

Abschließender Sachbericht

Paternale epigenetische Effekte: Besitzen Spermien ein epigenetisches Gedächtnis?

ausführende Stelle: Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung

Aktenzeichen: SAW-2011-IZW-2

Förderzeitraum: 01.05.2011- 31.5.2014

Ansprechpartner: Prof. Katarina Jewgenow

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung des Projektes	1
Entwicklung der durchgeführten Arbeiten.....	1
Methodenentwicklungen im Projekt:.....	1
Abweichungen vom ursprünglichen Konzept.....	2
Darstellung der erreichten Ergebnisse	3
Arbeitspaket 1: Experimentelle Tierhaltung, reproduktionsbiologische und verhaltens-ökologische Untersuchungen am Wildmeerschweinchen	3
Arbeitspaket 2: Embryonale Genaktivierung	6
Arbeitspaket 3: Methylomanalyse	9
Beiträge von Kooperationspartnern	13
Qualifikationsarbeiten	13
Liste der Publikationen aus diesem Vorhaben:.....	14
in Vorbereitung:	14
Liste der Pressemitteilungen und Medienberichte	15

Executive summary:

Epigenetic inheritance of adapted traits or “experiences” to the next generation is fundamental for long term adaptational memory to changing environmental condition and is most likely not restricted to maternal transmission. In this study, we aimed to investigate whether changes of environmental conditions cause an epigenetic programming not only in father animals but also in their male offspring. To study these so-called paternal effects of exogenous factors on a molecular level, we applied moderate heat treatment and reduction of nutritional compounds during spermatogenesis and used assisted reproduction methods to identify changes in DNA methylation and gene expression of the offspring. To identify basic mechanisms of paternal epigenetic inheritance in a natural setting, we chose a genetically heterogeneous species rather than inbred strains or cell cultures.

In our study we confirmed our hypothesis on paternal epigenetic effects. We showed that the paternal epigenetic pattern (DNA methylation) of the Wild guinea pig was modified after both treatments, heat exposure and low protein diet; both in fathers and sons, indicating immediate *and* inherited epigenetic modifications. Differences in the gene activity (transcription) to changing environmental conditions could be shown for selected genes in tissue samples from naïve sons sired by exposed fathers. Further analyses are ongoing. Embryonic gene expression was independent of treatment but determined by sire (paternal effect). Cryopreservation of sperm cells caused changes in gene expression in *in-vitro* produced embryos. The developmental impact on the offspring remains still unclear.

To our best knowledge this is the biggest study on epigenetic adaptations in a wild, genetically heterogeneous mammal and the first study on epigenetic effects after exposure to increased ambient temperatures. In context with other newly published studies on paternal epigenetic transmission our results confirm the transgenerational inheritance through the male germ line as an adaptive response to changing environmental conditions, in addition to the maternal response.

The results of the project were so far published in nine “peer reviewed” publications, three more are submitted or in preparation. Different aspects of the study were presented at national and international conferences, either in talks or posters. Till now, 6 qualifying theses have been successfully defended: one dissertation, three master theses and two bachelor thesis.

Executive summary (deutsch):

Epigenetische Vererbung als Grundlage für die Anpassungsfähigkeit auf veränderte Umweltbedingungen ist sehr wahrscheinlich nicht nur auf maternale Effekte beschränkt, sondern lässt einen äquivalenten Mechanismus auch auf paternalen Seite vermuten. Im Projekt sollte daher untersucht werden, ob drastische Veränderungen der Umweltbedingungen bei Vätertieren eine epigenetische Manifestierung in den Nachkommen bewirkt. Es sollte untersucht werden, ob exogene, während der Spermatogenese einwirkende Faktoren, wie Hitzebehandlung/ Temperaturerhöhung oder Reduktion von Nahrungskomponenten, oder die Manipulationen von Spermien unmittelbar vor der Befruchtung durch Maßnahmen der assistierten Reproduktion eine Veränderung der DNA-Methylierung und Genexpression in den Nachkommen bewirken. Um nach grundlegenden Mechanismen der paternalen Vererbung unter natürlichen Bedingungen zu suchen, bevorzugten wir für unsere Untersuchung eine genetisch heterogene Wildtierart im Gegensatz zu isogenen Inzuchtstämmen oder Zellkulturen.

In dieser Studie bestätigen wir unsere Ausgangshypothese. Wir zeigen, dass das väterliche Methylohm des wilden Meerschweinchens (WMS) sowohl nach Temperaturerhöhung als auch nach Nahrungsveränderungen epigenetische Anpassungsprozesse (DNA-Methylierung) durchläuft, die zudem an die Nachkommen weitergegeben werden. Veränderungen der Genaktivität (Transkription) als Reaktion auf veränderte Umweltfaktoren, denen die Väter ausgesetzt waren, konnten bisher für ausgewählte Gene nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen folgen. Im Embryo zeigt die Gen-Expression selektierter Gene eine Abhängigkeit vom jeweiligen Vater, nicht aber von den untersuchten Umweltfaktoren. Die Gefrierkonservierung von Sperma resultiert in einer veränderten Expression ausgewählter Gene in-vitro produzierter Embryonen. Die Auswirkungen auf erzeugte Nachkommen sind noch ungeklärt.

Dies ist die bisher größte Studie, die epigenetische Anpassungsfähigkeit in einem wilden, genetisch heterogenen Säugetier untersucht, sowie die erste Untersuchung an einem Säugetier zur epigenetischen Anpassung an erhöhte Temperaturen. Unsere Ergebnisse zeigen im Kontext neuerer internationaler Studien, dass neben der maternalen epigenetischen Vererbung auch der transgenerative paternale epigenetische Vererbungsweg für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen relevant ist.

Im Rahmen des Projektes wurden bisher 9 „peer reviewed“ Publikationen veröffentlicht, drei weitere sind eingereicht oder in Vorbereitung. Die verschiedenen Aspekte des Projektes wurden auf nationalen und internationalen Kongressen als Poster oder Vortrag vorgestellt. Bisher wurden eine Dissertation, drei Masterarbeiten und zwei Bachelorarbeiten in Rahmen des Projektes angefertigt.

Abschließender Arbeits- und Ergebnisbericht

Zielsetzung des Projektes

Epigenetische Vererbung als Grundlage für die Fähigkeit auf veränderte Umweltbedingungen reagieren zu können, ist sehr wahrscheinlich nicht nur auf maternale Effekte beschränkt, sondern lässt einen äquivalenten Mechanismus auch bei männlichen Keimzellen vermuten. Im Projekt sollte daher untersucht werden, ob drastische Veränderungen der Umweltbedingungen bei Vartieren eine veränderte epigenetische Programmierung in den Nachkommen bewirken. Es sollte untersucht werden, ob exogene, während der Spermatogenese auf die Väter einwirkende Einflüsse wie Temperaturerhöhung oder Reduktion von Nahrungskomponenten oder die Manipulationen von Spermien unmittelbar vor der Befruchtung durch Maßnahmen der assistierten Reproduktion eine Veränderung der Genexpression in den Nachkommen bewirken.

Zum Nachweis dieses Einflusses sollte die Genaktivierung während der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden (Transkriptomanalyse) und eine Methylomanalyse in den Keimdrüsen (Hoden), Keimzellen (Spermienzellen) und somatischen Zellen (z. B. Leber) der Vartiere und der männlichen Nachkommen durchgeführt werden. Die Untersuchungen erfolgten an Wildmeerschweinchen (WMS), um generelle (und nicht nur auf einen Zuchtstamm beschränkte) Aussagen zu erzielen.

Entwicklung der durchgeführten Arbeiten

Die durchgeführten Arbeiten wurden überwiegend entsprechend des Arbeitsplans erfüllt, wobei die ersten zwei Projektjahre insbesondere dem experimentellen Aufbau, der Methodenentwicklung, der Exposition der Vartiere und der Probensammlung dienten. Im finalen Projektjahr wurden dann die molekularen Untersuchungen zur Genexpression in den Embryonen sowie die Methylomanalysen verschiedener Gewebe durchgeführt.

Methodenentwicklungen im Projekt:

Die experimentelle Tierhaltung von WMS sowie das Monitoring des Paarungsverhaltens bedingte die Etablierung eines permanenten Kamerasystems zur Videoüberwachung der Tiere. Hier wurden mit Erfolg Infrarot-Rückfahrkameras aus dem Automobilbereich eingesetzt.



Abbildung 1:
Permanente
Kamerabeobachtung
der WMS in zwei
Gehegen (A, C und B,
D), A+B Außengehege
und C+D Innengehege,
mit Verpaarung in Käfig
C (Pfeil)

Es ist gelungen, Methoden zur wiederholten Bioptisgewinnung von Hoden- und Lebergewebe am lebenden Tier und ein dafür geeignetes Narkoseregime zu etablieren. Ausfall- und Komplikationsrate der chirurgischen Eingriffe lag bei erfreulichen 0%.

Weiterhin wurde ein Protokoll zur zeitgerechten Embryonenspülung beim WMS etabliert, dieses war die Grundlage für die Untersuchung der Genexpression in präimplantativen Embryonen.

Zudem wurde die DNA-Isolierung aus allen Gewebetypen optimiert und standardisiert. Hierbei stellte die Isolierung von DNA aus Spermien eine besondere Herausforderung dar. Das innerhalb des Projektes erarbeitete Protokoll wurde bei Current Protocols of Molecular Biology (Weyrich, 2012) publiziert. Wegen des extrem schwankenden Ausbeuteerfolges konnte leider keine stabile Spermienengewinnung bei den WMS realisiert werden, so dass die DNA-Isolierung aus Spermien für Methylomanalysen im weiteren Projektverlauf nicht zur Anwendung kam. Für Folgeprojekte und zur vollständigen Nutzung der verwendeten Tiere wurden Präparationen von Gehirnanalen erlernt, etabliert und standardisiert durchgeführt.

Im Rahmen des Projektes erfolgte die Genom-Sequenzierung der WMS. Die Sequenz ist nun auf der öffentlichen Datenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) zugänglich. Im Zuge dessen wurde zudem die nativen Methylome von Leber- und Hodenzellen mittels methylierte DNA-bindender Proteine (MBD) und Antikörper (MeDIP) angereichert und anschließend sequenziert. Außerdem wurde eine neue, einzelbasenspezifische Methylierungsergebnisse liefernde Methode zur Methylomuntersuchung (MethylDNA-Enriched-Bisulfite-Sequencing, MEBS) entwickelt und publiziert (Weyrich et al., 2014).

Für die Auswertung sowohl der Meerschweinchen-Genom-Daten als auch für die Analyse der Methylomdaten wurden eigene (in-house) bioinformatische Auswertepipelines entwickelt. Das Arbeiten mit Nicht-Modellorganismen stellt eine bioinformatische Herausforderung dar, weil in den öffentlich zugänglichen Datenbanken keine oder unvollständige Informationen zur Verfügung stehen. Wir entwickelten eine Pipeline, um die benötigte Referenzsequenz für *Cavia aperea* zu erstellen. Hierzu wurden die Sequenzen von *Cavia aperea* gegen *Cavia porcellus* gemappt. Für die weitere Auswertung benötigten Gen-Annotationen und Gen Ontology Begriffe (GO-Terms) konnten von *Cavia porcellus* übernommen und an die *C. aperea*-Sequenz angepasst werden, und wurden zudem um CpG Inseln und Promotor-Annotation erweitert.

Auch die Pipelines für die Auswertung einzelner methylierter/ nicht-methylierter Cytosin-Positionen waren nicht standardisiert und wurden im Detail erarbeitet und erfolgreich für die weiteren Analysen formatiert. Für die Filterung einzelner CpG-Positionen und differenziell methylierter Regionen (DMRs) war es erforderlich, Skripte in Python und Perl zu programmieren. Die so gefundenen Positionen und Bereiche wurden um ihre biologische Funktion (CpG-Inseln, Gen-Annotation, GO Terms) ergänzt und mit R visualisiert.

Abweichungen vom ursprünglichen Konzept

Abweichend vom ursprünglichen Konzept wurden zwei größere Änderungen vorgenommen. Zum einen ist es uns nicht gelungen, von den Vatertieren ausreichend Spermia durch Elektroejakulation zu gewinnen. Daher war der geplante Versuch zum Einfluss der Gefrierkonservierung auf die frühembryonale Genexpression im WMS-Modell nicht durchführbar. Zwar wurde die IVM-IVF und Spermiegefrierkonservierung am Hausmeerschweinchen erprobt, letztendlich konnten jedoch keine Versuche bei den WMS durchgeführt werden.

Die zweite größere Abweichung betrifft die Auswahl der Methode für die Methylomanalyse. Im Antrag hatten wir eine Mikro-Array-Methylomanalyse vorgesehen, da eine Genomsequenzierung zum Zeitpunkt der Antragstellung nicht finanzierbar schien. Durch die

Preisentwicklung für Sequenzierungen während der letzten Jahre konnten jedoch modernste Sequenzieretechniken (Next Generation Sequencing; NGS) verwendet werden. Gegenüber der Mikroarray-Analyse ist die Sequenzierung nicht nur spezifischer und schneller, sondern auch deutlich anwenderfreundlicher. Einzig der Aufwand an bioinformatischer Datenbearbeitung ist drastisch gestiegen, so dass die Einbeziehung von wissenschaftlichen Hilfskräften notwendig wurde.

Weiterhin sind diverse Untersuchungen zur Lebensgeschichte und Reproduktion, sowie zur Ernährungsphysiologie von WMS unter dem Einfluss von Umweltveränderungen ins Arbeitsprogramm aufgenommen worden, die ursprünglich nicht erwähnt wurden, aber im Kontext der Untersuchungen Sinn machen. Die naturnahe Haltung und erfolgreiche Fortpflanzung der WMS bot die Möglichkeit für diese Studien, ohne dass den Tieren ein zusätzlicher Stress entstanden ist.

Darstellung der erreichten Ergebnisse

Arbeitspaket 1: Experimentelle Tierhaltung, reproduktionsbiologische und verhaltensökologische Untersuchungen am Wildmeerschweinchen

Für die Durchführung des Projektes wurde eine naturnahe Haltung in der Feldforschungsstation des IZW etabliert. Insgesamt wurden dort 15 männliche und 20 weibliche Tiere über den Versuchszeitraum von 3 Jahren gehalten. Diese besondere indoor/outdoor-Haltung der Tiere wurde genutzt, um den Einfluss der Haltung auf das Wohlbefinden zu untersuchen. Vergleichend wurden Daten aus einer alternativen Haltung in Bielefeld herangezogen (siehe Schumann et al., 2014a). Es konnte gezeigt werden, dass allein ein Zugang zu Außengehegen höhere Körpergewichte und niedrigere Blutcortisolwerte in den Versuchstieren zur Folge hatte. Mit dieser Haltung sollten negative physiologische und metabolische Konsequenzen ausgeschlossen werden, aber auch ethische Aspekte einer oft versuchsbedingten ausschließlichen Innenhaltung bei experimentellen Arbeiten (insbesondere bei Wildtieren) berücksichtigt werden.

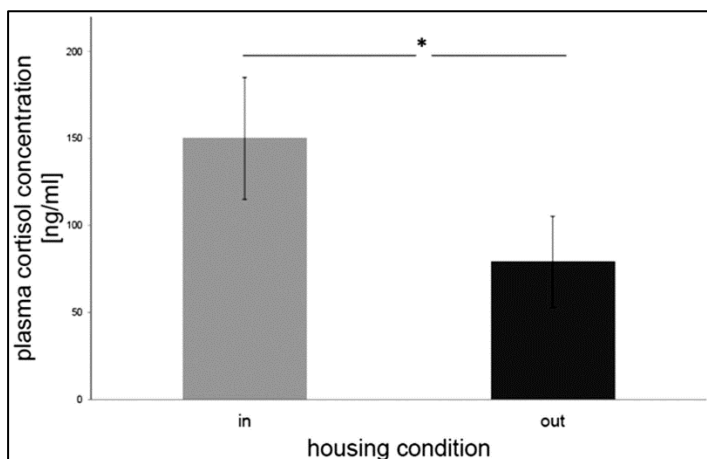


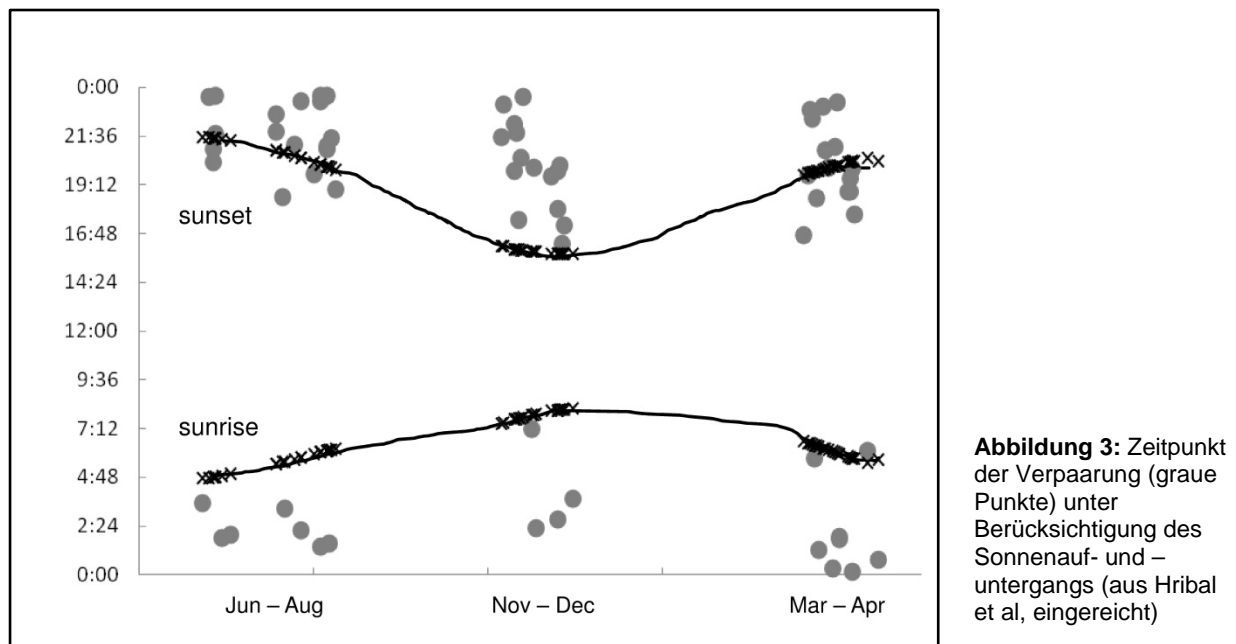
Abbildung 2: Mittlere Cortisolkonzentrationen im Blutplasma von männlichen WMS, die unter unterschiedlichen Bedingungen gehalten wurden. (aus: Schumann et al. 2014a)

Im ersten Jahr wurde die tierärztliche Intervention für die Biopsieentnahme von Leber und Hodengewebe erfolgreich etabliert. Wie bereits erwähnt, ist es nicht gelungen, Spermien in ausreichenden Quantitäten von den WMS zu gewinnen, obwohl für Hausmeerschweinchen etablierte Verfahren der Elektroejakulation zum Einsatz kamen. Erschwerend kam hinzu, dass sich Sperma von Meerschweinchen sehr schlecht einfrieren lässt. Bei Versuchen mit Nebenhodensperma von Hausmeerschweinchen konnte zwar eine Verbesserung der

Auftausergebnisse erzielt werden, jedoch waren die Raten nicht ausreichend für die geringe Menge des durch Elektroejakulation gewonnenen Spermias, welches für eine Besamung eingesetzt werden sollte.

Daher wurde der Versuchsteil zur Genexpression nach Gefrierkonservierung alternativ an Katzensperma durchgeführt und die frühembryonale Genexpression in In-vitro-gezeugten Embryonen untersucht.

Wie im Projektantrag vorgesehen, wurden die männlichen Meerschweinchen nacheinander den beiden Umwelteinflüssen (Proteinmangeldiät sowie Hitze) ausgesetzt und vor und nach der Behandlung beprobt. Letzteres wurde durch minimal-invasive Entnahme von Biopsien aus Leber und Hoden realisiert. Nach einer post-operativen Regenerationszeit wurden die Männchen verpaart und der männliche Nachwuchs ebenfalls für die epigenetischen Analysen beprobt. Der weibliche Nachwuchs wurde nach Erreichen der Geschlechts- und Zuchtreife mit den behandelten Männchen verpaart und die Embryonen konnten für die Genexpressionsanalysen durch Spülung der Uteri gewonnen werden. Dazu war eine genaue Bestimmung des Verpaarungszeitpunktes notwendig (Kamerabeobachtung/Vaginaluntersuchung). Diese Ergebnisse waren Grundlage für eine Analyse des Paarungsverhaltens und die Identifikation von saisonalen und sozialen Einflüssen auf die Reproduktion (Hribal et al., eingereicht).



Nach einer Erholungszeit, in deren Anschluss nochmal Proben von den Versuchsmännchen (Kontrolle) genommen wurden, wurden die Tiere dem jeweils anderen Umwelteinfluss ausgesetzt. Anschließend erfolgte wiederum die Probengewinnung und Verpaarung nach dem oben genannten Schema. Alle zehn Versuchsmännchen wurden kontinuierlich medizinisch überwacht und haben die Operationen, die Einwirkungen der Umwelteinflüsse und weitere Behandlungen ohne Komplikationen überstanden. Für die Gewinnung der Embryonen und die epigenetischen Analysen wurden insgesamt 125 nachgezüchtete Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken beprobt (Tierversuchsantrag V3-2347-35-2011).

Zur Charakterisierung der Embryonalentwicklung beim WMS wurden trächtige Tiere regelmäßig mittels hochauflösendem Ultraschalls untersucht und embryonale Wachstumsparameter erfasst. Des Weiteren wurden im Zeitraum der Einwirkung des

experimentell gesetzten Umwelteinflusses in zweiwöchigem Abstand minimalinvasive Blutabnahmen durchgeführt, um die Auswirkungen des Umwelteinflusses auf die Physiologie der Tiere zu detektieren (Schumann et al., 2014b).

Tabelle 1: Intrauterines Wachstum von WMS Feten, dargestellt anhand des mittleren biparetalen Durchmessers (BPD) \pm SD und Scheitel-Steiß-Länge (SSL) \pm SD. (aus: Schumann et al., 2014b)

Trächtigkeit [Tage]	No. Feten (in Messung für BPD/ SSL berücksichtigt)	BPD \pm SD	SSL \pm SD
10-12	3 (0 / 3)		0.31 \pm 0.1
13-15	24 (0 / 24)		0.41 \pm 0.07
16-18	11 (0 / 11)		0.86 \pm 0.35
19-21	32 (0 / 32)		1.11 \pm 0.23
22-26	38 (19 / 37)	0.77 \pm 0.09	1.77 \pm 0.59
27-29	39 (35 / 27)	0.88 \pm 0.08	2.62 \pm 0.36
30-32	15 (15 / 9)	1.00 \pm 0.11	3.18 \pm 0.45
33-35	29 (29 / 12)	1.18 \pm 0.1	4.0 \pm 0.37
36-38	18 (16 / 6)	1.24 \pm 0.11	4.0 \pm 0.48
39-41	17 (17 / 0)	1.50 \pm 0.08	
42-44	14 (11 / 0)	1.50 \pm 0.09	
45	3 (3 / 0)	1.50 \pm 0.02	

Da die Verpaarungen zu unterschiedlichen Jahreszeiten vorgenommen wurden, konnte retrospektiv anhand der Daten zu Ovulationen, lebenden Nachkommen und Geschlechterverhältnis auch eine Analyse zum saisonalen Investment in die Reproduktion erfolgen (Rübensam et al., 2015).

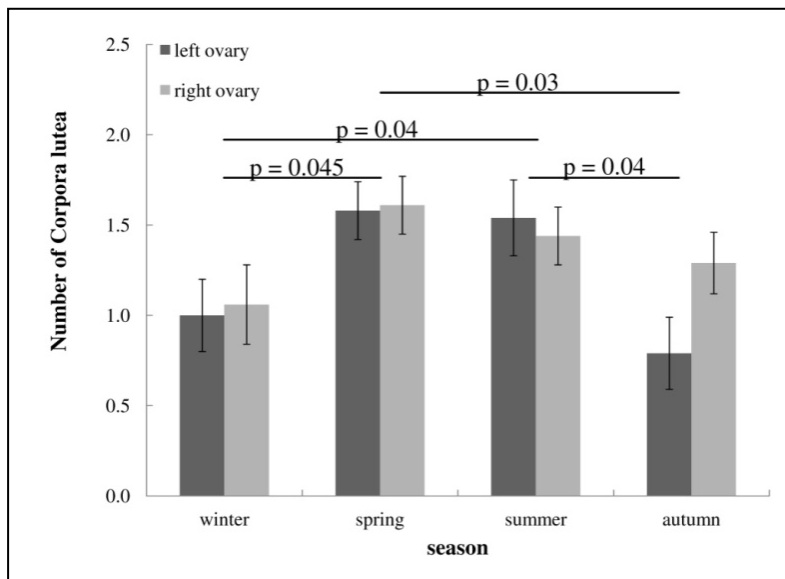


Abbildung 4: Anzahl der Ovulationen pro Eierstock (n Corpora lutea) in Abhängigkeit von der Jahreszeit (aus: Rübensam et al., 2015)

Um das Ausmaß und die Wirksamkeit der auf die männlichen Meerschweinchen einwirkenden Stressoren (Proteinmangel-Diät und Temperaturerhöhung) zu charakterisieren, wurden Verdauungsleistung, Nahrungspräferenz und Ruheumsatz der Tiere erfasst und der Brutto-Energie-Umsatz sowie die Proteinaufnahme bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ermöglichten es, die „Wirksamkeit“ der ausgewählten Umweltfaktoren zu bestätigen und den zeitlichen Verlauf der physiologischen Reaktionen zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die WMS zumindest für den untersuchten Zeitraum sehr gut mit einem Proteinmangel zurechtkommen und bei ihrer Nahrungsaufnahme eher die Energieaufnahme als die Proteinaufnahme regulieren. Es wurden keine Unterschiede im Energieverbrauch gefunden. Auch bei der Einwirkung von Hitze (permanente Umgebungstemperatur von 30°C) konnte keine signifikante Veränderung des Energieumsatzes nachgewiesen werden (MSc-Arbeit, sowie Hille et al. in Vorbereitung).

Zusammenfassung der Ergebnisse in diesem Arbeitspaket:

- signifikanter Einfluss einer Außenhaltung auf Parameter des Wohlbefindens bei WMS (Gewicht, Serumcortisol), Optimierung der Haltungsbedingungen bei Versuchstieren?
- Verbesserung der Gefrierkonservierung von epididymalen Spermien des Hausmeerschweinchens.
- Das Paarungsverhalten der WMS unterliegt stärkeren saisonalen Schwankungen als das des Hausmeerschweinchens.
- Die WMS konnten sich gut an die untersuchten Umwelteinflüsse „Hitze“ und „Ernährung“ anpassen.

Arbeitspaket 2: Embryonale Genaktivierung

Nach der Etablierung der quantitativen PCR für verschiedene Gene beim WMS, denen laut Literatur bei der embryonalen Genaktivierung eine wichtige Funktion zugewiesen wird, wurden alle im Versuch gewonnen Embryonen einer quantitativen Expressionsanalyse unterzogen.

Tabelle 2: Gene, deren Expression im Embryo untersucht wurden, sowie deren Funktion

Genname	Funktion
Octamer binding transcription factor 4 (<i>OCT4</i>)	Aufrechterhalt der Pluripotenz
Gap junction protein alpha 1 (<i>GJA1</i>)	Kommunikation, Kompaktierung
Insulin receptor (<i>INSR</i>)	Glukosestoffwechsel
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (<i>SLC2A1</i>)	Glukosetransporter
Bcl2-associated X protein (<i>BAX</i>)	Apoptoseregulation
B-cell lymphoma protein 2 (<i>BCL2</i>)	Apoptoseregulation
Insulin-like growth factor 2 (<i>IGF2</i>)	stoffwechselregulierend
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (<i>G6PD</i>)	Energiestoffwechsel
DNA-Methyltransferase 3A (<i>DNMT3A</i>)	De novo-DNA-Methyltransferase
sowie die Haushaltsgene	
Beta-Glucuronidase (<i>Gusb</i>)	
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (<i>GAPDH</i>)	
Beta-Actin (<i>Actb</i>)	

Die erzielten Ergebnisse zeigten ausschließlich für den Glukosetransporter *SLC2A1* eine Beziehung zur Vorbehandlung der Vatertiere. Für alle anderen untersuchten Gene (Hribal et al., 2016) war im Embryo kein paternaler epigenetischer Effekt aufgrund der veränderten Umweltfaktoren nachweisbar. Leider war die Menge an mRNA (cDNA) aus den einzelnen Embryonen zu gering, um weitere Gene zu untersuchen, bzw. um eine genomweite Transkriptomanalyse durchzuführen. Hier müssten bei weitem mehr Embryonen (gepoolt) untersucht werden, was im Rahmen des beantragten Tierversuches nicht vorgesehen und letztendlich auch ethisch nicht zu vertreten war.

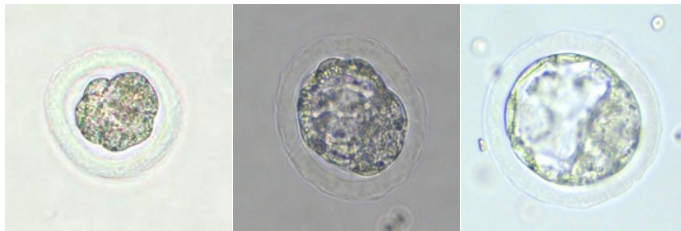


Abbildung 5:
Embryonalstadien des WMS:
kompakte Morula, frühe
Blastozyste und expandierte
Blastozyste (aus Hribal et al.,
eingereicht)

Jedoch erbrachten die Untersuchungen andere interessante Aspekte. Da die Gewinnung der Embryonen in einem Zeitfenster von 117- 135 h nach Verpaarung erfolgte, konnte die embryonale Entwicklung *in vivo* beim WMS genau dargestellt werden, wobei der optimale Zeitpunkt zum Spülen von Blastozysten als bei 123-126 h *post mating* liegend bestimmt wurde.

Interessanterweise war auch die Expression einiger Gene (*Pou5f1*, *Bax*, *Slc2a1*, *Dnmt3a*) hochgradig vom Gewinnungszeitpunkt der Blastozysten abhängig. Die Jahreszeit der Gewinnung veränderte die Expression ebenso wie die Anzahl der Embryonen pro Muttertier. Den größten Einfluss auf die embryonalen Genexpression hatte die Identität der Vatertiere unabhängig von der Behandlung. Somit konnte zwar eine paternale Beeinflussung der embryonalen Genexpression nachgewiesen werden, jedoch war diese nicht, wie in der Ausgangshypothese zum Projekt vermutet, epigenetisch induziert. (Hribal et al., 2016).

Tabelle 3: Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die mRNA- Expression der untersuchten Gene.

	<i>Pou5f1</i>	<i>Bax</i>	<i>Slc2a1</i>	<i>G6pd</i>	<i>Stat3</i>	<i>Dnmt3a</i>
Zeit seit Verpaarung	$\chi^2_{(1)}= 3.4$; $p = 0.042$	$\chi^2_{(1)}= 16.6$ $p < 0.001$	$\chi^2_{(1)}= 5.7$ $p = 0.017$	n.s.	n.s.	$\chi^2_{(1)}= 12.5$ $p < 0.001$
Anzahl „Geschwister“- Embryos	n.s.	n.s.	$\chi^2_{(1)}= 3.2$ $p = 0.075$	n.s.	$\chi^2_{(1)}=5.4$ $p = 0.020$	n.s.
Saison	$\chi^2_{(3)}=2.7$ $p= 0.066$	$\chi^2_{(3)}= 8.1$ $p= 0.023$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Vorbehandlung Vater	n.s.	n.s.	$\chi^2_{(3)}= 10.1$ $p=0.017$	n.s.	n.s.	n.s.
Identität Vater	$\chi^2_{(1)}= 4.0$ $p = 0.049$ $V^2= 0.24$	$\chi^2_{(1)}= 3.2$ $p= 0.07$ $V^2= 0.18$	n.s.	n.s.	$\chi^2_{(1)}= 19.3$ $p < 0.001$ $V^2=0.62$	n.s. $V^2=0.09$

Außerdem wurde der Einfluss der Spermiefrierkonservierung auf die Expression spezifischer Gene in frühen *in-vitro*-erzeugten Embryonen der Hauskatze mittels semiquantitativer sowie quantitativer PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Gefrierkonservierung von Spermien einen Einfluss auf die mRNA-Expression in frühen Embryonen der Hauskatze hat. So war in Morulae, welche mit frischen Sperma erzeugt wurden, die mRNA Menge höher als in Embryonen, die mit gefrierkonservierten Sperma produziert wurden. Die Wahl der Befruchtungsmethode – *in-vitro*-Befruchtung versus *intra*-cytoplasmatische Spermieninjektion – hatte hingegen keinen Einfluss. Der Vergleich von mRNA Expression in einem späteren Entwicklungsstadium verdeutlichte zusätzlich Unterschiede im zeitlichen Muster der embryonalen Genexpression zwischen den beiden Versuchsgruppen (Hribal et al., 2012).

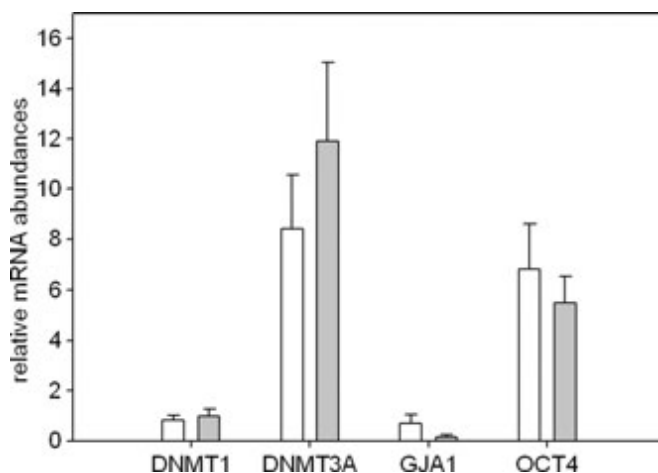


Abbildung 6: Relative RNA-Expression von DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1, DNMT3A) und 3A, Gap junction Proteins1 (GJA1) und des Octamer-bindingtranscriptionfactors (OCT4) in Blastozysten, die mit frischen (weiße Säule) und gefrierkonservierten (graue Säule) Spermienproduziert wurden (aus Hribal et al., 2012)

Zusammenfassung der Ergebnisse in diesem Arbeitspaket:

- In Abhängigkeit vom Umwelteinfluss war die embryonale Genexpression des Glukosetransporter *SLC2A1* verändert. Die begrenzte Anzahl an Genen machte den Nachweis einer epigenetischen Vererbung bisher nicht möglich.
- Die embryonale Genaktivität einiger Gene war Vatertier-abhängig (paternale Vererbung).
- Spermiefrierkonservierung beeinflusst die Expression spezifischer Gene in *in-vitro*-erzeugten Embryonen der Hauskatze. Daraus resultierende Folgen für mit gefrierkonservierten Sperma erzeugte Nachkommen sind unklar.

Arbeitspaket 3: Methylomanalyse

Für die epigenetischen Analysen wurden insgesamt 1.980 Proben von Nachkommen (Leber, Hoden, Milz, fünf Gehirnnareale, Blut, Muskel, Ohr, Haut), sowie von den Vatertieren (Leber- und Hodenbiopsien) unter immer gleichen stringenten Bedingungen genommen, gelistet, gelagert und den im ersten Jahr etablierten DNA-Isolierungsmethoden unterzogen. Bisher fokussierten wir uns ausschließlich auf die Leber und Hodenproben. Das weitere Material steht für zukünftige Projekte zur Verfügung. Wir erstellten die bis dahin nicht publizierte Genomsequenz von *Cavia aperea* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/2252454>; Acc.No. AVPZ00000001-AVPZ00003131) und konnten 20.653 Gene annotieren, die für 14.003 Proteine kodierten (Weyrich et al. 2014). Diese neue Referenzsequenz diente uns als Grundlage für die Auswertungen der Methylomanalysen nach veränderten Umweltbedingungen (A. Temperatur, B. Nahrung).

A. Paternale epigenetische Anpassung an Temperaturerhöhung

Paternale epigenetische Anpassungen an eine temporär erhöhte Umgebungstemperatur von 30°C wurde durch Sequenzierung des Methyloms von Leberbiopsien untersucht. Diese wurden sowohl von den Vatertieren gewonnen, und zwar vor und nach der Hitzebehandlung (F0_{Kontrolle}, F0_{Hitze}), als auch von den vor bzw. nach Hitzebehandlung der Väter gezeugten Söhnen (F1_{Kontrolle}, F1_{Hitze}). Von den Söhnen wurden sowohl Leber und Hoden für DNA-Methylierungsanalysen verwendet.

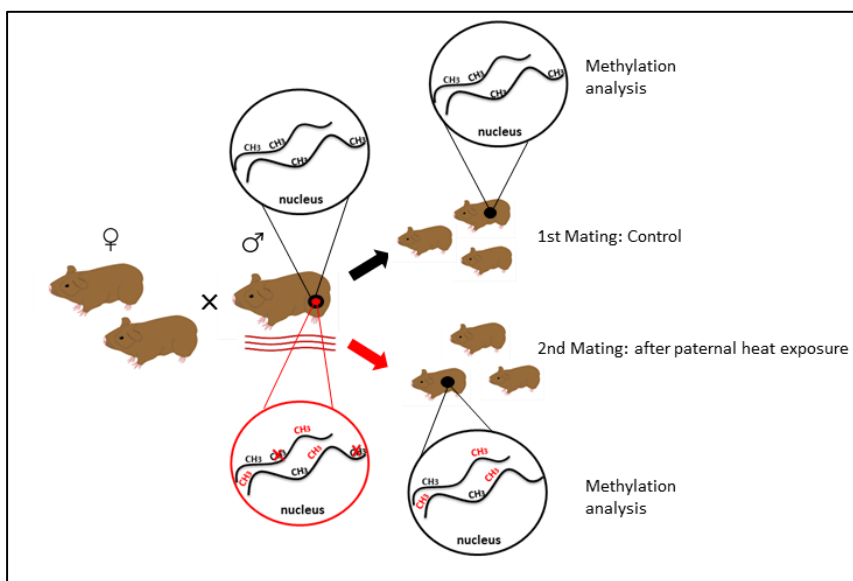


Abbildung 7: Experimenteller Aufbau der Versuche zur Methylomanalyse: WMS (F0) wurden vor und nach der Hitzeeinwirkung verpaart. Potentielle Veränderungen in der DNA-Methylierung wurden in Leber und Hoden der F0 Väter, sowie der F1 Söhne bestimmt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Hitzebehandlung, die über einen begrenzten Zeitraum von 2 Monaten stattfand, zu einer Veränderung der DNA-Methylierung (Methodik: Reduced Representation Bisulfite Sequencing, RRBS) sowohl in den exponierten F0 Vätern, als auch in den nicht-exponierten F1 Söhnen führte. Zwischen den Proben der Väter vor (F0_{Leber,Kontrolle}) und nach der Behandlung (F0_{Leber,Hitze}) wurden 1.831 differentiell methylierte Regionen (DMRs) gefunden, von denen 758 in annotierten Regionen (Promotoren, kodierenden Bereichen, CpG Inseln (CGIs)) lagen. Diese Ergebnisse stellen die unmittelbare Antwort "immediate response" (oder "epigenetic plasticity") auf den Hitzestress dar (Weyrich et al., 2015; Ein Wissenschaftscomic zum Verständnis dieser Ergebnisse ist in der Finalisierung).

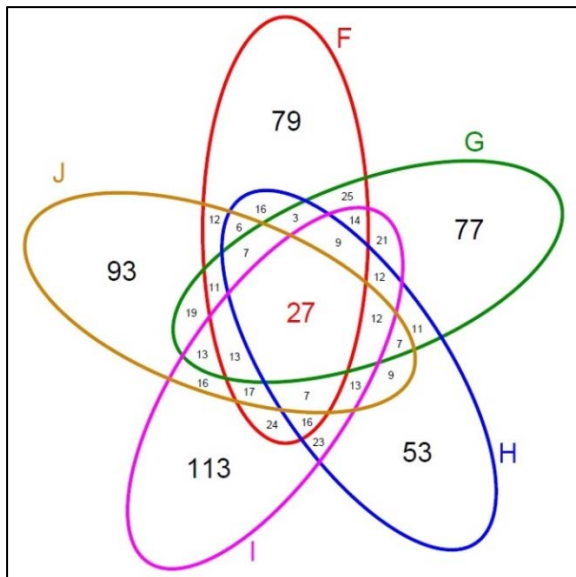


Abbildung 8: Annotierte differentiell methylierte Regionen (DMRs) nach Hitzebehandlung: Das Venn Diagramm zeigt die die Anzahl der überlappenden und nicht-überlappenden annotierten DMRs (Promotoren, kodierende Bereiche (CDS), CpG Inseln) die nach Hitzebehandlung in der Leber aller fünf F0 Väter (F-J), sowie in Leber und Hoden der F1 Söhne (pro Vatergruppe) vorkommen.

Zwischen den Leberproben der Söhne ($F1_{\text{Leber,Kontrolle}}$ vs. $F1_{\text{Leber,Hitze}}$) wurden 471 DMRs (inkl. 245 in annotierten Regionen) identifiziert, diese sprechen für eine vererbte Antwort ("inherited response" oder "transgenerational epigenetic plasticity"). In den Hodenproben der Söhne, die nach Hitzebehandlung der Väter gezeugt wurden ($F1_{\text{Testis,Kontrolle}}$ vs. $F1_{\text{Testis,Hitze}}$) konnten wir 2.484 DMRs (inkl. 940 in annotierten Regionen) detektieren. Diese Veränderungen im Methylierungsmuster implizieren eine epigenetische Vererbung über die Keimzellen in die F2-Generation.

Unter den identifizierten Genen, die eine Veränderung über die Generationen hinweg zeigten, waren zum Beispiel das Hitzeschockprotein AlphaB-crystallin (*A9Ipa2*) und das Hitzeschockprotein beta (*Hspb2*). Beide gehören zur Hitzeschockprotein Familie 20 (*HSP20*), deren Mitglieder als unmittelbare Antwort auf Hitze oder anderen Umweltstress aktiviert werden.

Ein weiteres Gen, welches sowohl bei Vätern als auch in der Leber und im Hoden der Söhne epigenetische Veränderungen aufwies, war das Seminal vesicle polypeptide (*Svp*) gene. Es ist für den Erhalt der Spermienintegrität verantwortlich und zeigte Veränderungen im Methylierungsgrad der Promotorregion. Außerdem identifizierten wir Unterschiede bei Genen, die in die Genregulation involviert sind, wie z.B. *Rara* (Retinoicacid receptor mit Transkriptionfaktor-Aktivität). Auch diesem Faktor wird eine Bedeutung in der Spermatogenese zugeschrieben, wie auch dem *Sox13*, (Sex determiningregion Y-related high mobilitygroup (HMG)-box 13), und dem Transkriptionsfaktor *Wiz* (Widely-interspaced-zinc-finger-motifs).

Des Weiteren konnten wir 12 von insgesamt 19 annotierten zusätzlichen Thermoregulationsgene mit signifikanten Veränderungen des Methylierungsgrades einzelner CpGs in den Promotor- und/oder CDS-Regionen nachweisen.

Für ausgewählte Gene wurde die epigenetische Vererbung auf die nachfolgende Generation auch auf Ebene der mRNA Expression untersucht. Signifikante Methylierungsunterschiede sowie Expressionsunterschiede nach Hitzeeinfluss in der Leber der naiven Söhne konnten für das Thermoregulationsgen Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (*Stat3*) gezeigt werden (Weyrich et al., 2016). *Stat3* ist ein systemisch-wirkendes Gen das wichtig für das Erhalten und Erreichen der Homöostase ist. Es wird durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert und reguliert in Abhängigkeit des Gewebetyps die Expression von

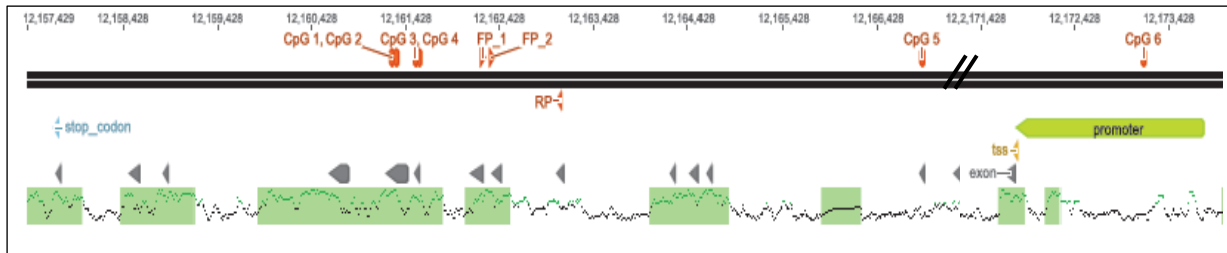


Abbildung 10: Stat3-Gen Illustration der unterschiedlich methylierten CpG-Positionen (rot) nach Hitzebehandlung der Väter, bestimmt in der Leber der F1. Oben ist die genomische Position im Scaffold angegeben, darunter der DNA-Doppelstrang (schwarz), der Promoterbereich (grüner Pfeil), die Exons (graue Pfeile) und CpG-Inseln (grüne Balken).

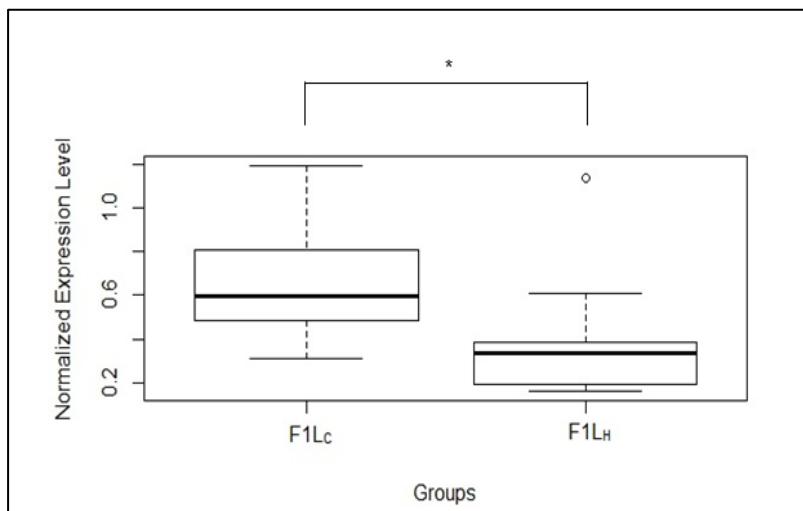


Abbildung 11: Stat3-
mRNA Expression in der
F1 Leber ($p < 0.0001$).
* $P = 0.00069$ (t-test); 2-
fache Veränderung

Zwei weitere Gene, die einen Unterschied in der Methylierung aufwiesen, waren Sirtuin 6 und Cathepsin Z. Beide Gene wiesen jedoch keine Expressions-Unterschiede in der quantitativen PCR auf, ebenso wenig wie die zur relativen Quantifizierung ausgewählten Haushaltsgene (*B2m*, *Gapdh*, *Hmbs*). Diese Ergebnisse zeigen, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um den flexiblen epigenetischen Mechanismus zu verstehen.

B. Paternale epigenetische Anpassung an Nahrungsänderung

Auch eine Veränderung der Nahrung führte zu einer potentiell adaptiven Veränderung in der epigenetischen Faktoren. Das Manuskript ist der Zeit in Bearbeitung, weshalb wir die Ergebnisse vorerst nicht veröffentlichen können.

Zusammenfassung der Ergebnisse in diesem Arbeitspaket:

- Beide Umwelteinflüsse induzierten Veränderungen im Methylom der Leber bei den Vätertieren (unmittelbare epigenetische Anpassung – immediate epigenetic response) und den Söhnen (vererbte epigenetische Anpassung – inherited epigenetic response).
- Die Programmierung epigenetischer Veränderungen im Methylom des Hodens der Söhne ermöglicht (sehr wahrscheinlich) epigenetische Vererbung in die F2-Generation.
- Bei ausgewählten Genen wurde die epigenetische Vererbung auf die folgende Generation auch auf Ebene der mRNA Expression untersucht.

Beiträge von Kooperationspartnern

Prof. Fritz Trillmich, Dr. Anja Günther, Universität Bielefeld

Wie im Projekt vorgesehen, wurden die WMS von unserem Projektpartnern aus Bielefeld bezogen. Aufgrund der besonderen Möglichkeiten der WMS Haltung während des Projektes konnten gemeinsam diverse Untersuchungen zur Lebensgeschichte und Reproduktion WMS vergleichend durchgeführt werden, die auf Datenmaterial von beiden Einrichtungen beruhen.

Dr. Camila Mazzoni, Berlin Center for Genomics in Biodiversity Research (BeGenDiv)

Sequenzierungen zur Genomsequenzerstellung wurden in Kooperation mit Dr. Wei Chen am Genomzentrum des Max Delbrück Zentrums (MDC) in Berlin durchgeführt. Die bioinformatische Aufbereitung und Analyse der Sequenzierdaten wurde am Berlin Center for Genomics in Biodiversity Research (BeGenDiv) durchgeführt.

Firma Zymoresearch, EpiQuest, 17062 Murphy Ave., Irvine, CA 92614, USA

Für die Sequenzierung der großen Probenanzahl nach und vor veränderten Umweltfaktoren, konnten wir die US-Amerikanische Firma Zymoresearch als Kooperationspartner gewinnen, die sich auf epigenetische Sequenzierungsmethoden und Analysen spezialisiert hat. Im ständigen Austausch mit Tzu Hung Chung (Bioinformatiker, Zymoresearch), haben Dr. Alexandra Weyrich und Dorina Lenz (Bioinformatikerin des IZWs) die nicht-standardisierte Analyse der Methylierungsdaten eines Wildtieres erarbeitet.

Qualifikationsarbeiten

Dissertation: Kathrin Rübensam, geb. Schumann, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin „Haltung und Reproduktion des Wildmeerschweinchens (*Cavia aperea*).“ 2015.

Msc-Arbeit: Stephanie A. Benz, University of Central Lancashire- School of Forensic and investigative Science “Paternaly induced gene expression changes in the offspring of Wild Guinea Pigs (*Cavia aperea*) subjected to heat – implications for climate change” 2014.

Msc-Arbeit: Katharina Hille, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Humboldt Universität zu Berlin; “Effects of heat and low protein diet on energy budget of male cavies (*Cavia aperea*)” 2012

Bsc-Arbeit: Tino Schüllermann, Bioinformatics, Freie Universität Berlin; “Creating a reference sequence and annotation file for the wild Guinea pig to find potential methylation sites.” 2012

Msc-Arbeit: Martina Schneemann, Biochemie und Molekularbiologie, Uni Potsdam „Epigenetik und Genexpressionsveränderungen beim Meerschweinchen“, Abschluss Oktober 2016

Bsc-Arbeit: Selma Yasar, Biochemie und Molekularbiologie, Uni Potsdam „Genexpressionsveränderungen beim Meerschweinchen“, Abschluss Oktober 2016

Liste der Publikationen aus diesem Vorhaben:

Hribal R, Ringleb J, Braun BC, Jewgenow K (2012): Capabilities and challenges of examination of gene expression in early cat embryos. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 6), 147–151, doi: 10.1111/rda.12081

Hribal R, Jewgenow K, Ruebensam K, Günther A (2016): Blastocyst recovery and multifactorial gene expression analysis in the wild guinea pig (*Cavia aperea*). *Theriogenology*, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.071

Rübensam K, Hribal R, Jewgenow K, Guenther A (2015) Seasonally different reproductive investment in a medium sized rodent (*Cavia aperea*). *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.04.023

Schumann K, Guenther A, Göritz F, Jewgenow K (2014b): Characterization of fetal growth by repeated ultrasound measurements in the wild guinea pig (*Cavia aperea*), *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.007.

Schumann K, Guenther A, Jewgenow K, Trillmich F (2014a): Animal housing and welfare: effects of housing conditions on body weight and cortisol in a medium sized rodent (*Cavia aperea*). *J Appl Anim Welf Sci* 17, 111-24. doi: 10.1080/10888705.2014.884407.

Weyrich A, Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012; 2:2.13.1-3. doi: 10.1002/0471142727.mb0213s98.

Weyrich A, Schüllermann T, Heeger F, Jeschek M, Mazzoni CJ, Chen W, Schumann K, Fickel J. (2014): Whole genome sequencing and methylome analysis of the wild guinea pig. *BMC Genomics*. 2014 Nov 28;15:1036. doi: 10.1186/1471-2164-15-1036.

Weyrich A, Lenz D, Jeschek M, Chung TH, Rübensam K, Göritz K, Jewgenow, K, Fickel J (2015): Paternal intergenerational epigenetic response to heat exposure in male Wild guinea. Running Title: Paternal epigenetic response to heat. *MOL ECOL – special issue Epigenetic Studies in Ecology and Evolution*.

Weyrich A, Benz S, Karl S, Jeschek M, Jewgenow K, Fickel J (2016) Paternal heat exposure causes DNA methylation and gene expression changes of Stat3 in Wild guinea pig sons. *Ecology and Evolution* DOI: 10.1002/ece3.1993; funded by Leibniz Open Access Fund <http://www.leibniz-gemeinschaft.de/infrastrukturen/open-access/open-access-publikationsfonds/gefoiderte-artikel/>

in Vorbereitung:

Hribal R, Günther A, Rübensam K, Eder S, Mueller K, Jewgenow K (in preparation): Gene expression in blastocysts of *Cavia aperea* is affected by paternal spermatogenetic properties.

Weyrich A, Lenz D, Jeschek M, Chung TH, Heeger F, Rübensam K, Goeritz F, Jewgenow K, Fickel J (in preparation) Paternal epigenetic adaptation to low protein nutrition exposure in male Wild guinea pig.

Hille KT, Weyrich A, Schumann K, Jewgenow K, Ortmann S (in preparation): Seasonally dependent responses to low protein diet in *Cavia aperea*, the Wild guinea pig.

Technologie- und Wissenstransfer

Im Zuge des vom BMBF geförderten Projektes zur Förderung von Wissens- und Technologietransfer (Projektleitung: Dr. Kathleen Röllig) konzipierte Frau Dr. Weyrich mit einer Illustratorin und einem weiteren Autor ein Wissenschaftscomic indem die Ergebnisse des Projektes, sowie die Rolle in der Anpassung in einfacher Form dargestellt werden. Der Comic wird beim JaJa-Verlag erscheinen, kann dort bestellt werden und wird auf Buchmessen sowie in Comicläden präsentiert. Zudem wird es Schulen zur Lernergänzung im Fach Biologie angeboten. Eine Bewerbung zur Vorstellung auf dem 9. Forum Wissenschaftskommunikation war erfolgreich. Dort halten Frau Dr. Röllig und Frau Dr. Weyrich einen Vortrag mit dem Titel „Das Verständnis für Forschungsprozesse fördern - wissenschaftliche Publikationen in Bilder übersetzt“.

Liste der Pressemitteilungen und Medienberichte.

Jewgenow K, Weyrich A, Schumann K, Hribal R (Dec 2011) Wie der Vater so der Sohn. Verbund Journal, Leibniz Gemeinschaft.

Resonanz der Presse zu folgendem Artikel:

Weyrich A, Lenz D, Jeschek M, Chung TH, Rübensam K, Göritz K, Jewgenow, K, Fickel J (2015): Paternal intergenerational epigenetic response to heat exposure in male Wild guinea. Running Title: Paternal epigenetic response to heat. MOL ECOL – special issue Epigenetic Studies in Ecology and Evolution.

- Epigenetics in wild guinea pigs. Online-Medien, phys.org, 23.12.2015
- Epigenetics in Wild Guinea Pigs, Online-Medien, soylentnews.org, 23.12.2015
- Like father like son: Epigenetics in wild guinea pigs. Online-Medien, diseasesresearchgroup.xonl.de, 23.12.2015
- Like father like son: Epigenetics in wild guinea pigs. Online-Medien, sciencedaily.com, 23.12.2015.
- Wie der Vater so der Sohn: Epigenetik bei Wildmeerschweinchen. Online-Medien, vbio.de, 23.12.2015.
- Wild guinea pigs adapt to heat in real time. Online-Medien, ooyuz.com, 23.12.2015.
- Wild guinea pigs adapt to heat in real time. Online-Medien, upi.com, 23.12.2015
- Epigenetik bei Wildmeerschweinchen. Online-Medien, szondi.ch, 24.12.2015
- Tal pai, tal filho: epigenética em porquinhos da Índia selvagens. Online-Medien, pos-darwinista.blogspot.de, 24.12.2015.
- Neues aus Wissenschaft und Naturschutz: Wie der Vater so der Sohn: Epigenetik bei Wildmeerschweinchen. Online-Medien, beutelwolf.martin-skerhut.de, 27.12.2015
- Jak rychle změna klimatu modifikuje genom? Rychle! Online-Medien, osel.cz, 03.01.2016
- Guinea Pigs Inherit Climate Change Defense From Fathers. Online-Medien, natureworldnews.com, 04.01.2016.
- Guinea Pigs Inherit Climate Change Defense From Fathers, Online-Medien, notey.com, 04.01.2016
- Guinea pigs beat climate change by tweaking their own DNA. Online-Medien, newscientist.com 06.01.2016.

- Guinea pigs beat hot temperatures by tweaking their DNA. Online-Medien, dailyme.com, 06.01.2016.
- Another way life adapts to climate change: fathers pass on climate lessons through epigenetics. Online-Medien, joannenova.com, 07.01.2016.
- Meerschweinchen kontra Klimawandel. Online-Medien, klimaretter.info, 08.01.2016
- Guinea pigs tweak genes to beat heat. Zeitschrift, New Scientist, 09.01.2016.
- Guinea pigs beat climate change by tweaking their own DNA, Online-Medien, zoonewsdigest.blogspot.de, 21.01.2016
- Epigenetik bei Wildmeerschweinchen. Online-Medien, vet-magazin.com, 04.02.2016
- Epigenetik bei Wildmeerschweinchen. Social Media, Facebook, Forschungsverbund Berlin e.V., 08.02.2016.
- Willkommen im Club, Meerschweinchen! Newsletter, Newsletter Epigenetik, 01.03.2016
- Klimawandel? Ausgetrickst! Online-Medien, fr-onlin.de, 18.04.2016.