicherweise im Zuge deren Abbaus degradiert wird, kann für die gereiften Oozyten eine Effizienz von 10 bis maximal 20% angenommen werden. Dies ist vergleichbar mit der Effizienz der LD von 2-Zell-Embryonen, aus welchen 13-25% der Allele erhalten wurden (El Hajj *et al.*, 2011). Die großen Verluste lassen sich wie vorab erwähnt mit der Reduktion der DNA-Menge durch Degradation bei der Bisulfitbehandlung erklären, sowie durch Pipettierverluste über Rückstände in der Pipettenspitze, obgleich versucht wurde, diesen Risikofaktor durch Minimierung der Spitzenwechsel und der DNA-Übertragungsrate zu reduzieren. Außerdem ist nicht völlig auszuschließen, dass gelegentlich mehrere Allele in einem Reaktionsansatz vorhanden waren, die aufgrund der identischen Basensequenz nicht identifiziert werden konnten. Tatsächlich zeigten wenige LD-Produkte nach der Sequenzierung ein heterozygoten Bild, erkennbar an einzelnen, sich überlagernden Peaks (Abb. 3.5). Diese Sequenzen wurden als zwei verschiedene Allele gewertet. Häufig befanden sich zudem Allele aller drei Gene zugleich im selben Well der ersten PCR. Zu erklären ist diese Akkumulation von DNA-

Molekülen durch ein Verklumpen der DNA („DNA-Clumping“), welche trotz intensiven Mischens durch Auf- und Abpipettieren nicht gänzlich verhindert werden kann.

Die Etablierung der Multiplex-PCR für die bisulfitkonvertierte DNA gestaltet sich zeitintensiv und aufwendig. Durch die Fragmentierung infolge der Bisulfitbehandlung ist die Länge der zu amplifizierenden Produkte auf maximal 500 bp begrenzt, so dass die Produktausbeute mit der Zunahme der Amplikonlänge sinkt. Weiterhin verliert die DNA-Basensequenz aufgrund der C-zu-T-Konversion an Komplexität, welche das Primerdesign erschwert und das Risiko der Loopbildung sowie der Primer- und DNA-Interaktion erhöht. Zur Etablierung der Multiplex-PCR ist es daher ratsam, die Primer in DNA-Verdünnungsreihen zu testen, um ihre Bindungseffizienz und –spezifität zu testen. Des Weiteren müssen beim Design der Primer längere Homopolymere (meist handelt es sich um T-Stretche) im Amplikon vermieden werden, da die DNA-Polymerase ab einer bestimmten Stretchlänge ins „Stottern“ gerät und zu Sequenzierfragmenten unterschiedlicher Länge führt. Die auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung basierte Technik der Deep Bisulfite Sequenzierung (DBS) analysiert erfolgreich längere Homopolymerstretche und könnte in Zukunft alternativ zur Sangersequenzierung zur Auswertung der Limiting-Dilution-Produkte verwendet werden. Von Nachteil und limitierend sind der hohe Arbeits- und Kostenaufwand der LD aufgrund der starken Verdünnung und der vielen genspezifischen Amplifikationen bei der zweiten PCR.

Die Verwendung elternspezifischer SNPs durch gezielte Zucht heterozygoter Mäuse erlaubte bereits kürzlich die Analyse von IVF-Blastozysten mittels LD und die Identifikation und Unterscheidung der beiden elterlichen Allele (El Hajj *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnten keine bovine Blastozysten untersucht werden, da bei *Bos taurus* zuchtbedingt nur wenige häufige SNPs vorhanden sind und mittels *in silico*-Analyse in den untersuchten DMRs keine informativen SNPs identifiziert werden konnten. Für die zukünftige epigenetische Analyse von bovinen Blastozysten sollte eine gezielte Befruchtung von Oozyten und Spermia mit bekanntem genetischem Profil, etwa durch Kreuzung entfernter Rassen in Betracht gezogen werden. Zusammenfassend ist die LD die optimale Methode zur Verhinderung eines Amplifikationsbias, deren Design und Ausführung in Zukunft durch Automatisierung und Verknüpfung mit neuen Sequenziermethoden verbessert und zur verlässlichen Analyse einzelner Zellen, insbesondere von Oozyten, herangezogen werden kann.

#### 4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Das Oozytenalter, die hormonelle Stimulation sowie verschiedene IVM-Medien und -protokolle scheinen keinen oder nur geringfügigen Einfluss auf die DNA-Methylierung der in dieser Arbeit untersuchten geprägten und ungeprägten bovinen Gene zu haben. Es konnten weder signifikante Unterschiede der Methylierungsmuster zwischen IVM-Oozyten und *in vivo*-gereiften Eizellen, noch zwischen IVM-Oozyten aus verschiedenen Alters- und Stimulationsgruppen nachgewiesen werden. Die DNA-Methylierung in Oozyten scheint somit stabil gegenüber den *in vitro*-Bedingungen der IVM zu sein, was auf ein geringes Risiko für durch Methylierungsfehler verursachte Imprintingkrankungen schließen lässt. Die hier beim Modellorganismus *Bos taurus* beobachtete Stabilität der DNA-Methylierung lässt Rückschlüsse auf eine ebenso stabile DNA-Methylierung menschlicher IVM-Eizellen zu. Die vorliegenden Resultate implizieren ein geringes Risiko der nach IVM gezeugten Kinder für Imprintingkrankungen, was in Übereinstimmung mit anderen Studien ist (Geuns *et al.*, 2007; Denomme *et al.*, 2011; El Hajj und Haaf, 2013). Die IVM ist demzufolge eine ART, deren zukünftige Anwendung zur humanen Reproduktion vielversprechend in Bezug auf eine Vermeidung des ovariellen Hyperstimulationssyndroms sowie die Konservierung der Fertilität von adulten und präpuberalen Krebspatientinnen ist.

Es ist jedoch anzumerken, dass die stichprobenartige Untersuchung von sechs Genen nur einen begrenzten Einblick in die Methylierungsdynamik von ungereiften und *in vitro*-gereiften Eizellen liefert, welche keine endgültige Aussage zur Sicherheit der IVM liefert. Insbesondere aufgrund der Plastizität des Epigenoms in den kritischen Entwicklungsphasen sowie seiner Variabilität im Laufe der Lebensdauer lässt sich kaum ein verlässlicher Hinweis erkennen, dass ARTs während dieser Phasen einen Einfluss auf die Prävalenz von Imprintingkrankungen haben (El Hajj und Haaf, 2013). Hingegen konnte eine veränderte DNA-Methylierung und Genexpression nach *in vitro*-Empfängnis mit chronischen Stoffwechselerkrankungen wie Typ-II-Diabetes oder Adipositas im Erwachsenenalter assoziiert werden (Katari *et al.*, 2009). Der Schwerpunkt zukünftiger ART-Studien sollte daher weniger auf der Identifizierung einer möglicherweise gesteigerten Prävalenz von einigen wenigen, sehr seltenen Imprintingkrankungen liegen, sondern vielmehr ein möglicher, funktioneller Zusammenhang der embryonalen Genomreprogrammierung mit dem Erwerb späterer Erkrankungen im Erwachsenenleben untersucht werden (El Hajj und Haaf, 2013). Es bedarf einer systematischen und multinationalen Langzeitbeobachtung der durch ARTs und

speziell durch IVM gezeugten Kinder hinsichtlich ihrer Entwicklung bis ins Erwachsenenalter sowie umfangreicher epigenetischer Analysen (Lidegaard *et al.*, 2006).

Obleich die IVM nicht mit einem erhöhten Risiko für Imprintingkrankungen assoziiert werden konnte, weisen IVM-Oozyten eine verringerte Entwicklungskompetenz zum Blastozystenstadium von nur 30% auf. Die im Institut für Nutztiergenetik, Mariensee, durchgeführten Expressionsanalysen zeigten deutliche Unterschiede der mRNA-Mengen zwischen ungerreifen, *in vitro*- und *in vivo*-gereiften Oozyten, welche jedoch nicht in den in dieser Arbeit untersuchten Methylierungsmustern reflektiert waren (Heinzmann *et al.*, 2011; Diederich *et al.*, 2012). Ihre Ursache ist daher vermutlich auf andere epigenetische Mechanismen und Modifikationen der Genexpression als der DNA-Methylierung zurückzuführen wie beispielsweise die Interaktion der DNA mit microRNAs, ncRNAs, Histonmodifikationen oder Gene-body-Methylierung. Diese durch die IVM ausgelösten epigenetischen Veränderungen bedingen vermutlich eine unzureichende zytoplasmatische Maturation und eine damit verbundene Beeinträchtigung der Präimplantationsentwicklung. Im Hinblick auf eine optimale Tierzucht sowie eine erfolgreiche humane assistierte Reproduktion sollte daher die weitere Erforschung der Biologie und Entwicklung von Eizellen sowie der Auswirkungen der IVM im Vordergrund stehen.

Zur Aufklärung der Dynamik und Sensitivität der DNA-Methylierung hinsichtlich äußerer Einflüsse wie die *in vitro*-Manipulation durch ARTs könnten in Zukunft neue Methoden wie die junge Deep-Sequencing-Technologie zur epigenetischen Analyse herangezogen werden, mit deren Hilfe genomweite Methylierungsprofile der DNA mit nur geringen Mengen an genomischer DNA erstellt werden können (Smallwood *et al.*, 2011). Weiterhin sollten *in vitro* beobachtete Interaktionen beispielsweise der *De novo*-Methyltransferasen mit den Nukleosomen auch *in vivo* nachvollzogen und bestätigt werden. Dies könnte etwa durch die Entwicklung von Protokollen der Chromatin-Immunopräzipitationssequenzierung (ChIP-Seq) zur Ermittlung von Histonmodifikationsprofilen erfolgen. Bahnbrechend wäre die Entwicklung eines Zellkulturmodells, das die Nachverfolgung der Imprintetablierung und damit der Identifikation neuer involvierter Faktoren ermöglicht (Smallwood und Kelsey, 2012). Da die DNA-Methylierung nur ein Teilgebiet der Epigenetik darstellt, sollten bei zukünftigen Fragestellungen nach Möglichkeit auch die Genexpression sowie andere epigenetische Mechanismen wie die Histon-Modifikationen oder Chromatinstruktur untersucht werden, um ein funktionelles Gesamtbild zu erhalten.

## 5. REFERENZEN

### 5.1. Literaturverzeichnis

Adjaye J, Herwig R, Brink TC, Herrmann D, Greber B, Sudheer S, Groth D, Carnwath JW, Lehrach H, Niemann H: Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiol Genomics* 31:315-327 (2007).

Al-Khtib M, Perret A, Khoueiry R, Ibala-Romdhane S, Blachere T, Greze C, Lornage J, Lefevre A: Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured in vitro. *Fertil Steril* 95:1955-1960 (2011).

Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L: Epigenetics and the germline. *Reproduction* 129:137-149 (2005).

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410 (1990).

Anckaert E, Adriaenssens T, Romero S, Dremier S, Smitz J: Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure. *Int J Dev Biol* 53:541-548 (2009a).

Anckaert E, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J: Ammonium accumulation and use of mineral oil overlay do not alter imprinting establishment at three key imprinted genes in mouse oocytes grown and matured in a long-term follicle culture. *Biol Reprod* 81:666-673 (2009b).

Anckaert E, De Rycke M, Smitz J: Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Hum Reprod Update* 19:52-66 (2013).

Antequera F: Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 60:1647-1658 (2003).

Armstrong DT: Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55:1303-1322 (2001).

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR: Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9:333-339 (1997).

Armstrong JD, Stanko RL, Cohick WS, Simpson RB, Harvey RW, Huff BG, Clemmons DR, Whitacre MD, Campbell RM, Heimer EP: Endocrine events prior to puberty in heifers: role of

somatotropin, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins. *J Physiol Pharmacol* 43:179-193 (1992).

Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B: Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 60:370-376 (2001).

Azzi S, Rossignol S, Le Bouc Y, Netchine I: Lessons from imprinted multilocus loss of methylation in human syndromes: A step toward understanding the mechanisms underlying these complex diseases. *Epigenetics* 5:373-377 (2010).

Baker TG, Hunter RHF: Oogenesis and follicular growth in the cow: implications for superovulation. Sreenan JM (Ed), *Control of Reproduction in the Cow* CEC Publications, Luxembourg, pp 34–49 (1978).

Bao L, Zhou M, Cui Y: CTCFBSDB: a CTCF-binding site database for characterization of vertebrate genomic insulators. *Nucleic Acids Res* 36:D83-87 (2008).

Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC: Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2011).

Barton SC, Surani MA, Norris ML: Role of paternal and maternal genomes in mouse development: *Nature*, pp 374-376 (1984).

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

Bertelsmann H, de Carvalho Gomes H, Monika M, Susanne B, Katja M: Fehlbildungsrisiko bei extrakorporaler Befruchtung. *Deutsches Ärzteblatt* 105(1-2): 11-7; DOI: 10.3238/arztebl.2008.0011 (2008).

Bestor TH: The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402 (2000).

Bird AP, Wolffe AP: Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454 (1999).

Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van Steirteghem A, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG: A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20:413-419 (2005).

Bordignon V, Morin N, Durocher J, Bousquet D, Smith LC: GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology* 48:291-298 (1997).

Borghol N, Lornage J, Blachere T, Sophie Garret A, Lefevre A: Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 87:417-426 (2006).

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294:2536-2539 (2001).

Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, Kirkman-Brown J, Harrison R, Maher ER, Reardon W: A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 22:3237-3240 (2007).

Brevini TA, Cillo F, Colleoni S, Lazzari G, Galli C, Gandolfi F: Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes, and embryos. *Mol Reprod Dev* 69:375-380 (2004).

Brown KW, Villar AJ, Bickmore W, Clayton-Smith J, Catchpoole D, Maher ER, Reik W: Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. *Hum Mol Genet* 5:2027-2032 (1996).

Brudno M, Do CB, Cooper GM, Kim MF, Davydov E, Green ED, Sidow A, Batzoglou S: LAGAN and Multi-LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA. *Genome Res* 13:721-731 (2003).

Buiting K: Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:365-376 (2010).

Bundesärztekammer: (Muster-)Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion, Novelle 2006 (2006). [Online im Internet:] URL: <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3261> [aufgerufen am 11.09.2013]

Cardoso MC, Leonhardt H: DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 147:25-32 (1999).

CDC: CDC's 2011 preliminary ART Fertility Clinic Success Rates Report (2013). [Online im Internet:] URL: <http://www.cdc.gov/art/> [aufgerufen am 10.09.2013]

Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ: Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 68:1009-1014 (2003).



Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK: Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 55:109-113 (1991).

Chamberlain SJ, Brannan CI: The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* 73:316-322 (2001).

Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, Debaun MR: Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril* 83:349-354 (2005).

Cirio MC, Ratnam S, Ding F, Reinhart B, Navara C, Chaillet JR: Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints. *BMC Dev Biol* 8:9 (2008).

Colosimo A, Di Rocco G, Curini V, Russo V, Capacchietti G, Berardinelli P, Mattioli M, Barboni B: Characterization of the methylation status of five imprinted genes in sheep gametes. *Anim Genet* 40:900-908 (2009).

Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, Bowdin SC, Riccio A, Sebastio G, Blik J, Schofield PN, Reik W, Macdonald F, Maher ER: Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 13:1025-1032 (2005).

Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B: Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71:162-164 (2002).

Curchoe CL, Zhang S, Yang L, Page R, Tian XC: Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle. *Anim Reprod Sci* 116:213-225 (2009).

Curley JP, Barton S, Surani A, Keverne EB: Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene. *Proc Biol Sci* 271:1303-1309 (2004).

de Castro EPLA, Hansen PJ: Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 68:763-770 (2007).

de Paz P, Sanchez AJ, De la Fuente J, Chamorro CA, Alvarez M, Anel E, Anel L: Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology* 55:1107-1116 (2001).

Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W: Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13734-13738 (2001).

DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP: Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72:156-160 (2003).

Deng Y, Wu X: Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12050-12055 (2000).

Denomme MM, Zhang L, Mann MR: Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition. *Fertil Steril* 96:734-738 e732 (2011).

Diederich M: Experimentelle Untersuchungen zur epigenetischen Modulation in präpuberalen und adulten bovinen Oozyten. Friedrich-Loeffler-Institut für Nutztiergenetik, Mariensee (2011).

Diederich M, Hansmann T, Heinzmann J, Barg-Kues B, Herrmann D, Aldag P, Baulain U, Reinhard R, Kues W, Weissgerber C, Haaf T, Niemann H: DNA methylation and mRNA expression profiles in bovine oocytes derived from prepubertal and adult donors. *Reproduction* 144:319-330 (2012).

Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G: Reproduktionsmedizin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ISBN-13 978-3-642-30180-3:650 (2013).

Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL: Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57:5-20 (2002).

Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM: Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62:1526-1535 (2000).

Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL: Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatr Res* 61:30R-37R (2007).

Eckert J, Niemann H: In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43:1211-1225 (1995).

Eckert J, Pugh PA, Thompson JG, Niemann H, Tervit HR: Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev* 10:327-332 (1998).

Edwards CA, Ferguson-Smith AC: Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* 19:281-289 (2007).

Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC: Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 221:632-635 (1969).

Eggermann T: Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes: opposite (epi)mutations in 11p15 result in opposite clinical pictures. *Horm Res* 71 Suppl 2:30-35 (2009).

Eggermann T: Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:355-364 (2010).

Eichenlaub-Ritter U, Peschke M: Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum Reprod Update* 8:21-41 (2002).

El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B: Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* 27:341-344 (2001).

El Hajj N, Haaf T: Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* 99:632-641 (2013).

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

Engel N, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS: CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. *Hum Mol Genet* 15:2945-2954 (2006).

Eppig JJ: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838 (2001).

Eppig JJ, O'Brien MJ: Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54:197-207 (1996).

Erickson BH: Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25:800-805 (1966).

ESchG: Gesetz zum Schutz von Embryonen vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746; Embryonenschutzgesetz - ESchG) (1990). [Online im Internet:] URL: <http://www.buzer.de/gesetz/9928/a173314.htm> [aufgerufen am 15.09.2013]

Evans AC, Adams GP, Rawlings NC: Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* 102:463-470 (1994).

Fadini R, Mignini Renzini M, Dal Canto M, Epis A, Crippa M, Caliari I, Brigante C, Coticchio G: Oocyte in vitro maturation in normo-ovulatory women. *Fertil Steril* 99:1162-1169 (2013).

Fair T: Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78:203-216 (2003).

Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE: Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65:178-191 (2006).

Flanagan JM, Wild L: An epigenetic role for noncoding RNAs and intragenic DNA methylation. *Genome Biol* 8:307 (2007).

Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM: Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet* 17:1653-1665 (2008).

Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M, Feil R: Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J* 21:6560-6570 (2002).

Frevel MA, Hornberg JJ, Reeve AE: A potential imprint control element: identification of a conserved 42 bp sequence upstream of H19. *Trends Genet* 15:216-218 (1999a).

Frevel MA, Sowerby SJ, Petersen GB, Reeve AE: Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms tumor. *J Biol Chem* 274:29331-29340 (1999b).

Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TA, Acocella F, Lauria A, Armstrong DT: Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 49:168-175 (1998).

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

Geuns E, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M: Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet* 44:144-147 (2007).

Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y: In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* 72:1338-1341 (2003).

Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y: Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 37:1003-1007 (2005).

Gifford CA, Ziller MJ, Gu H, Trapnell C, Donaghey J, Tsankov A, Shalek AK, Kelley DR, Shishkin AA, Issner R, Zhang X, Coyne M, Fostel JL, Holmes L, Meldrim J, Guttman M, Epstein C, Park H, Kohlbacher O, Rinn J, Gnirke A, Lander ES, Bernstein BE, Meissner A: Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* 153:1149-1163 (2013).

Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K: In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod* 70:99-105 (2004).

Gong JG: Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 23:229-241 (2002).

Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JS, Broadbent PJ: In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51:951-961 (1999).

Gougeon A: Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1:81-87 (1986).

Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M, Craig J, Turner K, McVeigh E, Child T: In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril* 98:355-360 (2012).

Griswold MD, Kim JS: Site-specific methylation of the promoter alters deoxyribonucleic acid-protein interactions and prevents follicle-stimulating hormone receptor gene transcription. *Biol Reprod* 64:602-610 (2001).

Haaf T: Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:13-22 (2006).

Hackett JA, Zylitz JJ, Surani MA: Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet* 28:164-174 (2012).

Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA: Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 452:877-881 (2008).

Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 117:15-23 (2002).

Hall T: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 94/95/NT. *Nucl Acids Symp* 41:95-98 (1999).

Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ: Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod* 20:328-338 (2005).

Hansmann T, Heinzmann J, Wrenzycki C, Zechner U, Niemann H, Haaf T: Characterization of differentially methylated regions in 3 bovine imprinted genes: a model for studying human germ-cell and embryo development. *Cytogenet Genome Res* 132:239-247 (2011).

Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM: CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-489 (2000).

Harvey AJ: The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98:113-128 (2007).

Hashimoto S: Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J Reprod Dev* 55:1-10 (2009).

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N: Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 57:353-360 (2000).

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

Hayatsu H: Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84:321-330 (2008).

Heinzmann J, Hansmann T, Herrmann D, Wrenzycki C, Zechner U, Haaf T, Niemann H: Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 78:188-201 (2011).

Herrier A, Einspanier R, Schams D, Niemann H: Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41:601-611 (1994).

Hitchins MP, Rapkins RW, Kwok CT, Srivastava S, Wong JJ, Khachigian LM, Polly P, Goldblatt J, Ward RL: Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'UTR. *Cancer Cell* 20:200-213 (2011).

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

Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27:2541-2548 (2012).

Horsthemke B, Buiting K: Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 113:292-299 (2006).

Horsthemke B, Ludwig M: Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 11:473-482 (2005).

Horsthemke B, Wagstaff J: Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A:2041-2052 (2008).

Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR: Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104:829-838 (2001).

Huang JM, Kim J: DNA methylation analysis of the mammalian PEG3 imprinted domain. *Gene* 442:18-25 (2009).

Hudson QJ, Kulinski TM, Huetter SP, Barlow DP: Genomic imprinting mechanisms in embryonic and extraembryonic mouse tissues. *Heredity (Edinb)* 105:45-56 (2010).

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32 (1997).

Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS: Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res* 647:77-85 (2008).

Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254 (2003).

Jiang X, Yu Y, Yang HW, Agar NY, Frado L, Johnson MD: The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *J Biol Chem* 285:8472-8480 (2010).

Jinno Y, Sengoku K, Nakao M, Tamate K, Miyamoto T, Matsuzaka T, Sutcliffe JS, Anan T, Takuma N, Nishiwaki K, Ikeda Y, Ishimaru T, Ishikawa M, Niikawa N: Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum Mol Genet* 5:1155-1161 (1996).

Jirtle RJ: The Genome Imprinting Website (2012). [Online im Internet:] URL: <http://www.geneimprint.com> [aufgerufen am 21.01.2014]

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL: Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145-150 (2004).

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

Katalinic A, Rosch C, Ludwig M: Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril* 81:1604-1616 (2004).

Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Gaughan JP, Coutifaris C, Sapienza C: DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 18:3769-3778 (2009).

Katz-Jaffe MG, McCallie BR, Preis KA, Filipovits J, Gardner DK: Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. *Theriogenology* 71:939-946 (2009).

Kauffold J, Amer HA, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj A: The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J Reprod Dev* 51:325-332 (2005).

Kaufman MH, Barton SC, Surani MA: Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265:53-55 (1977).



Keizer M, Middelburg K, Vogel N, Pelinck MJ, Simons A, Hoek A: Birth weight of singletons born after modified natural cycle IVF compared with singletons born after IVF with ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 82(Suppl 2),S48 (2004).

Kelsey G: Genomic imprinting--roles and regulation in development. *Endocr Dev* 12:99-112 (2007).

Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R: Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 64:918-926 (2001a).

Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R: Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* 7:419-427 (2001b).

Khoueiry R, Ibala-Rhomdane S, Mery L, Blachere T, Guerin JF, Lornage J, Lefevre A: Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes. *J Med Genet* 45:583-588 (2008).

Khurana NK, Niemann H: Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 62:847-856 (2000).

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J: UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15:70-73 (1997).

Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Zeinstra EC, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ: In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 17:775-784 (2005).

Kohli RM, Zhang Y: TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502:472-479 (2013).

Kruij TA, Bevers MM, Kemp B: Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53:611-618 (2000).

Kruij TAM, den Daas JHG: In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52 (1997).

Kues WA, Sudheer S, Herrmann D, Carnwath JW, Havlicek V, Besenfelder U, Lehrach H, Adjaye J, Niemann H: Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19768-19773 (2008).

Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H: Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol* 313:335-346 (2008).

Laible G: Enhancing livestock through genetic engineering--recent advances and future prospects. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32:123-137 (2009).

Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O: *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer-Verlag Berlin, Auflage 4; ISBN: 978-3540897590 (2009).

Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A, Tilghman SM: Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 375:34-39 (1995a).

Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM: An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev* 9:2079-2089 (1995b).

Lequarre AS, Grisart B, Moreau B, Schuurbiens N, Massip A, Dessy F: Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev* 48:216-226 (1997).

Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, Smith P, Dean W, Walter J, Higgins M, Feil R, Reik W: Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 36:1291-1295 (2004).

Li L, Keverne EB, Aparicio SA, Ishino F, Barton SC, Surani MA: Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed Peg3. *Science* 284:330-333 (1999).

Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN: Imprinting disorders after assisted reproductive technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:293-296 (2006).

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

Liu JH, Yin S, Xiong B, Hou Y, Chen DY, Sun QY: Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev* 75:598-607 (2008).

Lohuis MM: Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43:51-60 (1995).

Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP: Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 66:297-305 (2003).

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I: Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* 37:48-53 (1994).

Long JE, Cai X: Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *Gene* 388:125-134 (2007).

Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL: Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41:67-72 (1994).

Loumaye E: The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 5:357-376 (1990).

Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM: Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 10:3-18 (2004a).

Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM: Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13:839-849 (2004b).

Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM: Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79:530-538 (2002).

Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM: Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 75:531-538 (2006).

Ludwig M, Katalinic A: Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 5:171-178 (2002).

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B: Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42:289-291 (2005).

Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M: Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61:329-335 (2004).

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM: Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 40:62-64 (2003).

Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS: Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 131:3727-3735 (2004).

Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR: Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 19:36-51 (2010).

Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL: De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 15:74-77 (1997).

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF: Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466:253-257 (2010).

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

Mayer W, Smith A, Fundele R, Haaf T: Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol* 148:629-634 (2000b).

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

McHughes CE, Springer GK, Spate LD, Li R, Woods R, Green MP, Korte SW, Murphy CN, Green JA, Prather RS: Identification and quantification of differentially represented transcripts in vitro and in vivo derived preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 76:48-60 (2009).

Meehan RR: DNA methylation in animal development. *Semin Cell Dev Biol* 14:53-65 (2003).

Menezo YJ, Herubel F: Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod Biomed Online* 4:170-175 (2002).

Milroy C, Liu L, Hammoud S, Hammoud A, Peterson CM, Carrell DT: Differential methylation of pluripotency gene promoters in in vitro matured and vitrified, in vivo-matured mouse oocytes. *Fertil Steril* 95:2094-2099 (2011).

Miozzo M, Simoni G: The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate* 81:217-228 (2002).

Mitwally M, Abdel-Razeq SS, Sullivan M, Crickard K: Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with the birth weight in pregnancies achieved after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 84(Suppl. 2),S50–S51 (2004).

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

Morita Y, Tsutsumi O, Hosoya I, Taketani Y, Oka Y, Kato T: Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 188:8-15 (1992).

Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA: The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev* 73:1367-1379 (2006).

NCBI: Gene ID: 6638. SNRPN small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N [Homo sapiens (human)] (2014). [Online im Internet:] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=6638> [aufgerufen am 21.01.2014]

Neumann B, Barlow DP: Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 6:159-163 (1996).

Niemann H, Carnwath JW, Herrmann D, Wieczorek G, Lemme E, Lucas-Hahn A, Olek S: DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. *Cell Reprogram* 12:33-42 (2010).

Niemann H, Lucas-Hahn A: Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 5:2-10 (2012).

Niemann H, Wrenzycki C: Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21-34 (2000).

Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW: Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells* 4:29-38 (2002).

Nisker J, Baylis F, McLeod C: Choice in fertility preservation in girls and adolescent women with cancer. *Cancer* 107:1686-1689 (2006).

O'Doherty AM, O'Shea LC, Fair T: Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. *Biol Reprod* 86:67 (2012).

Obata Y, Kono T: Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 277:5285-5289 (2002).

Oropeza A, Wrenzycki C, Herrmann D, Hadelers KG, Niemann H: Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol Reprod* 70:1634-1643 (2004).

Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K: Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 72:218-219 (2003).

Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J: Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10:475-478 (2000).

Oyamada T, Fukui Y: Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 50:107-117 (2004).

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18 (1992).

Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbies-Tran R: Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 71:1359-1366 (2004).

Pincus G, Enzmann EV: The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. the Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 62:665-675 (1935).

Plagge A, Gordon E, Dean W, Boiani R, Cinti S, Peters J, Kelsey G: The imprinted signaling protein XL alpha s is required for postnatal adaptation to feeding. *Nat Genet* 36:818-826 (2004).

Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X: Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 56:386-392 (1997).

Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H: Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* 21:738-748 (2009).

Rawlings NC, Evans AC, Honaramooz A, Bartlewski PM: Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 78:259-270 (2003).

Redding GP, Bronlund JE, Hart AL: The effects of IVF aspiration on the temperature, dissolved oxygen levels, and pH of follicular fluid. *J Assist Reprod Genet* 23:37-40 (2006).

Reik W, Constancia M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A, Tycko B, Sibley C: Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol* 547:35-44 (2003).

Reik W, Dean W, Walter J: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093 (2001).

Reik W, Walter J: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2:21-32 (2001).

Relaix F, Wei X, Li W, Pan J, Lin Y, Bowtell DD, Sassoon DA, Wu X: Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2105-2110 (2000).

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P: Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-248 (2002).

Rodriguez-Martinez H: Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 1:21-26 (2012).

Russe I: Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 24:77-92 (1983).

Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH: The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 73:1255-1270 (2006).

Sadler TW: *Medizinische Embryologie*. Thieme, Stuttgart; Auflage: 11, vollständig überarbeitet (25 September 2008); ISBN: 978-3134466119 (2008).

Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT: Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod* 64:1761-1768 (2001).

Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W: Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-182 (2002).

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

Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS: Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 346:731-737 (2002).

Schrooten C, Bink MC, Bovenhuis H: Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87:3550-3560 (2004).

Sha K: A mechanistic view of genomic imprinting. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:197-216 (2008).

Shi W, Haaf T: Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63:329-334 (2002).

Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Broadbent PJ, Robinson JJ: Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil* 116:177-186 (1999).

Sleutels F, Zwart R, Barlow DP: The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415:810-813 (2002).

Smallwood SA, Kelsey G: De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* 28:33-42 (2012).

Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrews SR, Kelsey G: Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* 43:811-814 (2011).

Smith SL, Everts RE, Sung LY, Du F, Page RL, Henderson B, Rodriguez-Zas SL, Nedambale TL, Renard JP, Lewin HA, Yang X, Tian XC: Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of in vitro maturation, fertilization and culture. *Mol Reprod Dev* 76:38-47 (2009).

Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB: Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update* 16:395-414 (2010).

Sontag LB, Lorincz MC, Georg Luebeck E: Dynamics, stability and inheritance of somatic DNA methylation imprints. *J Theor Biol* 242:890-899 (2006).

Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A: Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 36:958-960 (2004).



Steeves TE, Gardner DK, Zuelke KA, Squires TS, Fry RC: In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev* 54:49-56 (1999).

Stephoe PC, Edwards RG: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366 (1978).

Suikkari AM, Soderstrom-Anttila V: In-vitro maturation of eggs: is it really useful? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21:145-155 (2007).

Surani MA, Barton SC, Norris ML: Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550 (1984).

Sutcliffe AG, Ludwig M: Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 370:351-359 (2007).

Suzuki J, Jr., Therrien J, Filion F, Lefebvre R, Goff AK, Smith LC: In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. *BMC Dev Biol* 9:9 (2009).

Sved J, Bird A: The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4692-4696 (1990).

Swaney WT, Curley JP, Champagne FA, Keverne EB: The paternally expressed gene Peg3 regulates sexual experience-dependent preferences for estrous odors. *Behav Neurosci* 122:963-973 (2008).

Sylvestre EL, Robert C, Pernetier S, Labrecque R, Gilbert I, Dufort I, Leveille MC, Sirard MA: Evolutionary conservation of the oocyte transcriptome among vertebrates and its implications for understanding human reproductive function. *Mol Hum Reprod* 19:369-379 (2013).

Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, Thayer MJ, Jones PA: Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet* 10:2619-2626 (2001).

Telford NA, Watson AJ, Schultz GA: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90-100 (1990).

Thelie A, Papillier P, Pernetier S, Perreau C, Traverso JM, Uzbekova S, Mermillod P, Joly C, Humblot P, Dalbies-Tran R: Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol* 7:125 (2007).

Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR: Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385-1391 (1995).

Tomizawa S, Nowacka-Woszek J, Kelsey G: DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. *Int J Dev Biol* 56:867-875 (2012).

Tomizawa S, Sasaki H: Genomic imprinting and its relevance to congenital disease, infertility, molar pregnancy and induced pluripotent stem cell. *J Hum Genet* 57:84-91 (2012).

Tost J, Dunker J, Gut IG: Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques* 35:152-156 (2003).

Trapphoff T, El Hajj N, Zechner U, Haaf T, Eichenlaub-Ritter U: DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum Reprod* 25:3025-3042 (2010).

Tremblay KD, Duran KL, Bartolomei MS: A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol Cell Biol* 17:4322-4329 (1997).

Trounson A, Wood C, Kausche A: In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62:353-362 (1994).

Uribe-Lewis S, Woodfine K, Stojic L, Murrell A: Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev Mol Med* 13:e2 (2011).

van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ: Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 52:335-349 (1999).

van de Sandt JJ, Schroeder AC, Eppig JJ: Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 25:164-171 (1990).

Velazquez MA, Hadelér KG, Herrmann D, Kues WA, Remy B, Beckers JF, Niemann H: In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. *Theriogenology* 78:517-527 (2012).

Vermeiden JP, Bernardus RE: Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* 99:642-651 (2013).

Vogelstein B, Kinzler KW: Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9236-9241 (1999).

Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF: The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology* 45:111-120 (1996).

Warnecke PM, Mann JR, Frommer M, Clark SJ: Bisulfite sequencing in preimplantation embryos: DNA methylation profile of the upstream region of the mouse imprinted H19 gene. *Genomics* 51:182-190 (1998).

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ: Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 25:4422-4426 (1997).

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457-466 (2007).

Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB: Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 18:8-14 (2010).

Wilkinson LS, Davies W, Isles AR: Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci* 8:832-843 (2007).

Williamson C, Blake A, Thomas S, Beechey C, Hancock J, Cattanach B, Peters J: World Wide Web Site - Mouse Imprinting Data and References (2012). [Online im Internet:] URL: [http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic\\_imprinting/](http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/) [aufgerufen am 21.01.2014]

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813 (1997).

Wisborg K, Ingerslev HJ, Henriksen TB: In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil Steril* 94:2102-2106 (2010).

Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A, Jr., Sirisathien S, Brackett B, Niemann H: Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16:893-901 (2001).

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Gebert C, Korsawe K, Lemme E, Carnwath JW, Niemann H: Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:1-9 (2005).

Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H: Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S77-83 (2007).

Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H: In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66:127-134 (2002).

Wu SC, Zhang Y: Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:607-620 (2010).

Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM: Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 33:187-191 (2003).

Yamasaki Y, Kayashima T, Soejima H, Kinoshita A, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Urano T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T: Neuron-specific relaxation of Igf2r imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air. *Hum Mol Genet* 14:2511-2520 (2005).

Yamazaki Y, Mann MR, Lee SS, Marh J, McCarrey JR, Yanagimachi R, Bartolomei MS: Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12207-12212 (2003).

Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC: Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:329-334 (2010).

Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH: DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 270:385-395 (1997a).

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13:335-340 (1997b).

Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD: Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27:153-154 (2001).

Zaraza J, Oropeza A, Velazquez MA, Korsawe K, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H: Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology* 74:75-89 (2010).

## 5.2. Elektronische Quellen

Bundesärztekammer: (Muster-)Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion, Novelle 2006 (2006). [Online im Internet:] URL: <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3261> [aufgerufen am 11.09.2013]

CDC's 2011 preliminary ART Fertility Clinic Success Rates Report (2013). [Online im Internet:] URL: <http://www.cdc.gov/art/> [aufgerufen am 10.09.2013]

ESchG: Gesetz zum Schutz von Embryonen vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746; Embryonenschutzgesetz - ESchG) (1990). [Online im Internet:] URL: <http://www.buzer.de/gesetz/9928/a173314.htm> [aufgerufen am 15.09.2013]

Jirtle RJ: The Genome Imprinting Website (2012). [Online im Internet:] URL: <http://www.geneimprint.com> [aufgerufen am 21.01.2014]

NCBI: Gene ID: 6638. SNRPN small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N [Homo sapiens (human)] (2014). [Online im Internet:] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=6638> [aufgerufen am 21.01.2014]

Prinzip der Pyrosequenzierung. [Online im Internet:] URL: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/spotlight/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/> [aufgerufen am 22.01.2014]

Technische Anleitung „pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems“ (Promega). [Online im Internet:] URL: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/TechnicalManuals/0/pGEM-TandpGEM-TEasyVectorSystemsProtocol.pdf>

Williamson C, Blake A, Thomas S, Beechey C, Hancock J, Cattanach B, Peters J: World Wide Web Site - Mouse Imprinting Data and References (2012). [Online im Internet:] URL: [http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic\\_imprinting/](http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/) [aufgerufen am 21.01.2014]

## 6. VERZEICHNISSE

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

A	<b>A</b> denin (DNA-Base)
Abb.	<b>A</b> bbildung
AI	<b>A</b> rtifizielle Insemination
APS	<b>A</b> denosin-5'- <b>p</b> hosphosulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	<b>A</b> ssistierte <b>R</b> eproduktion
ART	<b>A</b> ssistierte <b>R</b> eproduktionstechniken
AS	<b>A</b> ngelman- <b>S</b> yndrom
ATP	<b>A</b> denosin <b>t</b> ri <b>p</b> hosphat (Kurzform von dATP)
<i>b</i>	<i><b>b</b>ovin</i> (lat. Rind-/ Rinder-)
BLAST	<b>B</b> asic <b>L</b> ocal <b>A</b> lignment <b>S</b> earch <b>T</b> ools
bp	<b>B</b> asen <b>p</b> aar(e)
BSA	<b>B</b> ovines <b>S</b> erum- <b>A</b> lbumin
BSA-FAF	essentially <b>f</b> atty <b>a</b> cid- <b>f</b> ree BSA
BTA	<i><b>B</b>os <b>t</b>aurus</i>
BWS	<b>B</b> eckwith- <b>W</b> iedmann- <b>S</b> yndrom
bzw.	<b>b</b> eziehungs <b>w</b> eise
C	<b>C</b> ytosin (DNA-Base)
ca.	<b>c</b> irca (etwa, ungefähr)
cDNA	<b>c</b> omplementary <b>D</b> N <b>A</b>
CpG	<b>C</b> ytosin- <b>P</b> hospho- <b>G</b> uanin-Dinukleotid
CTCF	CCCTC-binding factor
dATP	<b>D</b> esoxyadenosin <b>t</b> ri <b>p</b> hosphat
dATP $\alpha$ S	<b>D</b> esoxyadenosinalfathiotriphosphat
dCTP	<b>D</b> esoxycytidin <b>t</b> ri <b>p</b> hosphat
dGTP	<b>D</b> esoxyguanosin <b>t</b> ri <b>p</b> hosphat
d.h.	<b>d</b> as <b>h</b> eißt
DMD	<b>d</b> ifferenziell <b>m</b> ethylierte <b>D</b> omäne (engl. <i><b>d</b>ifferentially <b>m</b>ethylated <b>d</b>omain</i> )
DMR	<b>d</b> ifferenziell <b>m</b> ethylierte <b>R</b> egion

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	<b>D</b> esoxyribonukleosid <b>t</b> riphosphat
dTTP	<b>D</b> esoxythymidin <b>t</b> riphosphat
dpc	<b>d</b> ays <b>p</b> ost <b>c</b> onception
EDTA	<b>E</b> thylendiamintetraacetat
engl.	<b>e</b> nglisch
ET	<b>E</b> mbryo <b>t</b> ransfer
<i>et al.</i>	<i><b>e</b>t <b>a</b>lii</i> (lat. und andere, weitere)
FLI	<b>F</b> riedrich-Löffler-Institut für Nutztiergenetik (Mariensee)
FSH	<b>F</b> ollikelstimulierendes <b>H</b> ormon
G	<b>G</b> uanin (DNA-Base)
GV	<b>G</b> erminales <b>V</b> esikel
GVBD	<b>G</b> erminal <b>v</b> esicle <b>b</b> reak <b>d</b> own
h	Stunde(n)
HRM	<b>H</b> igh <b>R</b> esolution <b>M</b> elting
HSA	<i><b>H</b>omo <b>s</b>apiens</i>
IC1	Imprinting <b>C</b> enter <b>1</b> (hier der geprägten Gene <i>H19</i> und <i>IGF2</i> )
ICE	imprinting control <b>e</b> lement
ICM	inner <b>c</b> ell <b>m</b> ass
ICR	Imprinting-Kontroll-Region (engl. <i>Imprinting <b>C</b>ontrol <b>R</b>egion</i> )
ICSI	Intrazytoplasmatische <b>S</b> permieninjektion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1- <b>t</b> hiogalactopyranosid
IU	international <b>U</b> nits
IVC	<i>in <b>v</b>itro</i> culture
IVF	<i>in <b>v</b>itro</i> -Fertiliation
IVM	<i>in <b>v</b>itro</i> - <b>M</b> aturation
IVP	<i>in <b>v</b>itro</i> - <b>P</b> roduktion
Kap.	<b>K</b> apitel
KOK	<b>K</b> umulus- <b>O</b> ozyten- <b>K</b> omplex
lat.	<b>l</b> ateinisch
LD	<b>L</b> imiting <b>D</b> ilution
LH	<b>L</b> uteinisierendes <b>H</b> ormon
LOS	<b>L</b> arge <b>O</b> ffspring <b>S</b> yndrome

---

MII	<b>M</b> etaphase <b>I</b> I
MAS	<b>m</b> arker- <b>a</b> ssisted <b>s</b> election
MCS	<b>M</b> ulti- <b>C</b> loning <b>S</b> ite
MET	engl. <i><b>m</b>aternal to <b>e</b>mbryo <b>t</b>ransition</i>
MP	<b>M</b> ultiplex
mSOF	<b>m</b> odifiziertes <b>s</b> ynthetisches <b>O</b> vidukt <b>f</b> luid
MS-PCR	<b>m</b> ethylierunssensitive PCR
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
OHSS	<b>o</b> varielles <b>H</b> yper <b>s</b> timulationssyndrom
OPU	ultrasound guided <b>o</b> vum <b>p</b> ick <b>u</b> p (transvaginale Follikelpunktion)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i><b>p</b>hosphate <b>b</b>uffered <b>s</b>aline</i> )
PCOS	<b>P</b> olyzystisches <b>O</b> varialsyndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i><b>p</b>olymerase <b>c</b>hain <b>r</b>eaction</i> )
PGC	primordiale Keimzelle (engl. <i><b>p</b>rimordial <b>g</b>erm <b>c</b>ell</i> )
PMSG	<b>P</b> regnant <b>m</b> are <b>s</b> erum <b>g</b> onadotropin
PPi	Pyrophosphat
PWS	<b>P</b> rader- <b>W</b> illi- <b>S</b> yndrom
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i><b>r</b>ibonucleic <b>a</b>cid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffradikale (engl. <i><b>r</b>eactive <b>o</b>xigen <b>s</b>pecies</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i><b>r</b>evolutions <b>p</b>er <b>m</b>inute</i> )
RRBS	<b>R</b> educed <b>R</b> epresentation <b>B</b> isulfite <b>S</b> equencing
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
s.	siehe
SCNT	<b>s</b> omatic <b>c</b> ell <b>n</b> uclear <b>t</b> ransfer
SNP	<b>S</b> ingle <b>N</b> ucleotide <b>P</b> olymorphism
SP	<b>S</b> ingle <b>p</b> lex
SRS	<b>S</b> ilver- <b>R</b> ussell- <b>S</b> yndrom
s.u.	siehe unten
T	<b>T</b> hymine (DNA-Base)
Tab.	<b>T</b> abelle
Taq	<i><b>T</b>hermus <b>a</b>quaticus</i>
TCM	<b>T</b> issue <b>C</b> ulture <b>M</b> edium
TRIS	<b>T</b> rihydroxymethylaminomethan



TSS	<b>T</b> ranskriptions <b>s</b> tart <b>s</b> telle
u.a.	<b>u</b> nd <b>a</b> ndere/ <b>u</b> nter <b>a</b> nderem
ÜNK	<b>Ü</b> bernacht <b>k</b> ultur
UPD	<b>U</b> niparentale <b>D</b> isomie
vgl.	<b>v</b> er <b>g</b> leiche
z.B.	<b>z</b> um <b>B</b> eispiel

## 6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Regulation und Struktur der <i>Igf2/H19</i> -ICR. ....	20
Abb. 1.2: Schema des geprägten PWS-/AS-Genlocus auf dem humanen Chromosom 15q11-q13 .....	23
Abb. 1.3: Schema des geprägten BWS-/SRS-Genlocus auf dem humanen Chromosom 11p15.5.....	24
Abb. 1.4: Exemplarische Darstellung der Änderungen der DNA-Methylierung im Laufe der epigenetischen Reprogrammierung in der Keimzellentwicklung der Maus.....	28
Abb. 1.5: Humane Follikulogenese.....	37
Abb. 1.6: Follikulogenese beim Rind. ....	39
Abb. 1.7: Flussdiagramm des dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsaufbaus.....	50
Abb. 2.1: Präparation boviner Eizellen.....	53
Abb. 2.2: Morphologie der Kumulus-Eizell-Komplexe vor und nach IVM. ....	54
Abb. 2.3: Konvertierung der Basensequenz durch Natriumbisulfitbehandlung.....	63
Abb. 2.4: Chemische Reaktion der Natriumbisulfit-Konvertierung der DNA.....	64
Abb. 2.5: Prinzip der Pyrosequenzierung.....	69
Abb. 2.6: Beispielpyrogramme unterschiedlich methylierter DNA. ....	70
Abb. 2.7: Vektorkarte und Sequenz-Referenzpunkte des pGEM <sup>®</sup> -T-Vektors.....	73
Abb. 2.8: Prinzip der Limiting Dilution am Beispiel des Gensets 1. ....	79
Abb. 3.1: Struktur der humanen <i>Igf2/H19</i> -ICR. ....	91
Abb. 3.2: Exemplarische Darstellung der Sequenzkonservierung der intergenischen <i>IGF2/H19</i> -DMR zwischen Mensch, Maus und Rind. ....	92
Abb. 3.3: Identifizierung der bovinen <i>IGF2/H19</i> -ICR. ....	94
Abb. 3.4: Methylierungsstatus der identifizierten bovinen intergenischen <i>IGF2/H19</i> -ICR.....	95

Abb. 3.5: Sequenzbeispiele für LD-Produkte mit mindestens zwei Allelen.....	98
Abb. 3.6: Methylierungsmuster der <i>IGF2/H19</i> -ICR von ungereiften, <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -gereiften Oozyten.....	102
Abb. 3.7: Methylierungsmuster der <i>SNRPN</i> -DMR von ungereiften, <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -gereiften Oozyten.....	103
Abb. 3.8: Methylierungsmuster der <i>PEG3</i> -DMR von ungereiften, <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -gereiften Oozyten.....	104
Abb. 3.9: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des <i>SLC2A1</i> -Promotors. ....	109
Abb. 3.10: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des <i>PRDX1</i> -Promotors. ....	110
Abb. 3.11: Lollipop-Diagramm der Methylierungsmuster des <i>ZAR1</i> -Promotors.....	111
Abb. 4.1: Relative Poly(A) <sup>+</sup> -mRNA-Gehalte von 11 entwicklungsrelevanten Genen in bovinen Eizellen.....	120
Abb. 4.2: Relativer mRNA-Gehalt maternalen, nicht geprägter Transkripte in ungereiften und <i>in vitro</i> -gereiften Oozyten präpuberaler und adulter Tiere.....	129

### 6.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Überblick über das experimentelle Design und die Versuchsgruppen zur hormonellen Stimulation präpuberaler und adulter Follikel.....	56
Tab. 2.2: Überblick über die verwendeten Methoden zur Bisulfitsequenzierung.....	67
Tab. 2.3: Sequenzen und chromosomale Lokalisation der Bisulfitprimer zur Charakterisierung boviner geprägter Regionen. ....	83
Tab. 2.4: PCR-Programme zur Charakterisierung geprägter Regionen beim Rind. ....	84
Tab. 2.5: Bisulfitprimersequenzen und chromosomale Lokalisation des Limiting-Dilution-Gensets 1.....	85
Tab. 2.6: PCR-Programme der Limiting Dilution mit Genset 1. ....	86
Tab. 2.7: Bisulfitprimersequenzen und chromosomale Lokalisation des Limiting-Dilution-Gensets 2.....	87
Tab. 2.8: PCR-Programme der Limiting Dilution mit Genset 2. ....	87
Tab. 3.1: Methylierungslevel der <i>IGF2/H19</i> -, <i>SNRPN</i> - und <i>PEG3</i> -DMRs in verschiedenen bovinen Geweben, ermittelt durch Pyrosequenzierung.....	97
Tab. 3.2: Übersicht über die Anzahl der durch Limiting Dilution erhaltenen Allele (Genset 1). ....	100

Tab. 3.3: Imprintingmutationen in den geprägten Genen *IGF2/H19*, *SNRPN* und *PEG3* nach IVM boviner Oozyten. .... 105

Tab. 3.4: Vergleich der Anzahl der einzelnen CpG-Fehler zwischen den Versuchsgruppen (Genset 1). .... 105

Tab. 3.5: Übersicht über die Anzahl der durch Limiting Dilution erhaltenen Allele (Genset 2). .... 107

Tab. 3.6: Vergleich der Anzahl der einzelnen CpG-Fehler zwischen den sechs Versuchsgruppen (Genset 2). .... 108

## 7. CURRICULUM VITAE

Name: Tamara Jennifer Mercedes Schneider  
Geburtsname: Hansmann  
geboren: 14.09.1982 in München  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulausbildung:

1989 – 1993: Gabelsberger Grundschule in Nürnberg  
1993 – 1994: Martin-Behaim-Gymnasium in Nürnberg  
1994 – 2002: Reichsstadt-Gymnasium Rothenburg ob der Tauber  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium und Promotion:

10/2002 - 09/2008: Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Abschluss: Diplom-Biologe  
Hauptfach: Biotechnologie  
Nebenfächer: Humangenetik, Pharmazeutische Biologie  
05/2006: Nominierung für das europäische Austauschprogramm "Erasmus"  
09/2006 – 02/2007: Auslands-Aufenthalt in Toulouse/Frankreich:  
Praktikum zum Erlernen des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor der Arbeitsgruppe für Biophysik und Biotechnologie der Proteine von Prof. Dr. Didier Fournier am "Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale" des CNRS (Centre national de la Recherche scientifique), Toulouse: Enzymkinetische Untersuchungen der Acetylcholinesterase verschiedener Spezies.  
11/2007 - 09/2008: Diplomarbeit: "Zytogenetischer Vergleich des Triels mit fünf Vogelarten durch Zoo-FISH" am Institut für Humangenetik  
11/2008-06/2012: Promotion am Institut für Humangenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2008 – 2009) und Fortführung der Arbeit am Institut für Humangenetik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2009 – 2012).

- 6/2012-11/2013: Mutterschutz und Elternzeit
- 12/2012: Eheschließung und Annahme des Nachnamens Schneider
- 11/2013-heute: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik,  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Haaf

## 8. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

### 8.1. Publikationen

**Kinetic insight into the mechanism of cholinesterase inhibition by aflatoxin B1 to develop biosensors.**

Hansmann T, Sanson B, Stojan J, Weik M, Marty JL, Fournier D.

Biosens Bioelectron. 2009 Mar 15;24(7):2119-24. Epub 2008 Nov 18.

**Cross-species chromosome painting corroborates microchromosome fusion during karyotype evolution of birds.**

Hansmann T, Nanda I, Volobouev V, Yang F, Scharl M, Haaf T, Schmid M.

Cytogenet Genome Res. 2009;126(3):281-304. Epub 2010 Jan 6.

**Characterization of differentially methylated regions in 3 bovine imprinted genes: a model for studying human germ-cell and embryo development.**

Hansmann T, Heinzmann J, Wrenzycki C, Zechner U, Niemann H, Haaf T.

Cytogenet Genome Res. 2011;132(4):239-47. Epub 2010 Dec 16.

**Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes.**

Heinzmann J, Hansmann T, Herrmann D, Wrenzycki C, Zechner U, Haaf T, Niemann H.

Mol Reprod Dev. 2011 Mar;78(3):188-201. doi: 10.1002/mrd.21281. Epub 2011 Feb 2.

**Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes.**

El Hajj N, Trapphoff T, Linke M, May A, Hansmann T, Kuhtz J, Reifenberg K, Heinzmann J, Niemann H, Daser A, Eichenlaub-Ritter U, Zechner U, Haaf T.

Epigenetics. 2011 Oct 1;6(10):1176-88. Epub 2011 Oct 1.

**Monozygotic twins discordant for constitutive BRCA1 promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer.**

Galetzka D, Hansmann T, El Hajj N, Weis E, Irmischer B, Ludwig M, Schneider-Raetzke B, Kohlschmidt N, Beyer V, Bartsch O, Zechner U, Spix C, Haaf T.

Epigenetics. 2012 Jan 1;7(1):47-54. doi: 10.4161/epi.7.1.18814. Epub 2012 Jan 1

**DNA methylation and mRNA expression profiles in bovine oocytes derived from prepubertal and adult donors.**

Diederich M, Hansmann T, Heinzmann J, Barg-Kues B, Herrmann D, Aldag P, Baulain U, Reinhard R, Kues W, Weißgerber C, Haaf T, Niemann H.

Reproduction. 2012 Sep;144(3):319-30. doi: 10.1530/REP-12-0134. Epub 2012 Jun 25.

**Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast.**

Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, Kroll P, Endt D, Gehrig A, Preisler-Adams S, Wieacker P, Haaf T.

Hum Mol Genet. 2012 Nov 1;21(21):4669-79. doi: 10.1093/hmg/dds308. Epub 2012 Jul 27.

**Methylation analysis of the promoter region and intron 1 of the factor VIII gene in haemophilia A patients.**

Zimmermann MA, Hansmann T, Haaf T, Oldenburg J, Müller CR, Rost S.

Hamostaseologie. 2013;33 Suppl 1:S46-9.

## **8.2. Kongressbeiträge**

**Epigenetic Analysis of Developmentally Important Genes in Bovine Oocytes of Different Origins.** Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner C, Haaf T, Niemann H. 36th Annual Conference of Embryo Transfer (IETS), Córdoba, Argentina (2010).

**Identification and characterization of differentially methylated regions in three bovine imprinted genes.** Hansmann T, Zechner U, Heinzmann J, Nieman H, Haaf T. 21st Conference of the German Society of Human Genetics, Hamburg, Germany (2010).

**Epigenetic analysis of imprinting in the bovine oocyte.** (Poster 7a) Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner U, Haaf T, Niemann H: 1st German DFG Reproductive Science Network Meeting, Giessen, Germany (2010).

**Epigenetic analysis of imprinting in the bovine oocyte.** (Poster 7b) Hansmann T, Heinzmann J, Zechner U, Wrenzycki C, Niemann H, Haaf T. 1st German DFG Reproductive Science Network Meeting, Giessen, Germany (2010).

**Epigenetische Analyse geprägter Gene in bovinen Eizellen unterschiedlichen Ursprungs.** Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner U, Haaf T, Niemann H. 37. Jahrestagung der AETd, Bonn, Germany (2010).

**Einfluss verschiedener Reifungsbedingungen auf Methylierung und Genexpression in bovinen Eizellen.** Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner C, Haaf T, Niemann H. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e.V. (GfT), Kiel, Germany (2010).

**Influence of *in vitro* maturation on epigenetic marks and gene expression in bovine oocytes.** Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner C, Haaf T, Niemann H. 37th Annual Conference of Embryo Transfer (IETS), Orlando, Florida, USA (2011).

**Screening of childhood cancer and familial breast cancer patients for constitutional epimutations in tumor suppressor genes reveals a constitutional BRCA1 epimutation in a discordant monozygotic twin with childhood cancer.** Hansmann, T, El Hajj N, Weis E, Ludwig M, Kroll P, Gehrig A, Kohlschmidt N, Schneider-Rätzke B, Spix C, Galetzka D, Haaf T. 22nd Conference of the German Society of Human Genetics, Regensburg, Germany (2011).

**Epigenetische Untersuchung ungereifter und gereifter Oozyten präpuberaler und adulter boviner Tiere.** Diederich M, Hansmann T, Kues WA, Barg-Kues B, Herrmann D, Haaf T, Reinhardt R, Niemann H. 38. Jahrestagung der AETd, Landwirtschaftszentrum Haus Riswick, Kleve, Germany (2011).

**Einfluss verschiedener Reifungsbedingungen auf Methylierung und Genexpression in bovinen Eizellen.** Heinzmann J, Hansmann T, Wrenzycki C, Zechner U, Haaf T, Niemann H. 38. Jahrestagung der AET-d, Kleve, Germany (2011).