

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi,
Ankara, Türkiye
ozgurcnr@gmail.com

Geliş Tarihi : 30 Mart 2022
Received

Kabul Tarihi : 11 Haziran 2022
Accepted

E Yayın Tarihi : 01 Ocak 2024
Online published

Bu makalede yapılacak atf
Cite this article as

Şükür G, Bozdemir N, Çınar Ö.
Oosit Maturasyonu Sürecinde Global
DNA Metilasyonunun Değişimi
Akd Tıp D 2024;10(1): 47-52

Gözde ŞÜKÜR
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Biyoteknoloji Enstitüsü,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-1957-551X

Nazlıcan BOZDEMİR
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0001-9110-4267

Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-2901-1910

Oosit Maturasyonu Sürecinde Global DNA Metilasyonunun Değişimi

Alteration of Global DNA Methylation in the Oocyte Maturation Process

ÖZ

Amaç:

Bu çalışmada, global DNA metilasyonunun Germinal Vezikül (GV) aşamasından Metafaz II (MII) aşamasına kadar olan oosit maturasyonu sürecinde değişim gösterip göstermediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler:

Bu çalışmada, 4 haftalık Balb/C farelerinin GV ve in vivo MII oosit evreleri arasındaki global DNA metilasyonu farkı immünofloresan yöntemi kullanılarak incelendi. Bu amaçla GV ve MII aşamasındaki oositlerde 5-metil sitozin (5mC) işaretlemesi sonrası Zeiss LSM-880 Airyscan konfokal mikroskopta alınan optik kesitlerinden elde edilen görüntülerden Image-J yazılımı kullanılarak hesaplanan sinyal yoğunlukları değerlendirildi.

Bulgular:

Global DNA metilasyonu, 5-metil sitozin (5mC) işaretlemesi sonrası değerlendirildiğinde, GV aşamasındaki oositlerde, çekirdek bölgesinde gözlemlenirken, MII aşamasındaki oositlerde metafaz plağına uygun lokasyonda olduğu izlendi.

Global DNA metilasyonunun göreceli sinyal yoğunluğu değerlendirildiğinde; MII aşamasında GV aşamasına göre 3,2 katlık istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı. Bu azalışın birinci mayoz sonrası DNA miktarındaki azalmaya bağlı olup olmadığı için yapılan hesaplamalar da bunun sadece DNA miktarındaki azalmadan kaynaklanmadığını gösterdi.

Sonuç:

Oositlerde, GV aşamasına kıyasla MII evresinde global DNA metilasyon seviyesinin üç kattan daha fazla azalmış olması, fertilizasyon öncesi oositteki DNA metilasyonunun çeşitli mekanizmalarla kontrol edildiğini ve bunun fertilizasyon dinamiğinde önemli olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler:

Epigenetik, Global DNA metilasyonu, Oogenez, Oosit

ABSTRACT**Objective:**

In this study, it was aimed to reveal whether alteration of global DNA methylation occurs or not during the oocyte maturation from Germinal Vesicle (GV) to Metaphase II (MII).

Material and Methods:

The difference in global DNA methylation between the GV and in vivo MII oocyte stages of 4-week-old Balb/C mice was examined by using the immunofluorescence method. For this purpose, oocytes at GV and MII stages were labeled with anti-5-methyl cytosine (5mC) antibody and images from optical sections taken with Zeiss LSM-880 Airyscan confocal microscope were obtained. Signal intensities of the images were digitalized and calculated by using Image-J software.

Results:

When the global DNA methylation was evaluated after 5-methyl cytosine (5mC) labeling, 5mC signals were observed in nucleus of GV stage oocytes, whereas at metaphase plate of MII stage. Relative signal intensities of global DNA methylation were evaluated, and statistically significant ($p < 0.0001$) 3.2-fold decrease was found at MII stage compared to GV. Calculations aiming to reveal whether this significant decrease depended on the reduction in the amount of DNA after meiosis I or not, showed that the decrease in global DNA methylation may not be caused by meiosis itself.

Conclusion:

The result that the global DNA methylation level was decreased more than three times at the MII stage compared to the GV stage oocytes suggests that DNA methylation is controlled by various mechanisms, and this may have vital role in fertilization dynamics.

Key Words:

Epigenetics, Global DNA methylation, Oogenesis, Oocyte

GİRİŞ

Memelilerde oogenez ve erken dönem embriyo gelişimi süreçlerinde epigenetik mekanizmaların görev aldığı bilinmektedir (1). Epigenetik mekanizmalar, doğrudan veya dolaylı olarak gen ifadesini kontrol etmektedir. Doğrudan gen ifadesini kontrol eden süreçlerden bir tanesi DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, genomdaki CpG (sitozin fosfat guanin) ya da CpG olmayan bölgelerdeki sitozin nükleotidlerinin beşinci karbon atomuna metil grubu eklenmesi ile gerçekleştirilir (2). DNA metilasyonunda sürdürme ve de novo metilasyon olmak üzere iki farklı mekanizma görev almaktadır. Her iki mekanizmayı da DNA Metil Transferaz (DNMT) enzimleri katalizler. Bu işlemlerde metil grubu vericisi S-adenozil-L-methionin (AdoMet)'dir (3). Bugüne kadar memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C ve DNMT3L olmak üzere altı farklı DNA metil transferaz enzimi tanımlanmıştır. DNMT enzimleri, yapısal olarak N-terminal düzenleyici bölge, C-terminal katalitik domain ve merkezi bağlayıcı domain olmak üzere üç ana domainden oluşmaktadır (4). N-terminal domain DNMT'lerin

hücre içi yerleşimlerini belirler ve metile olmamış ve yarı-metile DNA zincirlerinin tanımlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, N-terminal bölge çoğalan hücre nükleer antijen-bağlayan (PBD), nükleer yerleşim sinyali (NLS), sitozin-zengin çinko parmak bağlayan (ATRX), polibromo homoloji (PHD) ve tetrapeptid kromatin bağlayan domainleri de içermektedir (5, 6). PBD domaini, DNMT'lerin DNA sekansı ve PCNA proteini ile ilişki kurmasını sağlarken PHD domaini replikasyon çatalında yeni DNA zinciri sentezini uyarılmaktadır (7,8). C-terminal domain 10 farklı motif içermektedir. Bu 10 motifin altısı (I, IV, VI, VIII, IX ve X) evrimsel olarak korunmuş olup, her birinin metilasyon sürecinde yapısal bir görevi bulunmaktadır. Üçüncü DNMT bölgesi olan merkezi bağlayıcı domain, lizin-glisin dipeptid tekrarlarından oluşmakta olup N ve C-terminal bölgeleri arasında yapısal bağlayıcılık ilişkisi kurmaktadır (4).

Primordial germ hücresinden (PGH) olgun (MII) oosite kadar gelişen oositlerin epigenetik ve transkripsiyonel değişiklikler gösterdiği bilinmektedir (9). PGH'sinde genom çapında DNA demetilasyonu, gonadal kabartıya ulaştıktan hemen sonra meydana gelmektedir. Puberte öncesi oositlerde DNA metilasyon seviyesinin beşinci günden on beşinci güne kadar artışı ve olgun GV oositte maksimum seviyeye ulaştığı bilinmektedir (10). Fertilizasyon sırasında global demetilasyon gerçekleşir. Fertilizasyondan sonra ise paternal genom hızlı bir şekilde demetilasyona uğrarken maternal genomun demetilasyonu pasif gerçekleşir (11). GV aşamasından MII maturasyonuna kadar DNMT1, 3a, 3b ve 3l seviyelerinin artışı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12, 13). Öte yandan global DNA metilasyonunun değişimine ilişkin literatürde çelişkili ifadeler söz konusudur. Bu çalışmada, folikülogenez sürecinde oosit gelişiminde önemli değişiklikler gösterdiği bilinen global DNA metilasyonunun, oosit mayozu sürecinde GV'den MII aşamasına geçen süreçte nasıl etkilendiğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çerçevede, in vivo elde edilen GV ve MII oositler çalışma kapsamında değerlendirilmiş ancak MI oositler in vivo olarak elde edilemediği için çalışma dışı tutulmuştur. Bulgularımız, GV aşamasına kıyasla MII aşamasındaki metilasyon miktarının üç kattan daha fazla azaldığını ortaya koymuştur.

GEREÇ ve YÖNTEMLER**Deney Hayvanları**

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylandı (Protokol no: 2020-17-145). Çalışma kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hayvanları Laboratuvarı Birimi'nden 4 haftalık dişi Balb/C fareler (n=18) kullanıldı. Tüm fareler, yiyecek ve suya sınırsız erişim ile barındırıldı ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu. Her gruptaki deney tekrarları teknik ve biyolojik tekrar baz alınarak hesaplandı. İstatistiksel olarak değerlendirme yapılabilmesi için en az üç deney tekrarı planlandı.

Oositlerin Toplanması ve Fiksasyonu

Germinal vezikül aşamasındaki (GV) oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin ovaryumları GMOPS (Vitrolife, 10130) medyumuna içerisine alındı. Ardından stereo mikroskop

altında insülin enjektör iğnesi ile parçalanması gerçekleştirildi ve oositlerin medyum içerisine çıkması sağlandı. Daha sonra medyum içerisindeki GV oositler mikropipet ile toplanıp etrafındaki granüloza hücreleri mekanik olarak uzaklaştırıldıktan sonra %4 PFA (paraformaldehit) içerisine alınarak 20 dakika fikse edildi. Süre sonunda oositler %2 BSA (sığır serum albumin) içeren PBS (fosfat tamponlu tuzlu su, yıkama solüsyonu) içerisine alınarak boyama aşamasına kadar +4°C’de muhafaza edildi. İn vivo metafaz II (MII) aşamasındaki oositleri toplamak için farelere 5 IU Gebe Kısrak Serum Gonadotropini (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG, Abbexa, abx260389) enjeksiyonundan 48 saat sonra 5 IU İnsan Koryonik Gonadotropini (Human Chorionic Gonadotropin, hCG, Sigma CG-10) uygulandı. On dört saat sonra fareler sakrifiye edildi ve tuba utarinalar GMOPS (Vitrolife, 10130) medyumuna içerisine alındı. Ardından Stereo mikroskop altında insülin enjektör iğnesi ile tuba utarinaları patlatıldı ve MII oositlerinin medyum içerisine çıkması sağlandı. Ardından 1 mg/ml konsantrasyondaki hiyaluronidaz solüsyonu (Sigma, H-4272) içerisnde en fazla 20 saniye sürecinde mikropipet yardımıyla oositlerin etrafındaki kumulus hücreleri uzaklaştırıldı. Hiyaluronidaz enzimini uzaklaştırmak için kumulus hücreleri uzaklaştırılmış oositler GMOPS (Vitrolife, 10130) medyumundan geçirilerek yıkandı. Ardından yukarıda anlatıldığı şekilde fikse edilip boyama aşamasına kadar bekletildi.

İmmüno Floresan Boyama

GV ve in vivo MII oositler PBS içinde hazırlanan %1 Tween-20 (v/v) (Sigma-Aldrich, ABD) ile oda sıcaklığında 15 dakika permeabilize edildi. Permeabilizasyonun ardından oositler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 2 mol/L HCl içinde bekletildi. Ardından PBS ile yıkayıp 60 dakika boyunca oda sıcaklığında bloklayıcı solüsyonunda (%20 (v/v) normal keçi serumu (Vector Laboratory, ABD) ve %0,1 (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA) içeren PBS) tutuldu. Bloklayıcı işleminin ardından oositler 5mC (1:100; Cell Signaling, USA; 28692S) primer antikoruna içerisine alınarak gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler 3x10 dakika yıkama solüsyonuyla (PBS-%2 BSA) yıkandı ve floresan işaretli sekonder antikor içerisine (Alexa-488 konjuge anti-taşan antikor (Kat. No: A-11094, Invitrogen, ABD)) aktarılarak 2 saat 37°C’de karanlık ortamda inkübe edildi. Sonrasında 3x10 dakika PBS-%2 BSA içinde yıkayan oositler 35 mm’lik cam tabanlı petri kaplarına konulan 4 µL’lik PBS damlalarına alındı ve üzeri parafin yağı (OVOIL, 10029, Vitrolife) ile kapatıldı. Zeiss LSM-880 Airyscan konfokal mikroskopta (Zeiss, Almanya) incelemeler yapıldı. Floresan proba uygun olarak 488 nm lazer hattı kullanıldı. Tüm lazer ve tarama parametreleri referans histogram kullanılarak optimize edildikten sonra sabit tutuldu. İki boyutlu (X-Y) ve üç boyutlu (X-Y-Z) analizlerde piksel çözünürlüğü tüm görüntülerde sabit tutuldu. Z aksında 5-metil sitozin sinyalinin başlangıç ve bitiş yerlerinden 1 µm aralıklarla optik kesitler alındı ve Zen Black programında kesitler bir araya getirilerek tek bir görüntü oluşturacak şekilde birleştirildi. Birleştirilen görüntülerden elde edilen sinyaller Image-J (NIH, ABD) yazılımı kullanılarak dijitalleştirildi ve ardından aynı yazılımın Görüntü Hesaplama

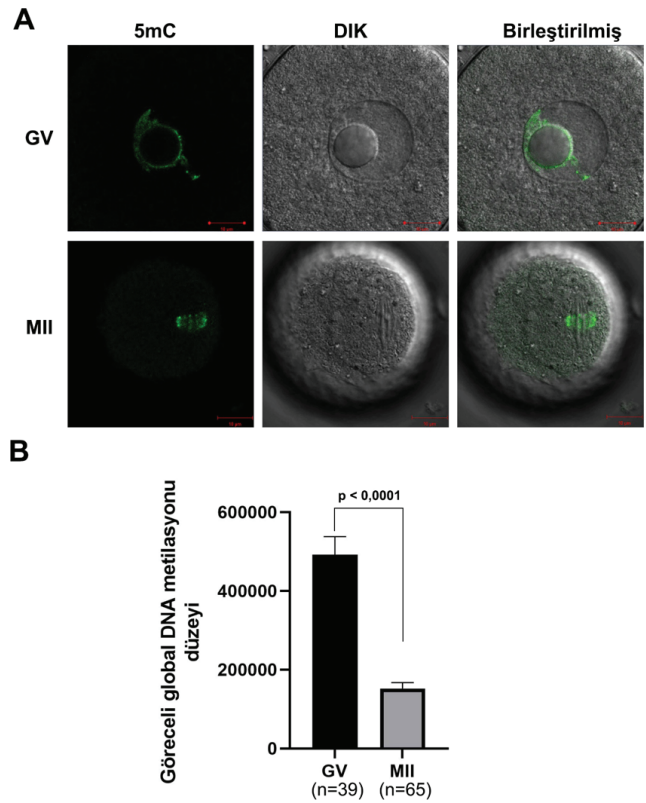
fonksiyonu kullanılarak sinyal yoğunlukları elde edildi.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç kez tekrarlandı. Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 6.0 yazılımı kullanılarak Student’ın t testi ile değerlendirildi ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

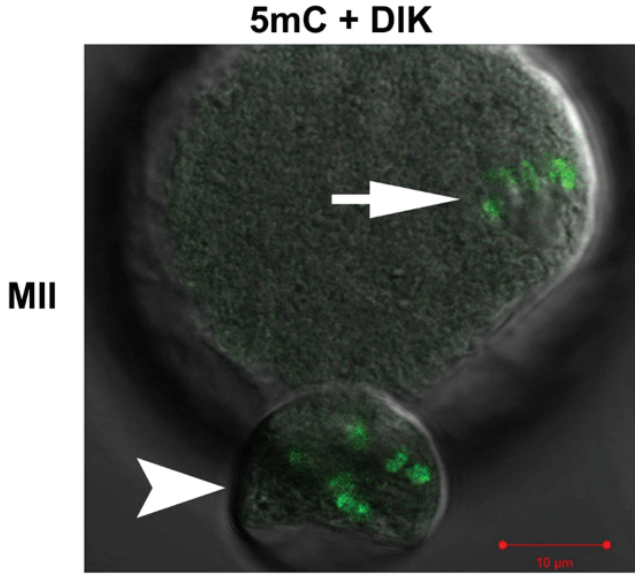
BULGULAR

Bu çalışmada global DNA metilasyonunu değerlendirmek amacıyla, anti-5-metil sitozin (5mC) antikoruna ile kromozom üzerinde metillenmiş CpG ve non-CpG bölgeleri işaretlendi. GV oositlerde 5mC sinyali, kromatinler üzerinde gözlemlenirken, MII oositlerde mayoz mekiği üzerindeki kromozomlarda gözlemlendi (Şekil 1A).



Şekil 1. 5mC işaretlemesi. A. İmmüno floresan sonuçları. Mikrograflardaki yeşil sinyal GV ve MII gruplarındaki global DNA metilasyonunu göstermektedir. B. Göreceli toplam global DNA metilasyon düzeyi (p<0,0001). GV; Germinal Vezikül, MII; Metafaz II, Ölçüm çubuğu=10 µm.

Ayrıca gözlemlenebilen kutup cisimciklerinde 5mC sinyalinin varlığı izlendi. İmmün işaretleme protokolü gereği kullanılan HCl’in oositlerin zona pellusida tabakasını eritmesinden dolayı MII oositlerin bir kısmında kutup cisimciği izlenemedi ve bu nedenle ayrıca kutup cisimciği sinyal analizi yapılamadı. Öte yandan kutup cisimciği gözlenebilen MII oositlerin kutup cisimciklerinde de yoğun global DNA metilasyonunun varlığı saptandı (Şekil 2).



Şekil 2. Kutup cisimciğinde ve metafaz plağında 5mC varlığı. Ok: Kutup cisimciği, Ok başı: Metafaz plağı, Ölçüm çubuğu=10 µm.

Global DNA metilasyonunu hesaplamak için çalışmamızda değerlendirilen GV aşamasındaki oositlerin (n=39) ortalama göreceli 5mC sinyal değerinin MII evresindeki oositlerden (n=65) 3,2 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 1B). GV aşamasındaki oosit mayozunu tamamlamamış bir aşamadayken MII aşamasında ilk mayoz bölünmeyi tamamladığı, dolayısıyla toplam DNA miktarının yarıya düştüğü bilgisi ışığında; 5mC sinyalindeki azalmanın mayoz bölünmeye bağlı olup olmadığı sorusu gündeme geldi. Bu çerçevede, GV aşamasındaki sinyal yoğunluklarının yarısı (DNA miktarının yarıya ineceği gerçeğiyle) hesaplanarak elde edilen veri MII aşamasından elde edilen veriyle karşılaştırıldığında saptanan yaklaşık 1,6 katlık azalmanın istatistiki olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,0007$).

TARTIŞMA

Genomda gerçekleşen epigenetik modifikasyonlardan biri olan DNA metilasyonunun, oositlerin gelişimi, büyümesi ve olgunlaşması ile oogeneze ve embriyogeneze sırasında erken embriyonik gelişim için önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (14). Literatürde, olgun GV oosit aşamasına yaklaştıkça ve oosit büyüdükçe global DNA metilasyonunun arttığı ifade edilmiştir (9, 10). GV aşamasından MII maturasyonuna kadar ise, global DNA metilasyonunun artmaya devam ettiği ve MII aşamasına gelindiğinde en üst seviyeye ulaşabileceği ön görülmüştür (1, 12, 15, 16). DNA metilasyonunun sadece CpG adalarında değil, aynı zamanda CpG adaları dışındaki (non-CpG) sitozinlerde de gerçekleştiği ve oositlerin global DNA metilasyonu dinamiğinde non-CpG bölgelerinin önemli bir katkısı olduğu bilinmektedir (17). Smallwood ve arkadaşları, CpG bölgelerindeki DNA metilasyonunu değerlendirmiş ve metillenen CpG'nin tüm CpG'lere oranını kıyasladıklarında MII evresindeki DNA metilasyonunun GV evresine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (18, 19). Öte yandan

çalışmalarında tüm DNA'daki metilasyon değişimi gösterilmemiştir. Saadeh ve arkadaşlarının kaleme aldıkları derleme makalede GV'den MII aşamasına doğru global metilasyonun arttığına ilişkin bir çizim Smallwood ve arkadaşlarının bulguları referans gösterilerek sunulmuş olmakla birlikte o çalışmada global DNA metilasyonunun değerlendirilmediğine dikkat etmek gereklidir (20). Costello ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada CpG dinükleotid içeriği yüksek olan ve fare genomunda fazlaca bulunan intrasisternal A partikülünün (IAP) CpG adalarındaki metilasyon seviyesini incelemiş ve GV evresine kıyasla MII aşamasında DNA metilasyonunun azaldığını göstermişlerdir (21). Yine çeşitli çalışmalarda CpG bölgelerindeki DNA metilasyonu değerlendirilerek GV'den MII aşamasına geçildiğinde CpG bölgelerindeki metilasyonun azaldığı gösterilmiştir (13, 22). Öte yandan, insan oositlerinde yapılan bir çalışmada, non-CpG bölgelerindeki DNA metilasyonunun GV evresine kıyasla MII oositlerinde fazla olduğu bulunurken, CpG bölgeleri incelendiğinde ise iki evre arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (23). CpG veya non-CpG bölgelerindeki DNA metilasyonunun ayrı ayrı değerlendirildiği bu çalışmalar, GV'den MII'ye geçiş sürecinde tüm DNA'da global metilasyonunun nasıl değiştiği sorusunun doğmasına neden olmaktadır.

Yukarıdaki araştırmalardan farklı olarak, bu çalışmamız kapsamında, GV ve MII aşamalarındaki oositlerde hem CpG hem de non-CpG bölgelerindeki toplam metilasyonu göstermek için 5mC düzeyleri değerlendirilmiş ve global DNA metilasyon seviyesinin MII evresinde GV aşamasındaki oositlere kıyasla üç kattan daha fazla bir azalma gösterdiği izlenmiştir. Bilindiği üzere, Profaz I aşamasındaki GV oositin kromozom sayısı mayoz I bölünmesini tamamlamasıyla yarıya düşmektedir (24). Dolayısıyla MII aşamasındaki oosit, GV oositin yarısı kadar DNA'ya sahiptir. Bu bilgiler doğrultusunda, DNA metilasyonunun hiç etkilenmemesi halinde, MII oositlerdeki metilasyon düzeyinin, GV oositin yarısı kadar olması ön görülebilir. Bu fikir doğrultusunda GV evresindeki elde ettiğimiz metilasyon değerlerinin yarısını alarak (ilk mayoz sonunda DNA miktarının yarıya düşmesi nedeniyle) MII evresindeki metilasyon değerleriyle ayrıca bir karşılaştırma daha yaptığımızda; yine bu değerlerin MII oositlerinden elde edilen değerden anlamlı derecede yüksek olduğunu hesapladık ($p<0,0007$). Bu konuyla ilgili iki olasılık olabileceğini ön görmekteyiz. Birincisi, kutup cisimciğine daha fazla metillenmiş DNA'nın atılıyor olması; ikincisi, MII aşamasına geçişte demetilasyonun gerçekleşebileceği. Birinci hipotezle ilişkili literatür taramasında, MII oosit ile birinci kutup cisimciğinde metilasyon seviyesi ve dağılımlarının benzerlik gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar söz konusudur (25, 26). Bu nedenle, bu azalış kutup cisimciğine aktarılan metillenmiş DNA miktarıyla ve kromozom sayısının yarıya düşmesiyle açıklanamayabilir. Dolayısıyla GV'den MII oosit evresine geçiş sürecinde global DNA metilasyonunun çeşitli mekanizmalarla azaltılabileceğini ön görüyoruz.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma, GV ve MII aşamalarında olan fare oositlerinin global DNA metilasyon farkını ortaya koymaktadır. Bu verinin ortaya konulması, literatürdeki çelişkili verilerin tekrar değerlendirilmesi ve global DNA metilasyon dinamiğinin oosit maturasyon sürecine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi açısından önem arz etmektedir. Bulgularımızın gösterdiği GV aşamasından MII aşamasına geçiş sürecinde metilasyon düzeylerinin azalmasında görev alan faktör ve yolların ortaya konulmasını sağlayacak yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Etik Komite Onayı:

Bu araştırma, ilgili tüm ulusal düzenlemelere, kurumsal politikalara ve Helsinki Bildirgesinin ilkelerine uygundur ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Protokol no: 2020-17-145).

Yazarların Katkısı :

Çalışmanın konsepti ve dizaynı: OC. Verilerin toplanması ve işlenmesi: GS, NB. Verilerin analizi ve yorumlanması: OC, GS, NB. Literatür araştırması: OC, GS, NB. Makalenin yazımı: OC, GS, NB. Kritik gözden geçirme: OC, GS, NB. Yayınlanacak versiyonun nihai onayı: OC, GS, NB.

Çıkar Çatışması:

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Finansman:

Bu çalışma TÜBİTAK 120S175 mali destekleri ile tamamlanmıştır.

1. Uysal F, Ozturk S. DNA Methyltransferases in Mammalian Oocytes. *Results Probl Cell Differ.* 2017;63:211-22.
2. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2001;2(1):21-32.
3. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(4):631-47.
4. Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M, Szyf M. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem.* 2001;276(10):6930-6.
5. Posfai J, Bhagwat AS, Posfai G, Roberts RJ. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2421-35.
6. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2395-402.
7. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science.* 1997;277(5334):1996-2000.
8. Easwaran HP, Schermelleh L, Leonhardt H, Cardoso MC. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep.* 2004;5(12):1181-6.
9. Pan Z, Zhang J, Li Q, Li Y, Shi F, Xie Z, Liu H. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *J Genet Genomics.* 2012;39(3):111-23.
10. Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction.* 2007;133(1):85-94.
11. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie.* 2015;116:103-13.
12. Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *J Mol Histol.* 2017;48(5-6):417-26.
13. Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet.* 2004;13(8):839-49.
14. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.
15. Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development.* 2012;139(1):15-31.
16. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet.* 2007;39(3):295-302.
17. Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003439.
18. 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.* 2011;43(8):811-4.
19. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* 2012;28(1):33-42.
20. Saadeh H, Schulz R. Protection of CpG islands against de novo DNA methylation during oogenesis is associated with the recognition site of E2f1 and E2f2. *Epigenetics Chromatin.* 2014;7:26.
21. Costello KR, Leung A, Trac C, Lee M, Basam M, Pospisilik JA, Schones DE. Sequence features of retrotransposons allow for epigenetic variability. *Elife.* 2021;10.
22. Sendzikaitė G, Kelsey G. The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte. *Essays Biochem.* 2019;63(6):691-705.
23. Yu B, Dong X, Gravina S, Kartal O, Schimmel T, Cohen J, Tortoriello D, Zody R, Hawkins RD, Vijg J. Genome-wide, Single-Cell DNA Methylomics Reveals Increased Non-CpG Methylation during Human Oocyte Maturation. *Stem Cell Reports.* 2017;9(1):397-407.
24. Hwang GH, Hopkins JL, Jordan PW. Chromatin Spread Preparations for the Analysis of Mouse Oocyte Progression from Prophase to Metaphase II. *J Vis Exp.* 2018(132).
25. Guo H, Zhu P, Yan L, Li R, Hu B, Lian Y, Yan J, Ren X, Lin S, Li J, Jin X, Shi X, Liu P, Wang X, Wang W, Wei Y, Li X, Guo F, Wu X, Fan X, Yong J, Wen L, Xie SX, Tang F, Qiao J. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature.* 2014;511(7511):606-10.
26. Yuan P, Guo Q, Guo H, Lian Y, Zhai F, Yan Z, Long C, Zhu P, Tang F, Qiao J, Yan L. The methylome of a human polar body reflects that of its sibling oocyte and its aberrance may indicate poor embryo development. *Hum Reprod.* 2021;36(2):318-30.