

**Zellentwicklung, Zelltod und die Expression  
Apoptose-assoziiierter Gene  
in der frühen Embryogenese  
beim Rind**

Dissertation

an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

angefertigt am Lehrstuhl für Tieranatomie II,  
insbesondere Allgemeine Anatomie, Histologie und Embryologie  
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz)

vorgelegt von

**Sandra Leidenfrost**

aus München

**Zellentwicklung, Zelltod und die Expression Apoptose-assoziiierter Gene in der frühen Embryogenese beim Rind.**

Dissertation an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

eingereicht von  
Dipl. Biologin Sandra Leidenfrost  
aus München

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Prof. Dr. George Boyan

Betreuer der Arbeit:

Prof. Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz  
Dr. Felix A. Habermann

Datum der mündlichen Prüfung: 11.06.2010

**Der Inhalt eines Werkes findet seinen Ausdruck  
in der Komposition, das heißt  
in der innerlich organisierten Summe  
der in diesem Falle notwendigen Spannungen.**

***Wassily Kandinski***

***(1866 - 1944)***

**für**

**Lars & meine Familie**

| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>   | <b>SEITE</b> |
|---|--------------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....                                    | <b>8</b>     |
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....                                    | <b>12</b>    |
| <b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>14</b>    |
| <b>SUMMARY</b> .....  | <b>16</b>    |
| <b>2 EINLEITUNG</b> .....   | <b>18</b>    |
| <b>2.1 Ziele der Arbeit</b> .....                                     | <b>19</b>    |
| <b>2.2 Die frühe Embryonalentwicklung beim Rind</b> .....             | <b>20</b>    |
| <b>2.3 Die Embryonalentwicklung und -kultur <i>in vitro</i></b> ..... | <b>25</b>    |
| <b>2.4 Der Zelltod</b> .....  | <b>27</b>    |
| 2.4.1 Apoptose.....   | 27           |
| 2.4.2 Zelluntergänge im frühen Embryo .....                           | 32           |
| <b>2.5 Genexpression im frühen Embryo</b> .....                       | <b>35</b>    |
| 2.5.1 Genomaktivierung .....  | 35           |
| 2.5.2 Zusammensetzung der Transkripte.....                            | 37           |
| 2.5.3 Mechanismen zur Regulation maternaler Transkripte .....         | 38           |
| 2.5.4 Transkript-Analysen an Eizellen und frühen Embryonen .....      | 39           |
| 2.5.4.1 Daten zur Expression Apoptose-assoziiierter Gene .....        | 42           |
| <b>2.6 Quantitative Real-Time RT-PCR (RT-qPCR)</b> .....              | <b>44</b>    |
| <b>2.7 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)</b> .....           | <b>45</b>    |
| <b>2.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)</b> .....            | <b>46</b>    |
| <b>2.9 Methodischer Ansatz</b> .....                                  | <b>47</b>    |
| <b>2.10 Auswahl der Gene</b> .....                                    | <b>48</b>    |
| <b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....                                  | <b>50</b>    |
| <b>3.1 Herstellung boviner Embryonen</b> .....                        | <b>50</b>    |
| 3.1.1 <i>In vitro</i> Produktion .....                                | 50           |
| 3.1.2 <i>Ex vivo</i> Gewinnung .....                                  | 54           |
| <b>3.2 Stereomikroskopische Klassifizierung der Embryonen</b> .....   | <b>56</b>    |

|   |           |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS  | 5         |
| <b>3.3 Dreidimensionale Analyse mittels konfokaler Mikroskopie</b>        | <b>59</b> |
| 3.3.1 Fixierung der Embryonen   | 59        |
| 3.3.2 Nachweis von DNA-Strangbrüchen mit TUNEL                            | 59        |
| 3.3.3 DNA-Färbung   | 60        |
| 3.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz  | 61        |
| 3.3.5 Einbettung der Embryonen  | 62        |
| 3.3.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)                          | 64        |
| 3.3.7 Quantitative Analyse  | 65        |
| 3.3.7.1 Zellzahl  | 65        |
| 3.3.7.2 Zellkerngröße   | 66        |
| 3.3.7.3 Zelluntergänge  | 67        |
| <b>3.4 Ultrastrukturelle Analyse mittels TEM</b>                          | <b>67</b> |
| 3.4.1 Fixierung und Einbettung der Embryonen                              | 67        |
| 3.4.2 Herstellung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten               | 69        |
| 3.4.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)                           | 69        |
| <b>3.5 Analyse der mRNA-Expression Apoptose-assoziiierter Gene</b>        | <b>70</b> |
| 3.5.1 Primer-Design   | 71        |
| 3.5.2 Herstellung von Transkript-spezifischen Plasmid-DNA-Standards       | 72        |
| 3.5.2.1 Amplifikation von Transkript-spezifischen DNA-Fragmenten aus cDNA | 73        |
| 3.5.2.2 Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente                       | 76        |
| 3.5.2.3 Selektion rekombinanter Bakterienklone                            | 77        |
| 3.5.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA  | 77        |
| 3.5.2.5 Photometrische Quantifizierung von DNA                            | 78        |
| 3.5.2.6 Überprüfung der klonierten DNA-Fragmente                          | 78        |
| 3.5.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA-Standards                        | 80        |
| 3.5.3 Vorbereitung der Proben   | 81        |
| 3.5.3.1 Gesamt-RNA-Isolierung   | 81        |
| 3.5.3.2 Reproduzierbarkeit der RNA-Isolierung                             | 82        |
| 3.5.3.3 Reverse Transkription in cDNA                                     | 83        |
| 3.5.4 Quantitative Real-Time RT-PCR (RT-qPCR)                             | 84        |
| 3.5.4.1 Transkript-Quantifizierung  | 86        |
| <b>3.6 Bildverarbeitung</b>   | <b>89</b> |
| <b>3.7 Statistische und graphische Auswertung</b>                         | <b>89</b> |

|  |            |
|--|------------|
| INHALTSVERZEICHNIS   | 6          |
| <b>4 ERGEBNISSE</b> .....  | <b>90</b>  |
| <b>4.1 <i>In vitro</i> Fertilisation und Embryokultur</b> .....  | <b>90</b>  |
| <b>4.2 Gewinnung von <i>in vivo</i> Embryonen</b> .....  | <b>93</b>  |
| <b>4.3 Heterogene Entwicklung früher Embryonen</b> .....   | <b>94</b>  |
| 4.3.1 Zellzahlen und Zelluntergänge .....  | 94         |
| 4.3.1.1 Der Nachweis von Zelluntergängen .....   | 96         |
| 4.3.1.2 Zellzahlen und Zelluntergänge von Tag 3 bis 7 <i>in vitro</i> .....  | 98         |
| 4.3.1.3 Zellzahlen und Zelluntergänge in Tag 6 und 7 Blastozysten <i>in vitro</i> .....  | 104        |
| 4.3.1.4 Zellzahlen und Zelluntergänge in Morulae und Blastozysten <i>in vitro/in vivo</i>  | 107        |
| 4.3.2 Früher Blastomeren-Arrest.....   | 109        |
| 4.3.3 Entwicklung der Kerngröße <i>in vitro</i> .....  | 110        |
| <b>4.4 mRNA-Expression von Apoptose-assoziierten Genen</b> .....   | <b>112</b> |
| 4.4.1 Identifizierung der klonierten DNA-Fragmente.....  | 112        |
| 4.4.2 Bestimmung der absoluten Kopienzahl mittels RT-qPCR .....  | 113        |
| 4.4.3 Nachweis der externen Standard-RNA .....   | 114        |
| 4.4.4 Transkript-Profile von Apoptose-assoziierten Genen <i>in vitro</i> .....   | 115        |
| 4.4.5 Vergleich von mRNA-Abundanzen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....   | 122        |
| <b>4.5 Lokalisation von Proteinen aktiver Apoptose-assoziiierter Gene</b> .....  | <b>125</b> |
| <b>4.6 Ultrastrukturelle Differenzierung auf der Ebene einzelner Zellen</b> .....  | <b>128</b> |
| 4.6.1 Heterogene Entwicklung <i>in vitro</i> .....   | 129        |
| 4.6.1.1 Entwicklung von Nucleoli und Mitochondrien .....   | 129        |
| 4.6.1.2 Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten .....   | 132        |
| 4.6.1.3 Zelluntergänge.....  | 134        |
| 4.6.2 Vergleich der Ultrastruktur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....   | 136        |
| <b>5 DISKUSSION</b> .....  | <b>139</b> |
| <b>5.1 Heterogenität und Variabilität der Entwicklung individueller Embryonen -<br/>  Lösungsansatz für ein kniffliges Problem</b> ..... | <b>139</b> |
| 5.1.1 Vorteile und Grenzen der Beobachtung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....  | 139        |
| 5.1.2 Bestimmung des tatsächlichen Entwicklungsstandes: die Verknüpfung<br>morphologischer und molekularer Daten .....                   | 141        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>5.2</b> | <b>Entwicklung der Zellzahl und Inzidenz von Zelltod.....</b>  | <b>141</b> |
| 5.2.1      | Das Entwicklungspotential von Embryonen .....  | 141        |
| 5.2.2      | Identifizierung und Quantifizierung von Zelluntergängen.....   | 142        |
| 5.2.3      | Hinweise auf programmierten Zelltod .....  | 143        |
| 5.2.4      | Die Bedeutung von Zelluntergängen im frühen Embryo .....   | 144        |
| <b>5.3</b> | <b>Der Entwicklungsstop/Arrest/Tod/Verlust einzelner früher Blastomeren<br/>vor/während der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms.....</b> | <b>146</b> |
| 5.3.1      | Mögliche Ursachen für einen Entwicklungsstop früher Blastomeren vor bzw.<br>während der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms .....        | 148        |
| <b>5.4</b> | <b>Transkript-Abundanz-Profile von Apoptose-assoziierten Genen .....</b>   | <b>149</b> |
| 5.4.1      | Technische Limitationen der RT-qPCR.....   | 150        |
| 5.4.2      | Zur Interpretation von Transkript-Kopienzahlen .....   | 152        |
| 5.4.3      | Diskussion der Kopienzahlen <i>in vitro</i> .....  | 154        |
| 5.4.4      | Vergleich der Kopienzahlen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....  | 158        |
| 5.4.5      | mRNA-Kopienzahl - funktionale Relevanz/Protein-Abundanz?.....  | 160        |
| <b>6</b>   | <b><i>FAZIT und AUSBLICK</i> .....</b>   | <b>162</b> |
| <b>7</b>   | <b><i>LITERATURVERZEICHNIS</i>.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>8</b>   | <b><i>ANHANG</i>.....</b>  | <b>181</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Herstellung von IVP-Stamm-Medien .....</b>  | <b>181</b> |
| <b>8.2</b> | <b>Quantitative Parameter der Embryo-Gewinnung .....</b>   | <b>184</b> |
| <b>8.3</b> | <b>Transkript-Abundanzen (absolute Kopienzahlen).....</b>  | <b>186</b> |
| 8.3.1      | Externer Standard .....  | 186        |
| 8.3.2      | Referenz-/Apoptose-assoziierte Transkripte .....   | 187        |
| <b>8.4</b> | <b>Sequenzanalyse der Transkript-spezifischen DNA-Fragmente .....</b>  | <b>193</b> |
| <b>8.5</b> | <b>Quantitative Parameter der Embryonen für TEM-Analysen.....</b>  | <b>196</b> |
|            | <b><i>DANKSAGUNG</i>.....</b>  | <b>197</b> |
|            | <b><i>LEBENS LAUF</i>.....</b>   | <b>199</b> |
|            | <b><i>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</i> .....</b>  | <b>202</b> |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****Chemikalien**

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Aqua dest.                       | Aqua destillata   |
| BSA                              | Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)                 |
| CaCl <sub>2</sub>                | Calziumchlorid  |
| CO <sub>2</sub>                  | Kohlendioxid  |
| DAPI                             | 4',6'-Diamidino-2-phenyl-indol                              |
| DMSO                             | Dimethylsulfoxid  |
| DTT                              | Dithiothreitol  |
| EDTA                             | Ethylendiamintetraessigsäure                                |
| FITC                             | Fluorescein-5-isothiocyanat                                 |
| FSH                              | Follikel-stimulierendes Hormon                              |
| KCl                              | Kaliumchlorid   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Kaliumhydrogenphosphat                                      |
| LB                               | Luria Bertani   |
| LH                               | Luteinisierendes Hormon                                     |
| MgCl <sub>2</sub>                | Magnesiumchlorid  |
| N <sub>2</sub>                   | Stickstoff  |
| NaCl                             | Natriumchlorid  |
| NaHCO <sub>3</sub>               | Natriumhydrogencarbonat                                     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Natriumdihydrogenphosphat                                   |
| NaOH                             | Natriumhydroxid   |
| O <sub>2</sub>                   | Sauerstoff  |
| OCS                              | Östrogen-Rinderserum (oestrous cow serum)                   |
| OH                               | Hydroxid  |
| PBS                              | Phosphatpuffer  |
| PFA                              | Paraformaldehyd   |
| PVP                              | Polyvinylpyrrolidon   |
| SDS                              | Natriumdodecylsulfat  |
| SSC                              | Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (sodium saline citrate) |
| STS                              | Staurosporin  |
| TAE                              | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                                     |
| Tris                             | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol                   |
| TRITC                            | Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanat                         |
| Triton-X-100                     | Octylphenol-decaethylen-glycolether                         |
| x-Gal                            | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galacto-pyranosid              |



**Nukleinsäuren**

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| cDNA      | complementary DNA            |
| DNA       | Desoxyribonucleinsäure       |
| dATP      | Desoxyadenosintriphosphat    |
| dCTP      | Desoxycytidintriphosphat     |
| dNTP      | Desoxynucleosidtriphosphat   |
| ddNTP     | Didesoxynucleosidtriphosphat |
| dGTP      | Desoxyguanosintriphosphat    |
| dTTP      | Desoxythymidintriphosphat    |
| dUTP      | Desoxyuridintriphosphat      |
| RH-Primer | Random Hexamer-Primer        |
| mRNA      | messenger RNA                |
| RNA       | Ribonucleinsäure             |

**Enzyme**

|       |                                       |
|-------|---------------------------------------|
| DNase | Desoxyribonuclease                    |
| RNase | Ribonuclease                          |
| Taq   | Thermus aquaticus                     |
| TdT   | Terminal-deoxynucleotidyl-Transferase |
| UNG   | Uracil-N-Glycosylase                  |

**Maßeinheiten**

|      |                             |
|------|-----------------------------|
| °C   | Grad Celsius                |
| bp   | Basenpaar                   |
| dpi  | Punktdichte (dots per inch) |
| g    | Gramm                       |
| g    | Gravidation                 |
| h    | Stunde                      |
| Hg   | Druck                       |
| IU   | Internationale Einheit      |
| kB   | kilo-Basen                  |
| l    | Liter                       |
| M    | Molar                       |
| mg   | Milligramm                  |
| mM   | Millimolar                  |
| min  | Minute                      |
| Mio. | Million                     |

---

|     |                                   |
|-----|-----------------------------------|
| ml  | Milliliter                        |
| ng  | Nanogramm                         |
| OD  | Optische Dichte                   |
| rpm | Drehzahl (revolutions per minute) |
| RT  | Raumtemperatur                    |
| sec | Sekunde                           |
| µg  | Mikrogramm                        |
| µl  | Mikroliter                        |
| µM  | Mikromolar                        |
| µm  | Mikrometer                        |
| v/v | Volumen pro Volumen               |
| m/v | Masse pro Volumen                 |

**Gen-Symbol**

|                 |  |
|-----------------|--|
| <i>BAX</i>      | BCL2-associated X protein                          |
| <i>BCL2</i>     | B-cell CLL/lymphoma 2                              |
| <i>BCL2L1</i>   | BCL2-like 1  |
| <i>BIRC4</i>    | Baculoviral IAP repeat-containing 4                |
| <i>CASP3</i>    | Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase    |
| <i>CASP8</i>    | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase    |
| <i>CASP9</i>    | Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase    |
| <i>FAS</i>      | TNF receptor superfamily, member 6                 |
| <i>FASLG</i>    | Fas ligand, TNF superfamily, member 6              |
| <i>H2AFZ</i>    | Histon 2A family, member Z                         |
| <i>HBA</i>      | Hämoglobin alpha                                   |
| <i>STAT3</i>    | signal transducer and activator of transcription 3 |
| <i>18S rRNA</i> | 18S ribosomale RNA                                 |

**Techniken**

|      |   |
|------|---|
| AI   | Künstliche Besamung (artificial insemination) |
| ART  | Assistierte Reproduktionstechniken            |
| CLSM | Konfokale Laserscanning-Mikroskopie           |
| ET   | Embryo-Transfer                               |
| IVC  | <i>In vitro</i> Kultur                        |
| IVF  | <i>In vitro</i> Fertilisation                 |
| IVM  | <i>In vitro</i> Maturation                    |
| IVP  | <i>In vitro</i> Produktion                    |

---

|         |   |
|---------|---|
| PCR     | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| RT      | Reverse Transkription                                 |
| RT-qPCR | Quantitative Real-Time Reverse Transkription PCR      |
| SOF     | Synthetic oviduct fluid                               |
| TALP    | Tyrode-Albumin-Lactat-Pyruvat                         |
| TEM     | Transmissions-Elektronenmikroskopie                   |
| TUNEL   | TdT mediated dUTP Nick End Labeling                   |

**Sonstiges**

|          |  |
|----------|--|
| Abb.     | Abbildung  |
| Acc.-ID. | Accession Identification                                 |
| AT       | Adenin und Thymin  |
| BFZF     | Bayerischen Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie |
| bzw.     | beziehungsweise  |
| ca.      | circa  |
| COCs     | Cumulus-Eizell-Komplexe (cumulus oocyte complexes)       |
| CT       | Schwellenwert (threshold cycle)                          |
| DVF      | Deutsches Fleckvieh                                      |
| d. h.    | das heißt  |
| ds       | doppelsträngig   |
| etc.     | et cetera (deutsch: <i>und so weiter</i> )               |
| et al.   | et alii (deutsch: <i>und andere</i> )                    |
| IAP      | Inhibitor der Apoptose (inhibitor of apoptosis)          |
| ICM      | Innere Zellmasse (inner cell mass)                       |
| IETS     | International Embryo-Transfer Society                    |
| LfL      | Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft               |
| LMU      | Ludwig-Maximilians-Universität                           |
| max.     | maximal  |
| PCD      | Programmierter Zelltod (programmed cell death)           |
| PB       | Polkörper (polar body)                                   |
| Tab.     | Tabelle  |
| TB       | Trophoblast  |
| u. a.    | unter anderem  |
| UFOs     | nicht befruchtete Eizellen (unfertilized oocytes)        |
| v. a.    | vor allem  |
| z. B.    | zum Beispiel   |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 1: Fertilisation und Präimplantations-Entwicklung bis zur Blastozyste beim Rind.....   | 24  |
| Abbildung 2: Bedeutsame Apoptose-Signalwege .....  | 31  |
| Abbildung 3: RNA-Synthese im frühen Embryo beim Rind .....   | 36  |
| Abbildung 4: Abundanz maternaler und embryonaler Transkripte von der Eizelle bis zur Blastozyste<br>beim Rind .....                                | 38  |
| Abbildung 5: Experimenteller Ansatz .....  | 48  |
| Abbildung 6: Auswahl von Apoptose-assoziierten Genen .....   | 49  |
| Abbildung 7: Einbettung und Analyse der Embryonen mittels CLSM.....  | 64  |
| Abbildung 8: Montage der Bildstapel einer Tag 7 expandierten Blastozyste.....  | 66  |
| Abbildung 9: Analyse der mRNA-Expression Apoptose-assoziiierter Gene .....   | 70  |
| Abbildung 10: <i>BCL2L1</i> -Sequenz für das Rind.....   | 72  |
| Abbildung 11: Herstellung von Transkript-spezifischen Plasmid-cDNA-Standards .....   | 72  |
| Abbildung 12: Amplifikationsgraphiken des BAX-spezifischen DNA-Standards .....   | 87  |
| Abbildung 13: Standardgerade für die absolute Quantifizierung BAX-spezifischer Transkripte .....   | 88  |
| Abbildung 14: Dissoziationskurven des BAX-Amplikons .....  | 89  |
| Abbildung 15: Stereomikroskopische Klassifizierung von Rinderembryonen .....   | 92  |
| Abbildung 16: Prototypen der stereomikroskopisch definierten 15 Entwicklungsstadien von Tag 3 bis<br>7 nach IVF .....                              | 95  |
| Abbildung 17: Nachweis von Zelluntergängen nach DNA-Färbung mit DAPI und TUNEL.....  | 97  |
| Abbildung 18: Heterogene Entwicklung der Zellzahl innerhalb der 15 verschiedenen<br>Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 <i>in vitro</i> .....      | 100 |
| Abbildung 19: Zelluntergänge innerhalb der 15 verschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 <i>in<br/>vitro</i> .....                          | 101 |
| Abbildung 20: Zellzahlen und Zelluntergänge in nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten und<br>schlüpfenden Tag 7 Blastozysten <i>in vitro</i> .....  | 106 |
| Abbildung 21: Heterogene Entwicklung von Zellen eines Tag 5 (120 h) IVF-Embryos.....   | 110 |
| Abbildung 22: Identifizierung klonierter Zielsequenzen im Agarosegel nach Behandlung der Plasmid-<br>DNA mit <i>EcoRI</i> .....                    | 113 |
| Abbildung 23: Nachweis von Hämoglobin- $\alpha$ (HBA)-mRNA in Rinder-Eizellen.....   | 115 |
| Abbildung 24: Heatmap von Transkript-Abundanzen in <i>in vitro</i> gereiften Eizellen und Tag 3 bis 7 IVF-<br>Embryonen.....                       | 116 |
| Abbildung 25: Transkript-Abundanz-Profile von 18S rRNA und H2AFZ in gereiften Eizellen und<br>Embryonen von Tag 3 bis 7 <i>in vitro</i> .....      | 118 |
| Abbildung 26: Transkript-Abundanz-Profile Apoptose-assoziiierter Gene in gereiften Eizellen und<br>Embryonen von Tag 3 bis 7 <i>in vitro</i> ..... | 122 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 27: Kopienzahlen pro intakte Zelle in Morulae und Blastozysten <i>in vitro und in vivo</i> .....  | 125 |
| Abbildung 28: Nachweis von STAT3-Protein in einer Tag 6 IVF-Blastozyste .....   | 126 |
| Abbildung 29: Nachweis aktivierter Caspase 3-Protein in einer Tag 6 IVF-Blastozyste.....  | 128 |
| Abbildung 30: Nucleoli-Strukturen in Tag 4 Embryonen <i>in vitro</i> .....  | 130 |
| Abbildung 31: Mitochondrien-Strukturen in Tag 3 und 6 Embryonen <i>in vitro</i> .....   | 132 |
| Abbildung 32: Zell-Zell-Kontakte im Trophoblast .....   | 133 |
| Abbildung 33: Zelluntergänge in Tag 3 Embryonen und Tag 6 Blastozyste <i>in vitro</i> .....   | 135 |
| Abbildung 34: Ultrastrukturelle Merkmale expandierter Blastozysten <i>in vitro und in vivo</i> .....  | 136 |
| Abbildung 35: Ultrastrukturelle Heterogenität in Blastozysten <i>in vitro</i> .....   | 137 |
| Abbildung 36: Ultrastrukturelle Heterogenität in Blastozysten <i>in vivo</i> .....  | 138 |
| Abbildung 37: Schema des Entwicklungsstops früher Blastomeren vor bzw. während der Haupt-<br>Genomaktivierung im Embryo (beim Rind im 4. Zellzyklus)..... | 147 |
| Abbildung 38: Früher Blastomeren-Arrest in einem Tag 5 IVF-Embryo .....   | 149 |
| Abbildung 39: Stereomikroskopisch erheblich entwicklungsverzögerte bzw. degenerierte Rinder-<br>embryonen an Tag 3 bis 7 <i>in vitro</i> .....            | 164 |

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Eines der Hauptprobleme der Reproduktion beim Rind (und anderen Säugetier-Spezies) ist die hohe Rate an Embryoverlusten noch vor der Implantation. Voraussetzung für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze für Fruchtbarkeitsstörungen ist ein besseres Verständnis von Schlüsselprozessen der frühen Embryonalentwicklung wie die Regulation der ersten Zellteilungen, die Aktivierung des embryonalen Genoms, die Ausbildung von Zellorganellen und schließlich das Auftreten und die Regulation von programmiertem Zelltod.

Für eine Identifizierung und Aufklärung kritischer Entwicklungsschritte und deren Kontrollpunkte (checkpoints) auf der Ebene einzelner Blastomeren und der Identifizierung von Markern für eine normale bzw. gestörte Entwicklung wurde systematisch die Entwicklung von *in vitro* fertilisierten (IVF) und -kultivierten Rinderembryonen bis zum Blastozystenstadium analysiert. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden kombiniert mit absoluter, quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) zur Bestimmung der mRNA-Kopienzahlen ausgewählter Gene, die bei der Initiation, Regulation und Exekution von Apoptose vermutlich von entscheidender Bedeutung sind. Optische Serienschnitte von dreidimensional konservierten „whole-mount“ Embryonen dienen als Grundlage zur Bestimmung von Anzahl, Größe und Struktur der Zellkerne sowie zur Identifizierung und Lokalisierung von Zelluntergängen. Für eine bessere Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert, die nach hormonell induzierter Superovulation am Tag 7 nach künstlicher Besamung durch nicht-invasive Spülung der Uterushörner aus Spendertieren isoliert wurden.

Der Beginn der embryonalen Entwicklung beim Rind ist gekennzeichnet durch eine enorme Heterogenität hinsichtlich der Entwicklung der Zellzahl und dem Auftreten von Zelluntergängen sowohl unter standardisierten Bedingungen *in vitro* als auch *in vivo*. Der Teilungsstopp und Verlust von frühen Blastomeren vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung (beim Rind im vierten Zellzyklus) beeinflusst kritisch den Anstieg der Zellzahl und die weitere Entwicklung des Embryos. Die Ursachen für die heterogene Entwicklung der einzelnen Embryonen sind vor allem im unterschiedlichen Entwicklungspotential der Eizellen und Spermien zu suchen. Eine hohe Inzidenz von Zelluntergängen (mit morphologischen Kennzeichen von Apoptose) in der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten *in vitro* und *in vivo* bei intaktem Trophoblast (TB) legt nahe, dass programmierter Zelltod bei der Entwicklung der ICM eine wichtige physiologische Rolle, etwa im Rahmen eines morphogenetischen „cell sorting“,

spielt. Der elektronenmikroskopische Nachweis sekundärer Lysosomen mit Chromatin-Resten ist ein starkes Indiz für eine kontrollierte Beseitigung von untergegangenen Zellen durch Nachbarzellen.

Transkript-spezifische Abundanz-Profile machen deutlich, dass der Abbau maternaler und der Anstieg embryonaler Transkripte im Verlauf der ersten Zellteilungen graduell und für jedes Gen unterschiedlich ablaufen. Ein Anstieg der Gesamt-Kopienzahl von der Morula zur schlüpfenden Blastozyste beruht vor allem auf einer Zunahme der Zellzahl. Fehlende bzw. niedrige Transkript-Abundanzen sprechen gegen eine Bedeutung des FAS/FASLG-Signalweges vor dem Blastozystenstadium. Das schliesst aber nicht aus, dass eine extrinsische Aktivierung von programmiertem Zelltod durch andere Death-receptor/ligand-Systeme im frühen Embryo von Bedeutung ist.

## SUMMARY

Preimplantation embryo death is a major reproductive problem in cattle and other mammalian species. A better understanding of key processes of the early embryonic development such as the regulation of the first cell divisions, epigenetic reprogramming, embryonic genome activation, organelle formation and the regulation of programmed cell death is important to improve fertility in cattle.

Therefore we started a systematic investigation of bovine embryos fertilized and grown *in vitro* up to the blastocyst stage. The main objectives were: a) to disclose critical steps and checkpoints at the blastomere level and b) to learn to distinguish between normal or abnormal development. Confocal laserscanning microscopy (CLSM) and transmission electron microscopy (TEM) were combined with absolute quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) to determine mRNA copy numbers for a series of genes, which might be critically involved in the initiation, regulation and execution of apoptosis. Optical serial sections of three-dimensionally preserved whole-mount specimen provided the basis to assess the developmental status by analyzing the embryo architecture, number and size of blastomere nuclei as well as the occurrence of cells with morphological signs of developmental arrest and/or cell death. To evaluate the relevance of the *in vitro* observations, the study was extended to *in vivo* embryos generated by superovulation and artificial insemination and recovered by non-invasive uterine flushing.

Under strictly standardized conditions *in vitro* and *in vivo*, the beginning of bovine embryonic development is characterized by an enormous heterogeneity between individual embryos with regard to the cell number increase and the incidence of cell death. Early blastomere arrest and loss prior to/around major genome activation (during the 4th cell cycle) critically affect the cell number increase and the fate of the embryo. Both *in vitro* and *in vivo* blastocysts showed a high incidence of cell death with morphological signs of apoptosis in the inner cell mass (ICM), while the cell death rate in the trophoblast was very low. Regularly, secondary lysosomes containing chromatin fragments were found by TEM analysis indicating a controlled removal of dying/dead cells by neighbouring cells. This raises numerous important questions about morphogenetic cell sorting and programmed cell death in the ICM at this early stage.

The particular mRNA profiles are characterized by a gradual and transcript-specific degradation of maternal transcripts and increase of embryonic transcripts up to the hatching blastocyst. Notably, the increase of total transcript copy numbers from the morula to the hatching



blastocyst is often primarily due to the increase of the cell number. The absence or very low abundance of transcripts for FAS, FASLG and CASP8 *in vitro* and *in vivo* strongly argues against a relevant role of this extrinsic apoptosis induction pathway before blastocyst formation. However, extrinsic activation of programmed cell death might be mediated by other death-receptor/ligand-systems.

## 2 EINLEITUNG

Die hohe Rate an Embryoverlusten noch vor der Implantation zwischen Tag 8. und 17. nach der Befruchtung beim Rind ist ein wirtschaftlich bedeutsames Phänomen (Wolf et al., 2003). Zusätzlich auftretende Fruchtbarkeitsstörungen, v. a. bei Hochleistungs-Milchkühen, sind für die Reproduktion und Zucht von Nachkommen mit geeigneten Leistungsmerkmalen von großer ökonomischer Bedeutung. Für eine Bewältigung der Fertilitätsstörungen und einer Verbesserung der Effizienz der Reproduktion beim Rind werden routinemäßig und mit wachsender Bedeutung verschiedene assistierte Reproduktionstechniken (assisted reproductive technologies, ARTs) angewandt. Dazu zählen neben der künstlichen Besamung (artificial insemination, AI) vor allem die *in vitro* Fertilisation, Superovulation und Embryotransfer (ET) sowie das Klonieren durch Zellkerntransfer. Niedrige Raten an Graviditäten bzw. gesunder Nachkommen nach dem Transfer von Embryonen aus verschiedenen ART-Techniken in Empfängertiere beim Rind (und anderen Säugetierspezies) machen jedoch deutlich, dass die entscheidenden Regulationsmechanismen der frühen Embryonalentwicklung noch weitgehend unverstanden sind. Für eine Verbesserung der Therapie-Möglichkeiten von Fruchtbarkeitsstörungen und assistierter Reproduktionstechniken ist ein besseres Verständnis von ablaufenden Schlüsselprozessen der frühen Embryonalentwicklung, wie die Regulation der ersten Zellteilungen, die epigenetische Reprogrammierung, die Aktivierung des embryonalen Genoms, die Ausbildung von Zellorganellen sowie das Auftreten und die Regulation von programmiertem Zelltod von Bedeutung. Gleichzeitig müssen geeignete Parameter identifiziert werden, um eine normale und abnormale Entwicklung von Embryonen sicher zu unterscheiden.

Als Modell für die Reproduktionsmedizin beim Menschen gewinnt die bovine Eizell- und Embryonalentwicklung zunehmend wissenschaftliche Akzeptanz. Die gesteigerte Nachfrage und Anwendung künstlicher Befruchtungstechniken beim Menschen beruhen u. a. auf einem zunehmenden Anstieg des reproduktiven Alters in Folge kultureller, sozialer und wirtschaftlicher Faktoren. Genetische Veränderungen und der Einfluss von Umweltfaktoren sind Ursachen für eine abnehmende Fertilität mit steigendem Alter.

Das Rind hat mit dem Menschen gemeinsam, dass in der Regel nur eine Eizelle pro Zyklus produziert wird. Zudem findet die Aktivierung des embryonalen Genoms und die Ausbildung der Blastozyste bei Rind und Mensch zu ähnlichen Zeitpunkten nach Fertilisation statt (Baumann et al., 2007; Wrenzycki et al., 2005).

## 2.1 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer systematischen Analyse von Rinderembryonen begonnen. Schwerpunkte der Untersuchung waren:

- die Visualisierung der frühen Embryonalentwicklung bis zur Blastozyste.
- die Identifizierung und Aufklärung kritischer Schritte und Regulationsmechanismen (checkpoints) auf der Ebene einzelner Blastomeren.
- die Analyse der räumlichen und zeitlichen Expression von Schlüsselgenen und -proteinen.
- die Bestimmung absoluter Transkript-Abundanzen pro Zelle.

Langfristiges Ziel ist die Identifizierung von zuverlässigen Parametern für eine Unterscheidung zwischen normaler und abnormaler Entwicklung von Embryonen.

Dafür wurden *in vitro* fertilisierte (IVF) und -kultivierte (IVC) Rinderembryonen an Tag 3 (72 h) bis Tag 7 (168 h) nach Zugabe der Spermien mit einer Kombination aus konfokaler Laser-scanning-Mikroskopie (CLSM), Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und quantitativer Real-Time Reverse Transkription (RT)-PCR (RT-qPCR) für eine Reihe von Genen mit Funktionen bei der Initiation, Regulation und Exekution der Apoptose systematisch untersucht. Als zentrale morphologische Parameter zur Bestimmung des Entwicklungspotentials wurden analysiert:

- die Zellzahl
- das Auftreten von Zelluntergängen
- räumliche und zeitliche Zellteilungsmuster
- ultrastrukturelle Differenzierungen

Für eine bessere Beurteilung der Relevanz der Beobachtungen zur embryonalen Entwicklung *in vitro* wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert, die nach hormonell induzierter Superovulation und künstliche Besamung am Tag 7 nicht-invasiv durch Spülung der Uterushörner gewonnen wurden.

## 2.2 Die frühe Embryonalentwicklung beim Rind

Der Zeitraum von der Befruchtung der gereiften Eizelle bis zur Einnistung der geschlüpften Blastozyste in die Uterusschleimhaut (Endometrium) wird als Präimplantationsentwicklung bezeichnet. Sie umfasst beim Rind einen Zeitraum von etwa 17 - 18 Tagen. In diesem kurzen Zeitraum finden grundlegende entwicklungsbiologische Weichenstellungen statt. Dazu zählen u.a. die epigenetische Reprogrammierung und Bildung totipotenter Zellen, die Aktivierung des embryonalen Genoms, die Ausbildung von Zellkontakten und die Entwicklung von Embryoblast und Trophoblast.

Im 21-tägigen Zyklus geschlechtsreifer Rinder kommt es zum periodischen Heranreifen einer kleinen Gruppe von Primär-Follikeln mit der Ausbildung eines dominanten Follikels (10 - 15 mm) unter Einfluss von follikelstimulierendem Hormon (FSH) (Fortune, 1994). In diesem Zeitraum wächst die im Follikel enthaltene Eizelle auf eine Größe von 110 - 140  $\mu\text{m}$  heran (Fair et al., 1995) und legt ein Reservoir von verschiedenen RNA-Molekülen und Proteinen an, die für den meiotischen Reifungsprozess und die Entwicklungskompetenz im Falle einer Befruchtung wichtig sind (Bachvarova, 1992). Ultrastrukturelle Kennzeichen für die hohe metabolische Aktivität der wachsenden Eizelle sind (1) funktionsfähige Nukleoli im Kern, (2) eine hohe Anzahl Mitochondrien mit vielen Cristae sowie (3) deutlich entwickelte Golgi-Felder und Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums (Hyttel et al., 1986; Motlik et al., 1984). Die Eizelle ist seit der fetalen Anlage in der Prophase der ersten Reifeteilung arretiert und durch die Ausbildung des Germinalvesikels (GV) als nukleäre Struktur charakterisiert (Wassarman et al., 1976). Unter dem Einfluss von luteinisierendem Hormon (LH) entwickelt sich der dominante Follikel zum sprungreifen Follikel, der als „Graafscher Follikel“ bezeichnet wird. Um die Eizelle wird die Zona pellucida (ZP), eine transparente schützende Glykoprotein-Hülle, ausgebildet (Abb. 1). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der spezifischen Erkennung und Bindung des Spermiums durch die Eizelle. Gleichzeitig sind Veränderungen in der Struktur und Konsistenz der Zona pellucida („Zona-Reaktion“) bedeutsam für die Verhinderung einer Polyspermie (Rüsse and Sinowatz, 1998).

### Die Eizellreifung

Vor der Ovulation findet ein meiotischer und zytoplasmatischer Reifeprozess der Eizelle statt. Die Reifung wird durch eine präovulatorische LH-Ausschüttung eingeleitet (Tsafiriri et al., 1976) und ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung. Im Prophase I-arretierten Zellkern der Eizelle kommt es zum Abbau der Nukleoli und zur Auflösung der Kernmembran,

dem „Germinal-Vesikel Breakdown“ (GVB). Die Eizelle beendet die erste Reifeteilung: die gepaarten homologen Chromosomen kondensieren, ordnen sich in der Metaphase-Ebene an (Hyttel et al., 1987; Wassarman et al., 1976) und werden getrennt. Ein haploider Satz von Chromosomen, bestehend aus je zwei Chromatiden, wird als erster Polkörper (PB) in den perivitellinen Spalt zwischen Eizelle und Zona pellucida abgegeben (Abb. 1). Unmittelbar danach tritt die Eizelle in die zweite Reifeteilung ein und wird in der Metaphase II erneut arretiert. Beim Rind wird die Eizelle im Stadium des Metaphase II-Arrest ovuliert, umgeben von der Zona pellucida und Zellen des Cumulus oophorus des Follikels. Nur im Falle einer Befruchtung wird die zweite Reifeteilung beendet: die Chromatiden der in der Eizelle verbliebenen Chromosomen werden getrennt und ein zweiter Polkörper wird abgeschnürt (Dekel, 2005). In der befruchteten Eizelle, der Zygote, verbleibt ein haploider Satz maternaler Chromosomen, bestehend aus je einer Chromatide und entwickelt sich zum weiblichen Vorkern. Im Zuge der zytoplasmatischen Reifung kommt es zur Umverteilung von intrazellulären Komponenten sowie zu einem Anstieg von Lipid-Einlagerungen. Die Golgi-Felder werden reduziert (Hyttel et al., 1986) und die Mitochondrien ins Zentrum der Eizelle verlagert (Stojkovic et al., 2001). In den Golgi-Feldern gebildete kortikale Granula ordnen sich direkt unterhalb der Eizellmembran an. Das ist für die Ausbildung eines Polyspermie-Blocks bei der Befruchtung von großer Bedeutung (Ducibella et al., 1977). Neben einer sekundenschnellen Depolarisation der Eizell-Oberfläche („rapid polyspermy block“) kann das Eindringen weiterer Spermien über eine Kalzium-abhängige Extrusion des proteolytisch wirkenden Inhaltes kortikaler Granula in den perivitellinen Raum zwischen Eizelle und Zona pellucida längerfristig blockiert werden (Ducibella et al., 1993).

#### Bildung der diploiden Zygote

Die Befruchtung findet bei Säugetieren in der Ampulle des Eileiters statt. Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ist ein Reifeprozess, der *in vivo* im weiblichen Genitaltrakt stattfindet und als Kapazitation bezeichnet wird. Er beinhaltet eine Reihe von Veränderungen an der Zelloberfläche und im Inneren der Zelle, durch die das Spermium die Kompetenz zur Befruchtung erhält (Rüsse and Sinowatz, 1998). Für das Passieren der Cumuluszell-Schichten und der Zona pellucida besitzt das Spermium ein Arsenal verschiedener Enzyme wie z. B. Akrosin und Hyaluronidase. Diese befinden sich in einer kappenartigen Struktur am Kopf des Spermiums, die als Akrosom bezeichnet wird. Nur bei spezifischer Erkennung und Bindung des Spermiums an die Zona pellucida wird der Inhalt der Akrosomen in der sogenannten Akrosomenreaktion frei und bereitet dem Spermium den Weg durch die Zona

pellucida und den perivitellinen Spalt zur Eizelle. Die Bindung und Fusion des Spermiums mit der Eizelle triggert eine Reihe von komplexen Prozessen. Die Eizelle beendet die zweite Reifeteilung mit der Ausschleusung eines zweiten Polkörpers (siehe oben). Parallel zur Entwicklung des weiblichen Vorkerns dekondensiert das Chromatin des Spermiums und es entwickelt sich der männliche Vorkern (Abb. 1). Beide Vorkerne replizieren ihre DNA und enthalten schließlich jeweils einen haploiden Satz von Chromosomen mit je zwei Chromatiden. Unmittelbar vor der ersten Furchungsteilung und der Bildung des 2-Zell-Embryos lösen sich die Vorkernmembranen auf. Die maternalen und paternalen Chromosomen ordnen sich in der Metaphase-Ebene der Teilungsspindel an und die Chromatiden werden getrennt (Beier, 1998; Rüsse and Sinowatz, 1998).

### Präimplantations-Entwicklung

Die befruchtete Eizelle wird durch die Furchungsteilungen in immer kleinere Zellen zerlegt. Das Zytoplasma der Eizelle wird auf die neugebildeten Zellen verteilt, die als Blastomeren bezeichnet werden. Die Gesamtgröße des Embryos verändert sich bis zum frühen Blastozystenstadium nicht (Abb. 1). Die Blastomeren der ersten beiden Teilungsgenerationen sind unabhängig voneinander und totipotent: sie besitzen die Fähigkeit, einen vollständigen Organismus auszubilden. Spätestens im 8-Zellstadium (etwa 3 Tage nach Befruchtung) verlieren die Blastomeren diese Fähigkeit (Fernandez-Gonzalez et al., 2007). Sie beginnen mit der Ausbildung spezifischer Zell-Zellkontakte. Während sich der Embryo zur Morula entwickelt (> 16 Zellen), wandert er im Eileiter von der Ampulle durch den Isthmus in das Uterushorn. Die außen liegenden Blastomeren mit Kontakt zur Oberfläche differenzieren sich von den Zellen ohne Kontakt zur Oberfläche und bilden spezifische Zellverbindungen aus. Dieser Prozess wird als Kompaktierung bezeichnet.

6 bis 8 Tage nach der Befruchtung wird mit dem Zusammenfließen von Interzellularräumen und der Ausbildung eines zusammenhängenden flüssigkeitsgefüllten Hohlraumes, des Blastozoels, das Stadium der Blastozyste (Abb. 1) erreicht. Der Embryo befindet sich jetzt im mittleren Abschnitt des Uterushornes und stellt ein blasenähnliches Gebilde dar, das zwei unterschiedlich differenzierte Zellkompartimente enthält. Der Trophoblast formt als einschichtiger Zellverband eine äußere Hülle und umschließt das Blastozoel. Er ist Vorläufer des Chorionepithels (später Amnion), das die äußerste Fruchthülle bildet. Das Chorion ist verantwortlich für die Implantation und den Stoffaustausch zwischen Embryo und Mutter. Der Embryoblast (Synonyme: innere Zellmasse, inner cell mass, ICM) ist zunächst ein scheinbar ungeordneter Zellhaufen, der partiell am Trophoblast fixiert, in das Blastozoel ragt (Abb. 1). Daraus entwi-

ckelt sich der Fetus. Die Zellen des Embryoblasten werden als pluripotente Stammzellen bezeichnet. Ihre Nachkommen können sich vermutlich zu allen Zelltypen des Organismus differenzieren (Rüsse and Sinowatz, 1998).

Ein Schlüsselereignis für die weitere Entwicklung und die Voraussetzung für die Implantation ist das Schlüpfen der Blastozyste aus der Zona pellucida um Tag 7 bis 9 nach der Befruchtung. Die Blastozyste expandiert durch die Vermehrung der Trophoblastzellen und die Aufnahme von Flüssigkeit ins Blastozoen (Abb. 1). Die Zona pellucida wird dünner und reißt. Die Elongation der geschlüpften Blastozyste beginnt um den Tag 13 nach der Befruchtung. Durch das starke Wachstum des Trophoblasten entsteht ein langes schlauchförmiges Gebilde. Im Verhältnis zum Trophoblast wächst der Embryoblast nur wenig und entwickelt sich zur Keimscheibe (Rüsse and Sinowatz, 1998).

Die Erkennung und Aufrechterhaltung der Gravidität erfordert eine intakte Kommunikation zwischen Embryo und Mutter (embryo-maternale Kommunikation, EMK) (Wolf et al., 2003). Die Erkennung der Gravidität beginnt beim Rind um den Tag 15 nach der Befruchtung. Ein zentrales embryonales Trächtigkeitssignal ist das Interferon-Tau (IFNT), das von den Trophoblastzellen gebildet wird (Robertson I, 1998). IFNT blockiert die Prostaglandin (PG) F<sub>2</sub> $\alpha$ -Synthese oder -Ausschüttung im Uterus und verhindert den Abbau des Gelbkörpers. Die Gravidität bleibt erhalten. Der Transfer eines Embryos ist beim Rind bis zum 16. Tag der Gravidität möglich, am 17. Tag nicht mehr. Spätestens zu diesem Zeitpunkt hat das Muttertier die Gravidität erkannt. Die Implantation beginnt mit der Kontaktaufnahme des Trophoblasten mit dem Uterusepithel am 18. bis 19. Tag der Gravidität (Beier, 1998; Rüsse and Sinowatz, 1998).

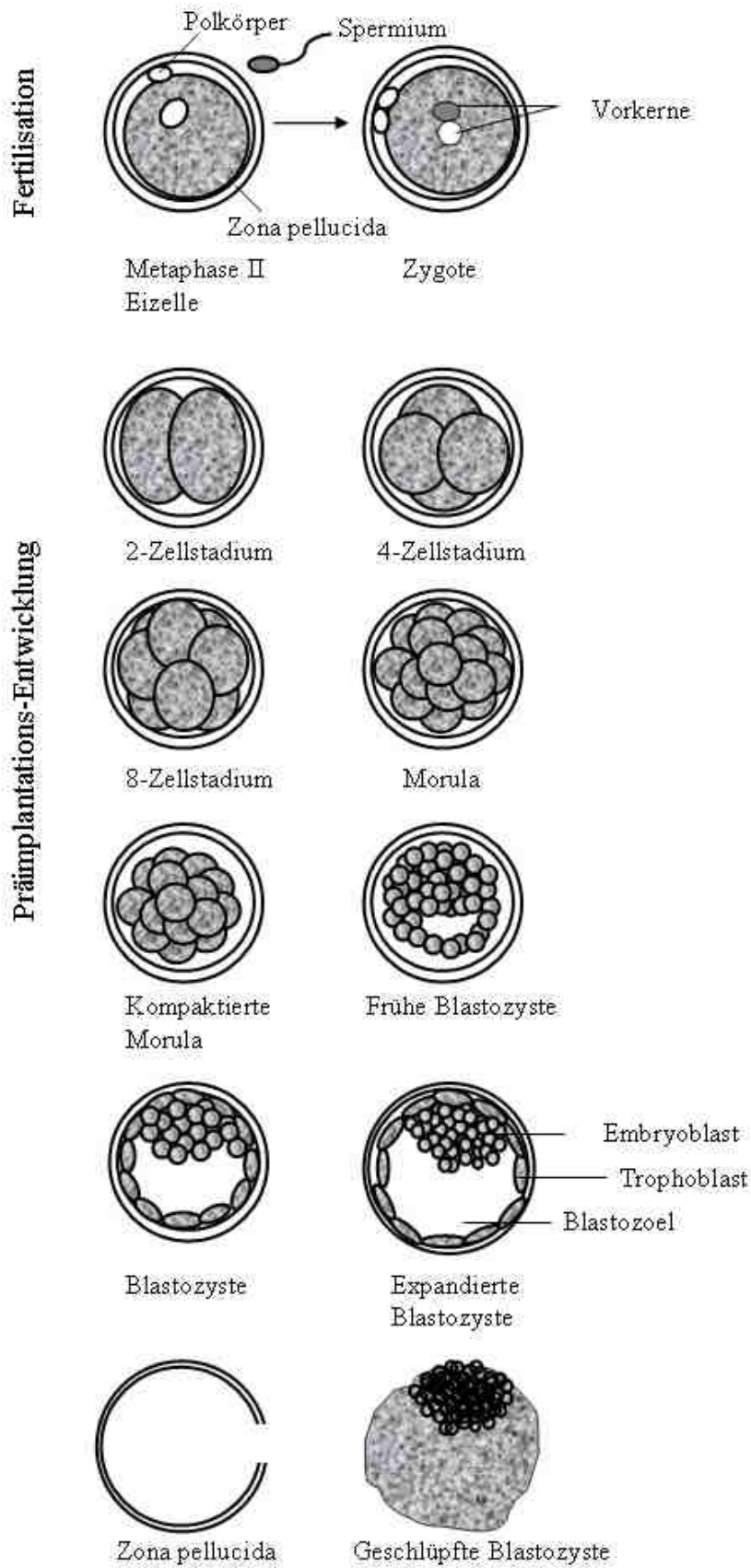


Abbildung 1: Fertilisation und Präimplantations-Entwicklung bis zur Blastozyste beim Rind



### 2.3 Die Embryonalentwicklung und -kultur *in vitro*

Seit den 50iger Jahren des 20. Jahrhunderts ist die Entwicklung von Kultursystemen zur *in vitro* Produktion (IVP) von Embryonen bei Säugern Gegenstand intensiver Forschung (Austin, 1951; Chang, 1959). 1982 wurde nach Transfer eines *in vitro* gereiften, *in vitro* befruchteten und *in vitro* kultivierten Embryos in eine Empfängerkuh das erste Kalb geboren (Brackett et al., 1982). Im Jahre 1989 beschrieben Berg und Brem ein praktisch nutzbares Verfahren zur *in vitro* Reifung, -Befruchtung und -Kultur von Rinderembryonen (Berg, 1989). Seitdem hat die IVP weitere Fortschritte erfahren, um die Bedingungen und Abläufe besser an die natürliche Situation *in vivo* anzupassen. Heute stellt die IVP von Embryonen eine etablierte Methode zur Produktion gesunder Nachkommen nach Embryotransfer dar und ist häufig die Voraussetzung für den Einsatz weiterer Reproduktionstechniken wie dem Klonen durch somatischen Kerntransfer (Stojkovic et al., 2001) oder der Eizell-Gewinnung durch transvaginale Follikelpunktion („ovum pick up“, OPU) (Merton et al., 2003). Nach einer Statistik von M. Thibier wurden im Jahr 2004 weltweit rund 83.000 *in vitro* produzierte Rinderembryonen in Empfängertiere übertragen (Thibier, 2005). Die Teilungsrate *in vitro* maturierter und fertilisierter Eizellen liegt zwischen 80 und 90 Prozent, die Blastozystenrate am Tag 7 noch bei 25 - 40 Prozent (Heyman, 2005; Wrenzycki, 2007). Nach Transfer von *in vitro* Blastozysten in Empfängertiere werden Trächtigkeitsraten von 40 - 60 Prozent und Abortraten von bis zu 12,5 Prozent beschrieben (Farin et al., 1999; Kruip and Den Daas, 1997; Thibier, 2005; Wrenzycki, 2007). Bei einer perinatalen Sterblichkeit von bis zu 14 Prozent schwankt die Geburtenrate zwischen 5 Prozent und 40 Prozent (Kruip and Den Daas, 1997).

Die niedrigere Trächtigkeits- und Geburtenrate beruht wahrscheinlich auf zwei wesentlichen Unterschieden zur natürlichen Entwicklung *in vivo*: (1) die Selektion der Gameten und (2) die Bedingungen der *in vitro* Reifung, -Fertilisation und -Kultivierung der Embryonen.

(1) Unter *in vivo* Bedingungen erfolgt eine strenge Selektion der Gameten. Pro Zyklus gelangen nur ein bis zwei gereifte Eizellen zur Ovulation und nur wenige Spermien, die das Ovidukt zum Zeitpunkt der Ovulation erreichen, haben die Möglichkeit die Eizelle zu befruchten. In der *in vitro* Reifung dagegen werden Eizellen eingesetzt, die aus Follikel unterschiedlicher Größe (4 - 8 mm) gewonnen wurden. Ein Teil der so isolierten Eizellen befindet sich noch in der Wachstumsphase bzw. schon in der Regressionsphase und hat ein eingeschränktes Entwicklungspotential (Merton et al., 2003). Die Auswahl der Spermien unterliegt ebenfalls weniger strengen Kriterien (Bavister, 2002), da *in vitro* wichtige natürliche Kontrollmechanis-

men wegfallen, wie beispielsweise eine Selektion über transiente Bindungen an Oviduktzellen (Gualtieri and Talevi, 2003).

(2) Die Kulturmedien und Zusätze der *in vitro* Produktion von Embryonen können die Bedingungen der natürlichen Entwicklung *in vivo* nur bedingt nachstellen, was zu vielfältigen und nachhaltigen Beeinträchtigungen der Entwicklung *in vitro* führen kann. Das gilt besonders für die *in vitro* Kultivierung der Embryonen, die einen Entwicklungszeitraum umfasst, in dem parallel viele zentrale, weichenstellende Prozesse ablaufen (Farin et al., 2001). Dazu zählt u.a. die epigenetische Reprogrammierung des Genoms nach der Befruchtung, bei der Gameten-spezifische Modifikationen gelöscht und durch Embryo-spezifische Modifikationen ersetzt werden. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Elternteil-spezifische Prägung ("imprinting") wichtiger Gene wie z. B. IGF2 (Insulin like growth factor 2). Von zentraler Bedeutung ist dabei vermutlich die adäquate Methylierung regulatorischer DNA-Sequenzen, deren Mechanismen schon länger intensiv untersucht werden (Haaf, 2001). Störungen in diesem hochkomplexen Prozess sind vermutlich eine wichtige Ursache für das Auftreten von embryonalen und fetalen Entwicklungsstörungen (Fernandez-Gonzalez et al., 2007) und den Verlust von Embryonen (Haaf, 2001). Bei Rind und Schaf wurde nach Anwendung verschiedener assistierter Reproduktionstechniken ein Large-Offspring-Syndrom (LOS) beschrieben, das in Zusammenhang gebracht wird mit Störungen der Methylierung (van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000). Nach dem Transfer *in vitro* produzierter Rinder-Embryonen wurden in geringem Maße (3 - 6%) Kälber mit Abnormalitäten beobachtet, die dem LOS-Syndrom entsprechen (Fernandez-Gonzalez et al., 2007). Dazu zählen erhöhte Geburtsgewichte, Abnormalitäten in der Organentwicklung, angeborene Missbildungen und eine erhöhte perinatale Sterblichkeit der Kälber (Farin et al., 2001).

In einer Reihe von Untersuchungen dienten Rinderembryonen, die *in vivo* durch hormonell stimulierte Superovulation und künstliche Besamung gewonnen wurden, als Vergleichsmaßstab für *in vitro* produzierte Embryonen. Dabei wurden bei *in vitro* produzierten Embryonen vielfältige potentiell bedeutsame Abweichungen beobachtet hinsichtlich:

- der Zellzahlen und Größe der inneren Zellmasse in Blastozysten (van Soom et al., 1997).
- der Morphologie und Kinetik der Entwicklung (Gutierrez-Adan et al., 2004; Holm et al., 2002).
- dem Auftreten von Zelluntergängen (Gjorret et al., 2003; Lonergan et al., 2006; Pomar et al., 2005) und Chromosomen-Abnormalitäten (Hyttel et al., 2001; Viuff et al., 2001).

- des Energie- und Glukose-Metabolismus (Khurana and Niemann, 2000).
- der Toleranz gegenüber Kryokonservierung (Rizos et al., 2003).
- der Expression ausgewählter Gene (Lonergan et al., 2003; Wrenzycki et al., 2004).

## 2.4 Der Zelltod

Zellen vielzelliger Organismen können ihren eigenen Tod aktiv über genetisch determinierte Programme steuern (programmierter Zelltod). Sie können aber auch so schwerwiegend geschädigt werden, dass sie durch einen unregulierten Mechanismus sterben. Diese Form des Zelltods wird als Nekrose bezeichnet (Blank and Shiloh, 2007). Im Gegensatz zum programmierten Zelltod zerfällt die Zelle bei der Nekrose infolge einer Volumenzunahme von Zelle und Zellorganellen und der Ruptur der zellulären Membranen. Es kommt zu einer unkontrollierten Freisetzung von zellulären Komponenten, die benachbarte Zellen eines Gewebes schädigen und eine Entzündungsreaktion auslösen können. Programmierter Zelltod (Programmed Cell Death, PCD) läuft streng kontrolliert ab und spielt eine zentrale physiologische Rolle in der Entwicklung, Morphogenese und Homöostase von multizellulären Organismen (Vaux and Korsmeyer, 1999). Der PCD dient der gezielten Entfernung von einzelnen, nicht mehr benötigten bzw. abnormalen Zellen, ohne das umliegende Gewebe zu schädigen. Eine Klassifizierung des Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) unterscheidet nach morphologischen Kriterien acht verschiedene Formen des Zelltods (Kroemer et al., 2005). Melino und Kollegen diskutieren bis zu 11 verschiedene Formen, von denen 10 genetisch determiniert sein könnten (Melino et al., 2005). Apoptose bezeichnet die bekannteste Form des programmierten Zelltods und dient häufig als Synonym für den PCD (Kroemer et al., 2005).

### 2.4.1 Apoptose

Bereits 1842 beschrieb Carl Vogt im Rahmen von Untersuchungen zur Entwicklung der Geburtshelferkröte absterbende Zellen (Vaux and Korsmeyer, 1999). Anfang der 70iger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde das Thema zum wiederholten Male wieder entdeckt und J.F. Kerr und Kollegen prägten den Begriff Apoptose (griechisch apoptosis = Absterben) (Kerr et al., 1972). Zu Beginn der 90iger Jahre wuchs mit den Forschungen zur embryonalen Entwicklung des Fadenwurmes *Caenorhabditis elegans* (Yuan et al., 1993) das Interesse an der Apoptose sprunghaft an. Im Jahr 2000 wurden über 10.000 Artikel zum Thema Apoptose veröffentlicht (Melino et al., 2001). Apoptose umfasst komplexe und für den Organismus potentiell gefährliche Prozesse, die eine strikte Regulation erfordern. Eine Fehlregulation von Proteinen, die

an der Induktion und Regulation der Apoptose beteiligt sind, ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Ein Beispiel für eine Rolle verminderter Apoptose bei der Entwicklung maligner Neoplasien ist das anti-apoptotisch wirkende Bcl2 (B-cell CLL/lymphoma)-Protein. Es ist in Neoplasien häufig überexprimiert und lässt Zellen, die absterben sollten, überleben (Reed, 1995). Eine vermehrte Apoptose wurde dagegen mit einer Reihe degenerativer Erkrankungen des Zentralnervensystems in Verbindung gebracht. So ist eine erhöhte Konzentration des proapoptotisch wirkenden FASLG (Synonym: CD95L)-Liganden im Liquor und Serum von Alzheimer-Patienten ein ernstzunehmender Hinweis auf eine Fehlregulation des Apoptose-Systems (de la Monte et al., 1998). Ein Hauptziel der Apoptoseforschung ist eine kontrollierte Induktion und Inhibition der Apoptose zu therapeutischen Zwecken (Grimm, 2003).

Ursprünglich wurde Apoptose aufgrund rein morphologischer Veränderungen der Zelle definiert (Kerr et al., 1972). Erste morphologische Zeichen der Apoptose sind ein Abrunden der Zelle und ein Schrumpfen des zellulären Volumens („Pyknose“). In der Folge ist eine Verdichtung des Chromatins und eine Fragmentation des Zellkernes („Karyorhexis“) zu beobachten. Die Integrität der Plasmamembran bleibt bis zum Spätstadium der Apoptose erhalten. Die Bestandteile der apoptotischen Zelle werden in Ausstülpungen der Plasmamembran verpackt und als „apoptotische Körperchen“ von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert (Fabian et al., 2005). Ein frühes biochemisches Charakteristikum ist die Verlagerung innerer Bestandteile der Zellmembran, wie beispielsweise Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche, das vermutlich als Erkennungssignal für Makrophagen dient (Martin et al., 1995). Eine oligonukleosomale DNA-Fragmentation im Zellkern (Wyllie, 1980) sowie die Aktivität spezifischer Proteasen im Zytoplasma sind weitere wichtige Kennzeichen der Apoptose (Melino et al., 2005).

Die Prozesse der Apoptose sind sehr komplex. Eine große Anzahl genetischer Komponenten und Proteine wurden bis heute entdeckt. Man nimmt aber an, dass viele Komponenten apoptotischer Signalwege noch unbekannt sind (Grimm, 2003). Der Ablauf der Apoptose kann in eine Induktions- und Regulationsphase sowie eine Exekutionsphase unterteilt werden (Kroemer et al., 1995). Als Hauptmediatoren der Apoptose werden spezifische, evolutionär hochkonservierte Proteasen, sogenannte Caspasen, angesehen (Budihardjo et al., 1999; Cikala et al., 1999; Earnshaw et al., 1999). Sie werden scheinbar bei fast jeder Art der Apoptose-Induktion aktiviert und sind notwendig, um das Apoptose-Programm durchzuführen. Inaktive Caspase-Vorstufen („Pro-Caspasen“ bzw. „Zymogene“) sind wahrscheinlich in jeder Zelle vorhanden (Earnshaw et al., 1999). Hinsichtlich ihrer Funktion in der Apoptose-Kaskade wer-

den Initiator (8, 9, 12) - und Effektor-Caspasen (3, 6, 7) unterschieden. Man nimmt an, dass sich die Initiator-Caspasen durch die Zusammenlagerung mehrerer Procaspase-Moleküle unter Vermittlung von Adaptermolekülen selbst aktivieren und anschließend die in der Kaskade nachfolgenden Caspasen aktivieren (Green, 1998; Hengartner, 2000). Apoptotische Signale können sowohl von benachbarten Zellen gebildet werden als auch in den betroffenen Zellen selbst entstehen (Grimm, 2003). Eine Vielzahl von Signalen, wie z. B. der Entzug von Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung oder DNA-Schäden, kann über unterschiedliche Signalwege Apoptose induzieren. Aktuell werden Signalwege über sogenannte Todesrezeptoren an der Zelloberfläche (extrinsischer Weg) und die Mitochondrien (intrinsischer Weg) beschrieben (Abb. 2).

Für den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg wird eine Induktion der Apoptose über die Bindung extrazellulärer Liganden wie FASLG (Fas Ligand) oder TNF (tumor necrosis factor) an zugehörige Zelloberflächen-Rezeptoren wie FAS oder TNFR1 (TNF rezeptor 1) mit charakteristischen Todes-Domänen (death domains) beschrieben (Abb. 2). Bezogen auf das FASLG/FAS-System oligomerisieren die FAS-Rezeptoren in der Membran nach FAS-Ligand-Bindung und FADD (fas associated death domain)-Adapter-Moleküle lagern sich im Bereich der Todes-Domänen an. An diesen als DISC (death inducing signaling complex) bezeichneten Proteinkomplex können Procaspase 8-Moleküle rekrutiert werden (Kischkel et al., 1995). Es wird vermutet, daß die räumliche Nähe zwischen den Procaspase 8-Molekülen eine gegenseitige Aktivierung ermöglicht. Aktive Caspase 8-Moleküle aktivieren daraufhin direkt die Effektor-Caspase 3 (Blank and Shiloh, 2007). Es gibt Hinweise, dass eine Induktion der Apoptose über die Todesrezeptoren durch den Signalweg über die Mitochondrien verstärkt werden kann (Abb. 2). Pro-apoptotische BID (BH3 interacting domain death agonist)-Proteine könnten nach proteolytischer Spaltung zu tBID (truncated BID) in die äußere Mitochondrienmembran translokalisieren und die Freisetzung von Cytochrom c und die Apoptosom-Bildung fördern (Luo et al., 1998).

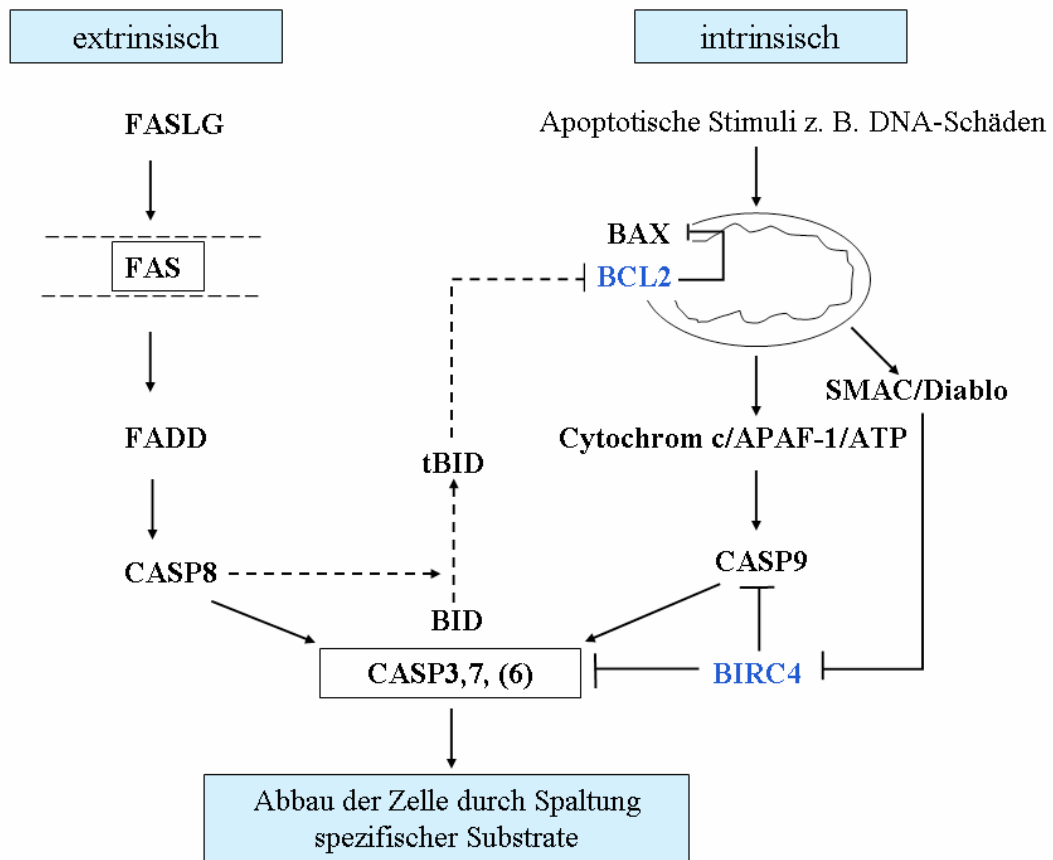
Die Mitochondrien werden als eine zentrale Schaltstelle für eingehende Apoptose-Stimuli beschrieben, die von Proteinen der BCL2 (B-cell lymphoma 2)-Familie kontrolliert werden. Möglicherweise entscheidet das Verhältnis von anti-apoptotischen Molekülen wie BCL2 und BCL2L1 (Bcl2 like 1) zu pro-apoptotischen Molekülen wie BAX (Bcl2 associated X protein), BID (BH3 interacting domain death agonist) und BAK (Bcl2-antagonist/killer) über das Schicksal der Zelle (Wyllie, 1995). Man vermutet, dass eine Veränderung des Gleichgewichtes zugunsten pro-apoptotischer Faktoren verantwortlich ist für eine Permeabilisierung der

Mitochondrienmembran, den Austritt von Cytochrom c und den Verlust des Membranpotentials. Neben Cytochrom c gelangen vermutlich weitere pro-apoptotisch wirkende Moleküle wie SMAC/Diablo (Du et al., 2000) und AIF (apoptosis inducing factor) ins Zytoplasma der Zelle (Donovan and Cotter, 2004). Die Bildung von Apoptosomen, Proteinkomplexen aus Cytochrom C, dem Adaptermolekül APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), ATP und Pro-Caspase 9 kann eine gegenseitige Aktivierung von Pro-Caspase 9-Molekülen induzieren, die anschließend die Effektor-Caspasen 3,6 und 7 aktivieren können (Cory et al., 2003; Green, 1998; Hengartner, 2000).

Der Mechanismus, der zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führt, ist noch unklar. Derzeit werden zwei Modelle diskutiert. Das Erste macht eine Translokation des pro-apoptotisch wirkenden BAX-Protein aus dem Zytosol in die Mitochondrien und die Interaktion mit verwandten pro-apoptotischen Proteinen (tBID, BAK) dafür verantwortlich. Die Ausbildung von Poren, die Cytochrom c durchlässig sind, beruht demnach auf einer Konformationsänderung und Oligomerisierung von BAX-Molekülen in der äußeren Mitochondrienmembran. Fraglich ist aber, ob auch größere Proteine wie SMAC/Diablo oder AIF diese Poren passieren können. Alternativ wird eine Interaktion von BAX-Molekülen mit dem VDAC (voltage dependent anion channel)-Kanal in der Mitochondrienmembran für möglich gehalten, wodurch ein Austritt von Cytochrom c ins Zytosol stattfinden kann (Kawamura et al., 2003). Weiterhin wird beschrieben, dass anti-apoptotische Faktoren wie BCL2 und BCL2L1 die Freisetzung von Cytochrom c verhindern können, indem sie BAX-Moleküle binden bzw. den VDAC-Kanal blockieren (Kawamura et al., 2003). Das zweite Modell postuliert das direkte Öffnen von sogenannten PTP (permeability transition pore)-Komplexen in der Mitochondrienmembran durch pro-apoptotische Moleküle sowie das Schließen durch anti-apoptotische Moleküle (Donovan and Cotter, 2004).

Die Induktion der Apoptose über beide Signalwege führt zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 und nachfolgend zur Aktivierung der Caspasen 6 und 7 (Abb. 2). Eine Regulierung der Apoptose wird über eine direkte Inaktivierung von Caspasen durch Bindung an IAPs (inhibitors of apoptosis) wie z. B. Caspase 3, 7 und 9 Inaktivierung durch BIRC4 (baculoviral IAP repeat-containing 4) beschrieben (Deveraux and Reed, 1999). Eine Regulierung der IAPs wiederum scheint möglich über pro-apoptotische Moleküle wie SMAC/Diablo, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden (Du et al., 2000). Die aktiven Effektor-Caspasen führen direkt oder indirekt über andere Proteasen zur selektiven Spaltung von lebenswichtigen zellulären Proteinen mit vielfältigen, auch morphologisch sichtbaren Konsequenzen. Das Ergebnis

ist ein kontrollierter Abbau der Zelle, deren Überreste von benachbarten Zellen durch Phagozytose gefahrlos beseitigt werden können (Kothakota et al., 1997; Rao et al., 1996).



**Abbildung 2: Bedeutsame Apoptose-Signalwege**

Induktion der Apoptose über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren z. B. über den FAS/FASLG-Signalweg (extrinsischer Weg) bzw. über die Mitochondrien durch Interaktion von pro-apoptotischen (BAX, etc.) und anti-apoptotischen (BCL2, etc.) Molekülen (intrinsischer Weg). Eine Inhibition der Apoptose ist auf der Ebene der aktiven Caspasen 3, 7 und 9 durch BIRC4 möglich. Eine Verbindung beider Signalwege wird über die Spaltung pro-apoptotischer BID-Moleküle zu tBID vermutet. Gen-Symbol: schwarz - pro-apoptotisch, blau - anti-apoptotisch

### 2.4.2 Zelluntergänge im frühen Embryo

Bei Säugern wird offenbar ein erheblicher Anteil der Embryonen vor der Implantation im Uterus in der Entwicklung arretiert und geht zugrunde (Betts and King, 2001). Die Ursachen sind vermutlich vielfältig und unzureichend erforscht. Präimplantations-Embryonen, die beispielsweise für den Embryo-Transfer aus dem Uterus isoliert wurden, sind typischerweise sehr heterogen - sowohl hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften als auch hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials. Morphologische Zeichen des Zelltodes lassen sich in unterschiedlichen Anteilen von Zellen sowohl in scheinbar normal entwickelten als auch arretierten Embryonen beobachten. Daraus ergibt sich der Verdacht, dass Zelluntergänge in dieser frühen Phase der Entwicklung eine besondere physiologische Rolle im Rahmen der normalen Entwicklung spielen könnten und gleichzeitig bei einer gestörten Entwicklung bis hin zum Tod des Embryos von großer Bedeutung sind.

Die Lebendbeobachtung von Säugerembryonen in dieser frühen Phase der Entwicklung in seiner natürlichen Umgebung im Eileiter und im Uterus ist je nach Spezies ausgesprochen schwierig bis unmöglich. Folglich müssen die Embryonen für die Untersuchung zu bestimmten Zeitpunkten nach Ovulation oder Befruchtung aus dem Eileiter oder dem Uterus isoliert werden. Je nach Spezies ist die Anzahl der Embryonen, die auf diese Weise gewonnen werden kann, aber stark limitiert. Einen Ausweg ermöglichte die Entwicklung von Techniken zur *in vitro* Fertilisation und Embryokultur. Leider ist auch *in vitro* die mikroskopische Lebendbeobachtung und Verfolgung von Zelluntergängen von Säugerembryonen aufgrund ihrer kugelförmigen Form und ihrer optischen Eigenschaften nicht so einfach zu bewerkstelligen wie beispielsweise bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Aus diesem Grund werden klassischerweise *in vivo* und *in vitro* produzierte Embryonen zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten gewonnen und für mikroskopische und molekulare Analysen fixiert. Ein entscheidender Nachteil ist dabei, dass das Entwicklungspotential der Embryonen nicht mehr - beispielsweise durch Transfer auf Empfängertiere - überprüft werden kann.

Der wichtigste Ansatz zur Identifizierung und Quantifizierung von Zelluntergängen ist die mikroskopische Analyse von Zellkernen und Mitosefiguren nach Anfärbung mit DNA-bindenden Farbstoffen wie DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) oder Hoechst 33342. Die partielle oder vollständige Kondensation und/oder Fragmentation des Zellkerns sind dabei typische Merkmale von Apoptose bzw. programmiertem Zelltod. Alleine oder in Kombination dazu wird häufig der mikroskopische Nachweis von fragmentierter DNA als Kennzeichen von



Apoptose bzw. programmiertem Zelltod mit dem TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling) -Test eingesetzt (Gavrieli et al., 1992).

Bei einer Reihe von Säugerspezies wurden vom Zwei-Zellstadium bis zur Blastozyste untergehende bzw. tote Zellen beobachtet (Betts and King, 2001). Je nach Spezies - bei der Maus ab dem 2-Zellstadium, bei Mensch und Schwein ab dem 4 - 8-Zellstadium und beim Rind ab dem 8 - 16-Zellstadium wurden Zelluntergänge mit typischen Merkmalen von Apoptose beschrieben. In *ex vivo* aus dem Uterus gespülten Embryonen vom Rind wurden apoptotische Zellen in der Hälfte der Morulae und in bis zu 100 Prozent der Blastozysten beobachtet (Fabian et al., 2005).

Die prognostische Bedeutung von Zelluntergängen während der Entwicklung der Blastozyste und die Rolle von Apoptose bzw. programmiertem Zelltod (PCD) sind noch weitgehend unklar. Mögliche Funktionen und Auslöser von PCD während der Präimplantations-Entwicklung sind

- die Eliminierung von Zellen mit genomischen Aberrationen. So wurde bei Rind (Viuff et al., 2000; Viuff et al., 2001) und Mensch (Pellestor, 1995) eine hohe Rate von Embryonen mit chromosomalen Abnormalitäten wie z. B. Multiploidie und Mosaikbildung beobachtet.
- die Eliminierung von Zellen mit falschem Entwicklungspotential z. B. von Blastomeren in der inneren Zellmasse mit einer Entwicklungspotenz in Richtung Trophoblastzellen (Handyside and Hunter, 1986).
- eine Regulation der Zellzahl im Stadium der Blastozyste (Fabian et al., 2005).
- eine Imbalance von Wachstums- oder Überlebensfaktoren wie z. B. der IGF (Insulin like growth factor)-Familie (Byrne et al., 2002a; Byrne et al., 2002b).
- schädigende Agenzien wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Yang et al., 1998), UV-Strahlung oder Hitzeschock (Paula-Lopes and Hansen, 2002).

#### Zelluntergänge *in vitro/in vivo*

Eine erhöhte Zelltod- bzw. Apoptose-Rate könnte ein Indikator für Störungen der frühen Embryogenese sein. So wurde in einer Reihe von Untersuchungen beim Rind und anderen Säugerspezies die Apoptose-Rate von *in vitro* und *ex vivo* aus dem Uterus gewonnenen (*in vivo* entwickelten) Embryonen bestimmt und verglichen [Übersicht bei (Fabian et al., 2005)].

Erste apoptotische Veränderungen im Kern wurden beim Rind bereits in 6-Zell-Embryonen *in vitro* und in 8-Zell-Embryonen *in vivo* identifiziert. Die DNA der Zellkerne war gleichzeitig auch TUNEL positiv (Gjorret et al., 2003). Insgesamt zeigten 5 - 30 Prozent der 8-16-Zell-Embryonen *in vitro* sowie 50 Prozent der Morulae *in vivo* und 60 - 80 Prozent der Morulae *in vitro* Zellkerne mit morphologischen Merkmalen des programmierten Zelltods. Das sind weniger als im Blastozystenstadium, wo zwischen 91 und 100 Prozent der Blastozysten *in vitro* und *in vivo* mindestens einen apoptotischen Zellkern enthielten. Gleichzeitig zeigten Blastozysten die höchste Rate an apoptotischen Zellen. Bei vielen Säugerspezies wurde die Mehrzahl der Zelluntergänge in der inneren Zellmasse beobachtet. Ein Vergleich von *in vitro/in vivo* erzeugten Blastozysten beim Rind ergab eine höhere Zelltod-Rate in *in vitro* Blastozysten mit 15 Prozent (*in vivo*: 8,5 Prozent) und bezogen auf die Zellzahl der inneren Zellmasse mit 11,2 Prozent (*in vivo*: 6,1 Prozent) wogegen die Zelltod-Rate *in vitro* bezogen auf die Zellzahl im Trophoblasten mit 3,6 Prozent (*in vivo*: 2,4 Prozent) gleichbleibend niedrig war (Gjorret et al., 2003). Die Apoptose-Rate betrug nach der Auswertung des TUNEL-Tests in *in vitro* produzierten Blastozysten zwischen 4 und 9 Prozent (Byrne et al., 1999; Gjorret et al., 2003). Entsprechende Studien bei Schaf, Schwein und Ziege fanden bei *in vitro* Blastozysten ebenfalls höhere Apoptose-Raten als *in vivo* (Pomar et al., 2005).

#### Induktion der Apoptose *in vitro*

Die experimentelle Induktion von Apoptose mit chemischen Agenzien wie Staurosporin (STS) könnte wichtige Informationen zur Rolle und Funktion des Apoptose-Systems bei der Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zur Blastozyste liefern. STS ist ein bakterielles Alkaloid, das verschiedene Proteinkinasen hemmt (Takahashi et al., 1990) und in mikromolarer Konzentration bei einer Vielzahl von Zelltypen über einen bis dato noch ungeklärten Mechanismus Apoptose induzieren kann (Jacobson et al., 1997). Weil et al. führten umfangreiche Studien zur Zelltyp-abhängigen Induzierbarkeit von Apoptose durch STS bei der Maus durch (Weil et al., 1996). Dabei untersuchten sie neben primären Zellkulturen von unterschiedlichen Organen neugeborener und adulter Mäuse auch Eizellen und Embryonen bis zum Blastozystenstadium. Die Embryonen wurden 48 h und 72 h nach der Paarung gewonnen. Parallel wurden Embryonen sowie isolierte Blastomeren für 18 - 60 h unter dem Einfluss unterschiedlicher Staurosporin-Konzentrationen kultiviert. In einem Teil der Experimente wurde gleichzeitig mit Cycloheximid (CHX) die Proteinsynthese gehemmt. Weil et al. folgerten aus ihren Untersuchungen: In Maus-Embryonen kann Apoptose von Beginn an induziert werden, auch bei gleichzeitiger Hemmung der Protein-Synthese mit Cycloheximid. Die erforderlichen Pro-

teine sind von Beginn an in allen Zellen vorhanden. Bei 1-4-Zell-Embryonen ist eine erheblich höhere STS-Konzentration und eine längere Expositionsdauer erforderlich (10  $\mu\text{M}$  über 26 - 60 h) als bei Blastozysten (1  $\mu\text{M}$  für 18 h). Die Autoren spekulierten, dass 1-4-Zell-Embryonen normalerweise Apoptose unterdrücken und über eine gewisse Resistenz gegenüber Staurosporin verfügen. Für das Rind liegen ähnliche Beobachtungen vor (Matwee et al., 2000).

Ob und welche Komponenten der Exekution und Regulation und Apoptose-Systems, d. h. welche Gene, Transkripte und Proteine während der frühen Embryogenese beim Rind und anderen Säugerspezies tatsächlich aktiv und von Bedeutung sind, darüber ist derzeit noch wenig bekannt.

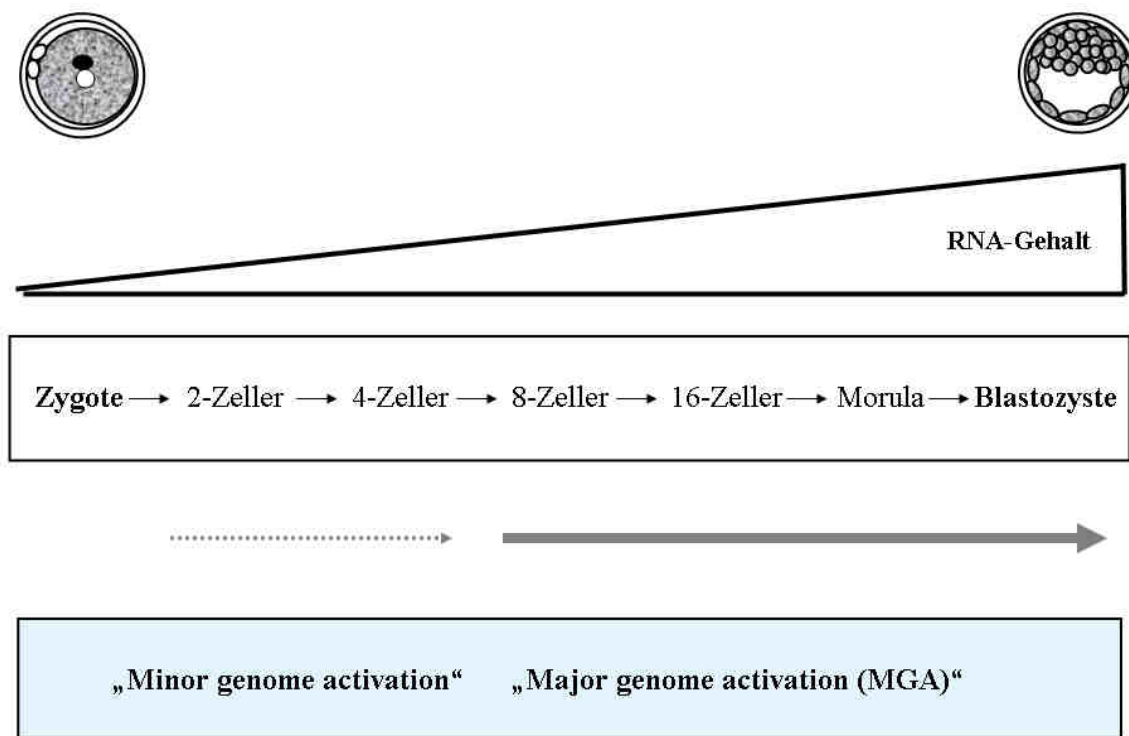
## 2.5 Genexpression im frühen Embryo

### 2.5.1 Genomaktivierung

Ein Schlüsselereignis der frühen Embryogenese ist die Aktivierung des embryonalen Genoms und die Synthese von embryonalen Transkripten und Proteinen. Der Beginn und Verlauf der Aktivierung des embryonalen Genoms variiert bei den verschiedenen Säuger-Spezies erheblich (Nothias et al., 1995). Je nach Spezies verlaufen die erste und folgende Furchungsteilungen ohne *de novo* Synthese von RNA in Abhängigkeit von Transkripten und Proteinen, die während des Wachstums und der Entwicklung in der Eizelle gebildet wurden (Stitzel and Seydoux, 2007). Wiederholt wurde gezeigt, dass sich Rinder-Embryonen auch bei vollständiger Hemmung der mRNA-Synthese durch Hemmung der RNA-Polymerase II mit 50 - 100  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Amanithin im Kulturmedium bis zum 8-16-Zellstadium entwickeln können (Barnes and First, 1991; Memili and First, 1998; Plante et al., 1994). Mit der *de novo* Synthese von RNA und Proteinen übernimmt der Embryo die Steuerung seiner Entwicklung, während maternale Transkripte und Proteine abgebaut werden. Dieser graduelle Prozess wird als Maternal-Embryonaler Übergang (maternal-embryonic transition, MET) bezeichnet (Telford et al., 1990).

Die *de novo* Synthese von RNA in der Eizelle und im frühen Embryo kann über den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin gemessen werden. Beim Rind wurde auf diese Weise in 2-Zell-Embryonen eine geringe RNA-Synthese entsprechend einer "minor genome activation" nachgewiesen (Hyttel et al., 1996; Memili and First, 1999; Viuff et al., 1996). Am Übergang vom 8- zum 16-Zell-Stadium wurde ein signifikanter Anstieg der RNA-Synthese beobachtet,

entsprechend der "major genome activation" (Barnes and First, 1991). Die Ausbildung morphologisch funktionsfähiger Nucleoli war elektronenmikroskopisch am Ende des vierten Zellzyklus nachweisbar [reviewed bei (Hyttel et al., 2000)]. In zeitlicher Übereinstimmung mit Hyttel et al. wurden ein Anstieg der Protein-Synthese und Veränderungen im Muster der neu-synthetisierten Proteine beim Rind beobachtet (Frei et al., 1989).



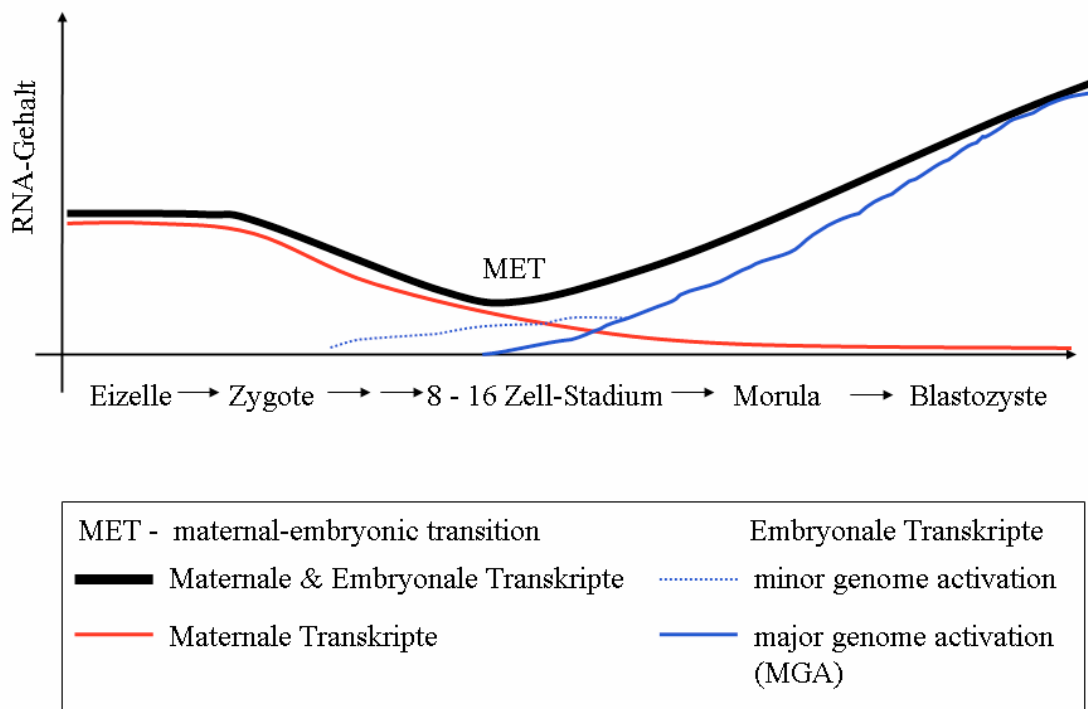
**Abbildung 3: RNA-Synthese im frühen Embryo beim Rind**

modifiziert nach (Badr et al., 2007)

Über die Mechanismen der Stilllegung des embryonalen Genoms während der ersten Furchungsteilungen bzw. der Signale zur Initiation der Genomaktivierung kann heute nur spekuliert werden. Aus Beobachtungen an evolutionär weit entfernten Modellorganismen wie *Drosophila*, *Xenopus* und Maus abgeleitete Erklärungsansätze zur Repression der Transkription sind: Chromatin-vermittelte Mechanismen, ein Defizit oder die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren und spezielle Formen der Zellzyklusregulation mit dem Ergebnis extrem schneller Zellzyklen (Schier, 2007). Die spezifische Aktivierung einzelner Steuergene und der folgende Prozess der graduellen und Gen-spezifischen Aktivierung des gesamten Genoms liegen aber noch weitgehend im Dunkeln.

### 2.5.2 Zusammensetzung der Transkripte

Das Zytoplasma der Eizelle enthält einen großen Vorrat an „maternalen“ Transkripten. Bereits mit der Wiederaufnahme der Meiose und der Reifung der Eizelle beginnt vermutlich eine streng regulierte Translation maternaler Transkripte, während gleichzeitig ein selektiver Abbau nicht mehr benötigter Transkripte stattfindet. Nach der Befruchtung der gereiften Eizelle werden parallel zur Aktivierung des embryonalen Genoms und der Synthese embryonaler Transkripte die verbliebenen maternalen Transkripte abgebaut. Dieser Vorgang ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Synthese embryonaler Transkripte beginnt in geringem Ausmaß bereits im 2-Zell-Stadium (minor genome activation), ein deutlicher Anstieg ist ab dem 8 - 16-Zell-Stadium (major genome activation) zu beobachten (siehe auch Kapitel 2.5.1). Es wird vermutet, dass der Abbau maternaler und die Synthese embryonaler Transkripte in gegenseitiger Abhängigkeit graduell und Transkript-spezifisch erfolgen (Evsikov et al., 2006; Kanka, 2003; Tadros et al., 2007). Die Mehrzahl der maternalen Transkripte wird vermutlich bis zum Morula- bzw. Blastozystenstadium abgebaut, um negative Effekte „falscher“ Transkripte auf die weitere Entwicklung des Embryos auszuschließen (Hamatani et al., 2004; Nothias et al., 1995).



**Abbildung 4: Abundanz maternalen und embryonalen Transkripte von der Eizelle bis zur Blastozyste beim Rind**

modifiziert nach (Wrenzycki, 2007)

### 2.5.3 Mechanismen zur Regulation maternalen Transkripte

Eine Reihe von Beobachtungen in letzter Zeit lieferten erste Einblicke in mögliche Mechanismen zur Regulation der Aktivität maternalen Transkripte in der Eizelle und im frühen Embryo. Die Beobachtungen stammen v. a. von Untersuchungen an Amphibien (*Xenopus laevis*, Krallenfrosch), Echinodermen (*Sea urchin*, Seeigel) und Insekten (*Drosophila melanogaster*, Fruchtfliege) (Tadros and Lipshitz, 2005; Vasudevan et al., 2006). Zu den regulatorischen Mechanismen zählen vermutlich: eine Deadenylierung von Transkripten, die Interaktion mit RNA-Proteinen und die Bindung an miRNAs (micro RNAs) bzw. siRNAs (small interfering RNAs) (Bettegowda and Smith, 2007).

Ein Teil der maternalen Transkripte wird nur für das Wachstum der Eizelle benötigt. In *Xenopus* und Maus wurde im Verlauf der Eizell-Reifung eine unspezifische Deadenylierung von Transkripten beobachtet, die zur Destabilisierung und zum Abbau durch spezifische Exonukleasen führen könnte. Zu diesen Transkripten zählen „Housekeeping“-mRNAs, die Protei-

ne wie Aktin und ribosomale Proteine kodieren (Bachvarova, 1992; Tadros and Lipshitz, 2005). Andere maternale Transkripte werden nur zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung wie der Reifung, Befruchtung und frühen Entwicklung des Embryos benötigt. Diese spezifischen Transkripte werden Beobachtungen zufolge mit kurzem Poly (A)-Schwanz und unterdrückter Translation im Zytoplasma der Eizelle gelagert. Mit der Reifung der Eizelle beginnt eine spezifische Aktivierung von maternalen Transkripten, die häufig mit einer Verlängerung des Poly (A)-Schwanzes korreliert ist. Dieser Prozess wird als zytoplasmatische Polyadenylierung bezeichnet und benötigt spezifische Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (UTR-Region) der Transkripte. Dazu zählen ein zytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element (CPE) mit der Konsensus-Sequenz UUUUUAAU und ein spezifisches Polyadenylierungssignal mit der Hexanukleotid-Sequenz AAUAAA (Bachvarova, 1992; Hake and Richter, 1997). Die Anlagerung von RNA-Bindungsproteinen (CPEB, CPSF) an diese Sequenzen führt vermutlich zu einer Poly (A)-Polymerase vermittelten Polyadenylierung am 3' Ende der mRNA. Häufig scheinen sogenannte *trans*-Faktoren (Maskin, Pumilo) über die Bindung an CPEB zusätzlich in die Regulation involviert zu sein (Bettegowda and Smith, 2007; Richter, 2008). Diese Faktoren führen vermutlich über unterschiedliche Mechanismen zu einer „Maskierung“ der mRNA, die zu einer Repression der Translation führt (Vardy and Orr-Weaver, 2007). Eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von CPEB wurde als Auslöser für die Entfernung der maskierenden Faktoren bzw. der zytoplasmatischen Polyadenylierung der mRNA beschrieben (Groisman et al., 2002). Das könnte die Bildung eines Translations-Initiationskomplexes am 5' Ende der mRNA und die Synthese korrespondierender Proteine ermöglichen. Eine aktuelle Untersuchung zur translationalen Kontrolle von maternalen Transkripten in *Xenopus* postuliert einen kombinatorischen Code, der sowohl den Zeitpunkt als auch das Ausmaß der Aktivierung eines Transkripts bestimmt (Pique et al., 2008). Dieser Code soll durch die Art und Anzahl von spezifischen Elementen in der 3' UTR-Region sowie deren Abstand zueinander definiert sein.

#### 2.5.4 Transkript-Analysen an Eizellen und frühen Embryonen

Während der Entwicklung von der befruchteten Eizelle zur Blastozyste werden Microarray-Analysen zufolge bei der Maus etwa 15.700 Gene transkribiert (Stanton et al., 2003). Beim Rind geht man von einer ähnlichen Größenordnung aus (Misirlioglu et al., 2006). Vermutlich ist aber nur eine verhältnismäßig kleine Zahl von Genen für die Steuerung der Entwicklung relevant (Wrenzycki et al., 2005). Ein wichtiges Ziel der Genexpressions-Analysen in frühen Embryonen ist die Identifizierung von entwicklungsrelevanten Genen, die als potentielle

Marker für den Entwicklungsstand und das Entwicklungspotential von Embryonen dienen könnten. Aktuell liegen Daten zur Expression von etwa hundert Genen mit Bedeutung für die Prä- und Postimplantationsentwicklung vor (Wrenzycki et al., 2005).

Technische Limitationen und der Mangel an Ausgangsmaterial beschränken eine genaue und umfassende Analyse von Genen mit derzeitigen Methoden. Der Gesamt-RNA-Gehalt wurde beim Rind auf 1 - 2 ng in der Eizelle und auf 5 ng in der Blastozyste geschätzt (Bilodeau-Goeseels and Schultz, 1997a). Eine genaue und zuverlässige Messung von so geringen RNA-Konzentrationen ist bislang aber schwierig. Um eine höhere Ausgangsmenge an RNA zur Verfügung zu haben, werden häufig Pools von bis zu 10 Eizellen bzw. Embryonen in die Transkript-Analysen eingesetzt (Boelhauve et al., 2005; Gutierrez-Adan et al., 2004; Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2004; Vigneault et al., 2004).

Die Konzentration spezifischer Transkripte kann mittels reverser Transkription (reverse transcription, RT) und Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) bestimmt werden. Isolierte RNA wird in korrespondierende DNA (cDNA) umgeschrieben und als Template in einer PCR-Reaktion zur Amplifikation der Targetsequenz mittels spezifischer Primersequenzen verwendet. In der einfachsten Form einer Quantifizierung wird die Menge an PCR-Produkt durch Auswertung der Bande im Agarose-Gel im Vergleich zu einer Referenzprobe abgeschätzt. Damit können große Unterschiede zwischen zwei Vergleichsproben erfasst werden. Eine entscheidende Weiterentwicklung und Verbesserung ist die Real-Time Reverse Transkription PCR (RT-qPCR), die derzeit die wichtigste Methode zur Quantifizierung spezifischer Transkripte in Eizellen und frühen Embryonen darstellt. Dabei wird die Menge der amplifizierten Zielsequenz während der PCR-Zyklen („Real-Time“) mit Hilfe eines fluoreszierenden Reporter-Farbstoffes gemessen und daraus die Ausgangskonzentration in der Probe berechnet (siehe Kapitel 2.6). Schon wenige Kopien eines Transkripts können mit großer Genauigkeit quantitativ nachgewiesen werden.

Trotz der Genauigkeit und Sensitivität der Methode gibt es technische Einschränkungen, die das Ergebnis bei geringen Ausgangsmengen an RNA entscheidend beeinflussen können. Dazu zählen Schwankungen in der Effizienz von RNA-Isolierung und Reverser Transkription. Der am häufigsten angewandte Weg zum Ausgleich von technisch bedingten Variationen ist eine Normalisierung der mRNA-Abundanzen spezifischer Transkripte im Verhältnis (semiquantitativ) zur mRNA-Abundanz einer als „endogenen Kontrolle“ (Referenzgen) bezeichneten Sequenz. Als Referenzgene werden sogenannte „Housekeeping-Gene“ verwendet, von denen man annimmt, dass sie in konstanter Menge im Probenmaterial vorhanden sind. Häufig ver-



wendete Referenzgene sind  $\beta$ -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und verschiedene Histone. Der Zeitraum von der Eizelle bis zur Formierung der Blastozyste ist sehr dynamisch. Es finden viele weichenstellende Prozesse statt wie z. B. die Befruchtung und Bildung der Zygote, die epigenetische Reprogrammierung, der Abbau maternaler Transkripte und der Aufbau embryonaler Transkripte infolge der Aktivierung des embryonalen Genoms (siehe Kapitel 2.2). Das macht die Auswahl von geeigneten Referenzgenen schwierig. Bislang konnte noch kein Referenzgen identifiziert werden, das während der frühen Embryonalentwicklung konstitutiv exprimiert wird. Im Gegenteil, Untersuchungen bei Rind und Maus zeigten, dass auch die Expression der „Housekeeping-Gene“ im frühen Embryo einer entwicklungspezifischen Regulation unterliegt (Bettegowda et al., 2006; Bilodeau-Goeseels and Schultz, 1997b; Goossens et al., 2005; Mamo et al., 2007; Robert et al., 2002). Die Verwendung variabel exprimierter Referenzgene zur Normalisierung von mRNA-Abundanzen ist problematisch und kann zu falschen Interpretationen führen. Das gilt besonders für eine Normalisierung mit nur einem Referenzgen.

Mit Hilfe einer Transkript-spezifischen Kalibrierkurve kann die Kopienzahl eines spezifischen Transkripts in einer Probe sehr genau und zuverlässig bestimmt werden (absolute Quantifizierung, siehe Kapitel 2.6). Die Erstellung einer Kalibrierkurve basiert auf einem rekombinanten RNA- oder DNA-Standard. Entscheidender Nachteil ist der erforderliche Aufwand für die Herstellung des Standards. Bislang gibt es kaum Daten zu absoluten Konzentrationen spezifischer Transkripte in Eizellen, frühen Embryonen und Blastomeren sowie somatischen Zelltypen.

Die Real-Time RT-PCR ermöglicht eine genaue Quantifizierung spezifischer Transkripte. Mit Hilfe der sogenannten Microarray-Technik können in einer Probe gleichzeitig mehr als zehntausend unterschiedliche Transkripte spezifisch nachgewiesen und relativ quantifiziert werden. Die DNA-Microarray-Technik ist eine Screening-Methode und verspricht u. a. die Entdeckung wichtiger entwicklungsrelevanter Gene z. B. durch einen Vergleich von Expressionsmustern unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Hamatani et al., 2004). Die Expression potentieller Kandidatengene wird anschließend mit Methoden wie der Real-Time RT-PCR oder RNA *in situ* Hybridisierung noch genauer analysiert.

Die Microarray-Technik basiert auf der spezifischen Hybridisierung komplementärer Nucleinsäure-Sequenzen: Aus einer Probe isolierte RNA wird in korrespondierende cDNA transkribiert und markiert z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Die markierten cDNA-Fragmente der Probe werden anschließend mit einer Vielzahl Transkript-spezifischer Oligonukleotide

bzw. cDNA-Fragmente, die strukturiert auf einem Trägersubstrat wie Glas gebunden sind, stringent hybridisiert.

#### Einfluss der *in vitro* Kultur auf Transkript-Abundanzen

In einer Reihe von Untersuchungen wurden Unterschiede in der Transkript-Abundanz einzelner, entwicklungsrelevanter Gene zwischen *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen beobachtet (Corcoran et al., 2006; Knijn et al., 2005; Lazzari et al., 2002; Lequarre et al., 2001; Lonergan et al., 2003). Es wird vermutet, dass bereits minimale Veränderungen im *in vitro* Kultur-System zu quantitativen Veränderungen von Transkript-Abundanzen spezifischer Transkripte führen, die möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung führen können (Rizos et al., 2002; Wrenzycki et al., 2001).

##### 2.5.4.1 Daten zur Expression Apoptose-assoziiierter Gene

Zahlreiche Studien bestätigen die Expression einzelner Komponenten des Apoptose-Systems in der Eizelle und/oder im frühen Embryo bei Maus, Mensch und Rind (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 2003; Liu et al., 2000; Metcalfe et al., 2004; Spanos et al., 2002).

#### Caspasen

Für die Caspasen 2, 3, 6, 7 und 12 wurden mRNA-Transkripte von der Eizelle bis zur Blastozyste bei Maus und Mensch nachgewiesen. Keine mRNA-Transkripte konnten für die Caspasen 1, 8 und 11 bis zur Blastozyste nachgewiesen werden (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 2003; Kelkar et al., 2003; Warner et al., 1998). Aktive Caspase 3- und 7-Proteine wurden über die Bindung an einen Fluoreszenz-markierten Caspase-Inhibitor in 2 - 4-Zell-Embryonen bis zur Blastozyste *in vitro* beim Rind detektiert (Anguita et al., 2007). In Übereinstimmung mit einer apoptotischen Morphologie der Zellkerne wurde mit derselben Methode aktive Caspase 3 erstmals in 8-Zell-Embryonen *in vitro* beim Rind beobachtet (Gjorret et al., 2007).

#### Die BCL2-Familie

Für zahlreiche pro- und anti-apoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie wurde von der Eizelle bis zur Blastozysten eine Expression von Transkripten und Proteinen bei Rind, Maus und Mensch nachgewiesen. Das lässt eine besondere Bedeutung dieser Genfamilie im Bezug auf Apoptose im frühen Embryo vermuten (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 1998; Knijn et al., 2005; Warner et al., 1998; Warzych et al., 2007). *BAX* (BCL2-associated X-protein) kodiert ein wichtiges pro-apoptotisches Protein, dessen Transkripte im frühen Embryo vermutlich

konstitutiv exprimiert sind. mRNA-Transkripte von BAX wurden sowohl in der Eizelle als auch in verschiedenen Entwicklungsstadien bis zur Blastozyste nachgewiesen (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 1998; Spanos et al., 2002; Warner et al., 1998; Yang and Rajamahendran, 2002). Eine signifikante Zunahme von BAX-Transkripten wurde in *in vitro* Rinder-Embryonen in Abhängigkeit vom Kulturmedium und fetalem Kälberserum als Medium-Zusatz (Rizos et al., 2003) und zytoplasmatischer Fragmentierung beobachtet (Yang and Rajamahendran, 2002). mRNA-Transkripte für BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), einem bedeutenden anti-apoptotischen Gegenspieler von BAX, waren mit unterschiedlichem Erfolg in der Eizelle und verschiedenen Entwicklungsstadien bis zur Blastozysten nachweisbar (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 1998; Metcalfe et al., 2004; Spanos et al., 2002; Warner et al., 1998; Yang and Rajamahendran, 2002). Es wird vermutet, dass die variable Expression von BCL2 mit der Qualität der Embryonen assoziiert ist. Eine Untersuchung an Einzelblastomeren von vitalen, arretierten bzw. nicht mehr lebensfähigen 1 - 9-Zell-Embryonen konnte nur vereinzelt in Blastomeren von vitalen Embryonen mRNA-Transkripte nachweisen (Liu et al., 2000).

### **Der FAS/FASLG-Signalweg**

Eine Expression von FAS (TNF receptor superfamily, member 6) und FASLG (Fas ligand) wurde auf RNA- und Proteinebene ab dem Blastozystenstadium bei Rind, Ratte und Mensch beobachtet (Kawamura et al., 2001; Kelkar et al., 2003; Pomar et al., 2005). Es wird vermutet, dass der FAS/FASLG-Signalweg ab dem Schlüpfen der Blastozyste in Trophoblastzellen von Bedeutung ist (Aschkenazi et al., 2002). Weiterhin scheint der FAS/FASLG-Signalweg in den Eizellen umgebenden Cumulus-Zellen aktiv zu sein (Kelkar et al., 2003; Rubio Pomar et al., 2004).

### **Inhibitoren der Apoptose (inhibitors of apoptosis, IAPs)**

Transkripte von Mitgliedern der IAP-Familie wurden sowohl in der Eizelle als auch in verschiedenen Teilungsstadien bei der Maus detektiert (Kawamura et al., 2003; Park et al., 2007). Beim Rind waren sowohl Transkripte für BIRC4 [baculoviral IAP repeat containing 4, ehemals XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis)] als auch BIRC5 [baculoviral IAP repeat containing 5(survivin)] von der Eizelle bis zur Blastozyste nachweisbar (Nino-Soto et al., 2007; Park et al., 2007). Bei Säugern ist das *BIRC4*-kodierende Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert („X-linked“ gene, siehe GenBank). Während der frühen Embryonalentwicklung kommt es bei weiblichen Embryonen zur Inaktivierung von einem X-Chromosom. Beim Rind wurden *in vitro* und *in vivo* in weiblichen Blastozysten höhere BIRC4-Transkript-Abundanzen

beobachtet als in männlichen Blastozysten (Jimenez et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome in einigen weiblichen Blastozysten noch nicht stattgefunden hat.

### **STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3)**

Das *STAT3*-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der vermutlich während der frühen Embryogenese bedeutsam ist für die Regulation von Embryo-Wachstum und Implantation (Maj and Chelmonska-Soyta, 2007). Die genaue Rolle von STAT3 im Rahmen von Apoptose ist noch unklar. Es wird vermutet, dass STAT3-Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression verschiedener pro- und anti-apoptotisch wirkender Gene spielen (Bromberg, 2000). Eine Expression von STAT3-Transkripten und -Proteinen wurde sowohl in der Eizelle als auch in verschiedenen Teilungsstadien bei Maus, Mensch und Rind beobachtet (Antczak and Van Blerkom, 1997; Antczak and Van Blerkom, 1999; Boelhauve et al., 2005). In Metaphase II-Eizellen bei Maus und Mensch wurde STAT3-Protein in polarisierter Form nachgewiesen. Während der Entwicklung bis zur Blastozyste bei der Maus konnte eine unterschiedliche Verteilung von STAT3-Protein zwischen den Blastomeren eines Embryos beobachtet werden. Blastozysten zeigten nach Inkubation mit einem monoklonalen STAT3-Antikörper in Trophoblastzellen eine starke Färbung, in ICM-Zellen nur eine schwache bis keine Färbung (Antczak and Van Blerkom, 1997; Antczak and Van Blerkom, 1999).

## **2.6 Quantitative Real-Time RT-PCR (RT-qPCR)**

Die Grundlage der quantitativen Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) ist eine konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986). Ausgehend von zwei Startpunkten (Primern) kommt es über die automatisierte Wiederholung einer zyklischen Abfolge von DNA-Strangtrennung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese zu einer enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Neben der Amplifikation von DNA-Fragmenten ist eine gleichzeitige Quantifizierung der gewonnenen DNA durch die Messung der Fluoreszenz von DNA-assoziierten Reporter-Farbstoffen im Reaktionsansatz möglich (Higuchi et al., 1992). Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen gemessener Fluoreszenz und DNA-Konzentration kann über den Fluoreszenz-Anstieg im Verlauf der PCR-Zyklen auf die Ausgangsmenge an Template geschlossen werden. Als Reporter-Farbstoffe werden neben DNA-interkalierenden Substanzen wie SYBR® Green auch Fluoreszenz-markierte Sonden verwendet (Bustin, 2000). Die Messung der Fluoreszenz erfolgt am Ende jedes einzelnen PCR-

Zyklus (real-time). Ein Analyseprogramm bestimmt den Zyklus (*threshold cycle*,  $C_T$ -Wert), bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals einen festgelegten Schwellenwert (*threshold*) überschreitet. Die Quantifizierung erfolgt über einen Vergleich mit dem  $C_T$ -Wert einer Sequenz bekannter Konzentration. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Methoden. Bei der am häufigsten angewandten „relativen Quantifizierung“ wird die Menge der unbekannt Zielsequenz im Verhältnis (semiquantitativ) zu einer als „endogenen Kontrolle“ (Referenz-Gen) bezeichneten Sequenz mit bekannter Menge angegeben. Als endogene Kontrolle werden Gene ausgewählt, von denen man annimmt, dass sie in konstanter Menge im Probenmaterial vorhanden sind. Sie werden auch als Haushaltsgene bezeichnet, da sie für den Grundstoffwechsel der Zelle benötigt werden wie z. B.  $\beta$ -Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) und Histon 2A (Bustin, 2000; Livak and Schmittgen, 2001). Im Falle einer absoluten Quantifizierung wird die absolute Kopienzahl der Zielsequenz in der Probe bestimmt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannter Konzentration benötigt. Als Standard dienen linearisierte Plasmide mit der klonierten Zielsequenz (rekombinante DNA-Standards, recDNA-Standard) oder mit Hilfe eines Plasmids *in vitro* transkribierte RNA (rekombinanter RNA-Standard, recRNA-Standard).

## 2.7 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Das Prinzip der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurde im Jahre 1957 von Marvin Lee Minsky in den USA zum Patent angemeldet (Minsky, 1961). Erst 30 Jahre später ermöglichten die Entwicklung geeigneter Laser und Computersysteme die praktische Anwendung dieser Technik für die dreidimensionale Untersuchung fluoreszierender Objekte (White et al., 1987). Heute ist die konfokale Laserscanning-Mikroskopie eine wichtige Standardtechnik in der Biologie und Medizin. Zu den Anwendungen zählen u. a. die hochauflösende Tomographie einzelner Zellen bzw. Zellorganellen sowie die Identifizierung von Genomveränderungen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

CLSM-Prinzip:

Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein Objekt Punkt für Punkt mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Dadurch werden nur die Fluoreszenz-Moleküle angeregt, die sich im Lichtweg des Laserstrahls befinden. Eine konfokal zum Laserfokus angeordnete Lochblende (Pinhole) sorgt dafür, dass nur die emittierte Strahlung aus der jeweiligen Fokusebene gesammelt wird. Fluoreszenzsignale ober- oder unterhalb der Fokusebene („out of focus“) werden ausgeblendet und es kommt zur Schichtaufnahme. Hinter der Lochblende befindet sich

ein lichtempfindlicher Empfänger (Photomultiplier, PMT), aus dessen Signal dann punktweise ein (Schnitt)-Bild zusammengesetzt wird. Der Durchmesser der Blende bestimmt dabei zusammen mit dem Mikroskop-Objektiv und dessen numerischer Apertur die Dicke des optischen Schnittes. Zeichnet man mehrere Schnitte in verschiedenen Fokusebenen auf, so erhält man eine Schichtung und kann daraus am Computer eine dreidimensionale Rekonstruktion des abgebildeten Objektes erstellen. Die punktförmige und einheitliche Anregung durch einen Laser sowie die Verminderung von „out of focus“ Licht über eine verstellbare Lochblende sind wichtige Unterschiede im Vergleich zu Weitfeldmikroskopen und ermöglichen die Herstellung von schärferen, kontrastreicheren Bildern. Das maximale Auflösungsvermögen liegt zwischen 250 nm und 330 nm lateral und zwischen 600 nm und 750 nm axial. Die Dicke optischer Schnitte liegt in einem Bereich von 0,8 - 1  $\mu\text{m}$ .

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie an Präimplantations-Embryonen ermöglicht u. a. eine detailliertere Analyse von Anzahl, Größe und Struktur der Blastomeren-Kerne. Dabei können morphologische Anzeichen von Zelluntergängen besser identifiziert werden. Die Aufnahme optischer Serienschnitte und die Rekonstruktion 3-dimensionaler Bilder an Embryonen setzt allerdings eine Präparation der Embryonen unter Erhalt ihrer kugelige Gestalt voraus. Die Analyse der „whole-mount“ präparierten Embryonen (Durchmesser: 140 - 200  $\mu\text{m}$ ) wird aber durch eine Abnahme des Auflösungsvermögen mit zunehmenden Abstand von Deckglas (aufgrund der Dicke der Probe) limitiert.

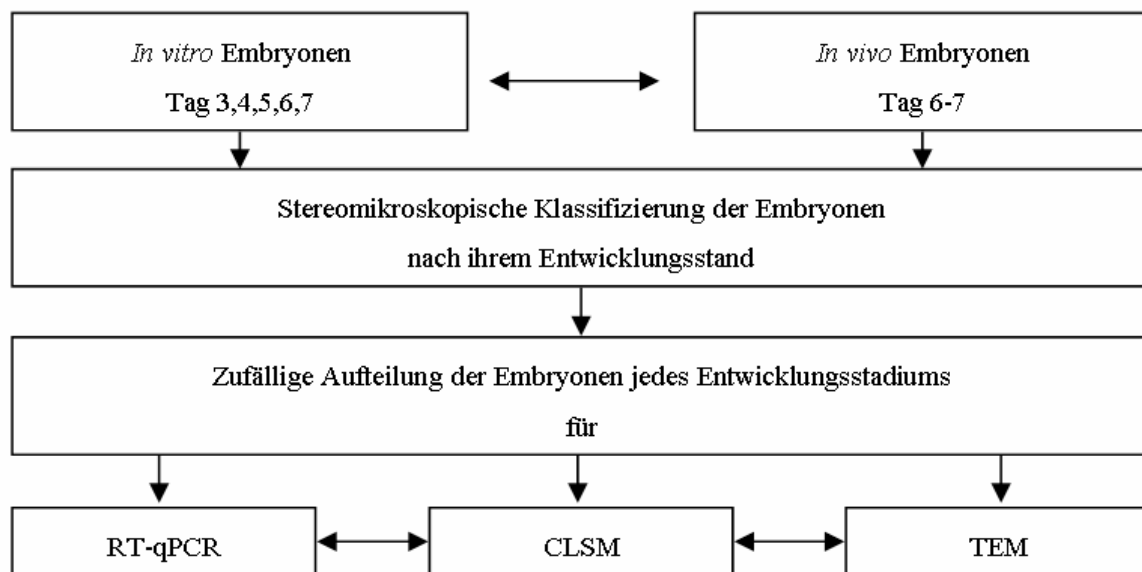
## **2.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

Das erste Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) wurde im Jahr 1931 von E. Ruska und M. Knoll gebaut (Knoll and Ruska, 1932) und 1987 mit dem Physik-Nobelpreis für E. Ruska gewürdigt (Ruska, 1987). Im optischen Aufbau ähnelt das TEM den herkömmlichen Lichtmikroskopen. Allerdings werden zur Beleuchtung eine Elektronenquelle und zur Strahlenfokussierung elektromagnetische Linsen (an Stelle von Glaslinsen) verwendet. Für eine ausreichende Beschleunigung der Elektronen arbeitet das TEM im Vakuum. Das Bild der Probe (Dicke 1 - 100  $\mu\text{m}$ ), das durch Wechselwirkung der einfallenden Elektronen mit den Probenatomen entsteht, wird mittels eines elektronenoptischen Systems auf einem Leuchtschirm abgebildet und kann mit einem Negativfilm bzw. mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet werden. Das Auflösungsvermögen herkömmlicher Lichtmikroskope wird mit dem Elektronenmikroskop um ein Tausendfaches übertroffen (Auflösung bis 0,2 nm), da beschleunigte Elektronen eine viel kürzere Wellenlänge als sichtbares Licht besitzen. Mit der Verbesserung der Präpariertechniken sowie einer Digitalisierung der Bilddaten hat sich die Elektronen-

mikroskopie zu einer heute unentbehrlichen Abbildungs- und Analyse-Technik entwickelt. Im Prinzip ist das TEM universell einsetzbar und wird sowohl in der Biologie/Medizin als auch den Materialwissenschaften benutzt. Die Transmissions-Elektronenmikroskopie findet in der Biologie und Medizin u. a. Anwendung in der Aufklärung der atomaren Strukturen organischer Moleküle und der Abbildung biologischer Objekte mit hoher Auflösung mit dem Ziel, die komplexen molekularen Prozesse biologischer Systeme besser zu verstehen. Schwierigkeiten bei der Beobachtung biologischer Objekte mittels TEM gibt es bei der Herstellung von gut durchstrahlbaren, vakuum- und einigermaßen strahlenbeständiger Präparate mit genügend hohem Kontrast. Obwohl das Auflösungsvermögen moderner Elektronenmikroskope im atomaren Bereich liegt, wird die Auflösung an biologischen Präparaten vor allem begrenzt durch Veränderungen der Proben infolge der Präparation und Kontrastierung sowie der strahlenbedingten Zerstörung während der Beobachtung.

## 2.9 Methodischer Ansatz

Für die Analyse der frühen Embryonalentwicklung beim Rind wurden *in vitro* fertilisierte (IVF) und -kultivierte (IVC) Rinderembryonen am Tag 3 (72 h), 4 (96 h), 5 (120 h), 6 (144 h) und 7 (168 h) nach Zugabe der Spermien aus der *in vitro* Kultur entnommen und nach morphologischer Beurteilung unter dem Stereomikroskop hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes klassifiziert. Die Embryonen jedes Entwicklungsstadiums wurden zufällig für die Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM), Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) und quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) aufgeteilt (Abb. 5). Dieser Ansatz erlaubt eine Korrelation von Transkript-Abundanzen der analysierten Gene mit konfokalen und elektronenmikroskopischen Analysen. Für eine Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden vergleichende Untersuchungen an *in vivo* Embryonalstadien durchgeführt, die 7 Tage nach künstlicher Besamung superovulierter Spendertiere nicht-invasiv durch Spülung der Uterushörner gewonnen wurden.



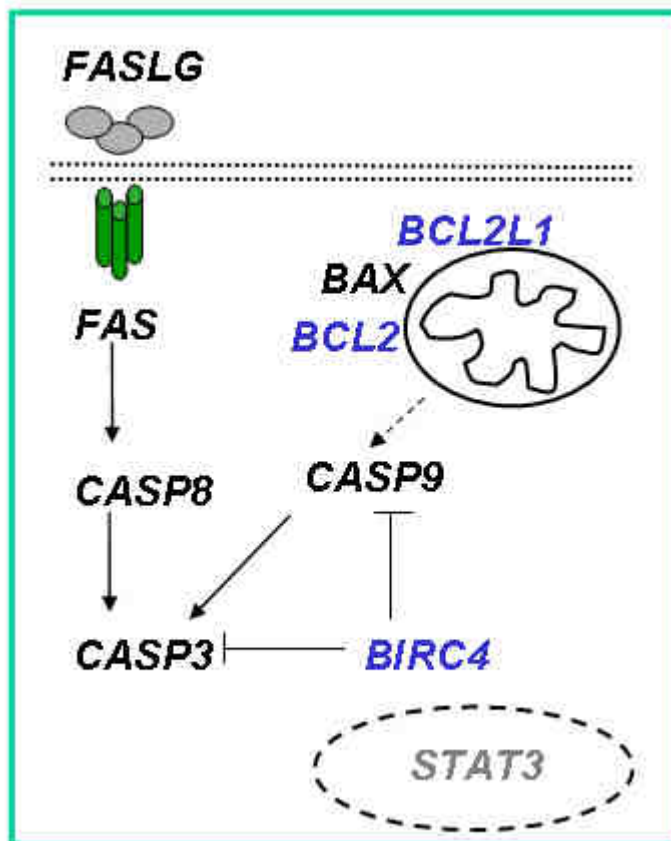
**Abbildung 5: Experimenteller Ansatz**

## 2.10 Auswahl der Gene

Die mRNA-Expression von ausgewählten Apoptose-assoziierten Genen wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR (RT-qPCR) analysiert. Die Auswahl der Gene erfolgte nach ihrer vermuteten Funktion hinsichtlich der Induktion, Regulation oder Exekution der Apoptose. Analysierte Gene mit pro-apoptotischer Funktion sind: *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FASLG* und *FAS* (Abb. 6, schwarze Schrift). Gene mit anti-apoptotischer Funktion sind: *BCL2*, *BCL2L1* und *BIRC4* (Abb. 6, blaue Schrift). *FAS*, *FASLG* und *CASP8* sind Komponenten des extrinsischen Apoptose-Induktionsweges über die sogenannten Todes-Rezeptoren. *BAX*, *BCL2L1*, *BCL2* und *CASP9* sind Komponenten des intrinsischen Induktionsweges über die Mitochondrien. *CASP3* kodiert die Effektor-Caspase 3, deren irreversible Aktivierung vermutlich den Untergang der betroffenen Zelle auslöst. *BIRC4* kodiert einen Inhibitor der Apoptose (inhibitor of apoptosis, IAPs), der aktive Caspase 3 und 9 blockieren kann (Bratton et al., 2002). *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3) kodiert einen Transkriptionsfaktor, der während der frühen Embryogenese vermutlich bedeutsam ist für die Regulation von Embryo-Wachstum und Implantation (Maj and Chelmonska-Soyta, 2007). Die Rolle von *STAT 3* im Rahmen von Apoptose ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass *STAT3* eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression verschiedener pro- und anti-apoptotisch wirkender Gene spielt. (Bromberg, 2000).



Zusätzlich wurden 18S rRNA (18S ribosomal RNA) und H2AFZ (histon 2 A family Z member)-Transkripte analysiert. Sie dienten als Referenz-Gene und wurden für eine nachträgliche Normalisierung der mRNA-Kopienzahlen Apoptose-assoziiierter Gene verwendet. 18S rRNA Transkripte werden in eukaryotischen Zellen aus Vorläufer-Transkripten (pre-45S rRNAs) prozessiert und posttranslational modifiziert. Zusammen mit anderen Proteinen bildet die 18S rRNA die kleine Unterheit (40S) eukaryotischer Ribosomen (McStay and Grummt, 2008), die für die Proteinsynthese verantwortlich sind. *H2AFZ* kodiert eine spezifische H2A-Histon-Variante, die replikationsunabhängig transkribiert wird (Hatch and Bonner, 1990). H2AFZ spielt eine komplexe, bislang aber weitgehend ungeklärte Rolle bei der epigenetischen/Chromatin-basierten Regulation der Genexpression (Draker and Cheung, 2009; Tham-birajah et al., 2009).



**Abbildung 6: Auswahl von Apoptose-assoziierten Genen**

Die Auswahl der Gene erfolgte nach der Funktion an der Induktion der Apoptose über den extrinsischen (*FAS/FASLG/CASP8*) bzw. intrinsischen (*BAX/BCL2/BCL2L1/CASP9*) Signalweg bzw. der Regulation oder Exekution der Apoptose (*CASP3/BIRC4*). Gen-Symbol: schwarz - pro-apoptotisch, blau - anti-apoptotisch, grau - anti- und pro-apoptotische Funktion

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Herstellung boviner Embryonen

##### 3.1.1 *In vitro* Produktion

Die *in vitro* Produktion (IVP) von Rinderembryonen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Biologie und Biotechnologie der Reproduktion“ am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München in Oberschleißheim nach einem Standardprotokoll (Berg, 1989). Die IVP umfasst drei Schritte: die Gewinnung und Reifung (*in vitro* Maturation, IVM) von Eizellen, die Befruchtung der gereiften Eizellen mit Tiefgefriersperma (*in vitro* Fertilisation, IVF) sowie die Kultivierung (*in vitro* Kultur, IVC) der nach Befruchtung erhaltenen Zygoten.

##### Material und Geräte:

- Rinderserum-Albumin (BSA; *Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Pyruvat (*Sigma*): 2,2 mg/ml in Aqua dest., bei - 20 °C gelagert
- Heparin (*Sigma*): 0,2 mg/ml in Aqua dest., bei - 20 °C gelagert
- Luteinisierendes Hormon (LH; *Kat.-Nr. 725, Sioux Biochemical, Sioux Center, USA*)  
2,5 U/ml in 0,9% NaCl<sub>2</sub>, bei - 20 °C gelagert
- Follikel-stimulierendes Hormon (FSH; *Kat.-Nr. 715, Sioux Biochemical, Sioux Center, USA*)  
5 U/ml in 0,9% NaCl<sub>2</sub>, bei - 20 °C gelagert
- Östrogen-Rinderserum (OCS) Eigenproduktion am Institut für Tierzucht
- 1x Phosphat-Puffer (PBS, Tab. 35, Anhang)
- BME-Aminosäuren, 100 x (*Gibco, Grand Island, USA*)
- MEM- Aminosäuren, 100 x (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Mineralöl (*Kat.-Nr. M5310, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Transferpettor (*Kat.-Nr. 701853, Brand, Wertheim, Deutschland*)
- CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Inkubator BB6060 (*Heraeus, Zürich, Schweiz*)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator Napco (*Precision Scientific, Chicago, USA*)
- Tischzentrifuge Rotanda 96 (*Hettich, Tuttlingen, Deutschland*)

##### *In vitro* Maturation (IVM)

Für die Gewinnung der Eizellen wurden Ovarien von Rindern aus dem Schlachthof verwendet. Die isolierten Ovarien wurden bis zur Weiterverarbeitung im Labor in 20 - 25 °C warmen Phosphat-Puffer (Isolierkanne) aufbewahrt. Aus 3 - 8 mm großen Follikeln wurde die Flüssigkeit unter Verwendung eines Aspirationsgerätes (Labotec, Göttingen, Deutschland) mit 80 -

100 mm Hg Unterdruck mittels einer Kanüle (Sterican® 100/20G/70 mm) abgesaugt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die unreifen Eizellen mit den umgebenden Cumuluszellen (cumulus oocyte complexes, COCs) wurden unter einem Stereomikroskop bei 20-facher Vergrößerung (M3B, Leica, Wetzlar, Deutschland) aus dem Sediment isoliert und nach morphologischen Eigenschaften des Eizell-Zytoplasmas sowie der Anzahl umgebener Cumulus-Zellschichten beurteilt. Die COCs wurden nach den Empfehlungen der I.E.T.S. (International Embryo Transfer Society) in vier Qualitätsklassen (Tab. 1) selektiert (Berg, 1989; Leibfried and First, 1979). Nur COCs der Klassen I und II wurden für die *in vitro* Reifung und Fertilisation verwendet und mehrmals mit frischem Maturationsmedium (Tab. 2) gewaschen.

**Tabelle 1: Qualitätsklassen der COCs nach I.E.T.S.**

| Klasse | Cumulus-Zellschichten | Eizell-Zytoplasma                |
|--------|-----------------------|----------------------------------|
| I      | > 5; lückenlos        | homogen, nicht granuliert        |
| II     | 3 – 5; lückenlos      | homogen, (nicht) granuliert      |
| III    | < 3; lückenhaft       | ungleichmäßig, granuliert,       |
| IV     | ohne                  | ungleichmäßig, granuliert, klein |

Die aus den Ovarfollikeln gewonnenen Eizellen sind noch nicht befruchtungsfähig. Sie müssen erst die Meiose I mit der Abschnürung des Polkörpers abschließen und die Meiose II bis zur Metaphase fortsetzen. Für die meiotische Reifung *in vitro* wurden die COCs über 22 h in Gruppen zu 30 - 40 Stück in 400 µl Maturationsmedium (Tab. 2) und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 Prozent CO<sub>2</sub> bei 39 °C inkubiert.

**Tabelle 2: Maturationsmedium**

|   |  |
|---|--|
| Modifiziertes Parker-Medium (MPM; Anhang Tab. 31) | 9,50 ml                                  |
| Luteinisierendes Hormon (LH)                      | 0,05 ml (Endkonzentration: 0,0125 IU/ml) |
| Follikel-stimulierendes Hormon (FSH)              | 0,05 ml (Endkonzentration: 0,025 IU/ml)  |
| Östrogen-Rinderserum (OCS)                        | 0,50 ml (Endkonzentration: 5%)           |

***In vitro* Fertilisation (IVF)**

Für die *in vitro* Fertilisationen wurde immer Sperma desselben Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh (DFV) verwendet (Herdbuchnummer: 10/9957197). Im Vorfeld der *in vitro* Fertilisation müssen auch die Spermien einen Reifungsprozess (Kapazitation) durchlaufen, der sie zur Befruchtung der Eizelle befähigt.

***In vitro* Kapazitation**

Zum Auftauen des in flüssigem Stickstoff gelagerten Tiefgefrierspermas wurde eine Sperma-Paillette für 20 sec in 37 - 39 °C warmes Wasser getaucht. In vorgewärmten Zentrifugenröhrchen wurden 100 µl Sperma (Konzentration:  $1 \times 10^5$  Spermien/µl) unter 1 ml Kapazitationsmedium (Tab. 3) geschichtet und für 1 - 2 h bei 39 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 Prozent CO<sub>2</sub> inkubiert. Kapazitierte, motile Spermien schwimmen aktiv in das überstehende Medium und wurden durch Überführung des Mediums in ein neues Zentrifugenröhrchen selektiert. Nach Zentrifugation mit 450 g für 10 min und Entfernen des überstehenden Mediums wurde mikroskopisch die Motilität der Spermien im Pellet überprüft. Die Konzentration der Spermien wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

**Tabelle 3: Kapazitationsmedium (Sperm-TALP, pH 7,35 - 7,4)**

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Modifiziertes Tyrode`s Medium<br>(Anhang, Tab. 32) | 10,0 ml                               |
| Pyruvat  | 0,5 ml (Endkonzentration: 0,11 mg/ml) |
| Rinderserum-Albumin                                | 60,0 mg (Endkonzentration: 6 mg/ml)   |

**Inkubation von Eizellen mit Spermien**

Die gereiften COCs wurden nach Entnahme aus dem Maturationsmedium wiederholt in Fertilisationsmedium (Tab. 4) gewaschen. Jeweils 20 - 30 COCs wurden anschließend in eine Vertiefung einer 4-Loch-Schale (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 400 µl frischem Fertilisationsmedium überführt. Nach Zugabe von 1 Million *in vitro*-kapazitierter Spermien pro ml Medium wurden die COCs über 18 h bei 39 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 Prozent CO<sub>2</sub> weiter kultiviert.

**Tabelle 4: Fertilisationmedium (Fert-TALP)**

|  |  |
|--|--|
| Modifiziertes Tyrode`s Medium<br>(Anhang, Tab. 33) | 10,0 ml                                |
| Pyruvat  | 0,1 ml (Endkonzentration: 0,022 mg/ml) |
| Heparin  | 0,5 ml (Endkonzentration: 0,01 mg/ml)  |
| Rinderserum-Albumin                                | 60,0 mg (Endkonzentration: 6 mg/ml)    |

***In vitro* Kultur (IVC)**

Die *in vitro* befruchteten Eizellen wurden unter Standardbedingungen im Kulturmedium SOF (Synthetic oviduct fluid; Tab. 5) kultiviert. Nach Beendigung der Kokultur mit den Spermien wurden die COCs in einem Zentrifugenröhrchen mit 1ml SOF-Medium für 3 min gevortext und zur vollständigen Entfernung von Cumuluszell-Resten mehrmals mit frischem Kulturmedium gewaschen. Je 30 - 40 (potentiell) befruchtete Eizellen wurden in eine Vertiefung einer 4-Loch-Schale mit je 400 µl frischem SOF-Medium überführt. Die Kulturen wurden mit 400 µl Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten von Wasser aus dem Medium zu verhindern und bei 39°C in einer sauerstoffreduzierten Atmosphäre von 5 Prozent O<sub>2</sub>, 5 Prozent CO<sub>2</sub> und 90 Prozent N<sub>2</sub> inkubiert.

**Tabelle 5: Kulturmedium**

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| SOF (Synthetic oviduct fluid; Anhang: Tab. 34) | 9,0 ml                        |
| BME-Aminosäuren                                | 0,4 ml (Endkonzentration: 4%) |
| MEM-Aminosäuren                                | 0,1 ml (Endkonzentration: 1%) |
| Östrogen-Rinderserum (OCS)                     | 0,5 ml (Endkonzentration: 5%) |

**Beurteilung der IVF-Versuche**

Die IVF-Kulturen wurden bis zu 7 Tagen kultiviert und nur zur Bestimmung der Teilungs- bzw. Blastozystenrate kurzzeitig aus dem Brutschrank genommen. Am Tag 3 nach *in vitro* Fertilisation (72 h nach Zugabe der Spermien) wurde unter einem Stereomikroskop die Anzahl der Eizellen bestimmt, die sich mindestens einmal geteilt hatten (Teilungsrate). Am Tag 7 (168 h) nach *in vitro* Fertilisation wurde die Anzahl Eizellen bestimmt, die das Blastozystenstadium erreicht haben (Blastozystenrate).

### 3.1.2 *Ex vivo* Gewinnung

Die *in vivo* Produktion boviner Embryonen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reproduktionstechniken der Embryo-Entnahmeeinheit Badersfeld des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München (DE-ETR 006 EWG) und dem Bayerischen Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie (BFZF) in Oberschleißheim nach einem Standardprotokoll (Reichenbach, 2003). Die *in vivo* Produktion umfasst drei Schritte: die hormonelle Induktion einer Mehrfach-Ovulation (Superovulation), die künstliche Besamung (artificial insemination, AI) mit Tiefgefriersperma und die nicht-invasive Gewinnung der Embryonen. Beim Rind können Embryonen innerhalb des Zeitraumes von Tag 5 bis Tag 18 nach AI nicht-invasiv aus dem Uterus (*ex vivo*) gespült werden. In der Praxis für kommerzielle Zwecke erfolgt die *ex vivo* Gewinnung am Tag 7 nach AI.

#### Material und Geräte:

- 1x Phosphat-Puffer (PBS, Anhang: Tab. 35)
- Vaginalspirale (PRID®, Ceva, Düsseldorf, Deutschland): 1,55 g Progesteron und 0,01 g Estradiol
- 1:1 Mischung (je 50 U/ml) LH/FSH (Pluset®, Laboratorio Callier, Barcelona, Spanien)
- 250 µg/ml Cloprostenol (Estrumate®, Essex, München, Deutschland)
- 4 µg/ml Buserelin (Receptal®, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland)
- Schwimmfilter (Kat.-Nr. 19010/0000, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland)

Als Spendertiere dienten 10 Kalbinnen der Rasse Deutsches Fleckvieh (DFV) im Alter von 15 - 21 Monaten mit 330 - 395 kg Körpergewicht. Alle Spendertiere wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub unter identischen Bedingungen gehalten. Insgesamt wurden 2 unabhängige Versuche im Abstand von 7 Wochen an den 10 identischen Spendertieren durchgeführt. Um bei allen Spendertieren am selben Tag eine Superovulation auszulösen, wurden deren Sexualzyklen synchronisiert. Das Behandlungsschema der Spendertiere ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Zyklus-Synchronisation erfolgte hormonell mittels einer Vaginalspirale mit 1,55 g Progesteron und 10 mg Estradiol. Für die Superovulation wurde eine 1:1 Mischung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH, 50 IU/ml) und Luteinisierendem Hormon (LH, 50 IU/ml) verwendet. Vier Tage nach dem Einsetzen der Vaginalspirale wurden 8 FSH/LH-Injektionen in abfallender Dosierung (100, 75, 75, 50, 50, 25, 25, 25 IU FSH/LH) über 4 Tage im zeitlichen Abstand von 12 h intramuskulär verabreicht. Mit der 6. und 7. FSH/LH-Injektion wurde den Spendertieren zusätzlich 500 µg des synthetischen Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) Cloprostenol intramuskulär verabreicht. Gleichzeitig mit der 7. FSH/LH-Applikation wurde die Vaginalspirale entnommen. 22 h, 37 h und 46 h nach der 8.

FSH/LH-Injektion wurden die Spendertiere mit Tiefgefriersperma eines DFV-Bullen, das auch bei der *in vitro* Produktion zum Einsatz kam, dreimal künstlich besamt. Gleichzeitig mit der ersten Besamung wurde 20 µg des synthetischen Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Buserelin intramuskulär verabreicht. Am Tag 7 (~ 160 h) nach der dritten Besamung wurden die Embryonen nicht-invasiv durch Spülung der Uterushörner mit jeweils 250 ml körperwarmem (~ 37 °C) PBS gewonnen. Nach Reduktion der Spüllösung mit Hilfe eines Schwimfilters auf wenige Milliliter wurden die Embryonen unter einem Stereomikroskop mit Heizplatte (37 °C) bei 20-facher Vergrößerung aus der verbliebenen Spüllösung isoliert und in eine Kulturschale (35/10 mm) mit frischem PBS überführt.

**Tabelle 6: Behandlungsschema der Spendertiere**

| Zyklustag | Uhrzeit       | Behandlung  |
|-----------|---------------|---|
| - 9       | 10:00         | 1,55 g Progesteron/10 mg Estradiol (Vaginalspirale)                     |
| - 5       | 07:00         | 100 IU FSH/100 IU LH  |
|           | 19:00         | 75 IU FSH/75 IU LH  |
| - 4       | 07:00         | 75 IU FSH/75 IU LH  |
|           | 19:00         | 50 IU FSH/50 IU LH  |
| - 3       | 07:00         | 50 IU FSH/50 IU LH  |
|           | 19:00         | 25 IU FSH/25 IU LH  |
|           |               | 500 µg Cloprostenol   |
| - 2       | 07:00         | 25 IU FSH/25 IU LH<br>500 µg Cloprostenol + Entnahme der Vaginalspirale |
|           | 19:00         | 25 IU FSH/25 IU LH  |
| - 1       | 17:00         | künstliche Besamung<br>20 µg Buserelin                                  |
| 0         | 08:00         | künstliche Besamung   |
|           | 17:00         | künstliche Besamung   |
| 7         | 08:00 - 11:00 | Gewinnung der Embryonen   |

### 3.2 Stereomikroskopische Klassifizierung der Embryonen

Die Embryonen wurden von einem Mitarbeiter mit langjähriger Erfahrung in Embryoproduktion und Embryotransfer beim Rind unter einem Stereomikroskop mit Heizplatte (37 °C) bei 20- bis 40-facher Vergrößerung morphologisch beurteilt (Tab. 7) und nach ihrem Entwicklungsstand klassifiziert.

#### Material:

- 1x Phosphatpuffer (PBS; Anhang: Tab. 35)
- 1mg/ml PVP in PBS (*Polyvinylpyrrolidon, Kat.-Nr. P5288, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)

#### *In vitro* Embryonen

Die *in vitro* Kultur von Embryonen wurde an Tag 3 (72 h), 4 (96 h), 5 (120 h), 6 (144 h) und 7 (168 h) nach *in vitro* Fertilisation (nach der Zugabe der Spermien) beendet. Die Embryonen wurden unter dem Stereomikroskop analysiert und hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes in drei Entwicklungsstadien (verzögert, intermediär und fortgeschritten) pro Untersuchungszeitpunkt selektiert. Die Definition der Entwicklungsstadien erfolgte im Vorfeld der Versuche und ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Bei fünf verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Tag 3 bis 7) wurden insgesamt 15 Entwicklungsstadien unterschieden. Die Embryonen aus jedem Entwicklungsstadium wurden zufällig in 10er Pools für die Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM), Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) aufgeteilt. Unbefruchtete Eizellen (unfertilized oocytes, UFOs), ungeteilte Zygoten, erheblich entwicklungsverzögerte Embryonen und bereits degenerierte Embryonen wurden nicht weitergehend analysiert.



*In vivo* Embryonen

Die *in vivo* entwickelten Embryonen wurden nicht-invasiv durch Spülung der Uterushörner gewonnen und nach den Kriterien der I.E.T.S. (International Embryo-Transfer Society) unter einem Stereomikroskop morphologisch beurteilt und klassifiziert (Robertson I, 1998). Nur Morulae- und Blastozystenstadien der I.E.T.S.-Klassen 1 und 2 (Tab. 7) wurden für die weitere Analyse ausgewählt. Aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer *in vivo* Embryonen wurden (kompaktierte) Morulae und frühe Blastozysten sowie Blastozysten und expandierte Blastozysten in je einem Entwicklungsstadium zusammengefasst (Tab. 8) und zufällig in 5er Pools für die Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM), Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) aufgeteilt.

**Tabelle 7: I.E.T.S.-Qualitätsklassen zur Beurteilung der *in vivo* Embryonen**

| Klasse | Bezeichnung          | Definition   |
|--------|----------------------|--|
| 1      | sehr gut bis gut     | Symmetrischer, runder Embryo mit einzelnen in Dichte, Farbe und Größe einheitlichen Blastomeren in Übereinstimmung mit dem erwarteten Entwicklungsstadium. Mindestens 85 Prozent des zellulären Materials* sind intakt und lebensfähig. Die Zona pellucida sollte dünn sein und keine konkave oder flache Oberfläche besitzen. |
| 2      | mäßig                | Mäßige Abweichung in Form des Embryos oder in Größe, Farbe und Dichte einzelner Blastomere. Mindestens 50 Prozent des zellulären Materials* sollte intakt und lebensfähig sein.  |
| 3      | schlecht             | Große Abweichungen in Form des Embryos bzw. in Größe, Farbe und Dichte einzelner Blastomere. Mindestens 25 Prozent des zellulären Materials* sollten intakt und lebensfähig sein.  |
| 4      | degeneriert bzw. tot | degenerierte (tote) Embryonen, ungeteilte Zygoten, unbefruchtete Eizellen  |

\*bestimmt über den Anteil ausgeschleusten Materials in den perivitellinen Spalt

**Tabelle 8: Stereomikroskopische Klassifizierung boviner Embryonen in definierte Entwicklungsstadien**

| <b><i>In vitro</i> Embryonen</b>            |  |  |                               |
|---|--|--|-------------------------------|
| Zeitpunkt nach IVF *<br>Tag (h)             | Entwicklungsstadium                      |  |                               |
|   | verzögert                                | intermediär  | fortgeschritten               |
| 3 ( 72 )                                    | 2 - 7 Zellen                             | 8 - 12 Zellen  | > 12 Zellen                   |
| 4 ( 96 )                                    | 6 - 12 Zellen                            | 13 - 20 Zellen   | > 20 Zellen                   |
| 5 (120)                                     | 16 - 20 Zellen                           | nicht-kompaktierte Morula                                | kompaktierte Morula           |
| 6 (144)                                     | kompaktierte Morula                      | frühe Blastozyste  | nicht-expandierte Blastozyste |
| 7 (168)                                     | nicht-expandierte Blastozyste            | expandierte Blastozyste                                  | schlüpfende Blastozyste       |
| <b><i>In vivo</i> Embryonen</b>             |  |  |                               |
| Zeitbereich nach AI <sup>Δ</sup><br>Tag (h) | Entwicklungsstadium                      |  |                               |
|   | verzögert                                | fortgeschritten  |                               |
| 6 - 7<br>(159/168/183)                      | kompaktierte Morula<br>frühe Blastozyste | nicht-expandierte Blastozyste<br>expandierte Blastozyste |                               |

\*Zugabe der Spermien zu den Cumulus-Eizell-Komplexen; <sup>Δ</sup> nach 3-maliger künstliche Besamung (artificial insemination, AI)

### 3.3 Dreidimensionale Analyse mittels konfokaler Mikroskopie

#### 3.3.1 Fixierung der Embryonen

Die Embryonen wurden mit 1,3 Prozent Paraformaldehyd (PFA) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach dem Waschen mit PBS/PVP für 5 min wurden die Embryonen entweder direkt weiter verwendet oder bis maximal 1 - 2 Wochen bei 2 - 8 °C in PBS/PVP aufbewahrt.

##### Material und Geräte:

- 1x Phosphatpuffer (PBS; Anhang: Tab. 35)
- PBS/PVP: 1 mg/ml PVP in PBS (*Polyvinylpyrrolidon, Kat.-Nr. P5288, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- 13 mg/ml PFA in PBS (*Paraformaldehyd, Kat.-Nr. P6148, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*): nach Zugabe weniger Tropfen 2,5 N NaOH unter Rühren bei 55 °C lösen, pH 7,4 mit 1 M HCl; 1 ml Aliquots bei - 20 °C gelagert
- 4-Loch-Schalen (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)
- Transferpettor (*Brand, Wertheim, Deutschland*)

#### 3.3.2 Nachweis von DNA-Strangbrüchen mit TUNEL

DNA-Strangbrüche sind ein Indiz für Apoptose. Der Nachweis kann *in situ* erfolgen, indem markierte Desoxynukleotide (dUTPs) durch eine Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) an die freien 3'-Hydroxyl-Enden der DNA-Strangbrüche angefügt (Gavrieli et al., 1992) und mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Reaktion wird als TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) oder ISEL (*in situ* end labeling) bezeichnet.

##### Material und Geräte:

- *In Situ Cell Detection*“ Kit, Fluorescein (*Roche, Basel, Schweiz*)
- 1 mM Staurosporin (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- 1x Phosphatpuffer (PBS; Anhang: Tab. 35)
- PBS/PVP: 1 mg/ml PVP in PBS (*Polyvinylpyrrolidon, Sigma*)
- 50 IU/ml DNase I in PBS (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- 13 mg/ml PFA in PBS (*Paraformaldehyd, Kat.-Nr. P6148, Sigma*)
- Objektträger mit Vertiefung (*Kat.-Nr. H884.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland*)
- 4-Loch-Schalen (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)
- Transferpettor (*Brand, Wertheim, Deutschland*)
- Brutschrank (*Heraeus, Zürich, Schweiz*)
- Stereomikroskop, SteREO CL1500 ECO (*Zeiss, Oberkochen, Deutschland*)

Der TUNEL-Test wurde mit dem „*In Situ Cell Detection*“ Kit mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem dUTP nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die fixierten Embryonen wurden für 1 h bei RT mit 0,5 Prozent (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend wiederholt mit PBS/PVP gewaschen. Jeweils 10 Embryonen wurden in einem 25 µl-Tropfen Reaktionsgemisch (TdT-Enzym, Reaktionspuffer, FITC-markierte dUTP-Nukleotide) auf einem Objektträger mit Vertiefung gegeben und für 1 h bei 37 °C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit frischem PBS/PVP wurden die Embryonen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'6'-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt und eingebettet (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.5).

(Technische) Kontrollen wurden wie folgt hergestellt:

Die DNA fixierter Embryonen wurde durch Inkubation mit 50 IU/ml DNase I für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer partiell verdaut. Nach mehrmaligem Waschen in PBS/PVP wurde der TUNEL-Test durchgeführt. Die Embryonen wurden mit TdT-Enzym (Positivkontrolle) bzw. ohne TdT-Enzym (Negativkontrolle) im Reaktionsansatz inkubiert.

Induktion von Apoptose:

In bovinen, fetalen Fibroblasten (Zelllinie: BFF 116, Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München) und IVF-Embryonen wurde Apoptose mit Staurosporin induziert. Semikonfluente Fibroblasten-Kulturen wurden 1 h, 2 h bzw. 3 h mit 1 µM Staurosporin im Medium kultiviert und anschließend mit 1,3 Prozent PFA für 15 min bei RT fixiert. Tag 4 ¾ IVF-Embryonen (114 h nach Zugabe der Spermien) wurden für 30 h mit 10 µM Staurosporin im Medium weiter kultiviert und anschließend fixiert (Kapitel 3.3.1). Danach wurde der TUNEL-Test durchgeführt. Parallel kultivierte Zellen bzw. Embryonen ohne STS im Medium wurden in einem Reaktionsansatz mit (Positivkontrolle) bzw. ohne TdT-Enzym (Negativkontrolle) inkubiert.

### 3.3.3 DNA-Färbung

Die DNA der Zellkerne wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'6'-Diamidino-2-phenylindol) gefärbt, der sich bevorzugt in den AT-reichen Regionen an die kleine Furche der DNA anlagert. Gebunden an doppelsträngige (ds) DNA liegt das Absorptionsmaximum von DAPI bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Die DAPI-Färbung erfolgte im Rahmen der Einbettung der Embryonen in Vectashield-DAPI (Kapitel 2.3.5) und diente (a) der Bestimmung der Zellkernzahl, (b) der morphologischen Identifizierung von Zellkernuntergängen und (c) als Gegenfärbung für TUNEL.

### 3.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Proteinen erfolgte über unmarkierte (Primär)-Antikörper (Tab. 9). Neben Apoptose-assoziierten Proteinen (CASP3, BCL2L1, BAX und BIRC4) wurden STAT 3, Ki-67 und Nucleolin analysiert. Für die Detektion der spezifischen Protein-Antikörper-Komplexe wurden Fluorochrom-gekoppelte (Sekundär)-Antikörper verwendet (Tab. 10). Das Aktin-Mikrofilament-System der Zellen wurde mit Tetramethylrhodamine-isothiocyanat (TRITC)-markiertem Phalloidin (1 µg/ml) angefärbt.

#### Material und Geräte:

- 1x Phosphatpuffer (PBS; Anhang: Tab. 35)
- PBS/PVP: 1 mg/ml PVP in PBS (*Polyvinylpyrrolidon, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- 5 mg/ml Triton X-100 in PBS (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- 1 µg/ml Phalloidin in PBS (*Kat.-Nr. P1951, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Objektträger mit Vertiefung (*Kat.-Nr. H884.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland*)
- 4-Loch-Schalen (*Nunc, Wiesbaden, Deutschland*)
- Transferpettor (*Brand, Wertheim, Deutschland*)
- Brutschrank (*Heraeus, Zürich, Schweiz*)
- Stereomikroskop, SteREO CL1500 ECO (*Zeiss, Oberkochen, Deutschland*)

Fixierte Embryonen (siehe Kapitel 3.3.1) wurden mit 0,5 Prozent (v/v) Triton X-100 in PBS für 1 h bei RT permeabilisiert und anschließend wiederholt mit PBS/PVP gewaschen. Die Antikörperfärbungen wurden in einem 50 µl Volumen auf Objektträgern mit Vertiefung in einer feuchten Kammer bei 37 °C durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die (Primär-) Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS/PVP und TRITC-markiertes Phalloidin (1 µg/ml) für 1 h mit den Embryonen inkubiert. Reste nicht gebundenen (Primär-) Antikörpers wurden durch wiederholtes Waschen für 5 min mit frischem PBS/PVP entfernt. Im zweiten Schritt wurde der Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/PVP zu den Embryonen gegeben und erneut für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS/PVP wurde die DNA der Zellkerne mit DAPI gefärbt (siehe Kapitel 3.3.3) und die Embryonen für die Analyse am CLSM eingebettet (siehe Kapitel 3.3.5).

Zur Überprüfung der Spezifität der Färbung wurden Negativkontrollen durch a) Weglassen des Primär-Antikörpers und durch b) Ersatz des Primer-Antikörpers durch Gesamt-IgG der gleichen Spezies (Tab. 11) durchgeführt.

**Tabelle 9: Primär-Antikörper**

| Protein          | Typ/Klon | Verdünnung/<br>Konzentration<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Hersteller (Kat.-Nr.)                    |
|------------------|----------|--|--|
| BAX              | p, K     | 1:250  | Biomol, Hamburg, Deutschland (1063-1)    |
| BCL2L1           | p, Z     | 4,0  | Santa Cruz Biotechnologies, USA (sc7122) |
| BIRC4            | p, K     | 1:1000   | Biomol, Hamburg, Deutschland (IMG5774)   |
| Activierte CASP3 | p, K     | 1:500  | Cell signaling, Beverly, USA (9661s)     |
| Ki-67            | m, M     | 1,6  | Dako, Hamburg, Deutschland (M7240)       |
| Nucleolin        | p, K     | 10,0   | Sigma, Taufkirchen, Deutschland (N2662)  |
| STAT3            | p, K     | 1:50   | Santa Cruz Biotechnologies, USA (sc482)  |

m - monoklonal, p - polyklonal, K - Kaninchen, Z - Ziege, M - Maus

**Tabelle 10: Sekundär-Antikörper (Dianova, Jackson Immuno Research, Hamburg, Deutschland)**

| Gesamt-IgG           | Fluorochrom | Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Kat.-Nr.  |
|----------------------|-------------|------------------------------------|-----------|
| Esel anti-Ziege      | FITC        | 3,0                                | 705095003 |
| Esel anti-Maus       | Cy5         | 2,8                                | 715175150 |
| Ziege anti-Kaninchen | FITC        | 3,0                                | 111095003 |
| Ziege anti-Maus      | Cy5         | 3,0                                | 115175003 |

IgG - Immunglobulin G

**Tabelle 11: Spezies-spezifisches Gesamt-IgG (Dianova, Jackson Immuno Research)**

| Gesamt-IgG | Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Kat.-Nr.    |
|------------|------------------------------------|-------------|
| Maus       | 1,5                                | 015-000-002 |
| Ziege      | 4,0                                | 005-000-003 |
| Kaninchen  | 10,0                               | 011-000-003 |

IgG - Immunglobulin G

### 3.3.5 Einbettung der Embryonen

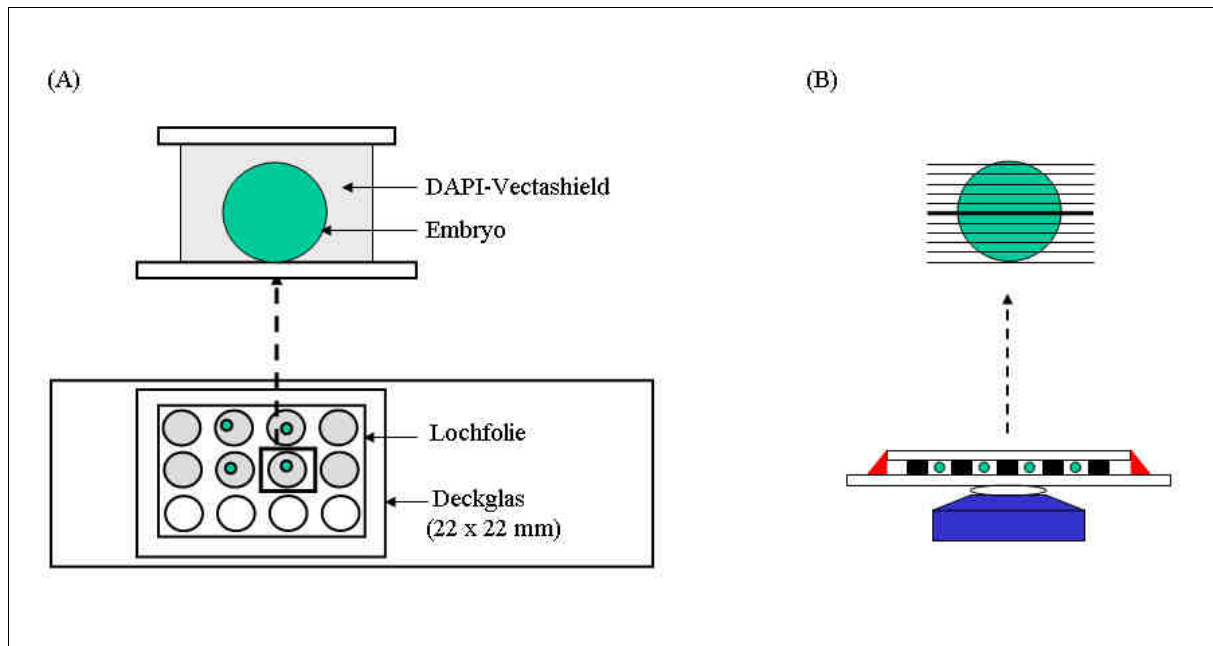
#### Material und Geräte:

- Vectashield-DAPI (*Kat.-Nr. VCH1200L010, Axxora/Alexis, Lörrach, Deutschland*)
- Deckglas, 24 x 76 x 1,7 mm, Firma Hecht (*Kat.-Nr. 7996, Schubert & Weiß, Deutschland*)
- Deckglas, 22 x 22 mm (*Kat.-Nr. 6311336, VWR, Darmstadt, Deutschland*)
- Objektträger (*Kat.-Nr. 6310650, VWR*)
- Klebefolie, gelocht (*Mactac, Stow, USA*)
- Transferpettor (*Brand, Wertheim, Deutschland*)
- Stereomikroskop SteREO CL1500 ECO (*Zeiss, Oberkochen, Deutschland*)

Die Embryonen wurden unter Erhaltung ihrer dreidimensionalen Struktur eingebettet. Dafür wurde ein Stück gelochte Klebefolie (Dicke ~ 200 µm, Loch-Durchmesser 2 mm) auf ein Deckglas der Größe 24 x 76 mm aufgebracht. Die Embryonen wurden einzeln in die Löcher der Folie überführt. Nach dem Auffüllen der Löcher mit Vectashield-DAPI wurde die Folie mit einem 22 x 22 mm großen Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Nagellack versiegelt (Abb. 7 A). Die eingebetteten Embryonen wurden bis zur Analyse am CLSM bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt.

### 3.3.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Optische Serienschritte von Embryonen (Abb. 7 B) wurden mit einem inversen Zeiss LSM 510 Meta Laserscanning-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und einem 40x PlanApochromat Ölimmersions-Objektiv (Numerische Apertur: 1.3) mit der Steuerungssoftware LSM, Version 3.2 von Zeiss auf einem PC unter Windows 2000 aufgenommen.



**Abbildung 7: Einbettung und Analyse der Embryonen mittels CLSM**

(A) Die Embryonen wurden unter Erhalt ihrer 3-dimensionalen Struktur eingebettet und (B) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) in optische Serienschritte zerlegt.

**Tabelle 12: Laser-Filter-Farbstoff Kombinationen des Zeiss LSM Meta 510**

| Laser         | Wellenlänge (nm) | Emissionsfilter (nm) | Farbstoffe | $Ex_{max}/Em_{max}$ |
|---------------|------------------|----------------------|------------|---------------------|
| Argon         | 364              | BP: 385 - 470        | DAPI       | 358/461             |
| Argon/Krypton | 488              | BP: 505 - 530        | FITC       | 492/521             |
| HeNe1         | 543              | BP: 560 - 615        | TRITC      | 550/570             |
| HeNe2         | 633              | LP: 650              | Cy5        | 650/670             |

BP = Bandpass, LP = Langpass;  $Ex_{max}$  = Extinktionsmaximum;  $Em_{max}$  = Emmissionsmaximum



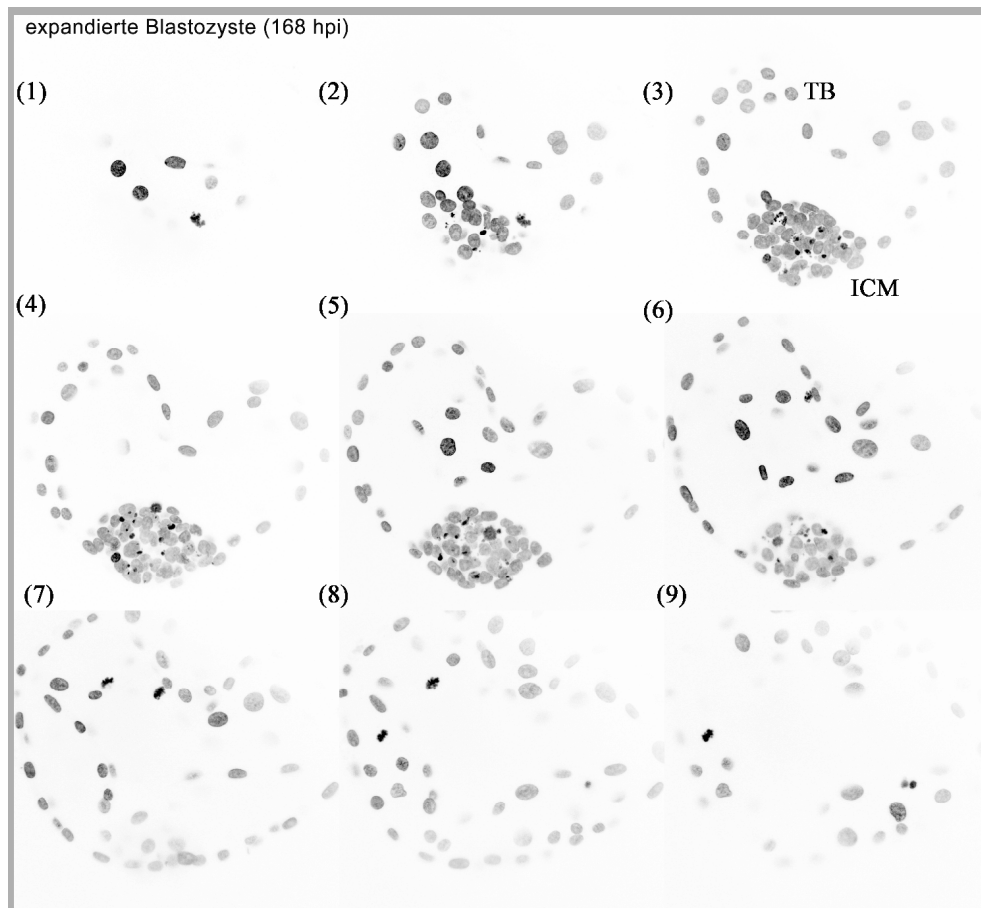
In jeder Fokusebene wurden nacheinander Bilder für die einzelnen Farbkanäle aufgenommen. Für jeden Farbkanal wurde die Bildfläche zweimal abgerastert. Die Signalwerte der beiden Durchgänge wurden gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) zu erhöhen. Für jeden Farbstoff wurde ein Stapel von 8 Bit Grauwertbildern aus 512 x 512 Pixeln (Pixelgröße: 350 x 350 nm) aufgenommen. Der Abstand zwischen zwei Schnittebenen betrug 1 µm ebenso wie die optische Schnittdicke einer Schnittebene. Von einzelnen Embryonen wurden Stapel von 8 Bit Grauwertbildern mit höherer Auflösung aufgenommen.

### 3.3.7 Quantitative Analyse

Die konfokalen Bildstapel aus bis zu 180 optischen Einzelschnitten wurden mit Hilfe der Open Source Software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) analysiert.

#### 3.3.7.1 Zellzahl

Die Zellzahl wurde über die Anzahl der DAPI gefärbten Zellkerne und mitotischen Figuren bestimmt. Mehrkernige Zellen wurden vernachlässigt. Die optischen Einzelschnitte (1 µm) des im DAPI-Farbkanal erzeugten Bildstapels wurden zu Teilstapeln von je 20 µm Dicke zusammengefaßt (Z-Projektionen, Abb. 8). Nacheinander wurde jede Schnittebene mit der darunter liegenden Nachbarebene verglichen und jeder erstmals auftretende Zellkern gezählt. In Blastozysten wurden Zellen der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophoblasten (TB) unterschieden und die Zellzahlen getrennt voneinander bestimmt. Die äußerste Zellschicht mit den typischerweise abgeflachten Zellkernen wurde als Trophoblast definiert.



**Abbildung 8: Montage der Bildstapel einer Tag 7 expandierten Blastozyste**

Die 180 optischen Einzelschnitte wurden zu 9 Bildstapeln (Z-Projektionen) mit jeweils 20 Einzelschnitten zusammengefasst. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde nacheinander jede Schnittebene mit der darunterliegenden Nachbarebene verglichen und jeder erstmals auftretende DAPI-gefärbte Zellkern gezählt. Dabei wurden Zellen der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophoblasten (TB) unterschieden. Die äußere Zellschicht mit den typischerweise abgeflachten Zellkernen wurde als Trophoblast definiert.

### 3.3.7.2 Zellkerngröße

Ein Parameter zur Unterscheidung der ersten Zellteilungsgenerationen ist die Größe von Zellkernen. Im Verlauf der ersten Zellteilungen kommt es zu einer Abnahme der Zellkerngröße. Die mittlere Zellkerngröße morphologisch intakter Blastomerenkerne an Tag 3 bis 7 nach IVF wurde bestimmt, indem ein zentraler Schnitt durch den Zellkern ausgewählt und der DAPI-gefärbte Bereich markiert wurde. Eine automatisierte Statistik berechnete die Schnittfläche durch Zählung der vorhandenen Bildpunkte (Pixel) im markierten Bereich (Pixelgröße:  $0,35 \times 0,35 \mu\text{m} = 0,1225 \mu\text{m}^2$ ).

### 3.3.7.3 Zelluntergänge

Zelluntergänge wurden nach Analyse der DAPI-gefärbten Zellkerne im CLSM bestimmt. Sowohl kondensierte, fragmentierte und degradierte Zellkerne als auch die Reste mitotischer Figuren wurden als untergehende bzw. tote Zellen gewertet.

Zusätzlich wurde das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in untergehenden Zellen mit TUNEL analysiert. Zellkerne waren positiv auf DNA-Strangbrüche bei (a) einer mindestens 2-fach erhöhten Fluoreszenz-Intensität gegenüber der Hintergrundfluoreszenz, (b) Kollokalisierung mit Chromatin des Zellkernes (DAPI-Färbung) sowie (c) gleichzeitiger Beurteilung als Zelluntergang im DAPI.

## 3.4 Ultrastrukturelle Analyse mittels TEM

### 3.4.1 Fixierung und Einbettung der Embryonen

#### Material und Geräte:

- 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer (*Kat.-Nr. 01131, Polyscience, Warrington, USA*)  
Stammlösung (0,4 M): 8,56 g  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  in 200 ml Aqua dest., pH 7,2 mit 0,2 M HCl; 1:2 verdünnt mit Aqua dest.
- Fixans nach Karnovsky; Stammlösung: 1:2 Mischung aus 0,05 g  $\text{CaCl}_2$  in 10% (v/v) Paraformaldehyd und 0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer, bei 4 °C gelagert; vor Gebrauch 7 ml Stammlösung mit 0,96 ml 25% Glutaraldehyd mischen
- 30 mg/ml Kaliumferrocyanid in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (*Kat.-Nr. P9387, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*), 24 h vor Gebrauch herstellen, bei 4°C gelagert
- 2% (v/v) Osmiumtetroxid in 0,1M Natrium-Cacodylatpuffer (*Kat.-Nr. 0972A, Polyscience, Warrington, USA*), bei 4 °C gelagert
- 0,2 g/ml Rinderserum-Albumin in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (*Kat.-Nr. A-7906, Sigma*), 24 h vor Gebrauch herstellen, bei 4 °C gelagert
- 25% Glutaraldehydlösung (*Kat.-Nr. 01909, Polyscience, Warrington, USA*)
- Propylenoxid (*Kat.-Nr. 1.12492, Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Methylenblau/Azur II-Färbelösung; Lösung A: 1mg/ml Azur II in Aqua dest.; Lösung B: 1mg/ml Methylenblau in 1% Borax; 1:1 Mischung von Lösung A + B, bei RT gelagert
- Poly/Bed® 812 BDMA Kit (*Kat.-Nr. 21844, Polyscience, Warrington, USA*)
- Einbettungsgießform mit 24 Vertiefungen (*Kat.-Nr. G3690, Plano, Wetzlar, Deutschland*)
- Ultramikrotom Ultracut E (*Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich*)
- Heizplatte Medax (*Nagel KG, Kiel, Deutschland*)
- Stereomikroskop (*Leitz, Wetzlar, Deutschland*)

Die Embryonen wurden über Nacht bei 4 °C in Fixans nach Karnovsky fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 min bei RT mit 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer wurden die Embryonen mit einer 1:1 Mischung aus 2 Prozent (v/v) Osmiumtetroxid und 3 Prozent (m/v) Kaliumferrocyanid für 2 h bei 4 °C weiter fixiert und vorkontrastiert (Osmierung). Nach wiederholtem Waschen für jeweils 20 min in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer wurden die Embryonen in 2 - 3 Tropfen 20-prozentiger (m/v) BSA-Lösung für 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 Tropfen 25-prozentiger Glutaraldehydlösung wurden die pelletierten Embryonen mit 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30 min in 50 Prozent, 70 Prozent, 90 Prozent Ethanol, 3 x 30 min 100 Prozent Ethanol) dehydriert. Für die Einbettung der Embryonen in Kunstharz (Epon) wurde der Poly/Bed® 812 BDMA Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden für 2 x 15 min in Propylenoxid überführt. Anschließend wurde das Propylenoxid in drei Schritten durch Epon ersetzt: (a) 1 h in Propylenoxid:Epon (2:1), (b) 24 h in Propylenoxid:Epon (1:1), (c) 1 h in Epon. Anschließend wurden die Embryonen in Einbettungsgießformen aus Kunststoff (12,5 mm x 4,5 mm x 3 mm) mit Epon überführt. Die Polymerisation des Einbettungsharzes erfolgte bei 60 °C für 24 h. Anschließend wurde das verfestigte Einbettungsharz mit der enthaltenen Probe (Präparatblock) vorsichtig aus der Gießform gelöst.

An einem Ultramikrotom wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte von den Präparateblöcken angefertigt und auf einer Heizplatte für 2 - 3 min mit Methylenblau/Azur II-Färbelösung angefärbt. Nach dem Abspülen der Färbelösung mit Aqua dest. wurden die Schnitte zum Trocknen nochmals auf die Heizplatte gelegt. Die Auswertung der Übersichtsschnitte erfolgte am Stereomikroskop bei 20 - 40 facher Vergrößerung.

### 3.4.2 Herstellung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten

#### Material und Geräte:

- gesättigte Uranylacetat-Lösung in Aqua dest. (*Kat.Nr. R1260A, Plano, Wetzlar, Deutschland*), bei 4 °C gelagert
- Reynolds Bleicitratlösung: 1,33 g Bleicitrat und 1,76 g Natriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O in 30 ml frisch abgekochtem Aqua dest. unter Schütteln lösen, nach 30 min Zugabe von 8 ml 1 N NaOH Lösung, auf 50 ml mit Aqua dest., 3 Monate bei 4 °C haltbar
- Drukker Diamantmesser (*Kat.Nr. V65860160, Labtec, Göttingen, Deutschland*)
- Maxtaform Kupfernetze, Fa. Pyser (*Kat. Nr. NHR23C, Plano, Warrington, USA*)
- Gridboxen (*Kat. Nr. B80100, Plano, Warrington, USA*)
- Ultramikrotom Ultracut E (*Fa. Reichert Jung, Wien, Österreich*)

Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie wurden an einem Ultramikrotom mit Drukker-Diamantmesser angefertigt. Die 60 - 70 nm dicken Schnitte wurden auf kleine Kupfernetze aufgebracht und durch Behandlung mit gesättigter, wässriger Uranylacetatlösung für 10 min und mit Reynolds-Bleicitratlösung für 3 min nachkontrastiert. Anschließend wurden die Kupfernetze mit Aqua dest. gewaschen, luftgetrocknet und in Gridboxen aufbewahrt.

### 3.4.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Aufnahmen von Ultradünnschnitten wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 902 (Zeiss, Oberkochen) angefertigt. Als Elektronenquelle diente eine Wolfram-Haarnadelkathode. Die Beschleunigungsspannung der emittierten Elektronen betrug 80 kV. Die erzeugten Bilder wurden an einem Leuchtbildschirm angezeigt. Kontrastreiche Bereiche der Probe werden schwarz, weniger kontrastreiche Bereiche grau bis farblos abgebildet. Nach der Auswahl des gewünschten Ausschnittes erfolgte die Bildaufnahme durch Belichtung eines schwarz-weiß-Films mit dem Format 70 x 60 mm (Kat.-Nr. UO1008, MACO ORT 25c/ISO25/15°, Maco Photo Products, Hans O. Mahn & CO., Deutschland). Die Negative wurden nach der Entwicklung mit 600 dpi mit einem Flachbett-Scanner digitalisiert.

### 3.5 Analyse der mRNA-Expression Apoptose-assoziiierter Gene

Die Expression von ausgewählten Apoptose-assoziierten Genen (Kapitel 2.10) in Eizellen und Präimplantations-Embryonen beim Rind wurde mittels quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) analysiert. Mit Hilfe von Transkript-spezifischen Plasmid-DNA-Standards wurde die absolute Anzahl an Kopien der analysierten Gentranskripte in Eizellen und definierten Präimplantationsstadien ermittelt (absolute Quantifizierung). Die DNA-Standards wurden durch Klonierung amplifizierter PCR-Fragmente in einen Plasmidvektor generiert.

Alle benötigten Lösungen, Verdünnungen und Reaktionsansätze wurden unter Verwendung von steril filtriertem Reinstwasser (Milli-RO Plus 60, Schwalbach, Deutschland) und sterilen Pipettenspitzen mit Filter (ART<sup>®</sup>, Molecular BioProducts, San Diego, USA) angesetzt. Die durchgeführten Arbeitsschritte sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

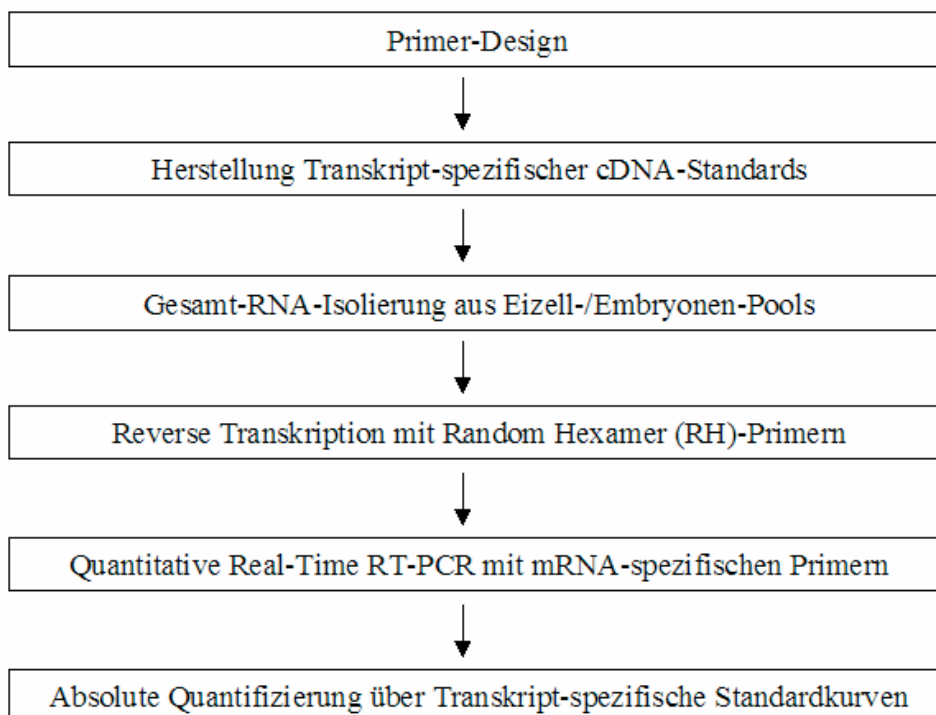


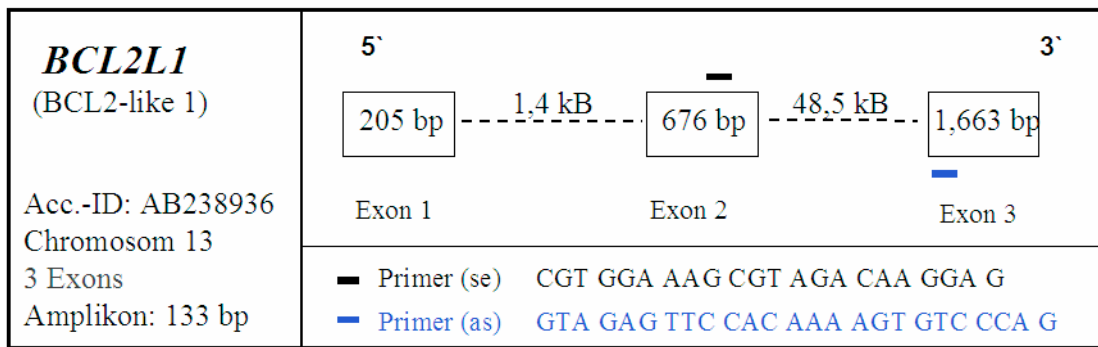
Abbildung 9: Analyse der mRNA-Expression Apoptose-assoziiierter Gene

### 3.5.1 Primer-Design

Die PCR-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente benötigt kurze Oligonukleotide (Primer) als Startpunkte für die DNA-Polymerase. Für die Auswahl der Primer wurden die aktuellen Nukleotidsequenzen (mRNA und genomisch) der zu analysierenden Gene für *Bos taurus* der Gen-Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Washington, D.C.) und EMBL (European Molecular Biology Laboratory) verwendet. Mit dem BLAST-Server (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die Rindersequenzen auf Homologie untereinander und mit anderen Spezies (Mensch, Maus, Ratte) getestet. Die Primersequenzen wurden mit der Software Primer Express 2.0 abgeleitet. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Länge der Primersequenz: 19 - 22 Nukleotide
- GC (Guanin/Cytosin)-Gehalt: 40 Prozent - 60 Prozent
- Schmelztemperatur: 61 - 63 °C (max. 1 °C Differenz zwischen sense/antisense Primer)
- Vermeidung interner Nukleotid-Wiederholungen bzw. komplementärer Bereiche
- Amplikonlänge: 100 - 200 Basenpaare (bp)

Um eine Amplifizierung kontaminierender genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primerpaare so gewählt, dass sie (a) durch ein längeres Intron getrennt waren (Abb. 10) oder (b) mindestens ein Primer eine Exon-Intron-Grenze überspannte. Die Spezifität der Primersequenzen wurde mit einer BLAST-Analyse der verfügbaren Genomsequenzen von *Bos taurus* (NCBI, EMBL) überprüft. Für jedes der untersuchten Gene wurden drei Primerpaare synthetisiert und mittels RT-qPCR an Gesamt-RNA aus Ovargewebe bzw. Gehirn vom Rind getestet (siehe Kapitel 3.5.2.1). Die PCR-Produkte von ausgewählten Primerpaaren wurden für die Herstellung der Transkript-spezifischen Plasmid-DNA-Standards verwendet und in einen Plasmidvektor kloniert (siehe Kapitel 3.5.2.2).

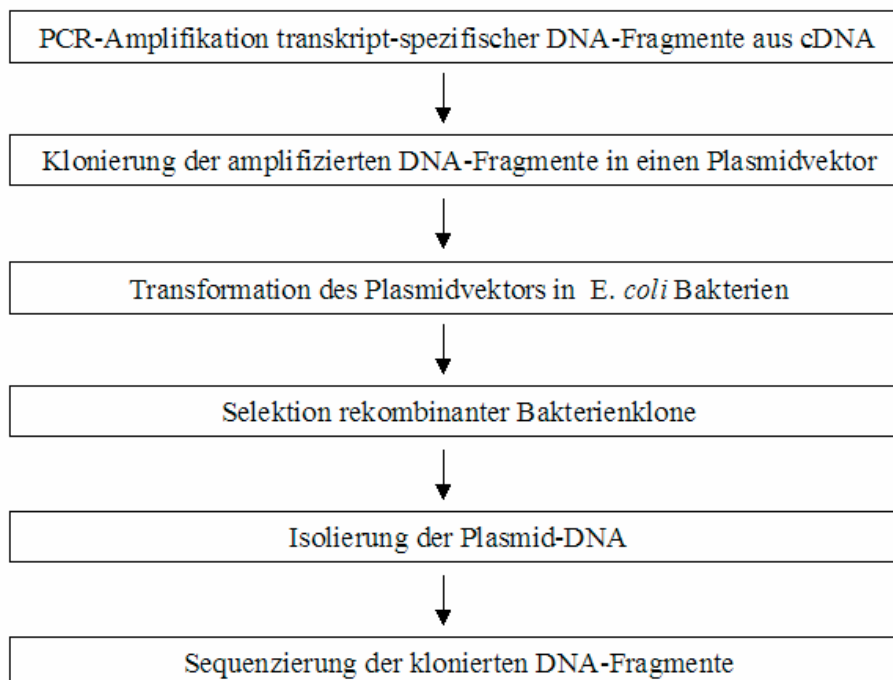


**Abbildung 10: *BCL2L1*-Sequenz für das Rind**

Stand 10/2008. Anzahl und Länge der Exon- bzw. Intronsequenzen. Position und Sequenz der sense (se) und antisense (as) Primer, Amplikon-Länge

### 3.5.2 Herstellung von Transkript-spezifischen Plasmid-DNA-Standards

Für die Herstellung der Transkript-spezifischen Plasmid-DNA-Standards wurden die in Abbildung 11 dargestellten Arbeitsschritte durchgeführt.



**Abbildung 11: Herstellung von Transkript-spezifischen Plasmid-cDNA-Standards**



### 3.5.2.1 Amplifikation von Transkript-spezifischen DNA-Fragmenten aus cDNA

Zunächst wurden Transkript-spezifische DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus cDNA amplifiziert, die aus Gesamt-RNA von Ovargewebe bzw. Gehirn vom Rind generiert wurde (siehe Kapitel 3.5.3.1 und 3.5.3.3).

#### Material und Geräte:

- 10 x Reaktionspuffer B (*Solis Biodyne, Tartu, Estland*)
- 25 mM Magnesiumchlorid (*Solis Biodyne, Tartu, Estland*)
- 100 mM dNTP-Mischung (*Solis Biodyne, Tartu, Estland*)
- 5 IU/ $\mu$ l Hot Fire Taq Polymerase (*Solis Biodyne, Tartu, Estland e*)
- 100  $\mu$ M Primer (*Thermo Fisher, Ulm, Deutschland*)
- Thermocycler (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Die PCR wurde in 25  $\mu$ l Ansätzen mit 50 ng cDNA als Template durchgeführt (Tab. 13). Die DNA-Fragmente wurden nach 15 min bei 95 °C in 40 Reaktionszyklen mit 30 sec bei 95 °C, 60 sec bei 60 °C, 60 sec bei 72 °C amplifiziert. Abschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 72 °C inkubiert.

**Tabelle 13: Reaktionsansatz zur Amplifikation Transkript-spezifischer DNA-Fragmente**

| Reagenzien              | Volumen ( $\mu$ l) | Endkonzentration/ $\mu$ l |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|
| 10 x Reaktionspuffer B  | 2,5                | 1,0 x                     |
| 1 mM dNTP`s             | 2,5                | 0,1 mM                    |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 4,0                | 4,0 mM                    |
| 5 $\mu$ M Primer se     | 1,5                | 0,3 $\mu$ M               |
| 5 $\mu$ M Primer as     | 1,5                | 0,3 $\mu$ M               |
| 5U/ $\mu$ l HotFirePol  | 0,2                | 1,0 IU                    |
| 50 ng/ $\mu$ l cDNA     | 1,0                | 50,0 ng                   |
| H <sub>2</sub> O        | 11,8               |                           |
| Gesamtvolumen           | 25,0               |                           |

Zur Überprüfung der mRNA-Spezifität der verwendeten Primer wurde gesamt-genomische DNA von *Bos taurus* gleicher Konzentration als Template eingesetzt. Die Auswahl geeigneter Primer für die RT-qPCR (Tab. 14) erfolgte nach Überprüfung der PCR-Produkte im 1,5-prozentigen Agarosegel nach folgenden Kriterien:

- korrekte DNA-Fragmentlänge
- Fehlen von Primer-Artefakten (Primer-Dimere etc.)
- kein PCR-Produkt mit DNA als Template

**Tabelle 14: Gene und Primer für RT-qPCR**

| Gen-Symbol      | Primersequenzen (5'-3')  | Referenz (GenBank) | Fragment-Länge (bp) | Exon       |
|-----------------|--|--------------------|---------------------|------------|
| <i>18S rRNA</i> | sense AAA CGG CTA CCA CAT CCA AGG<br>antisense GCG GAA GGA TTT AAA GTG GAC TC      | DQ066896           | 138                 | -          |
| <i>H2AFZ</i>    | sense CGA AAT GGC TGG CGG TAA G<br>antisense GGC TAG TCG TCC TAG ATT TCA GGT       | NM_174809          | 134                 | 1 - 2<br>3 |
| <i>STAT3</i>    | sense CTG CAG CAG AAG GTT AGC TAC AAA<br>antisense TTC TAA ACA GCT CCA CGA TTC TCT | AJ620655           | 85                  | 2<br>2     |
| <i>BAX</i>      | sense GCA GAG GAT GAT CGC AGC TG<br>antisense CCA ATG TCC AGC CCA TGA TG           | U92569             | 197                 | 3 - 4<br>5 |
| <i>CASP3</i>    | sense CTG GAA AAC CCA AAC TTT TCA TTA<br>antisense GCC AGG AAA AGT AAC CAG GTG C   | AY575000           | 165                 | 4<br>5 - 6 |
| <i>CASP9</i>    | sense CGA CGC TTC CAC CTG CTG<br>antisense CAC AAT TCT CTC GAC GGA CAC AG          | NM_032996          | 219                 | 3<br>5     |
| <i>BCL2</i>     | sense CTT CGC CGA GAT GTC CAG TC<br>antisense CAC CAC CGT GGC GAA GC               | AF515848           | 96                  | 2<br>2     |
| <i>BCL2L1</i>   | sense CGT GGA AAG CGT AGA CAA GGA G<br>antisense GTA GAG TTC CAC AAA AGT GTC       | AB238936           | 133                 | 2<br>3     |
| <i>BIRC4</i>    | sense GAA GCA CGG ATC ATT ACA TTT GG<br>antisense CCT TCA CCT AAA GCA TAA AAT CCA  | AF458770           | 89                  | 1<br>1 - 2 |
| <i>FAS</i>      | sense GCA ACT CTG CAG CCT CAA ATG<br>antisense CAT CTA TTT TGG CTT CTT CCA TAC C   | U34794             | 153                 | 3<br>5     |
| <i>FASL</i>     | sense TCC ACC AGC CAA AGG CAT AC<br>antisense GAT GGA TCT TGA GTTGAG CTT GC        | AB035802           | 126                 | 2<br>4     |
| <i>CASP8</i>    | sense GGC CAT GTC AGA CTC TCC AGA AC<br>antisense CGA AAG GTC TTA TCC AAA GCG TC   | DQ319070           | 204                 | 5<br>6 - 7 |

Referenzen in Gendatenbank: Stand 06/2005, außer *BCL2* und *BCL2L1*: Stand 10/2008

### 3.5.2.2 Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente

Für die Klonierung der PCR-Fragmente wurde das TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit mit dem pCR<sup>®</sup> II-TOPO-Vektor nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Das Verfahren nutzt die Tatsache, dass die Taq-Polymerase Template-unabhängig an das 3`Ende von PCR-Produkten ein einzelnes Desoxyadenosin (A) anhängt. Der linearisierte pCR<sup>®</sup> II-TOPO Vektor besitzt an den 3' Enden einzelne 3' Desoxythymidin (T)-Überhänge. Die PCR-Fragmente werden durch die Ligase-Aktivität von kovalent an das Vektor-Plasmid gebundener Topoisomerase-I direkt in den Vektor ligiert.

#### Material und Geräte:

- TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (*Kat.-Nr. K4600-01, Invitrogen, Carlsbad, USA*)
- Luria-Bertani (LB)-Medium: 10 g Pepton/Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl<sub>2</sub>, Aqua dest. auf 1000 ml, pH 7,0 mit 0,5 M NaOH, autoklavieren
- LB-Agar: 2,5 g Hefeextrakt, 5,0 g Pepton/Trypton, 2,5 g NaCl<sub>2</sub>, Aqua dest. auf 500 ml, pH 7,0 mit 0,5 M NaOH, Zugabe von 7,5 g Agar-Agar, autoklavieren, bei 60 °C flüssig halten
- 50 mg/ml Ampicillin (*Kat.-Nr. A9393, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) in Aqua dest.
- 50 mg/ml X-Gal (*Kat.-Nr. 2315.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland*) in Dimethylformamid
- Thermomixer 5436 (*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*)

Die Ligation der PCR-Fragmente mit dem Plasmid-Vektor wurde in einem 6 µl Reaktionsansatz mit 10 ng Vektor-DNA und einem großen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments durchgeführt (Tab. 15). Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ligationsansatz für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

**Tabelle 15: Ligationsansatz**

| Reagenzien                                      | Volumen | Endkonzentration |
|---|---------|------------------|
| 0,5 µg/µl PCR-Produkt                           | 2 µl    | 1 µg             |
| 10 ng/µl pCR <sup>®</sup> II-TOPO Vektor        | 1 µl    | 10 ng            |
| Salzlösung (1,2 M NaCl/0,06 MgCl <sub>2</sub> ) | 1 µl    |                  |
| H <sub>2</sub> O                                | 2 µl    |                  |

Für die Transformation wurde ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*)-Bakterien (Stamm: TOP10, im Kit enthalten) auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 2 µl Ligationslösung gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 sec bei 42 °C inkubiert, 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (im Kit enthalten) für 60 min bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Nach der Transformation wurden die Bakterien auf vorgewärmte Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ausplattiert und für 20 - 24 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.5.2.3 Selektion rekombinanter Bakterienklone

Mit der Transformation wurde der Plasmidvektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO in den chemisch kompetenten *E.coli*-Stamm TOP10 übertragen. Da nur ein Bruchteil der Bakterien ein rekombiniertes Plasmid aufnimmt, wurden die Bakterien in zwei Stufen selektiert:

- Selektion Plasmid-tragender Bakterienklone:

Nur Bakterienklone, die den Plasmidvektor aufgenommen haben, exprimieren das vom Vektor kodierte Ampicillin-abbauende Enzym β-Lactamase und wachsen auf Ampicillin-haltigen Agarplatten.

- Selektion von Klonen, die ein rekombiniertes Plasmid tragen:

Der Plasmid-Vektor enthält ein lacZ-Reportergen, das für β-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym hydrolysiert farbloses X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, das vom Luftsauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Eine erfolgreiche Insertion des PCR-Fragmentes in den Vektor unterbricht die für β-Galaktosidase kodierende Sequenz. Das Enzym wird nicht mehr exprimiert und die Bakterienkolonien bleiben in Anwesenheit von X-Gal farblos.

Einzelne, positive (farblose) Klone wurden steril entnommen und in 2 ml Luria-Bertani (LB)-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin auf einem Schüttler für 15 - 16 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.5.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Aus den Flüssigkulturen der rekombinanten Bakterienklone wurde durch alkalische Lyse (Birnboim, 1983) die Plasmid-DNA isoliert. Dafür wurde das QIAprep Spin Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.5.2.5 Photometrische Quantifizierung von DNA

DNA-Konzentrationen wurden spektrophotometrisch (GeneQuant<sup>®</sup>, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) über die Messung der Lichtabsorption (der optischen Dichte, OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt [Berechnung: Formel (1)]. Die Reinheit der DNA-Präparation wurde über das Verhältnis der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm bestimmt.

$$(1) \beta_{\text{dsP-DNA}} (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{(A260)} \times 50 (\mu\text{g/ml})$$

$\beta_{\text{dsP-DNA}}$  = Konzentration doppelsträngiger (ds) Plasmid (P)-DNA, Ein Absorptionwert  $\text{OD}_{(A260)} = 1,0$  entspricht 50  $\mu\text{g}$  dsDNA pro ml Lösung bei einer Küvettschichtdicke von 10 mm.

### 3.5.2.6 Überprüfung der klonierten DNA-Fragmente

#### Agarosegel-Elektrophorese

Für eine Überprüfung der Qualität der Plasmid-DNA und die Sequenzierung der klonierten Fragmente (siehe unten) wurden die isolierten Plasmide mit dem Restriktionsenzym *XhoI* im Vektorbereich geschnitten und linearisiert (Plasmid-Größe ~ 4,0 kB). Um die Länge der klonierten DNA-Fragmente (Fragment-Größen: 85 - 219 bp) zu überprüfen, wurden sie mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Vektor geschnitten.

#### Material und Geräte:

- Agarose, Elektrophorese Grad (Kat.-Nr. 15510-027, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 6 x Ladepuffer (Kat.-Nr. R0611, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 1 mg/ml Ethidiumbromid (Kat.-Nr. E8751, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in Aqua dest.
- 50 x TAE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8, auf 1000 ml mit Aqua dest.
- pUC Mix Marker 8 (Kat.-Nr. SM0301, Fermentas)
- Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII*-Marker (Kat.-Nr. SM0191, Fermentas)
- 10 IU/ $\mu\text{l}$  *EcoRI* (Kat.-Nr. ER0271, Fermentas)
- 10 IU/ $\mu\text{l}$  *XhoI* (Kat.-Nr. ER0691, Fermentas)
- Gel-Dokumentationssystem GelDoc2000<sup>™</sup>/Quantity one 4.2 Software (BioRad, Hercules, USA)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Jeweils 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI* bzw. *XhoI* in getrennten Ansätzen bei 37 °C inkubiert (Tabelle 16). Nach 90 min wurden die Reaktionen durch Inkubation für 10 min bei 65 °C (*EcoRI*) bzw. 80 °C (*XhoI*) beendet. Der gesamte (*EcoRI*) bzw.  $\frac{1}{3}$  (*XhoI*) Reaktionsansatz

wurden mit 1/6 Volumen an Ladepuffer versetzt und auf ein 1,5-prozentiges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 90 min bei 5 V/cm in 1 x TAE-Puffer. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe eines DNA-Längenstandards.

**Tabelle 16: Reaktionsansatz für Plasmid-DNA-Spaltung**

| Reagenzien  | Volumen        |
|---|----------------|
| 10 IU/ $\mu$ l Enzym ( <i>Eco</i> RI bzw. <i>Xho</i> I) | 1 $\mu$ l      |
| Reaktionspuffer   | 2 $\mu$ l      |
| 1 $\mu$ g Plasmid-DNA                                   | x $\mu$ l      |
| H <sub>2</sub> O  | auf 17 $\mu$ l |

### Sequenzierung

Die klonierten DNA-Fragmente wurden nach dem von Sanger entwickelten Kettenabbruch-Prinzip (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit sequenziert. Sequenzierungs-Elektrophorese und Auswertung wurden kommerziell vom Sequenzierservice des Helmholtz-Zentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt) durchgeführt.

Die Sequenzierreaktion entspricht einer PCR mit einem Primer, in der einer der beiden DNA-Stränge abschnittsweise linear amplifiziert wird. Der Reaktionsansatz enthält neben den für die DNA-Synthese benötigten Desoxynukleotiden (dNTPs) geringe Anteile fluoreszenzmarkierter 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs). Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert. Der zufällige Einbau eines ddNTP anstelle eines dNTP führt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch. So erhält man ein Gemisch von DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge, die in Abhängigkeit vom endständigen Nukleotid eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung tragen. Die DNA-Moleküle werden durch Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei kann aus der Abfolge der Fluoreszenzmarkierungen die Basensequenz abgelesen werden.

Es wurden beide Stränge der klonierten DNA-Fragmente sequenziert. Als Startpunkte für die Sequenzierreaktion dienten die vektorspezifischen Primer *M13 Reverse* (CAG GAA ACA GCT ATG AC) und *T7* (ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC), deren Bindungsstellen die Klonierungsstelle flankieren. Die Sequenzierreaktionen wurden in 10  $\mu$ l Ansätzen mit jeweils 50 ng linearisierter Plasmid-DNA als Template (Tab. 17) in einem Block-Thermocycler durchge-

führt. Das PCR-Programm bestand aus einem initialen Zyklus mit 95 °C für 60 sec und 40 Zyklen mit der Abfolge: 5 sec 95 °C, 10 sec 50 °C und 240 sec 60 °C.

**Tabelle 17: Reaktionsansatz für die DNA-Sequenzierung**

| Reagenzien              | Volumen   |
|-------------------------|-----------|
| BigDye-Sequenzierpuffer | 4 µl      |
| BigDye-Reaktionsmix     | 1 µl      |
| 1 µM Primer             | 1 µl      |
| 25 ng/µl Plasmid-DNA    | 2 µl      |
| H <sub>2</sub> O        | auf 10 µl |

Die PCR-Produkte wurden durch Ethanolfällung aufgereinigt. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA und 30 µl 100 Prozent Ethanol auf Eis für 15 min. Nach Zentrifugation bei 4 °C mit 11.900 rpm für 30 min wurde die pelletierte DNA mit 50 µl 70 Prozent Ethanol gewaschen und bei 11.900 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30 µl Wasser gelöst. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bis zur Sequenzierungs-Elektrophorese bei -20 °C gelagert.

### 3.5.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA-Standards

Für jedes der analysierten Transkripte wurde eine Stammlösung des linearisierten Plasmid-DNA-Standards mit einer definierten Konzentration von  $10^6$  Einzelstrang-Kopien pro µl hergestellt. Nach der Linearisierung der Plasmide mit *XhoI* wurde photometrisch die (Massen-) Konzentration der doppelsträngigen DNA  $\beta_{dsDNA}$  bestimmt (siehe Kapitel 3.5.2.7). Aus der Länge und der Sequenz von Vektor und Insert wurde die molare Masse des doppelsträngigen Plasmids  $M_{dsP}$  berechnet (Formel 2). Aus  $\beta_{dsDNA}$  und  $M_{dsP}$  wurde die molare Konzentration des doppelsträngigen Plasmids  $C_{dsP}$  bestimmt (Formel 3). Daraus wurden die Anzahl der doppelsträngigen Plasmid-Kopien  $N_{dsP}$  (Formel 4) und schließlich die Anzahl der Einzelstrang-Kopien  $N_{ssP}$  (Formel 5) pro µl Lösung berechnet.

$$(2) M_{dsP} \text{ (g/mol)} = (a + t) \times (M_A + M_T) + (g + c) \times (M_G + M_C) + 2 \times M_{OH}$$

$M_{dsP}$  = molare Masse des doppelsträngigen Plasmids (Vektor + Insert)

a, t, g, c = Anzahl der Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G), Cytosin (C)

$M_A, M_T, M_G, M_C$  = Molare Massen (g/mol) der monophosphorylierten Nukleotide (unter Berücksichtigung der Phosphordiesterbindungen);  $M_A = 313,21$ ;  $M_T = 304,63$ ;  $M_G = 329,21$ ;  $M_C = 289,19$ ;

$M_{OH}$  = Molare Masse (g/mol) der 3' OH-Gruppe;  $M_{OH} = 17,01$



$$(3) C_{dsP} \text{ (mol/l)} = \beta_{dsDNA} \text{ (g/l)} \times M_{dsP} \text{ (g/mol)}$$

$$(4) N_{dsP/\mu l} = C_{dsP} \text{ (mol/l)} \times N_A \text{ (Moleküle/mol)} \times 10^6$$

$N_A = \text{Avogadro-Konstante} = 6,022 \times 10^{23} \text{ Teilchen/mol}$

$$(5) N_{ssP/\mu l} = N_{dsP/\mu l} \times 2$$

Die Stammlösungen wurden in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Bei der Erstellung einer Verdünnungsreihe für eine qPCR-Standardkurve wurde die Stammlösung in sieben Stufen jeweils 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

### 3.5.3 Vorbereitung der Proben

#### 3.5.3.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Für die RNA-Expressionsanalysen wurden Pools von 10 (*in vitro*) bzw. 5 (*in vivo*) Embryonen verwendet. Diese wurden nach stereomikroskopischer Klassifizierung (siehe Kapitel 3.2) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zusätzlich wurden Pools von je 10 *in vitro* gereiften Eizellen mit analysiert. Nach 22 h Kultur im Maturationsmedium (siehe Kapitel 3.1.1) wurden die Eizellen in  $100 \mu\text{l}$  PBS/PVP durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren von den umgebenden Cumuluszellen getrennt, mehrmals mit PBS/PVP gewaschen und nach kurzer Inkubation in Flüssig-Stickstoff bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Beim Umgang mit RNA sind besondere Maßnahmen zu beachten, da ubiquitär vorkommenden RNasen (Ribonucleasen) die RNA sehr schnell abbauen. Zur Minimierung von RNase-Aktivitäten wurden alle Arbeitsschritte mit Handschuhen an einem separaten Arbeitsplatz mit extra Pipettensatz durchgeführt. Es wurden RNase-freie Spitzen (ART<sup>®</sup>, Molecular BioProducts, San Diego, USA) und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit steril filtriertem Reinstwasser (Milli-Q Plus PF, Millipore, Cork, Irland) angesetzt. Die verwendeten Lösungen und Reagenzien wurden bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Zentrifugationen erfolgten in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei  $4^\circ\text{C}$  und 11.900 rpm.

#### Material:

- Chloroform (Kat.-Nr. 7331.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol p.a. (Kat.-Nr. 9065.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Isopropanol (Kat.-Nr. 1.096.341.000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycogen (Kat.-Nr. 37-1810, Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- TriZol<sup>®</sup> (Guanidin-Thiocyanat/Phenol-Lösung, Kat.-Nr. 35-1020, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels Guanidin-Thiocyanat/Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987). Die Proben wurden unmittelbar nach dem Auftauen auf Eis mit 500 µl Trizol-Reagenz versetzt und 15 sec gevortext. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde der Ansatz 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 90 µl Chloroform versetzt, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und 2 µl Glycogen wurde die RNA durch vorsichtiges Mischen mit der Hand (5 - 6 x schwenken) präzipitiert. Der Fällungsansatz wurde nach 10 min Inkubation bei RT durch Zentrifugation für 20 min sedimentiert. Die pelletierte RNA wurde mit 500 µl 75 Prozent Ethanol gewaschen und abschließend 5 min zentrifugiert. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20,2 µl steril filtriertem Reinstwasser bei 55 °C für 5 - 10 min gelöst und bis zur Reversen Transkription (siehe Kapitel 3.5.3.3) auf Eis inkubiert.

### 3.5.3.2 Reproduzierbarkeit der RNA-Isolierung

Die Aussagekraft von RT-qPCR-Analysen hängt entscheidend von der Effizienz der RNA-Isolierung und Reversen Transkription ab. In drei unabhängigen Versuchen an *in vitro* gereiften Eizellen wurde das verwendete Verfahren überprüft. Die Proben wurden vor der Phasentrennung mit Chloroform mit einer definierten Menge einer externen Standard-RNA gemischt. Nach der RNA-Isolierung (siehe Kapitel 3.5.3.1) und der Reversen Transkription (siehe Kapitel 3.5.3.3) wurde die Anzahl der cDNA-Kopien der externen Standard-RNA mit Real-Time qPCR bestimmt (siehe Kapitel 3.5.4). Die absolute Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve mit Hilfe eines rekombinanten Plasmid-DNA-Standards (siehe Kapitel 3.5.4.1).

#### Material und Geräte:

- Hämoglobin  $\alpha$  (HBA)-mRNA, Kaninchen (*Kat.-Nr. R1253, Sigma, Taufkirchen, Deutschland*): Lyophilisat in Aqua dest. aufnehmen, mit TriZol auf 0,01 pg/µl verdünnen, in 10 µl Aliquots bei - 80 °C gelagert
- 100 µM HBA-Primer (*Thermo Fisher, Ulm, Deutschland*)

Pro Versuch wurden drei Pools von je 10 Eizellen gebildet. Die Gesamt-RNA wurde an unterschiedlichen Tagen aus den Eizell-Pools isoliert. Als externe Standard-RNA diente hochreine Hämoglobin  $\alpha$  (HBA)-mRNA der Spezies Kaninchen (Acc.-ID: X04751). Für die verwendeten Primer (sense 5`GCA GCC ACG GTG GCG AGT AT 3`; antisense 5`CAG GGC TTC GGA CAC CTT C 3`) gibt es keine Target-Sequenzen beim Rind. Jede Eizellprobe wurde vor der Zugabe von Chloroform mit 0,1 pg HBA-mRNA gemischt. Das entsprach 0,01 pg HBA/Eizelle bzw. 32.100 HBA-Molekülen/Eizelle. Aus dem Quotienten von in der qPCR

nachgewiesenen Molekülen eines 145 bp HBA-Fragmentes und der Anzahl eingesetzter HBA-Moleküle wurde die Effizienz der RNA-Isolierung und Reversen Transkription ermittelt [Formel (6)].

$$(6) E = N_{qPCR} / N$$

E = Effizienz

$N_{qPCR}$  = Anzahl in qPCR detektierter Moleküle eines 145 bp HBA-Fragments

N = Anzahl Moleküle in 0,1 pg HBA-mRNA

### 3.5.3.3 Reverse Transkription in cDNA

Isolierte RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA-Moleküle als Matrize für die Synthese komplementärer DNA-Stränge verwendet. Als Startpunkte (Primer) für die Reverse Transkriptase wurde ein Gemisch von Hexamer-Oligonukleotiden aller möglichen Hexamer-Sequenzen [Random Hexamer-(RH)-Primer)] verwendet.

#### Material und Geräte:

- 1 IU/μl Desoxyribonuclease I (Kat.-Nr. EN0521, Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland)
- Random Hexamer (RH)-Primer (Kat.-Nr. 1353078, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- dNTP-Mischung (Kat.-Nr. 0321, Solis BioDyne, Tartu, Estland): je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Dithiothreitol (DTT; Kat.-Nr. Y00147, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Ribonuklease-Inhibitor, Rnase OUT™ (Kat.-Nr. 1363301, Invitrogen)
- 5x Transkriptionsspuffer (Kat.-Nr. Y00146, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 200 IU/μl Reverse Transkriptase SuperSkript™ II (Kat.-Nr. 18064-014, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Für die Entfernung von Resten genomischer DNA wurde die Gesamt-RNA vor der Reversen Transkription mit 0,5 μl Desoxyribonuclease (DNase) I (0,5 IU) und 2,3 μl DNase I-Puffer versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 25 °C wurde die DNase I durch Zugabe von 2 μl 25 mM EDTA (2 mM Endkonzentration) und 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Das Gesamt-RNA-Isolat jeder Probe wurde nach DNase-Behandlung in einem 50 μl Reaktionsvolumen in cDNA umgeschrieben. Das Reaktionsgemisch enthielt 0,15 μg/μl RH-Primer, 0,5 mM dNTP-Mix, 20 mM Dithiothreitol (DTT), 2 IU/μl RNase-Inhibitor (RNaseOUT), 1 x

Transkriptionspuffer und 1,2 IU/ $\mu$ l Superscript II Reverse Transkriptase (Tab. 18). Die Reverse Transkription wurde nach 120 min bei 42 °C durch Inkubation bei 70 °C für 15 min beendet. Nach Abkühlung auf Eis wurde die synthetisierte cDNA bei - 80 °C gelagert.

**Tabelle 18: Reaktionsansatz für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA**

| Reagenzien   | Volumen ( $\mu$ l) | Endkonzentration/ $\mu$ l |
|--|--------------------|---------------------------|
| RNA-Lösung* (nach DNase-Verdau)                      | 25,0               |                           |
| 3 $\mu$ g/ $\mu$ l Random Hexamer (RH)-Primer        | 2,5                | 0,15 $\mu$ g              |
| 10 mM dNTP-Mischung                                  | 2,5                | 0,5 mM                    |
| 0,2 M Dithiotreitol (DTT)                            | 5,0                | 0,02 M                    |
| 40 IU/ $\mu$ l RNase-Inhibitor                       | 2,5                | 2 IU                      |
| 5x Transkriptionspuffer                              | 10,0               | 1 x                       |
| 200 IU/ $\mu$ l Superscript II Reverse Transkriptase | 0,3                | 1,2 U                     |
| H <sub>2</sub> O                                     | 2,2                |                           |
| gesamt   | 50,0               |                           |

\*aus Pools von 10 Eizellen bzw. *in vitro* Embryonen

### 3.5.4 Quantitative Real-Time RT-PCR (RT-qPCR)

Die qPCR-Analysen wurden mit einem ABI Prism Sequenz-Detektionssystem (SDS) 7000 (Applied Biosystems, USA) und der zugehörigen SDS-Software (Version 1.1) durchgeführt. Als Reporterfarbstoff wurde SYBR Green I verwendet, der gebunden an doppelsträngige DNA ein Absorptionsmaximum bei 494 nm und Emissionsmaximum bei 521 nm besitzt. Am Ende von jedem PCR-Zyklus wurde die Fluoreszenzemission im Bereich von 500 - 600 nm gemessen. Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen gemessener Fluoreszenz und DNA-Konzentration kann über einen Fluoreszenz-Anstieg im Verlauf der PCR-Zyklen auf die Ausgangsmenge an Template geschlossen werden.

**Material und Geräte:**

- 10 x Reaktionspuffer B (*Solis Biodyne, Tartu, Estland*)
- 25 mM Magnesiumchlorid (*Solis Biodyne, Tartu, Estland*)
- dNTP-Mischung (*Solis Biodyne*): je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dUTP
- 100 µM Primer (*Thermo Fisher, Ulm, Deutschland*).
- 5 IU/µl HotFire TaqPolymerase (*Solis BioDyne, Tartu, Estland*)
- 10.000 x SYBR Green I Stammlösung (*Kat.-Nr. S-7567, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)  
1:1.000 Verdünnung in 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0; bei - 20 °C lichtgeschützt lagern
- ROX-Referenz-Farbstoff (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)
- Uracil-N-Glykosylase (*Kat.-Nr. ENO362, Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland*)
- Thermo-Fast 96-Lochplatten (*Kat.Nr. 82-1100A, Peqlab, Erlangen, Deutschland*)
- PCR-Abdeckfolien (*Kat.-Nr. 4311971, Applied Biosystems, Foster City, USA*)
- Zentrifuge Rotanda 96 (*Hettich, Tuttlingen, Deutschland*)

Alle Proben wurden in Triplikaten mittels Real-Time qPCR analysiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Amplifikationsprodukten vorangegangener PCR-Reaktionen („carry over“ Kontaminationen) wurde anstelle von Desoxy-Thymidin-Triphosphat (dTTP) Desoxy-Uracil-Triphosphat (dUTP) zusammen mit dem Enzym Uracil-N-Glykosylase (UNG) eingesetzt, das kontaminierende, dUTP-enthaltende PCR-Produkte abbaut.

Ein 25 µl Reaktionsansatz enthielt: 1µl cDNA (entsprechend der cDNA-Menge von 1/10 Embryo bzw. 0,1 Embryo-Äquivalent) bzw. 2 µl des Transkript-spezifischen DNA-Standards (je nach Verdünnungsstufe  $2 \times 10^6$  - 20 Einzelstrang-Kopien, siehe Kapitel 3.5.2.7) als Template, eine 1:500.000 Verdünnung von SYBR Green I Stammlösung, 0,5 µM ROX-Referenzfarbstoff, 1 x Reaktionspuffer B, 0,2 mM dNTPs, 4 mM Magnesiumchlorid, 0,01 IU/µl Uracil-N-Glykosylase, 0,3 µM Primer (sense und antisense) und 0,04 IU/µl HotFire Taq-Polymerase (Tab. 19).

Die einzelnen PCR-Komponenten wurden ohne Template zu einem PCR-Mastermix zusammen pipettiert. Davon wurde das entsprechende Volumen zum Template gegeben. Die Proben wurden in eine 96-Lochplatte pipettiert. Diese wurde mit Folie verschlossen und für 30 sec mit 400 rpm zentrifugiert. Uracil-N-Glykosylase (UNG) wurde vor den Amplifikationszyklen bei 50 °C für 5 min aktiviert und durch eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 min wieder vollständig inaktiviert. Anschließend wurden 40 Amplifikationszyklen mit 15 sec bei 95

°C und 60 sec bei 60 °C durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die PCR-Platten bei -20 °C aufbewahrt.

Zum Ausschluß von Kontaminationen im PCR-Mastermix wurden Negativkontrollen mit Wasser anstelle von Template (non-template control, NTC) mitgeführt. Aufgrund der mRNA-Spezifität der verwendeten Primer wurde auf minus RT-Proben (RNA-Proben ohne Reverse Transkription) verzichtet.

**Tabelle 19: Reaktionsansatz für die qPCR-Analysen**

| Reagenzien                    | Volumen (µl) | Endkonzentration/µl |
|-------------------------------|--------------|---------------------|
| 10 x Reaktionspuffer B        | 2,5          | 1 x                 |
| 2 mM dNTPs                    | 2,5          | 0,2 mM              |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>       | 4,0          | 4,0 mM              |
| 5 µM Primer se                | 1,5          | 0,3 µM              |
| 5 µM Primer as                | 1,5          | 0,3 µM              |
| 1 IU/µl Uracil-N-Glykosylase  | 0,25         | 0,01 U              |
| 10 x SYBR Green I             | 0,5          | 0,2 x               |
| 25 µM ROX                     | 0,5          | 0,5 µM              |
| 5 IU/µl HotFire TaqPolymerase | 0,2          | 0,04 U              |
| H <sub>2</sub> O              | 10,55        |                     |
| cDNA                          | 1,0          |                     |
| Gesamtvolumen                 | 25,0         |                     |

#### 3.5.4.1 Transkript-Quantifizierung

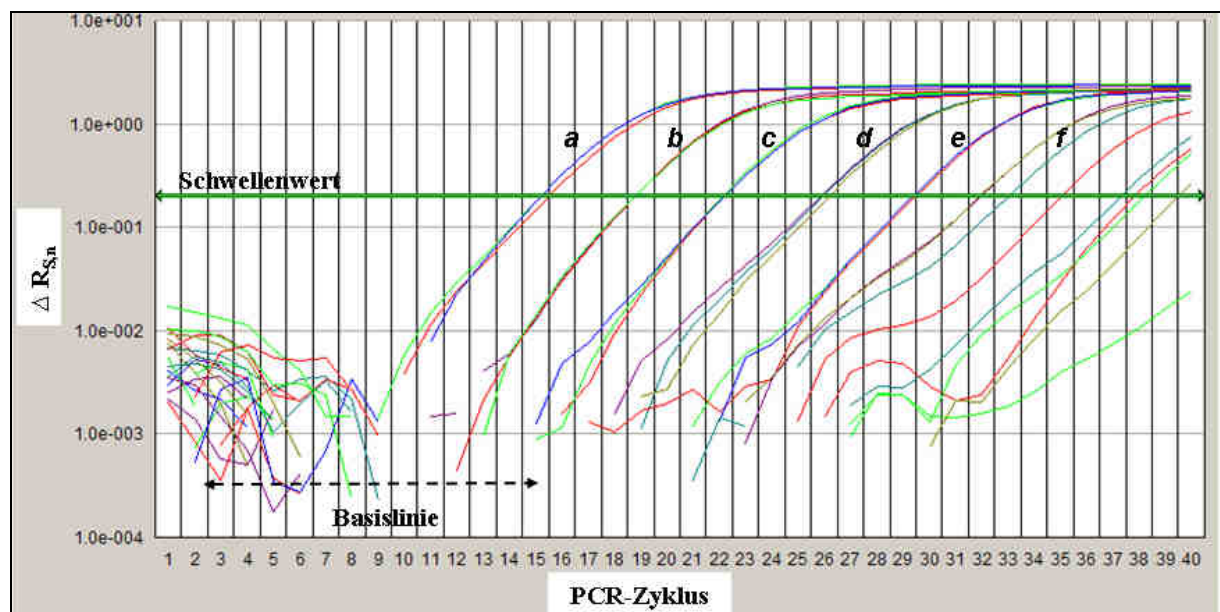
Die Analyse der qPCR-Reaktion erfolgte mit der SDS-Software Version 1.1. Die gemessene SYBR Green Fluoreszenz ( $R_S$ ) wurde über einen mitgeführten passiven Referenzfarbstoff (ROX, Anregungs- und Emissionsmaximum: 578 bzw. 603 nm) normalisiert (Formel 7). Anschließend wurde die Basislinie definiert, welche der Hintergrund-Fluoreszenz der ersten PCR-Zyklen entspricht. Hier gemessene Reporter-Fluoreszenzen lassen sich nicht eindeutig von einer vorhandenen Hintergrund-Fluoreszenz abgrenzen. In der Regel wurden die PCR-Zyklen 3 - 15 für die Berechnung der Hintergrund-Fluoreszenz verwendet (Abb. 12). Für hoch-abundante Targets wie die 18S rRNA, deren Amplifikation oftmals schon in früheren PCR-Zyklen zu einem signifikanten Fluoreszenz-Anstieg führte, wurde das Ende der Basis-

linie 1 - 2 PCR-Zyklen vor Beginn der ersten messbaren Amplifikation gelegt. Das normalisierte Fluoreszenz-Signal ( $R_{S,n}$ ) wurde um die Hintergrund-Fluoreszenz der Basislinie korrigiert (Formel 8).

$$(7) R_{S,n} = R_S / R_{Rox}$$

$$(8) \Delta R_{S,n} = R_{S,n} - R_{Basislinie}$$

Nach der Basislinie wurde der Schwellenwert (threshold, T) definiert. Er wurde in die exponentielle Phase der qPCR-Reaktion gelegt und entsprach einem  $\Delta R_{S,n}$ -Wert von 0,2 (Abb. 12, grüne Linie). Der ermittelte CT (threshold cycle)-Wert entsprach dem PCR-Zyklus, in dem der  $\Delta R_{S,n}$ -Wert den Schwellenwert überschritt.



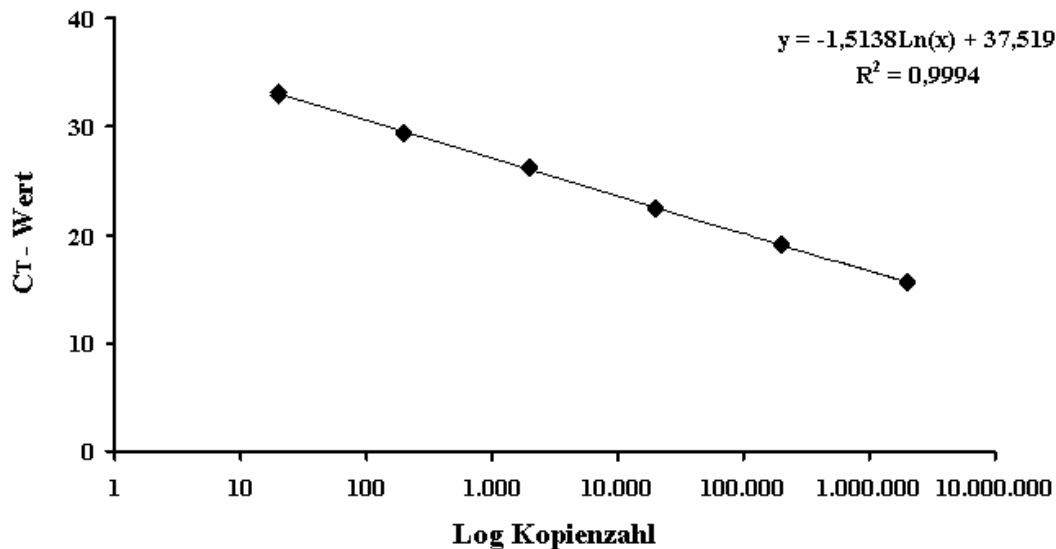
**Abbildung 12: Amplifikationsgraphiken des BAX-spezifischen DNA-Standards**

Darstellung des normalisierten Fluoreszenzwertes  $\Delta R_{S,n}$  auf der y-Achse und der 40 PCR-Zyklen auf der x-Achse. Kopienzahl des DNA-Standards: *a* -  $2 \times 10^6$ , *b* -  $2 \times 10^5$ , *c* -  $2 \times 10^4$ , *d* -  $2 \times 10^3$ , *e* -  $2 \times 10^2$ , *f* - 20 (ABI Prism 7000, Software Version 1.1).

Die mittels qPCR bestimmten CT-Werte der seriellen Verdünnungen von Transkript-spezifischen DNA-Standards wurden für die Generierung der Standardgeraden verwendet (Abb. 13). Für die Berechnung der Kopienzahl der Transkript-spezifischen Fragmente wurde der CT-Wert der Probe sowie der y-Achsenabschnitt und die Steigung der Standardgerade in Formel (9) eingesetzt. Dabei war zu beachten, dass die zu bestimmende Kopienzahl in der Probe in dem vom Standard abgedeckten Kopienbereich lag.

### (9) Kopienzahl = 10 [(CT-Wert) / Steigung]

Die ermittelte Kopienzahl wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, da in eine qPCR-Reaktion die cDNA-Menge entsprechend 1/10 Embryo (0,1 Embryo-Äquivalent) als Template eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3.5.4).



**Abbildung 13: Standardgerade für die absolute Quantifizierung BAX-spezifischer Transkripte**

Die  $C_T$ -Werte der seriellen Verdünnungsstufen des BAX-DNA-Standards sind auf der y-Achse, die zugehörigen Konzentrationen (Kopienzahl) logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen.

Aus den Kopienzahlen der Triplikate einer Probe wurde die mittlere Kopienzahl bestimmt. Extreme Einzelwerte (Ausreisser) mit mehr als 10-facher Abweichung wurden ausgeschlossen. Die Kopienzahlen von 3 unabhängigen Versuchen wurden zur mittleren Kopienzahl zusammengefasst.

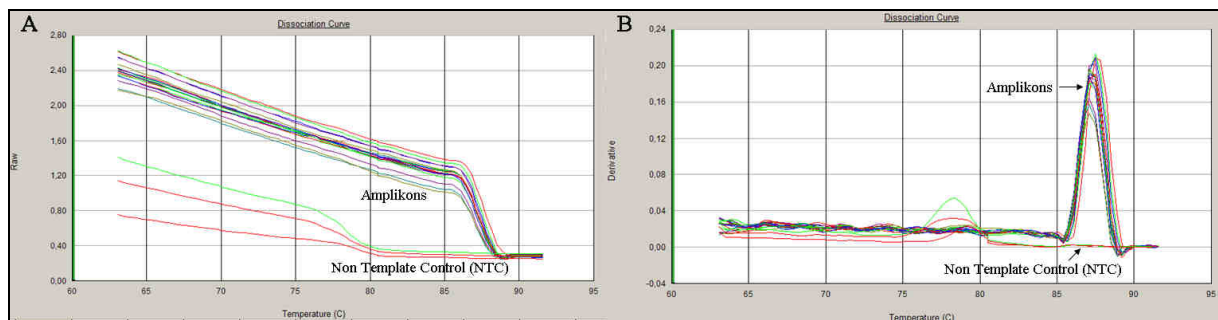
### Analyse von Schmelzprodukten

Die entstandenen Amplifikationsprodukte wurden über die Schmelzkurven von SYBR-Green I untersucht. SYBR-Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Mit der Schmelzkurvenanalyse wurde das Auftreten von (unerwünschten) Primer-DNA-Hybridisierungen in der qPCR-Reaktion überprüft. Spezifische Amplikons schmelzen in der Regel bei höheren Temperaturen als Primer-Dimere (Abb. 14).

Nach Ablauf der qPCR-Reaktion wurden die Amplifikate in einem Dissoziationsprotokoll in 20 min von 60 °C auf 90 °C erhitzt und dabei die emittierte Fluoreszenz gemessen. Die



Schmelztemperatur ist gekennzeichnet durch eine maximale Abnahme des Fluoreszenz-Signals aufgrund einer Spaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge.



**Abbildung 14: Dissoziationskurven des BAX-Amplikons**

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden im Anschluss an qPCR-Reaktion aufgeschmolzen. **(A)** Darstellung der Abnahme der Fluoreszenz (Raw, y-Achse) bei Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 90 °C (x-Achse). **(B)** Darstellung der Fluoreszenz-Änderung (dF) als Funktion der Temperatur (Derivate, -dF/dT). Primer-Dimere in der Negativkontrolle (non template control, NTC) haben eine niedrigere Schmelztemperatur (77 °C) als das BAX-Amplikon (86 °C).

### 3.6 Bildverarbeitung

Bildtafeln und -montagen wurden mit der Software Adobe Photoshop Version CS2 angefertigt.

### 3.7 Statistische und graphische Auswertung

Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Microsoft Exel 2003 und SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 16.0 und 17.

Zum Vergleich von Mittelwerten unabhängiger Proben wurde der *Student's* T-Test bzw. der Mann-Whitney-*U*-Test eingesetzt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P \leq 0,05$  wurden als signifikant, von  $P \leq 0,005$  als hoch-signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *In vitro* Fertilisation und Embryokultur

Für die Herstellung von Rinderembryonen wurden Cumulus-Eizell-Komplexe (cumulus-oocyte-complexes, COCs) aus insgesamt 1.255 Ovarien geschlachteter Rinder isoliert (siehe Tab. 36, Anhang). Eine Gesamtzahl von 4.606 *in vitro* gereiften und *in vitro* fertilisierten Eizellen wurde nach dem Entfernen der Cumuluszellen für 3, 4, 5, 6 bzw. 7 Tage *in vitro* kultiviert. Insgesamt wurden 17 unabhängige *in vitro* Fertilisationen durchgeführt, mindestens drei pro Untersuchungszeitpunkt (Tab. 20). Die Teilungsrate, d. h. der Anteil der befruchteten und geteilten Eizellen an Tag 3, betrug  $88 \pm 5$  Prozent (Mittelwert  $\pm$  SD von 17 Experimenten), die Blastozystenrate  $25 \pm 7$  Prozent an Tag 6 (3 Experimente) und  $37 \pm 5$  Prozent an Tag 7 (4 Experimente).

**Tabelle 20: *In vitro* Produktion boviner Embryonen**

| Zeitpunkt<br>Tag (h) * | Experimente | Eizellen <sup>°</sup> | Teilungsrate <sup>+</sup> | Blastozystenrate <sup>□</sup> |
|------------------------|-------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 3 ( 72)                | 3           | 514                   | $80 \pm 7$                |                               |
| 4 ( 96)                | 3           | 843                   | $90 \pm 4$                |                               |
| 5 (120)                | 4           | 1.244                 | $90 \pm 2$                |                               |
| 6 (144)                | 3           | 1.006                 | $88 \pm 3$                | $25 \pm 7$                    |
| 7 (168)                | 4           | 999                   | $90 \pm 1$                | $37 \pm 5$                    |
| gesamt                 | 17          | 4.606                 | $88 \pm 5$                | $32 \pm 6$                    |

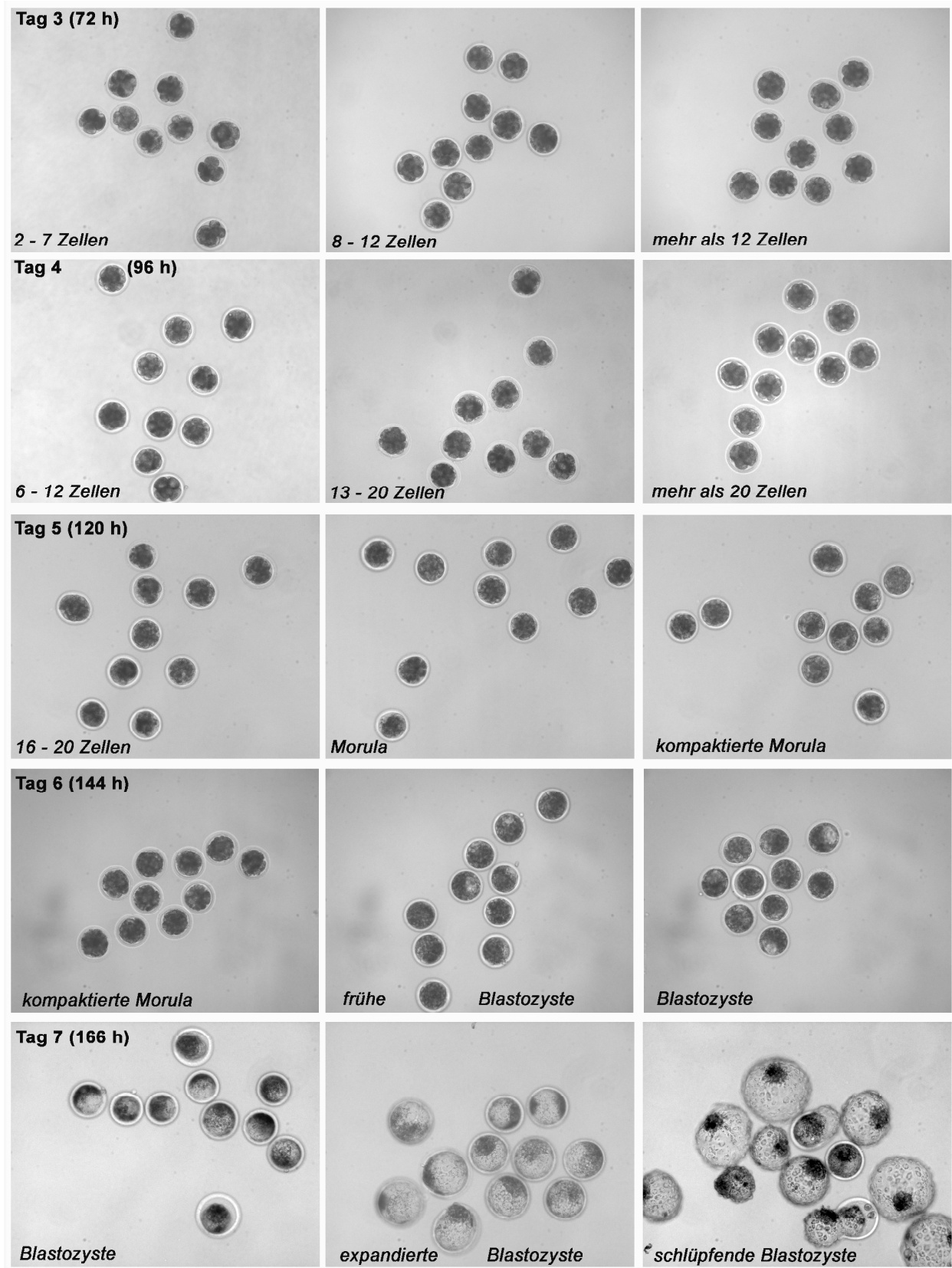
\*nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs, I.E.T.S.-Klassen 1 und 2); <sup>°</sup>potentiell befruchtete Eizellen für die *in vitro* Kultur; <sup>+</sup>Prozent befruchtete und geteilte Eizellen an Tag 3; <sup>□</sup>Prozent Blastozysten an Tag 6 und 7; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Nach Beendigung der *in vitro* Kultur wurden die Embryonen von einem erfahrenen Untersucher unter dem Stereomikroskop nach ihrem Entwicklungsstand klassifiziert und selektiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefaßt. An jedem Untersuchungszeitpunkt wurden nur die Embryonen analysiert, die eines der im Vorfeld definierten Entwicklungsstadien erreicht hatten (siehe Kapitel 3.2). Die stereomikroskopische Klassifizierung und Selektion der Embryonen wurde photographisch dokumentiert. Abbildung 15 zeigt exemplarisch für jedes der insgesamt 15 Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 die stereomikroskopische Aufnahme eines Pools von 10 Embryonen. Unbefruchtete Eizellen (unfertilized oocytes, UFOs) bzw. nicht geteilte Zygoten, erheblich entwicklungsverzögerte Embryonen und bereits degenerierte Embryonen wurden nicht weitergehend analysiert.

**Tabelle 21: Stereomikroskopische Klassifizierung boviner *in vitro* Embryonen**

| Zeitpunkt, Tag (h)* | Stereomikroskopische Klassifizierung | Embryonen/Eizellen <sup>o</sup> (%) |
|---------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 3 ( 72)             | UFOs                                 | 109 (21)                            |
|                     | 2 - 7 Zellen                         | 171 (33)                            |
|                     | 8 - 12 Zellen                        | 162 (32)                            |
|                     | > 12 Zellen                          | 72 (14)                             |
|                     | gesamt                               | 514                                 |
| 4 ( 96)             | UFOs                                 | 83 (10)                             |
|                     | degeneriert                          | 147 (17)                            |
|                     | 6 - 12 Zellen                        | 222 (26)                            |
|                     | 13 - 20 Zellen                       | 243 (29)                            |
|                     | > 20 Zellen                          | 148 (18)                            |
|                     | gesamt                               | 843                                 |
| 5 (120)             | UFOs                                 | 132 (11)                            |
|                     | degeneriert                          | 429 (34)                            |
|                     | 16 - 20 Zellen                       | 274 (22)                            |
|                     | nicht-kompaktierte Morula            | 366 (29)                            |
|                     | kompaktierte Morula                  | 47 (4)                              |
|                     | gesamt                               | 1.248                               |
| 6 (144)             | UFOs                                 | 119 (12)                            |
|                     | degeneriert                          | 425 (42)                            |
|                     | kompaktierte Morula                  | 209 (21)                            |
|                     | frühe Blastozyste                    | 166 (17)                            |
|                     | nicht-expandierte Blastozyste        | 87 (9)                              |
|                     | gesamt                               | 1.006                               |
| 7 (168)             | UFOs                                 | 89 (9)                              |
|                     | degeneriert                          | 550 (55)                            |
|                     | nicht-expandierte Blastozyste        | 139 (14)                            |
|                     | expandierte Blastozyste              | 154 (15)                            |
|                     | schlüpfende Blastozyste              | 67 (7)                              |
|                     | gesamt                               | 999                                 |

\*nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs); <sup>o</sup>Anzahl (Anteil) Embryonen/Eizellen aus drei (Tag 3, 4, 6) bzw. vier (Tag 5, 7) biologischen Replikaten; UFOs - unbefruchtete Eizellen (unfertilized oocytes)



**Abbildung 15: Stereomikroskopische Klassifizierung von Rinderembryonen**

Die *in vitro* fertilisierten und kultivierten Embryonen wurden in 15 vordefinierte Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 nach IVF selektiert.

## 4.2 Gewinnung von *in vivo* Embryonen

Für eine Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert. Für die Gewinnung von *in vivo* Embryonen wurden zwei unabhängige Versuche mit 10 Spendertieren durchgeführt. Die Zyklus-synchronisierten Spendertiere wurden hormonell zur Reifung und Ovulation multipler Eizellen stimuliert (Superovulation). Zur Befruchtung der *in vivo* gereiften und ovulierten Eizellen wurden die Spendertiere 0, 15 und 24 h nach Induktion der Ovulation künstlich besamt (artificial insemination, AI). Sieben Tage (159 h) nach der dritten AI wurden die Embryonen nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen. Der Entwicklungsstand der Embryonen wurde von einem erfahrenen Untersucher unter dem Stereomikroskop morphologisch beurteilt. Die Ergebnisse der Klassifizierung sind in Tabelle 22 zusammengefaßt. Insgesamt wurden 218 *in vivo* Embryonen und Eizellen gewonnen. 53 kompaktierte Morulae und 78 noch nicht geschlüpfte Blastozysten wurden als Embryotransfer-tauglich klassifiziert und für die Analysen mittels CLSM, TEM und RT-qPCR-Analysen ausgewählt. Pro Spendertier und Versuch wurden im Mittel  $6,5 \pm 1,4$  (MW  $\pm$  SD) Transfer-taugliche Embryonen gewonnen (Tab. 37, Anhang). Unbefruchtete Eizellen (unfertilized oocytes, UFOs) bzw. nicht geteilte Zygoten, erheblich entwicklungsverzögerte Embryonen und bereits deutlich degenerierte Embryonen wurden nicht weitergehend analysiert.

**Tabelle 22: Gewinnung boviner *in vivo* Embryonen**

| Zeitspanne nach AI<br>Tag (h)* | Stereomikroskopische Klassifizierung       | Embryonen/Eizellen (%) <sup>°</sup> |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|
| 6 - 7<br>(159/168/183)         | UFOs                                       | 56 (25)                             |
|                                | degeneriert                                | 31 (15)                             |
|                                | kompaktierte Morula/frühe Blastozyste      | 53 (25)                             |
|                                | nicht-expandierte/expandierte Blastozysten | 78 (35)                             |
|                                | gesamt                                     | 218                                 |

\*nach 3-maliger künstlicher Besamung (artificial insemination, AI); <sup>°</sup>Anzahl (Anteil) Embryonen/Eizellen aus 2 Versuchen mit 10 Spendertieren; UFOs - unbefruchtete Eizellen (unfertilized oocytes)

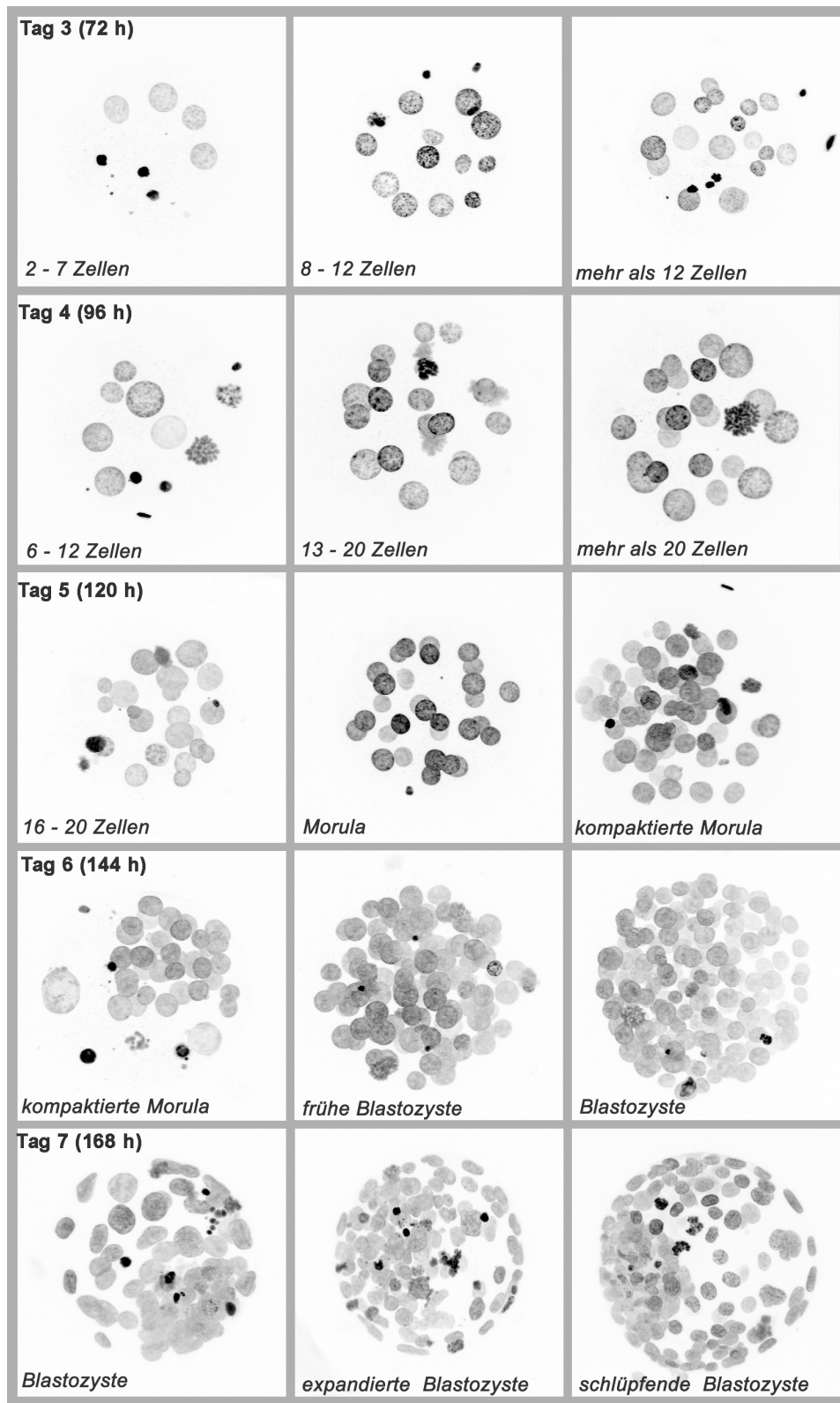
### 4.3 Heterogene Entwicklung früher Embryonen

#### 4.3.1 Zellzahlen und Zelluntergänge

Für die Bestimmung der Zellzahlen und Zelluntergänge wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie erzeugte 3-Kanal-Bildstapel (Transmission, DAPI, FITC) von optischen Serienschnitten 3-dimensional präparierter Embryonen analysiert. Die Transmissionsaufnahmen lieferten wichtige strukturelle Informationen über die allgemeine Embryo-Architektur wie z. B. die Größe und Form der einzelnen Blastomeren, intrazelluläre Vakuolen, zytoplasmatische Abgrenzungen und interzelluläre Hohlräume.

Die Zellzahl pro Embryo wurde über die Anzahl der DAPI-gefärbten Zellkerne und mitotischen Figuren bestimmt. Das Auftreten mehrkerniger Zellen wurde vernachlässigt. Kondensierte, fragmentierte und degradierte Zellkerne sowie Reste mitotischer Figuren wurden als Zelluntergänge gewertet. Zusätzlich wurde das Auftreten von DNA-Fragmentation, ein Indiz für Apoptose, *in situ* mit dem TUNEL-Test (siehe Kapitel 3.3.2) sichtbar gemacht. Die Auswertung der TUNEL-Bilder (FITC) erfolgte im direkten Vergleich mit den DAPI-Bildern.

In Abbildung 16 ist stellvertretend für die 15 stereomikroskopisch definierten Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 jeweils ein repräsentativer Embryo dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils alle DAPI-gefärbten Zellkerne eines Embryos in einer Maximum-Intensitäts-Z-Projektion.



**Abbildung 16: Prototypen der stereomikroskopisch definierten 15 Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 nach IVF**

Darstellung jeweils aller DAPI-gefärbten Zellkerne eines Embryos in einer in einer Maximum-Intensitäts-Z-Projektion.

4.3.1.1 Der Nachweis von Zelluntergängen

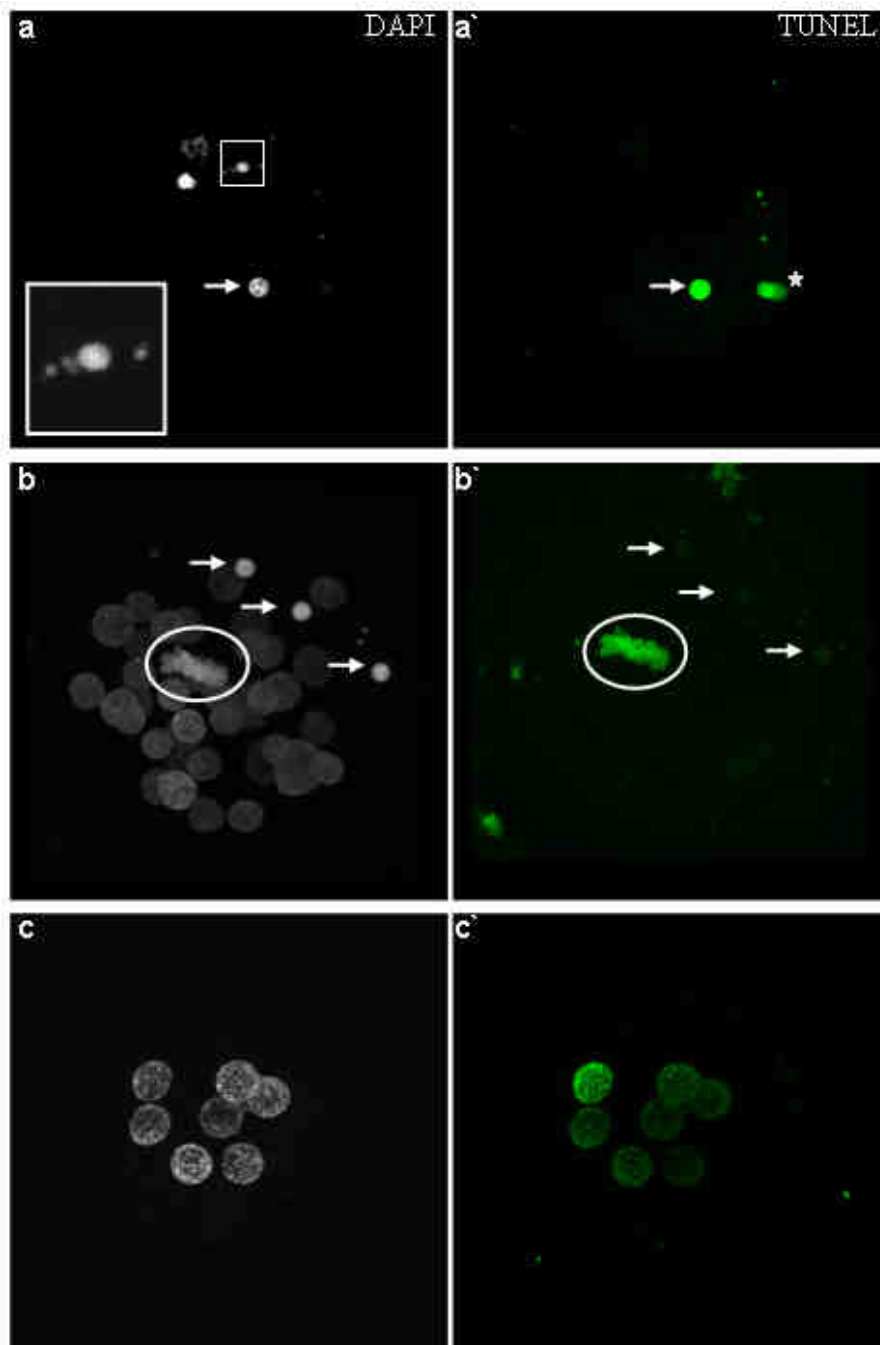
In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung an mehr als 25.000 Zellkernen zusammengefasst. Über die DAPI-Färbung wurden insgesamt 2.399 Zellkerne mit morphologischen Kennzeichen von programmiertem Zelltod identifiziert. 67 Prozent der DAPI-positiven Zelluntergänge waren im TUNEL negativ. Das Problem bei der Auswertung von TUNEL war, dass hochkondensierte bzw. fragmentierte Zellkerne entweder negativ, schwach oder intensiv TUNEL gefärbt waren. Gleichzeitig waren morphologisch intakte Zellkerne schwach bis deutlich TUNEL gefärbt (Abb. 17). Es war nicht möglich, einfache und konsistente Kriterien zu finden, um eine schwache, aber spezifische TUNEL-Fluoreszenz morphologisch intakter Zellkerne und mitotischer Figuren von unspezifischer Hintergrund-Fluoreszenz zu trennen. Die Quantifizierung von Zelluntergängen wurde deshalb allein durch die morphologische Analyse der DAPI-Bildstapel durchgeführt.

**Tabelle 23: Zelluntergänge nach DNA-Färbung mit DAPI und TUNEL**

| Zeitpunkt<br>Tag (h)* | Zellzahl<br>gesamt | untergehende/tote Zellen |            |            |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|------------|------------|
|                       |                    | DAPI (D+)                | TUNEL (T+) | D+/T- (%)° |
| 3 (72h)               | 864                | 88                       | 38         | 57         |
| 4 (96h)               | 1.378              | 147                      | 46         | 69         |
| 5 (120h)              | 2.346              | 208                      | 78         | 62         |
| 6 (144h)              | 8.197              | 567                      | 216        | 62         |
| 7 (168h)              | 12.321             | 1.389                    | 412        | 70         |
| gesamt <sup>Δ</sup>   | 25.106             | 2.399                    | 790        | 67         |

\*nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs); <sup>Δ</sup>Summe bzw. Mittelwert; (D+) DAPI-positiv: Zellen mit kondensierten, fragmentierten und degradierten Zellkernen; (T+) TUNEL-positive Zellen (mit DNA-Fragmentierung), die gleichzeitig DAPI-positiv waren; <sup>°</sup>Anteil der DAPI-positiven (D+) Zelluntergänge, die TUNEL negativ (T-) waren. Abkürzung: TUNEL - terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling





**Abbildung 17: Nachweis von Zelluntergängen nach DNA-Färbung mit DAPI und TUNEL**

DNA-Färbung (DAPI, weiß), DNA-Fragmentierung (TUNEL, grün). **(a und c)** Tag 3 IVF-Embryonen und **(b)** Tag 5 IVF-Embryo (Z-Projektionen). Im DAPI positive Zelluntergänge mit kondensiertem bzw. fragmentiertem Chromatin waren negativ (aa': Viereck), schwach positiv (bb': Pfeile) bzw. intensiv (aa': Pfeil) TUNEL gefärbt. Mitotische Figuren (bb': Kreis) und Spermien (aa': Stern) waren häufig TUNEL positiv. Morphologisch intakte Zellkerne waren teilweise schwach bis deutlich TUNEL positiv (cc'). Abkürzung: TUNEL - terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT) mediated dUTP nick end labelling

#### 4.3.1.2 Zellzahlen und Zelluntergänge von Tag 3 bis 7 *in vitro*

Die *in vitro* Maturation, Fertilisation und Embryo-Kultur wurden unter strikt standardisierten und für alle Experimente identischen Bedingungen durchgeführt. Die Embryonen eines Kulturansatzes waren aber zu jedem Untersuchungszeitpunkt extrem heterogen. Deshalb wurden die Embryonen von einem erfahrenen Untersucher unter dem Stereomikroskop morphologisch hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes beurteilt und in definierte Entwicklungsstadien pro Untersuchungszeitpunkt vorselektiert (siehe Kapitel 3.2). Insgesamt wurden so 15 Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 nach IVF unterschieden.

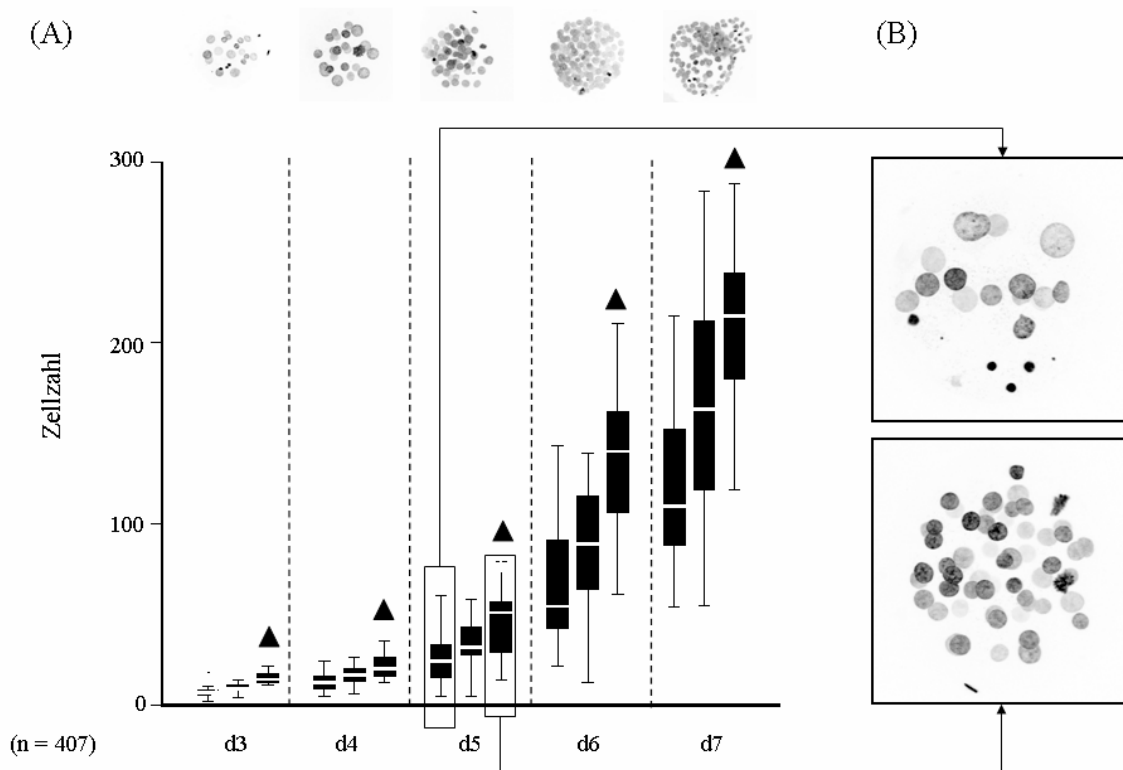
Die Heterogenität der Embryonen war aber auch innerhalb der einzelnen, stereomikroskopisch definierten Entwicklungsstadien sehr groß - sowohl hinsichtlich der Zellzahl als auch hinsichtlich der Anzahl an Zelluntergängen. Das zeigt die Schwierigkeiten auch für erfahrene Untersucher, den Entwicklungsstand und insbesondere die Zellzahl mit dem Stereomikroskop richtig abzuschätzen.

Die heterogene Entwicklung der Zellzahl von Tag 3 bis 7 mit den 15 stereomikroskopisch definierten Entwicklungsstadien ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Embryonen sind charakterisiert durch eine enorme Variabilität der Zellzahlen an allen Untersuchungszeitpunkten und in allen Kulturansätzen, auch bei gleicher stereomikroskopischer Klassifizierung (Abb. 18 A). Ein repräsentatives Beispiel für die große Heterogenität der Entwicklung innerhalb eines Kulturansatzes ist in Abbildung 18 B gezeigt. Die DAPI-gefärbten Zellkerne und Mitosefiguren von zwei Tag 5 IVF-Embryonen sind durch eine Maximum-Intensitäts-Projektion konfokaler Serienschritte in einer Ebene dargestellt. Der obere Embryo wurde stereomikroskopisch als entwicklungsverzögert eingestuft und enthielt nur 15 intakte Zellkerne unterschiedlicher Größe. Der untere Embryo wurde stereomikroskopisch als für diesen Zeitpunkt weit entwickelt eingestuft und enthielt 48 Zellkerne verhältnismäßig einheitlicher Größe.

Das Auftreten von Zelluntergängen an Tag 3 bis 7 mit den 15 stereomikroskopisch definierten Entwicklungsstadien ist in Abbildung 19 dargestellt. Die am weitesten entwickelten Embryonen enthielten an Tag 3 bis 5 die wenigsten, an Tag 7 dann die meisten untergehenden/toten Zellen (Abb. 19 A). Der Anteil der Embryonen mit mindestens einer untergehenden/toten Zelle stieg von Tag 3 bis 7 auf 100 Prozent. Dabei enthielten an Tag 3 bis 5 deutlich mehr Embryonen mit verzögerter Entwicklung mindestens eine untergehende/tote Zelle (Abb. 19 B).

Die detaillierten Zellzahlen und Zelluntergänge der Rinderembryonen aus den 15 stereomikroskopisch unterschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 sind in den Tabellen 24 und 25 aufgeführt.

An Tag 3 schwankte die Zellzahl zwischen 2 und 21 Zellen pro Embryo, der Median betrug 10 Zellen. Dabei wurde in 48 Prozent der Embryonen mindestens eine untergehende/tote Zelle identifiziert. Tag 4 IVF-Embryonen enthielten im Median 16 Zellen bei einer Spannweite von 5 bis 35 Zellen. Die Zellzahl kompakterer Morulae an Tag 5 schwankte von 14 bis 79 Zellen mit einem Median von 41 und einem Mittelwert (MW) von 47 (Standardabweichung, SD: 19). Von Tag 3 bis 6 stieg der Prozentsatz der Embryonen mit mindestens einer untergehenden/toten Zelle von 48 Prozent auf 92 Prozent. An Tag 7 variierte die Zellzahl in Blastozysten zwischen 49 und 288 Zellen, während der Median bei 159 Zellen lag (Tab. 24). Alle untersuchten Tag 7 Blastozysten wiesen mindestens eine untergehende/tote Zelle auf. Interessanterweise wurde dabei in den schlüpfenden Blastozysten die höchste Zahl von Zelluntergängen beobachtet.

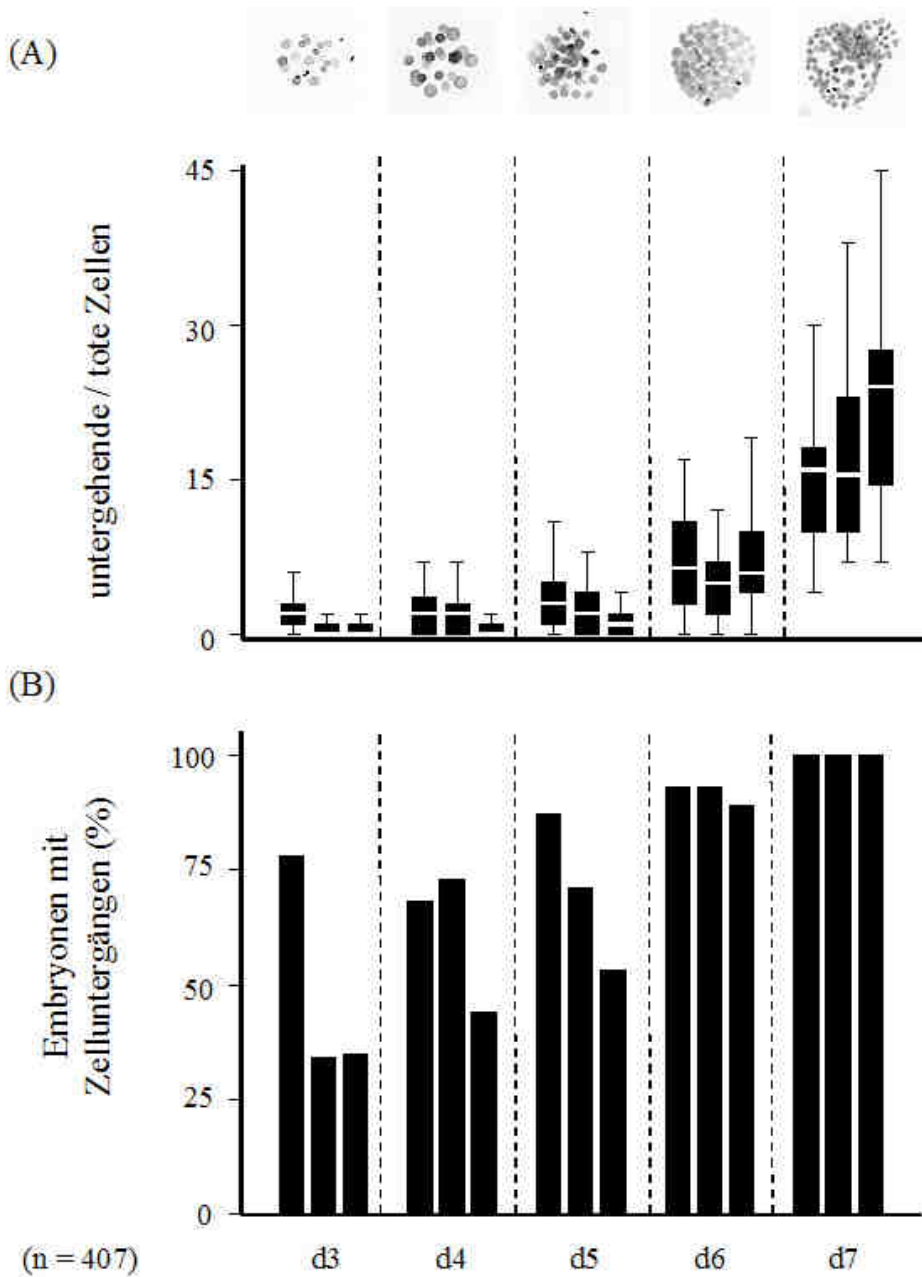


**Abbildung 18: Heterogene Entwicklung der Zellzahl innerhalb der 15 verschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 *in vitro***

(A) Heterogener Anstieg der Zellzahl: An allen Untersuchungszeitpunkten und in allen Kulturansätzen ist die Zellzahl pro Embryo sehr variabel, auch bei gleicher stereomikroskopischer Klassifizierung. Whisker-Boxplot-Diagramm: Median (Querstrich) und 25 bzw. 75 Perzentile (Box), 5 und 95 Perzentile (Whisker).

(B) Repräsentatives Beispiel für die heterogene Entwicklung innerhalb eines Kulturansatzes: Die DAPI-gefärbten Zellkerne und Mitosefiguren von zwei Tag 5 IVF-Embryonen sind durch eine Maximum-Intensitäts-Projektion konfokaler Serienschritte in einer Ebene dargestellt. Der obere Embryo enthält insgesamt nur 15 intakte Zellkerne unterschiedlicher Größe und wird stereomikroskopisch als entwicklungsverzögert beurteilt. Der untere Embryo enthält insgesamt 46 intakte Zellkerne vergleichbarer Größe und wird stereomikroskopisch als weit entwickelt beurteilt.

(▲) Die stereomikroskopisch an den 5 Untersuchungszeitpunkten jeweils am weitesten entwickelten Embryonen werden für die Generierung von entwicklungstypischen Abundanz-Profilen ausgewählter Apoptose-assoziiierter Transkripte verwendet (siehe Kapitel 3.5).



**Abbildung 19: Zelluntergänge innerhalb der 15 verschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 *in vitro***

(A) Anstieg der Zelluntergänge. Die am weitesten entwickelten Embryonen zeigen an Tag 3 bis 5 die wenigsten, an Tag 7 dann die meisten untergehenden/toten Zellen. Whisker-Boxplot-Diagramm: Median (Querstrich) und 25 bzw. 75 Perzentile (Box), 5 und 95 Perzentile (Whisker).

(B) Anstieg der Embryonen mit Zelluntergängen. Der Anteil Embryonen mit mindestens einer untergehenden/toten Zelle steigt von Tag 3 bis 7 auf 100 Prozent. Dabei enthalten mehr Embryonen mit verzögerter Entwicklung an Tag 3 bis 5 mindestens eine untergehende/tote Zelle.

**Tabelle 24: Zellzahlen und Zelluntergänge in Tag 3 bis 7 Rinderembryonen *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>Klassifizierung* | n <sup>Δ</sup> | Anzahl Zellen <sup>◊</sup> |                     |                     | Zelltod-Index (%) |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
|                                |                | total                      | untergehend/tot     |                     |                   |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>            |                |                            |                     |                     |                   |
| 2 - 7 Zellen                   | 27             | 7; 7 ± 3; 2 - 18           | 2; 2 ± 2; 0 - 10    | 25; 33 ± 26; 0 - 88 |                   |
| 8 - 12 Zellen                  | 29             | 9; 9 ± 2; 4 - 16           | 0; 1 ± 1; 0 - 3     | 0; 5 ± 9; 0 - 33    |                   |
| > 12 Zellen                    | 26             | 14; 15 ± 3; 11 - 21        | 0; 1 ± 1; 0 - 2     | 0; 3 ± 5; 0 - 17    |                   |
| gesamt                         | 82             | 10; 10 ± 4; 2 - 21         | 0; 1 ± 2; 0 - 10    | 0; 14 ± 21; 0 - 86  |                   |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>            |                |                            |                     |                     |                   |
| 6 - 12 Zellen                  | 28             | 13; 12 ± 5; 5 - 24         | 2; 2 ± 2; 0 - 7     | 17; 24 ± 29; 0 - 90 |                   |
| 13 - 20 Zellen                 | 30             | 17; 17 ± 5; 6 - 26         | 2; 2 ± 2; 0 - 7     | 12; 14 ± 16; 0 - 67 |                   |
| > 20 Zellen                    | 25             | 20; 21 ± 6; 12 - 35        | 0; 1 ± 1; 0 - 5     | 0; 4 ± 7; 0 - 36    |                   |
| gesamt                         | 83             | 16; 16 ± 6; 5 - 35         | 1; 2 ± 2; 0 - 7     | 7; 15 ± 23; 0 - 90  |                   |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>           |                |                            |                     |                     |                   |
| 6 - 20 Zellen                  | 30             | 24; 27 ± 15; 5 - 66        | 3; 4 ± 4; 0 - 14    | 13; 21 ± 24; 0 - 85 |                   |
| Morula                         | 24             | 32; 35 ± 17; 5 - 77        | 2; 3 ± 4; 0 - 14    | 4; 15 ± 22; 0 - 73  |                   |
| komp. Morula                   | 15             | 51; 47 ± 19; 14 - 79       | 1; 2 ± 2; 0 - 9     | 2; 3 ± 4; 0 - 13    |                   |
| gesamt                         | 69             | 31; 34 ± 18; 5 - 79        | 2; 3 ± 2; 0 - 14    | 5; 15 ± 23; 0 - 85  |                   |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>           |                |                            |                     |                     |                   |
| Morula                         | 30             | 60; 69 ± 34; 21 - 143      | 7; 7 ± 5; 0 - 17    | 9; 13 ± 14; 0 - 59  |                   |
| frühe Blastozyste              | 29             | 89; 84 ± 32; 12 - 139      | 5; 5 ± 4; 0 - 15    | 7; 7 ± 6; 0 - 27    |                   |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 27             | 140; 131 ± 40; 59 - 197    | 6; 8 ± 6; 0 - 24    | 5; 6 ± 5; 0 - 21    |                   |
| gesamt                         | 86             | 91; 94 ± 44; 12 - 197      | 6; 7 ± 5; 12 - 21   | 6; 9 ± 8; 0 - 59    |                   |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>           |                |                            |                     |                     |                   |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 27             | 110; 120 ± 44; 54 - 215    | 16; 15 ± 6; 4 - 30  | 12; 13 ± 6; 5 - 27  |                   |
| exp. Blastozyste               | 30             | 164; 169 ± 56; 49 - 284    | 16; 17 ± 8; 7 - 38  | 10; 11 ± 5; 3 - 25  |                   |
| schl. Blastozyste              | 20             | 215; 218 ± 39; 143 - 288   | 24; 23 ± 10; 7 - 45 | 11; 11 ± 4; 4 - 18  |                   |
| gesamt                         | 77             | 159; 162 ± 60; 49 - 288    | 17; 18 ± 9; 4 - 45  | 11; 12 ± 5; 3 - 27  |                   |

\*Zeitpunkt nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs), Klassifizierung der Embryonen unter dem Stereomikroskop; <sup>Δ</sup>Anzahl untersuchter Embryonen; <sup>◊</sup>Anzahl Zellen pro Embryo; Werte sind: Median; Mittelwert ± Standardabweichung; Spannweite; <sup>□</sup>nicht-expanded; Abkürzungen: komp. - kompaktiert; exp. - expandiert; schl. - schlüpfend

**Tabelle 25: Anteil *in vitro* produzierter Rinderembryonen mit Zelluntergängen**

| Zeitpunkt/<br>Klassifizierung* | Anzahl Embryonen   |  |
|--------------------------------|--------------------|--|
|                                | total <sup>Δ</sup> | mit mindestens einer untergehenden/toten Zelle (%) |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>            |                    |  |
| 2 - 7 Zellen                   | 27                 | 21 (78)  |
| 8 - 12 Zellen                  | 29                 | 10 (34)  |
| > 12 Zellen                    | 26                 | 9 (35)   |
| gesamt                         | 82                 | 40 (48)  |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>            |                    |  |
| 6 - 12 Zellen                  | 28                 | 19 (68)  |
| 13 - 20 Zellen                 | 30                 | 22 (73)  |
| > 20 Zellen                    | 25                 | 11 (44)  |
| gesamt                         | 83                 | 52 (62)  |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>           |                    |  |
| 6 - 20 Zellen                  | 30                 | 26 (87)  |
| Morula                         | 24                 | 17 (71)  |
| kompaktierte Morula            | 15                 | 8 (53)   |
| gesamt                         | 69                 | 51 (74)  |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>           |                    |  |
| kompaktierte Morula            | 30                 | 28 (93)  |
| frühe Blastozyste              | 29                 | 27 (93)  |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 27                 | 24 (89)  |
| gesamt                         | 86                 | 79 (92)  |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>           |                    |  |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 27                 | 27 (100)   |
| expandierte Blastozyste        | 30                 | 30 (100)   |
| schlüpfende Blastozyste        | 20                 | 20 (100)   |
| gesamt                         | 77                 | 77 (100)   |

\*Zeitpunkt nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs), Klassifizierung der Embryonen unter dem Stereomikroskop; <sup>Δ</sup>Anzahl untersuchter Embryonen; <sup>□</sup>nicht-expandiert

#### 4.3.1.3 Zellzahlen und Zelluntergänge in Tag 6 und 7 Blastozysten *in vitro*

In Blastozysten wurden Zellen der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophoblasten (TB) getrennt ausgewertet. *In vitro* wurden nicht-expandierte Blastozysten an Tag 6 und 7 (144 und 168 h) nach Zugabe der Spermien zu den Eizellen beobachtet, expandierte und schlüpfende Blastozysten nur an Tag 7. Insgesamt wurden 104 Blastozysten in vier stereomikroskopisch unterschiedenen Stadien analysiert. Die vier Blastozystenstadien wurden hinsichtlich der Gesamtzellzahl und Zellzahl in ICM und TB sowie hinsichtlich der Zelluntergänge verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

Die an Tag 6 nach IVF am weitesten entwickelten Embryonen hatten das Stadium der nicht-expandierten Blastozyste erreicht. Sie besaßen mehr Zellen und einen höheren Anteil ICM-Zellen im Vergleich zu nicht-expandierten Tag 7 Blastozysten. Gleichzeitig wurden in den nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten im Median weniger Zelluntergänge (5 Prozent) beobachtet als in den nicht-expandierten Tag 7 Blastozysten (12 Prozent). Der Anteil der untergehenden/toten Zellen in der ICM betrug in nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten im Median 6 Prozent und in nicht-expandierten Tag 7 Blastozysten 18 Prozent (Tab. 26). In nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten betrug die Zellzahl im Median 140, in schlüpfenden Tag 7 Blastozysten im Median 217 Zellen (Tab. 26). Die höhere Zellzahl in den schlüpfenden Tag 7 Blastozysten beruhte in erster Linie auf einer größeren Zahl von Trophoblastzellen (Abb. 20). In den expandierten und schlüpfenden Tag 7 Blastozysten lag der Anteil untergehender/toter Zellen in der ICM im Median bei 20 und 27 Prozent und war deutlich höher als in den nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten mit 6 Prozent (Tab. 26). Gleichzeitig blieb die Zahl der intakten ICM-Zellen (Gesamtzellzahl minus untergehende/tote Zellen) konstant (Abb. 20). Sie lag in den nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten und in den schlüpfenden Tag 7 Blastozysten im Median bei 64 (Abb. 20). Dies könnte auf eine Regulation der Zellzahl der ICM durch programmierten Zelltod hindeuten. Der Anteil untergehender/toter Zellen im TB blieb konstant niedrig (Abb. 20, Tab. 26).

Der Vergleich von sich schnell entwickelnden Blastozysten an Tag 6 (nicht-expandiert) und Tag 7 (schlüpfend, Abb. 20) führte zu folgenden Schlussfolgerungen:

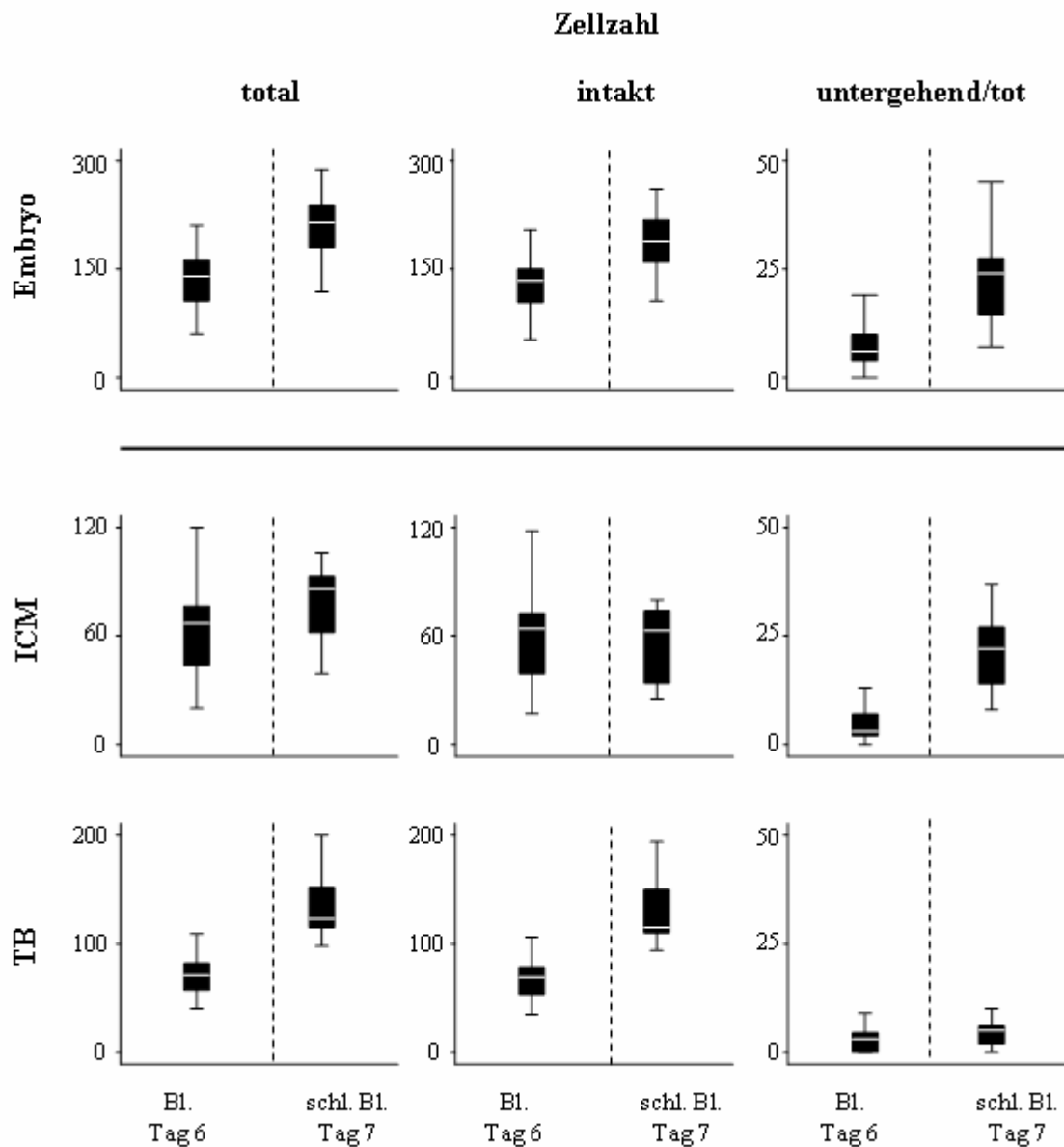
1. Der Anstieg der Zellzahl beruht vor allem auf einer Zunahme der Trophoblastzellen.
2. Der Anstieg der Zelluntergänge beschränkt sich fast ausschließlich auf die ICM.
3. Die intakte Zellzahl in der ICM (Gesamtzellzahl minus untergehende/tote Zellen) bleibt konstant.



**Tabelle 26: Zellzahlen und Zelluntergänge in der inneren Zellmasse (ICM) und im Trophoblasten (TB) verschiedener Blastozystenstadien**

| Zeitpunkt/ Stereo-<br>mikroskopische<br>Klassifizierung* | n  | Zellzahl <sup>□</sup>         |                            |                              | Zelluntergänge <sup>□</sup> |                           |                       |
|--|----|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
|  |    | Zellzahl-Index (%)            |                            |                              | Zelltod-Index (%)           |                           |                       |
|  |    | total                         | ICM                        | TB                           | total                       | ICM                       | TB                    |
| nicht-expandierte<br>Blastozyste (d 6)                   | 27 | 140 / 131 ± 40<br>(59 - 197)  | 67 / 65 ± 27<br>(20 - 130) | 71 / 71 ± 20<br>(40 - 120)   | 6 / 8 ± 6<br>(1 - 24)       | 3 / 5 ± 4<br>(1 - 15)     | 3 / 3 ± 3<br>(0 - 13) |
|  |    |                               | 47 / 46 ± 9<br>(26 - 62)   | 53 / 54 ± 9<br>(38 - 74)     | 5 / 6 ± 5<br>(0 - 21)       | 6 / 9 ± 9<br>(0 - 35)     | 4 / 6 ± 6<br>(0 - 23) |
| nicht-expandierte<br>Blastozyste (d 7)                   | 27 | 110 / 120 ± 44<br>(54 - 215)  | 52 / 51 ± 27<br>(22 - 100) | 64 / 70 ± 24<br>(34 - 117)   | 16 / 15 ± 6<br>(4 - 30)     | 10 / 10 ± 6<br>(1 - 24)   | 5 / 5 ± 4<br>(0 - 13) |
|  |    |                               | 41 / 41 ± 10<br>(19 - 59)  | 59 / 59 ± 10<br>(41 - 81)    | 12 / 12 ± 6<br>(5 - 27)     | 18 / 21 ± 13<br>(0 - 67)  | 7 / 8 ± 7<br>(0 - 27) |
| expandierte<br>Blastozyste (d 7)                         | 30 | 164 / 169 ± 56<br>(49 - 284)  | 66 / 73 ± 31<br>(20 - 139) | 92 / 98 ± 30<br>(35 - 151)   | 16 / 17 ± 8<br>(7 - 38)     | 12 / 12 ± 6<br>(4 - 24)   | 4 / 5 ± 3<br>(0 - 15) |
|  |    |                               | 42 / 42 ± 8<br>(19 - 56)   | 58 / 59 ± 8<br>(44 - 81)     | 10 / 11 ± 5<br>(3 - 25)     | 20 / 20 ± 10<br>(4 - 40)  | 4 / 5 ± 4<br>(0 - 20) |
| schlüpfende<br>Blastozyste (d 7)                         | 20 | 217 / 210 ± 44<br>(119 - 288) | 86 / 77 ± 22<br>(39 - 106) | 123 / 140 ± 37<br>(98 - 228) | 24 / 25 ± 9<br>(12 - 45)    | 22 / 21 ± 8<br>(8 - 37)   | 5 / 4 ± 3<br>(0 - 10) |
|  |    |                               | 39 / 36 ± 9<br>(16 - 46)   | 61 / 64 ± 9<br>(54 - 84)     | 11 / 12 ± 4<br>(4 - 18)     | 27 / 28 ± 12<br>(12 - 60) | 4 / 3 ± 2<br>(0 - 8)  |

\*Zeitpunkt nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten COCs, Klassifizierung der Embryonen unter dem Stereomikroskop; <sup>□</sup>pro Embryo; Werte: Median / Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite)



**Abbildung 20: Zellzahlen und Zelluntergänge in nicht-expandierten Tag 6 Blastozysten und schlüpfenden Tag 7 Blastozysten *in vitro***

Die höhere Zellzahl in schlüpfenden Tag 7 Blastozysten beruht in erster Linie auf einer Zunahme der Trophoblastzellen (TB). Der Anstieg der Zelluntergänge beschränkt sich fast ausschließlich auf die innere Zellmasse (ICM). Gleichzeitig bleibt die Zahl der intakten ICM-Zellen (Gesamtzellzahl minus untergehende/tote Zellen) konstant. Whisker-Boxplot-Diagramme: Median (Querstrich) und 25 bzw. 75 Perzentile (Box), 5 und 95 Perzentile (Whisker). Abkürzungen: Bl. - Blastozyste, schl. Bl. - schlüpfende Blastozyste

#### 4.3.1.4 Zellzahlen und Zelluntergänge in Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo*

Für eine Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert, die aus hormonell superovulierten Spendertieren 6 - 7 Tage (159 - 183 h) nach künstlicher Besamung nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.1.2). Zu diesem Zeitpunkt wurden Embryonen vom Stadium der kompaktierten Morula bis zur expandierten Blastozyste isoliert, jedoch keine schlüpfenden Blastozysten.

*In vivo* entwickelte Morulae und Blastozysten wurden mit *in vitro* produzierten kompaktierten Morulae und (nicht geschlüpfen) Blastozysten von Tag 6 (144 h) und 7 (168 h) verglichen - hinsichtlich der Gesamtzellzahl und der Zellzahl in ICM und TB und hinsichtlich der aufgetretenen Zelluntergänge. Aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer *in vivo* Embryonen wurden die Entwicklungsstadien zusammengefasst zu:

1. **Morulae:** kompaktierte Morulae und beginnende (frühe) Blastozysten mit noch nicht klar abgrenzbarer ICM.
2. **Blastozysten:** nicht-expandierte und expandierte Blastozysten

Die Zellzahlen und Zelluntergänge der untersuchten Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo* sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die *in vivo* entwickelten Morulae und Blastozysten waren ebenso heterogen wie die *in vitro* produzierten Embryonen - sowohl hinsichtlich der Zellzahlen als auch hinsichtlich der Zahl von Zelluntergängen. In den untersuchten *in vitro* Morulae schwankte die Zellzahl von 22 bis 143 bei einem Median von 76, *in vivo* von 38 bis 173 bei einem Median von 117. Der Anteil untergehender/toter Zellen lag im Median bei 13 Prozent *in vitro* und bei 10 Prozent *in vivo* (Tab. 27). In den untersuchten Blastozysten schwankte die Zellzahl *in vitro* von 38 bis 284 bei einem Median von 143 und *in vivo* von 87 bis 180 bei einem Median von 133. Blastozysten *in vitro* und *in vivo* zeigten eine hohe Inzidenz an Zelluntergängen in der ICM: Der Anteil untergehender/toter Zellen in der ICM betrug im Median 16 Prozent *in vitro* und 17 Prozent *in vivo* (Tab. 27).

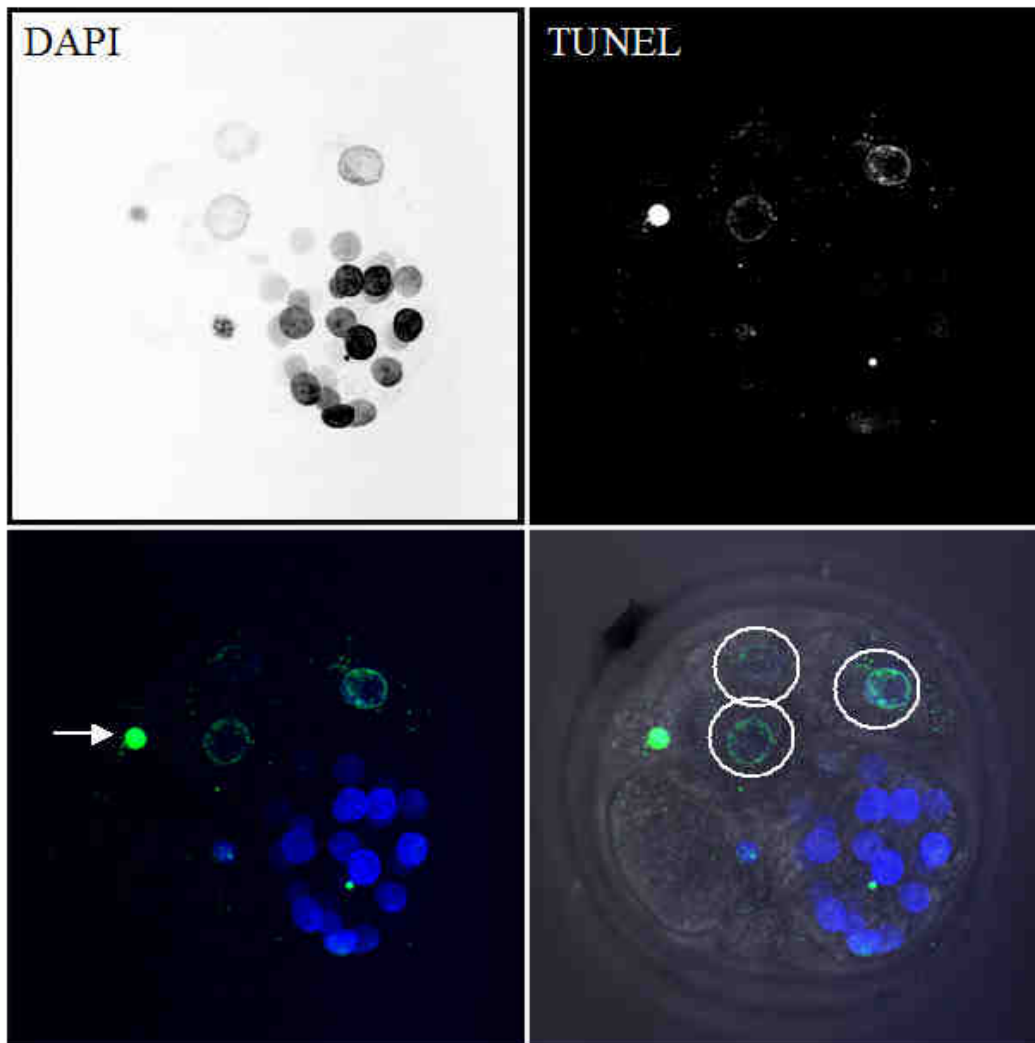
**Tabelle 27: Zellzahlen und Zelluntergänge in Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo***

| Zeitpunkt/<br>Stereomikroskopische Klassifizierung*       | n  | Zellzahl <sup>□</sup>        |                            |                            | Zelluntergänge <sup>□</sup> |                          |                       |
|---|----|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
|   |    | Zellzahl-Index (%)           |                            |                            | Zelltod-Index (%)           |                          |                       |
|   |    | total                        | ICM                        | TB                         | total                       | ICM                      | TB                    |
| <b><i>In vitro</i> (d 6 - 7)</b>                          |    |                              |                            |                            |                             |                          |                       |
| kompaktierte Morula/<br>frühe Blastozyste                 | 59 | 76 / 76 ± 34<br>(22 - 143)   |                            |                            | 5 / 6 ± 4<br>(0 - 17)       |                          |                       |
|   |    |                              |                            |                            | 13 / 10 ± 6<br>(0 - 38)     |                          |                       |
| nicht-expandierte Blastozyste/<br>expandierte Blastozyste | 85 | 143 / 142 ± 52<br>(38 - 284) | 61 / 62 ± 29<br>(15 - 139) | 79 / 80 ± 29<br>(23 - 151) | 13 / 13 ± 8<br>(0 - 38)     | 9 / 9 ± 6<br>(0 - 24)    | 4 / 4 ± 3<br>(0 - 9)  |
|   |    |                              | 42 / 43 ± 9<br>(19 - 62)   | 58 / 57 ± 9<br>(38 - 81)   | 10 / 10 ± 6<br>(0 - 27)     | 16 / 17 ± 12<br>(0 - 67) | 5 / 6 ± 6<br>(0 - 26) |
| <b><i>In vivo</i> (d 6 - 7)</b>                           |    |                              |                            |                            |                             |                          |                       |
| kompaktierte Morula/<br>frühe Blastozyste                 | 31 | 117 / 111 ± 32<br>(38 - 173) |                            |                            | 10 / 12 ± 8<br>(0 - 31)     |                          |                       |
|   |    |                              |                            |                            | 10 / 10 ± 11<br>(0 - 26)    |                          |                       |
| nicht-expandierte Blastozyste/<br>expandierte Blastozyste | 19 | 133 / 131 ± 26<br>(87 - 180) | 59 / 56 ± 14<br>(30 - 81)  | 72 / 75 ± 18<br>(51 - 110) | 13 / 14 ± 9<br>(0 - 34)     | 10 / 12 ± 8<br>(0 - 30)  | 2 / 2 ± 2<br>(0 - 15) |
|   |    |                              | 42 / 43 ± 7<br>(28 - 58)   | 58 / 57 ± 71<br>(42 - 72)  | 11 / 11 ± 7<br>(1 - 26)     | 17 / 23 ± 19<br>(0 - 77) | 3 / 4 ± 4<br>(0 - 17) |

\*Zeitpunkt nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten COCs, Klassifizierung der Embryonen unter dem Stereomikroskop; <sup>□</sup>pro Embryo; Werte: Median / Mittelwert ± Standardabweichung, (Spannweite)

### 4.3.2 Früher Blastomeren-Arrest

Ein kritischer Faktor für den heterogenen Anstieg der Zellzahl ist vermutlich der Entwicklungsstopp früher Blastomeren vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung, die beim Rind während des vierten Zellzyklus separat in den einzelnen Blastomeren stattfindet (Memili et al., 1998). In Abbildung 21 ist ein Tag 5 IVF-Embryo (120 h nach Zugabe der Spermien) dargestellt, der mehrere, in ihrer Entwicklung arretierte Blastomeren enthält. Diese können über die Größe des Zytoplasmas im Durchlicht verschiedenen Generationen zugeordnet werden. Auffällig sind die großen Zellkerne mit peripher kondensiertem Chromatin, das sich nur schwach mit DAPI anfärbt. Bei drei von diesen Kernen ist das Chromatin stark TUNEL positiv. Nur in einer Blastomere fanden weitere Zellteilungen statt.



**Abbildung 21: Heterogene Entwicklung von Zellen eines Tag 5 (120 h) IVF-Embryos**

Entwicklungsstopp früher Blastomeren vor bzw. während der Hauptgenomaktivierung im Embryo (Rind: 4. Zellzyklus). Auffällig sind die großen Zellkerne mit peripher kondensiertem Chromatin (Kreise), das sich nur schwach mit DAPI anfärbt und teilweise TUNEL positiv ist. Nur in einer Blastomere fanden weitere Zellteilungen statt. Pfeil: Polkörper, TUNEL positiv. DNA-Färbung mit DAPI (blau bzw. Grauwert) und TUNEL-Färbung (grün bzw. Grauwert); Z-Projektionen: 150 optische Serienschritte wurden in eine Ebene projiziert.

### 4.3.3 Entwicklung der Kerngröße *in vitro*

Ein charakteristisches Kennzeichen von entwicklungsverzögerten Embryonen mit einer für den Entwicklungszeitpunkt niedrigen Zellzahl waren auffällige Größenunterschiede von DAPI-gefärbten Zellkernen. Das gab Anlaß, die Kerngrößen in Tag 3 - 7 IVF-Embryonen zu messen. Während ihrer Entwicklung zur Blastozyste teilt sich die Zygote in immer kleinere Zellen. Dabei nimmt neben der Größe des Zytoplasmas auch die Kerngröße erheblich ab. Offensichtlich arretierte, frühe Blastomeren (erkennbar an der Größe des Zytoplasmas) enthielten teilweise auffällig große Zellkerne unterschiedlicher Morphologie. Die Kerngröße könnte somit neben bzw. mit morphologischen Merkmalen als Parameter zur Unterscheidung der ersten Zellgenerationen im Embryo dienen.

Zur Vereinfachung wurde anstelle des Volumens die maximale Fläche der DAPI-gefärbten Zellkerne im konfokalen Bildstapel als Maß für die Kerngröße bestimmt (siehe Kapitel 3.3.7.2). An Tag 3 bis 5 wurden jeweils alle Zellkerne eines Embryos, an Tag 6 und 7 jeweils 25 - 30 zufällig ausgewählte Zellkerne gemessen. In Tag 7 Blastozysten wurden Zellkerne von ICM und Trophoblast getrennt analysiert.

In Tabelle 28 sind die mittleren Zellkerngrößen von Embryonen an Tag 3 bis 7 nach IVF zusammengefasst. An allen Untersuchungszeitpunkten waren die Kernflächen innerhalb eines Embryos extrem heterogen. Mögliche Ursachen dafür sind die asynchrone Teilung der Blastomeren und der Entwicklungsstopp einzelner Blastomeren in vielen Embryonen. Eine signifikante Abnahme der Kernfläche wurde erstmals am Tag 5 gemessen. Die mittlere Kernfläche sank von  $179 \pm 67 \mu\text{m}^2$  (Standardabweichung, SD) an Tag 3 auf  $146 \pm 50 \mu\text{m}^2$  (SD) an Tag 5 und  $118 \pm 29 \mu\text{m}^2$  an Tag 6 (Tab. 28). In Tag 7 Blastozysten war die mittlere Kernfläche von TB-Zellen mit  $118 \pm 36 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zu Tag 6 unverändert, in der ICM mit  $98 \pm 27 \mu\text{m}^2$  (SD) jedoch signifikant kleiner als im TB (Tab. 28).

**Tabelle 28: Mittlere Kerngröße in Rinderembryonen an Tag 3 bis 7 *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>Klassifizierung* | n <sup>Δ</sup> | Kerngröße (Fläche in μm <sup>2</sup> ) |   |                                  |
|--------------------------------|----------------|--|---|----------------------------------|
|                                |                | total                                  | ICM   | TB                               |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>            |                |  |   |                                  |
| 2 - 7 Zellen                   | 214            | 193 ± 90; 32 - 488                     |   |                                  |
| 8 - 12 Zellen                  | 368            | 183 ± 61; 45 - 373                     |   |                                  |
| > 12 Zellen                    | 361            | 166 ± 54; 53 - 401                     |   |                                  |
| gesamt                         | 943            | 179 ± 67; 32 - 488                     |   |                                  |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>            |                |  |   |                                  |
| 6 - 12 Zellen                  | 428            | 198 ± 79; 38 - 596                     |   |                                  |
| 13 - 20 Zellen                 | 632            | 188 ± 62; 53 - 486                     |   |                                  |
| > 20 Zellen                    | 504            | 184 ± 60; 45 - 409                     |   |                                  |
| gesamt                         | 1564           | 189 ± 66; 38 - 596                     |   |                                  |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>           |                |  |   |                                  |
| 6 - 20 Zellen                  | 716            | 159 ± 60; 35 - 618                     |   |                                  |
| Morula                         | 917            | 147 ± 47; 45 - 392                     |   |                                  |
| komp. Morula                   | 716            | 132 ± 37; 43 - 340                     |   |                                  |
| gesamt                         | 2349           | 146 ± 50; 35 - 618 <sup>°</sup>        |   |                                  |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>           |                |  |   |                                  |
| komp. Morula                   | 621            | 114 ± 27; 69 - 340                     |   |                                  |
| frühe Blastozyste              | 883            | 128 ± 31; 69 - 275                     |   |                                  |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 658            | 110 ± 23; 63 - 216                     |   |                                  |
| gesamt                         | 2162           | 118 ± 29; 63 - 340 <sup>°</sup>        |   |                                  |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>           |                |  |   |                                  |
| Blastozyste <sup>□</sup>       | 727            | 107 ± 35; 44 - 325                     | 92 ± 24; 50 - 210<br>(n = 212)              | 112 ± 37; 44 - 325<br>(n = 515)  |
| exp. Blastozyste               | 377            | 112 ± 37; 52 - 270                     | 95 ± 30; 52 - 228<br>(n = 127)              | 121 ± 37; 56 - 270<br>(n = 250)  |
| schl. Blastozyste              | 1271           | 114 ± 33; 42 - 313                     | 102 ± 27; 42 - 255<br>(n = 475)             | 121 ± 35; 49 - 313<br>(n = 796)  |
| gesamt                         | 2375           | 111 ± 35; 42 - 325                     | 98 ± 27; 42 - 255 <sup>°</sup><br>(n = 814) | 118 ± 36; 44 - 325<br>(n = 1561) |

\*nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* maturierten Cumulus-Eizell-Komplexen (COCs), Klassifizierung der Embryonen unter dem Stereomikroskop; <sup>Δ</sup>Anzahl untersuchter Zellkerne; <sup>□</sup>nicht-expanded; Werte sind: Mittelwert ± Standardabweichung; Spannweite; <sup>°</sup>Signifikanz von  $P < 0,01$  mit Students *t* - Test; <sup>□</sup>nicht-expanded; Abkürzungen: komp. - kompaktiert; exp. - expandiert; schl. - schlüpfend

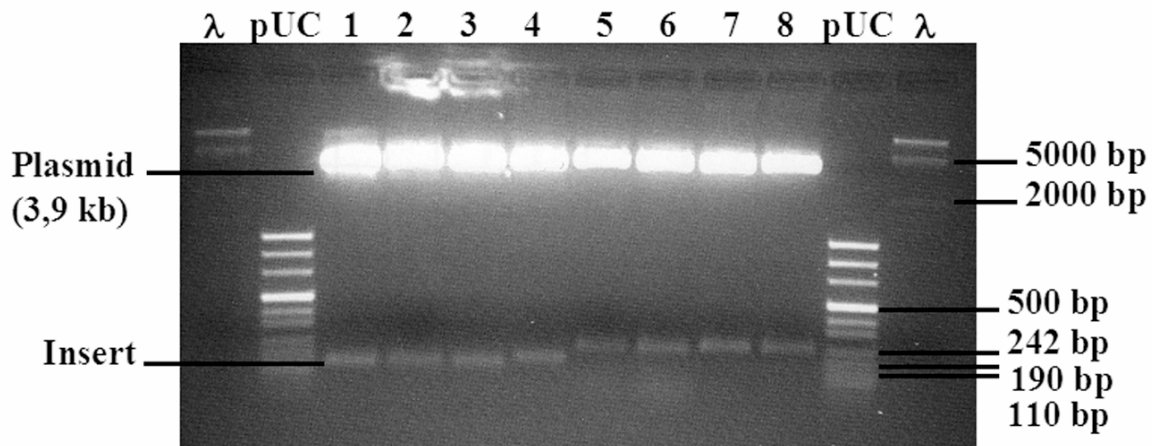
#### 4.4 mRNA-Expression von Apoptose-assoziierten Genen

Die mRNA-Expression von insgesamt zehn Apoptose-assoziierten Genen mit Funktion in der Initiation, Regulation bzw. Exekution der Apoptose wurde in *in vitro* gereiften Eizellen und frühen Embryonen vom Rind analysiert. Für die gleichzeitige Quantifizierung aller ausgewählten Transkripte in einer Probe wurde jeweils die Gesamt-RNA von einem Pool von 10 Eizellen/Embryonen mittels Trizol-Chloroform isoliert. Neben 24 h *in vitro* gereiften Eizellen wurden *in vitro* fertilisierte und 3 bis 7 Tage *in vitro* kultivierte Embryonen analysiert, die hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes unter dem Stereomikroskop in 15 verschiedene Entwicklungsstadien selektiert wurden (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.2.). Es wurden mindestens 3 biologische Replikate pro Zeitpunkt und Entwicklungsstadium analysiert. Parallel dazu wurden *in vivo* entwickelte Embryonen untersucht, die 6 bis 7 Tage nach künstlicher Besamung aus superovulierten Spendertieren nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.1.2). Für die Synthese korrespondierender DNA-Fragmente aus der isolierten Gesamt-RNA wurden Random-Hexamer (RH)-Primer verwendet. Die Quantifizierung der ausgewählten Transkripte erfolgte mittels quantitativer Real-Time RT-PCR unter Verwendung von mRNA-spezifischen Primern. Für eine Bestimmung der Kopienzahl pro Embryo (absolute Quantifizierung) über eine Kalibrierkurve wurde für jedes untersuchte Transkript der entsprechende DNA-Standard hergestellt. Dazu wurde das Transkript-spezifische DNA-Fragment mit Hilfe eines Plasmid-Vektors und kompetenter *E.coli*-Bakterien kloniert (siehe Kapitel 3.5.2).

##### 4.4.1 Identifizierung der klonierten DNA-Fragmente

Die klonierten Transkript-spezifischen DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Plasmidvektor isoliert (siehe Kapitel 3.5.2.6). Der Nachweis der korrekten Fragmentlänge erfolgte im Agarosegel über eine Auftrennung der Plasmid-DNA. Die Transkript-spezifischen DNA-Fragmente waren 100 bis 250 Basenpaare (bp) groß und stellten im Agarosegel die untere, schwächere Bande dar (Abb. 22). Der linearisierte Plasmidvektor ohne Insert hatte eine Größe von 3,9 Kilobasen (kb) und war im Agarosegel als dicke, obere Bande sichtbar (Abb. 22). Eine eindeutige Identifizierung der klonierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Sequenzierung. Die Ergebnisse der Sequenz-Analyse sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 8.4).





**Abbildung 22: Identifizierung klonierter Zielsequenzen im Agarosegel nach Behandlung der Plasmid-DNA mit *EcoRI***

Transkript-spezifische DNA-Fragmente (Insertgröße): 1 - 3 - FASLG (126 bp), 4 - FAS (153 bp), 5 - 6 - CASP8 (204 bp), 7 - 8 - CASP9 (219 bp)

#### 4.4.2 Bestimmung der absoluten Kopienzahl mittels RT-qPCR

DNA-Standard und Proben wurden mittels quantitativer Real-Time RT-PCR analysiert (siehe Kapitel 3.5.4). Die CT (threshold cycle)-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen des DNA-Standards wurden für die Herstellung einer Standardkurve verwendet. Die Bestimmung der Kopienzahl der spezifischen Transkripte in der Probe erfolgte durch Einsetzen des CT-Wertes in die zugehörige Standardgleichung. Der durch die Standardkurve bestimmte Messbereich reichte von 2 Mio. Kopien bis zu 200 (H2AFZ) bzw. 20. Für 18S rRNA-Transkripte lag der Messbereich bei  $2 \times 10^9$  bis  $2 \times 10^3$  Kopien (Tab. 29).

**Tabelle 29: Standardkurven/CT\*-Werte der RT-qPCR**

| Transkript | Detektionsbereich |                                 |                    |
|------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|
|            | DNA-Standard      |                                 | Probe <sup>o</sup> |
|            | CT*               | Kopienzahl                      | CT*                |
| 18S rRNA   | 5 - 26            | $2 \times 10^9 - 2 \times 10^3$ | 9 - 15             |
| H2AFZ      | 20 - 32           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^2$ | 23 - 32            |
| STAT3      | 15 - 34           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 23 - 29            |
| BAX        | 15 - 33           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 26 - 33            |
| CASP3      | 16 - 36           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 28 - 36            |
| CASP9      | 17 - 36           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 31 - 36            |
| BCL2       | 17 - 35           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 32 - 35            |
| BCL2L1     | 16 - 35           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 27 - 35            |
| BIRC4      | 15 - 32           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 25 - 32            |
| FASLG      | 16 - 35           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | 32 - 35            |
| FAS        | 15 - 33           | $4 \times 10^6 - 4 \times 10^1$ | 31 - 33            |
| CASP8      | 16 - 34           | $2 \times 10^6 - 2 \times 10^1$ | <i>n.d.</i>        |

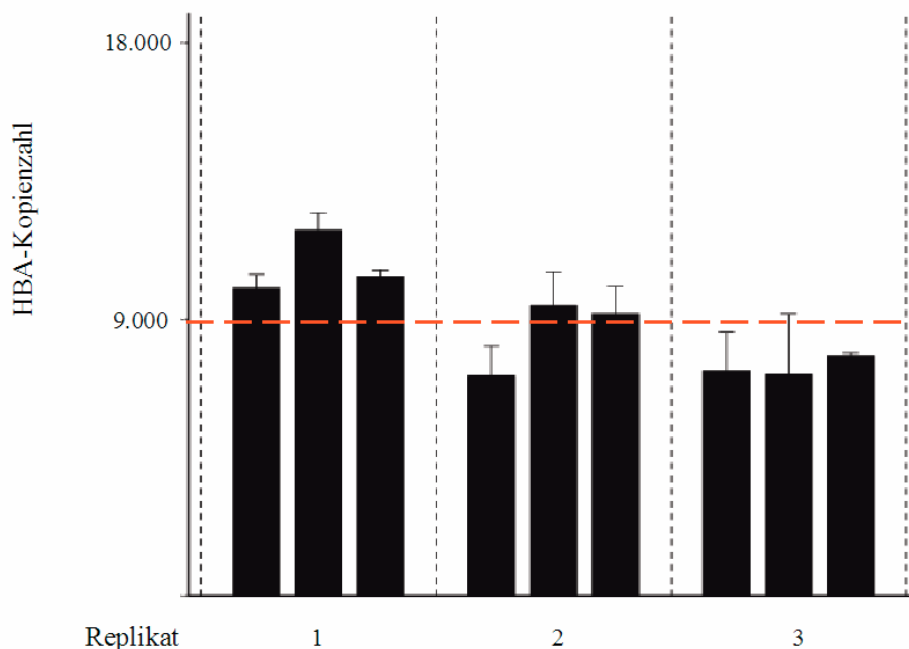
\*Schwellenwert (CT - threshold cycle); <sup>o</sup>Probe: 10 *in vitro* gereifte Eizellen/*in vitro* fertilisierte und kultivierte Tag 3 bis 7 IVF-Embryonen bzw. 5 *in vivo* entwickelte Morulae bzw. Blastozysten, die am Tag 7 nach wiederholter, künstlicher Besamung nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen wurden.

#### 4.4.3 Nachweis der externen Standard-RNA

Effizienz und Reproduzierbarkeit von RNA-Isolierung und Reverser Transkription wurden mittels einer externen Standard-RNA überprüft. Artfremde, hochreine mRNA wurde in definierter Konzentration vor der Extraktion der RNA zu den Proben gegeben. Nach der Reversen Transkription wurde die Konzentration des externen Standards mittels qPCR quantifiziert. Aus der Kopienzahl des externen Standards vor und nach der Behandlung der Probe wurde die Effizienz von RNA-Isolierung und Reverser Transkription abgeleitet (siehe Kapitel 3.5.3.2). Für unsere Analysen wurde 0,1 pg Hämoglobin- $\alpha$  (HBA)-mRNA vom Kaninchen zu jeder Probe gegeben. Dies entsprach 0,01 pg HBA-mRNA bzw. 32.100 HBA-Kopien pro Eizelle. Insgesamt wurden 9 Proben von jeweils 10 *in vitro* gereiften Eizellen analysiert - 3 bio-

logische Replikate mit jeweils 3-facher Wiederholung. Die RNA wurde an verschiedenen Tagen isoliert. Jede qPCR wurde als Triplet-Ansatz durchgeführt.

Im Mittel wurde für den externen RNA-Standard eine Kopienzahl von  $8.940 \pm 1.815$  (Standardabweichung, SD) nach RNA-Isolierung und Reverser Transkription gemessen (Abb. 23). Bei einer HBA-Ausgangskonzentration von 32.100 Kopien lag die Effizienz der RNA-Isolierung und Reversen Transkription bei 28 Prozent  $\pm$  5 Prozent (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Die Spannweite betrug von 22 Prozent bis 37 Prozent (Tab. 38, Anhang).



**Abbildung 23: Nachweis von Hämoglobin- $\alpha$  (HBA)-mRNA in Rinder-Eizellen**

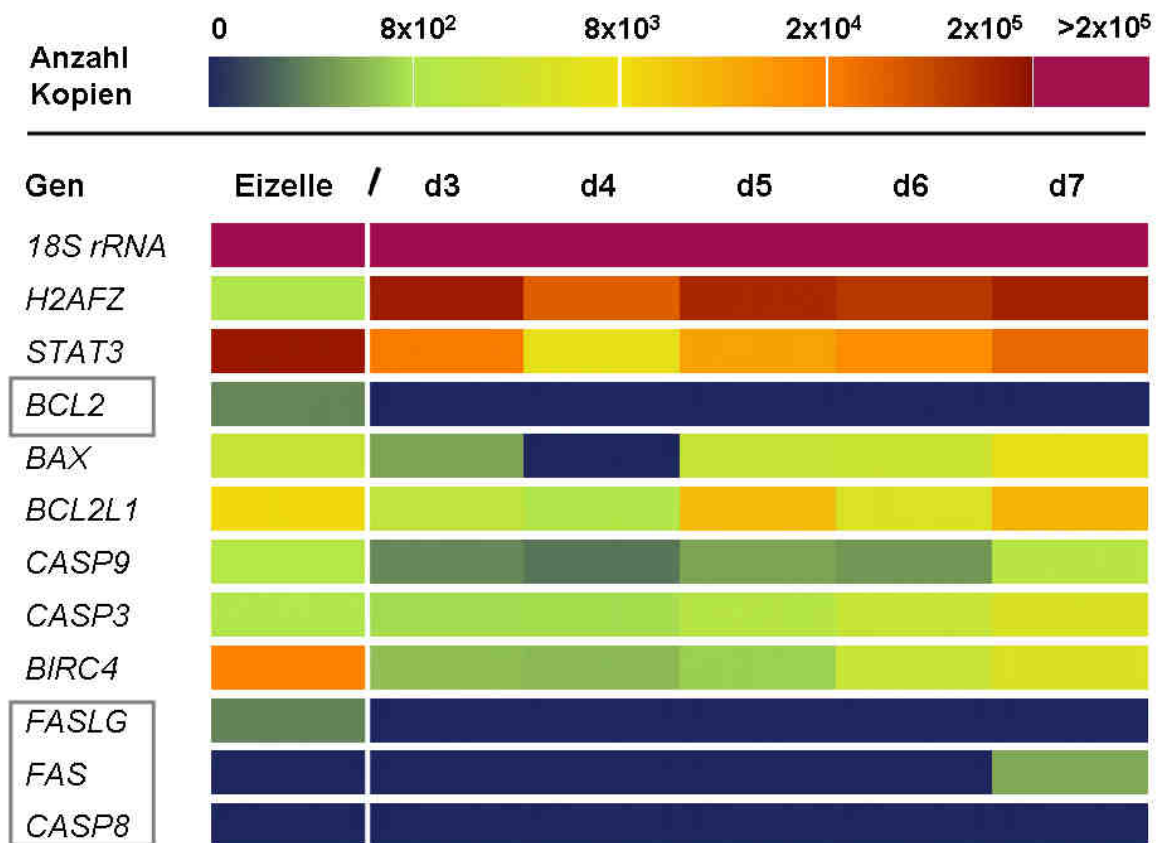
Dargestellt sind die Kopienzahlen pro Eizelle von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 3 Wiederholungen. Jede Probe wurde als Triplet-Ansatz in der qPCR analysiert. Die gestrichelte rote Linie stellt mit  $8.940 \pm 1.815$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) die mittlere Kopienzahl aus den 9 Proben dar.

#### 4.4.4 Transkript-Profile von Apoptose-assoziierten Genen *in vitro*

Die Transkript-Abundanzen Apoptose-assoziiierter Gene wurden in Tag 3 bis 7 Embryonen und als Bezugspunkt in gereiften Eizellen bestimmt. Als Referenz-Transkripte dienten 18S rRNA (18S ribosomale RNA)- und H2AFZ-mRNA (Histon 2A, family Z-member). Für die Generierung von Abundanz-Profilen, die vermutlich am ehesten eine ungestörte Entwicklung

repräsentieren, wurden die Messwerte der Embryonen mit dem stereomikroskopisch jeweils am weitesten fortgeschrittenen Entwicklungsstand herangezogen (Abb. 25 und 26).

Es wurden teilweise große Unterschiede in den Transkript-Abundanzen zwischen den verschiedenen Genen und im Verlauf der Entwicklung von der Eizelle bis zur Blastozyste für einzelne Gene detektiert. Um einen Überblick über die Entwicklung der Transkript-Abundanzen von der Eizelle bis zur Blastozyste zu erhalten, wurden die Kopienzahlen pro Eizelle/Embryo von allen untersuchten Transkripten zweidimensional graphisch dargestellt. Die Visualisierung erfolgte über eine Ausgabe der Kopienzahlen als Farbwerte (Heatmap: Abb. 24).



**Abbildung 24: Heatmap von Transkript-Abundanzen in *in vitro* gereiften Eizellen und Tag 3 bis 7 IVF-Embryonen**

Dargestellt sind die Messwerte (mittlere Kopienzahl pro Embryo aus drei biologischen Replikaten) der Embryonen mit dem stereomikroskopisch jeweils am weitesten fortgeschrittenen Entwicklungsstand. Dunkelblau kodiert für eine Kopienzahl von null bzw. unter der Nachweisgrenze. Für BCL2, FAS, FASLG und CASP8 ist kein sicherer Nachweis von mRNA-Kopien in Embryonen vor dem Blastozystenstadium möglich.

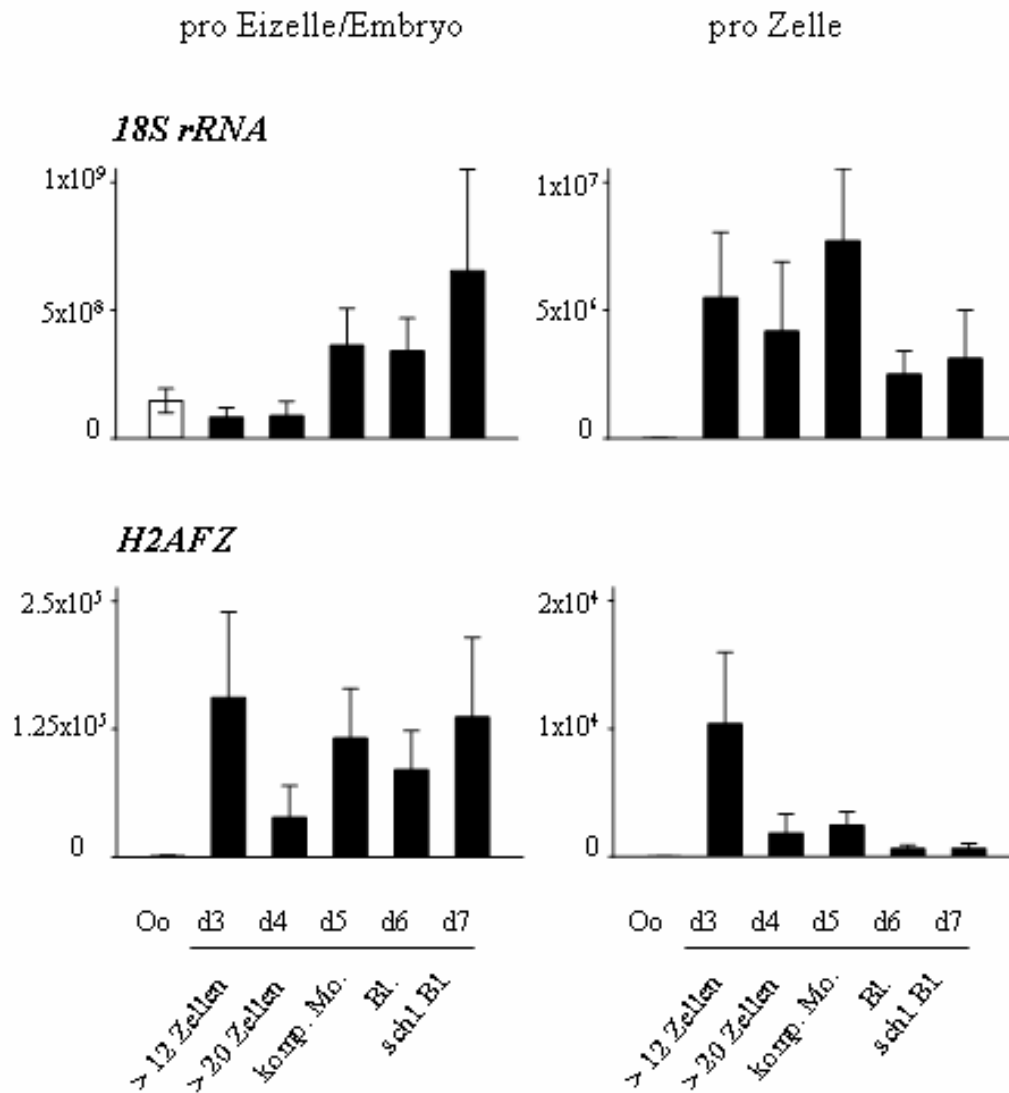
Die Transkript-Abundanz-Profile von STAT3, BAX, BCL2L1, CASP9, CASP3 und BIRC4 waren gekennzeichnet durch einen Abfall der Kopienzahlen von der Eizelle bis Tag 3 oder Tag 4 und einen Wiederanstieg im Rahmen der weiteren Entwicklung des Embryos. Auffällig waren die im Vergleich zur Eizelle hohen mRNA-Kopienzahlen für H2AFZ an Tag 3 und der Abfall zu Tag 4. Für FAS, FASLG, CASP8 und BCL2 war kein sicherer Nachweis von mRNA-Kopien in Embryonen vor dem Blastozystenstadium möglich (Abb. 24).

Im Detail sind die Kopienzahlen der analysierten Transkripte in *in vitro* Eizellen und Embryonen der 15 stereomikroskopisch unterschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 in den Tabellen 39 bis 42 aufgeführt (siehe Kapitel 8.3.2, Anhang). Für die Generierung von Transkript-Abundanz-Profilen, die vermutlich am ehesten einer ungestörten Entwicklung entsprechen, wurden jeweils die Messwerte der Embryonen mit der stereomikroskopisch am weitesten fortgeschrittenen Entwicklung herangezogen. Die Kopienzahl pro Zelle wurde als Quotient der Kopienzahl pro Embryo und der mittleren Zellzahl der Embryonen in diesem Entwicklungsstadium berechnet. Die Abundanz-Profile für die beiden Referenz-Transkripte sind in Abb. 25 dargestellt.

In gereiften Eizellen wurden  $1,5 \times 10^8 \pm 4,7 \times 10^7$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) Kopien 18S rRNA gemessen. In Tag 3 Embryonen (mit mehr als 12 Zellen) waren es  $8,5 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^7$  und in Tag 7 Embryonen (schlüpfende Blastozysten)  $6,5 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^8$  Kopien pro Embryo (Tab. 39). Die Kopienzahl stieg aber erst zwischen Tag 4 (mehr als 20 Zellen) und Tag 5 (kompaktierte Morula) steil an. An Tag 5 wurden die höchsten Kopienzahlen pro Zelle beobachtet. Zwischen Tag 6 und Tag 7 - von der nicht-expandierten zur schlüpfenden Blastozyste - stieg die Kopienzahl pro Embryo erneut steil an. Dieser Anstieg resultierte überwiegend aus dem Anstieg der Zellzahl, weniger aus einem Anstieg der Kopienzahl pro Zelle.

Das Transkript-Profil für H2AFZ weicht davon dramatisch ab. In gereiften Eizellen wurden  $1.100 \pm 450$  Kopien gemessen. Auffällig waren die hohe Transkript-Abundanz an Tag 3 mit  $160.000 \pm 84.000$  Kopien und der Abfall an Tag 4 auf  $38.000 \pm 31.000$  (Tab. 39). Die Kopienzahl pro Zelle war in nicht-expandierten (Tag 6) und schlüpfenden Blastozysten (Tag 7) mit  $700 \pm 290$  und  $642 \pm 358$  konstant.

### Transkript-Kopienzahl



**Abbildung 25: Transkript-Abundanz-Profile von 18S rRNA und H2AFZ in gereiften Eizellen und Embryonen von Tag 3 bis 7 *in vitro***

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten von Embryonen mit dem stereomikroskopisch jeweils am weitesten fortgeschrittenen Entwicklungsstand; Kopienzahl pro Zelle: Quotient aus Kopienzahl pro Zelle und mittlerer Zellzahl. Abkürzungen: Oo - gereifte Eizellen, komp. Mo - kompaktierte Morula, schl. Bl. - schlüpfende Blastozyste

Transkripte für CASP3, der zentralen Effektor-Caspase, und einem ihrer Inhibitoren, BIRC4, wurden sowohl in gereiften Eizellen als auch in Embryonen an Tag 3 bis 7 nachgewiesen (Abb. 26). In der Eizelle wurden mit  $930 \pm 650$  viel weniger Kopien von CASP3 im Verhältnis zu BIRC4 mit  $22.000 \pm 8.200$  gemessen. In den Embryonen lagen die Transkript-

Abundanzen für CASP3 und BIRC4 auf gleichem Niveau (Tab. 40 - 41). So wurden in Tag 4 Embryonen mit mehr als 20 Zellen  $760 \pm 130$  Kopien für CASP3 und  $780 \pm 390$  für BIRC4 bestimmt sowie  $5.500 \pm 3.300$  Kopien CASP3 und  $6.200 \pm 2.800$  Kopien BIRC4 in schlüpfenden Tag 7 Blastozysten. Die Anzahl von CASP3-Transkripten pro Zelle blieb mit  $36 \pm 6$  für Tag 4 Embryonen und  $26 \pm 15$  für Tag 7 Embryonen relativ konstant.

Für die Initiator-Caspase 9 wurden sowohl in der gereiften Eizelle als auch in allen Stadien von Tag 3 bis 7 spezifische Transkripte nachgewiesen (Abb. 26, Tab. 40). Die Anzahl der gemessenen Kopien lag in den gereiften Eizellen bei  $1.600 \pm 700$ , in den Embryonen von Tag 3 (mit mehr als 12 Zellen) bis Tag 6 (kompaktierte Morula) in einer Größenordnung von 300 bis 500 Kopien. In schlüpfenden Tag 7 Blastozysten wurde ein deutlicher Anstieg auf  $2.000 \pm 1.000$  Kopien pro Embryo beobachtet. Dies entsprach einer mittleren Kopienzahl von nur  $9 \pm 5$  pro Zelle.

Transkripte für BCL2L1, einem anti-apoptotischen Mitglied der BCL2-Familie, waren ebenfalls durchgehend nachweisbar. Dabei fiel die mRNA-Abundanz von  $9.300 \pm 3.500$  Kopien in der gereiften Eizelle auf  $1.400 \pm 1.200$  Kopien pro Embryo und  $67 \pm 57$  pro Zelle in Tag 4 Embryonen mit mehr als 20 Zellen (Abb. 26, Tab. 41). In den kompaktierten Morulae an Tag 5 zeigte sowohl die Kopienzahl pro Embryo mit  $12.000 \pm 6.000$  als auch die Kopienzahl pro Zelle mit  $255 \pm 128$  einen deutlichen Peak. In den geschlüpften Tag 7 Blastozysten lag die Kopienzahl dann bei  $14.000 \pm 10.000$  pro Embryo und nur  $64 \pm 46$  pro Zelle.

Für das pro-apoptotische und Mitochondrienmembran-assoziierte BAX lag die Kopienzahl in der gereiften Eizelle bei  $4.100 \pm 3.000$  Kopien (Tab.40). An Tag 4 waren BAX-Transkripte in den stereomikroskopisch weit entwickelten Embryonen (mehr als 20 Zellen) nicht nachweisbar (Abb. 26). Die Kopienzahl pro Embryo stieg wieder an auf  $17.000 \pm 8.600$  in schlüpfenden Tag 7 Blastozysten. Die höchsten Kopienzahlen pro Zelle wurden in kompaktierten Morulae an Tag 5 und schlüpfenden Blastozysten an Tag 7 mit  $72 \pm 26$  bzw.  $80 \pm 40$  gefunden.

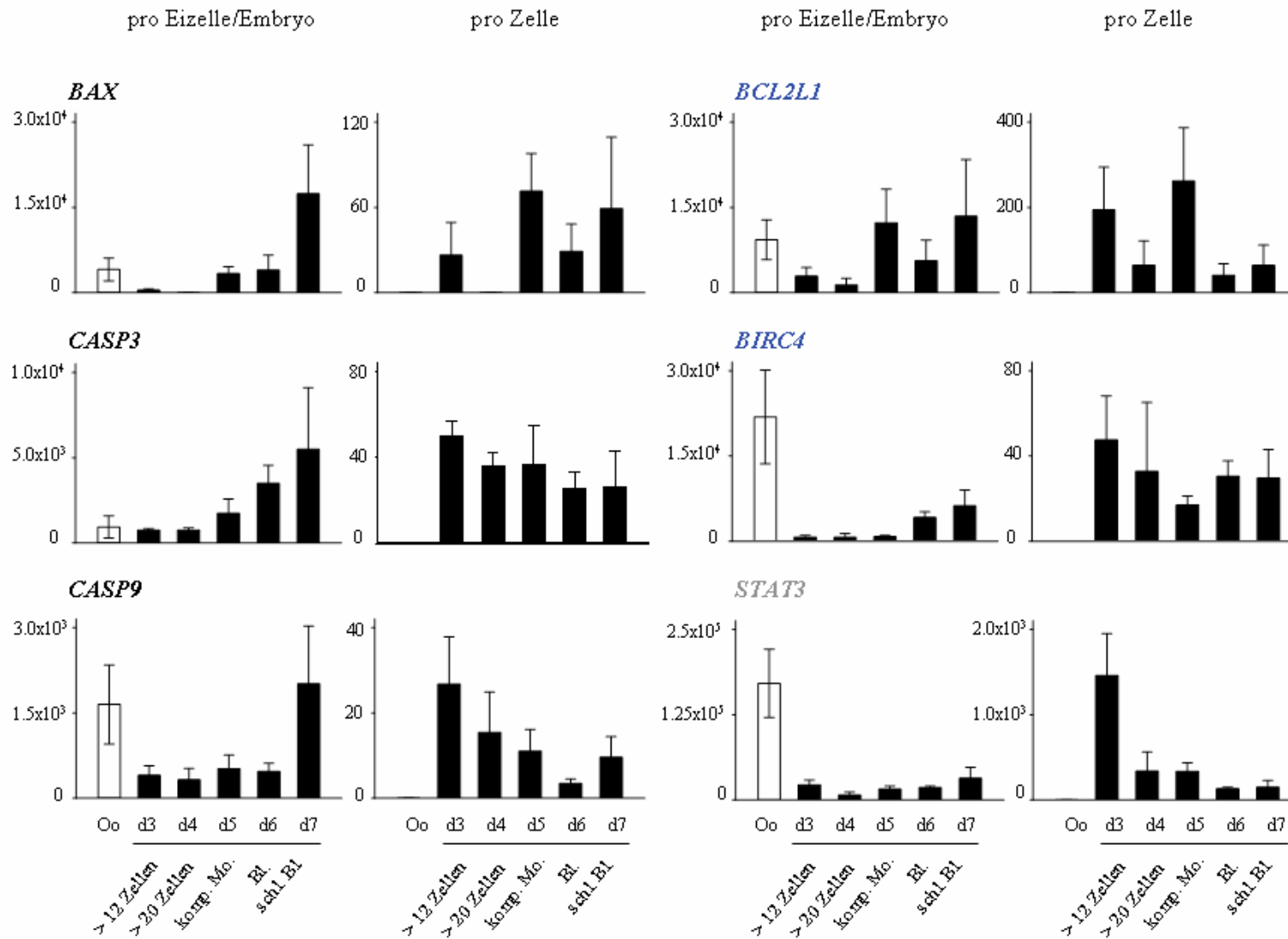
STAT3-Transkripte waren in der gereiften Eizelle mit hoher Abundanz nachweisbar (Abb. 26). In der gereiften Eizelle wurden mit  $170.000 \pm 50.000$  Kopien die meisten Transkripte für den Transkriptionsfaktor STAT3 bestimmt (Tab. 39). In Tag 4 Embryonen (mehr als 20 Zellen) wurden mit  $7.100 \pm 4.700$  die niedrigsten Kopienzahlen pro Embryo gemessen. In den schlüpfenden Tag 7 Blastozysten wurden  $32.000 \pm 14.000$  Kopien pro Embryo und  $147 \pm 73$  pro Zelle bestimmt.

Für BCL2, einen wichtigen anti-apoptotischen Gegenspieler von BAX, war nur in der Eizelle mit  $360 \pm 143$  Kopien ein sicherer Nachweis möglich (Tab. 41).

Transkripte für FASLG waren ebenfalls nur mit einer niedrigen Abundanz von  $370 \pm 140$  Kopien in der gereiften Eizelle nachweisbar (Tab. 42). Transkripte für den FAS-Rezeptor waren nur in schlüpfenden Blastozysten an Tag 7 nachweisbar, CASP8-Transkripte weder in gereiften Eizellen noch in Embryonen von Tag 3 bis 7 (Tab. 42).



**Transkript-Kopienzahlen**



**Abbildung 26: Transkript-Abundanz-Profile Apoptose-assoziiierter Gene in gereiften Eizellen und Embryonen von Tag 3 bis 7 *in vitro***

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten von Embryonen mit den stereomikroskopisch jeweils am weitesten fortgeschrittenen Entwicklungsstand; Kopienzahl pro Zelle: Quotient aus Kopienzahl pro Embryo und mittlerer Zellzahl; Gen-Symbol: schwarz - pro-apoptotisch, blau - anti-apoptotisch, grau – pro-und anti-apoptotisch; Abkürzungen: Oo - gereifte Eizellen, komp. Mo. - kompaktierte Morula, schl. Bl. - schlüpfende Blastozyste

#### 4.4.5 Vergleich von mRNA-Abundanzen *in vitro* und *in vivo*

Um die Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* produzierten Embryonen besser einschätzen zu können, wurden parallel *in vivo* entwickelte Embryonen analysiert. Die *in vivo* Embryonen wurden aus superovulierten Spendertieren 6 - 7 Tage (159 - 183 h) nach wiederholter künstlicher Besamung nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen (siehe Kapitel 3.1.2). Zu diesem Zeitpunkt wurden Embryonen vom Stadium der kompaktierten Morula bis zur expandierten Blastozyste isoliert, jedoch keine schlüpfenden Blastozysten.

Durch die *in vitro* Fertilisation und -Kultur produzierten Embryonen der Entwicklungsstadien von kompaktierter Morula bis nicht-expandierter Blastozyste an Tag 6 (144 h) und nicht-expandierter bis expandierter Blastozyste an Tag 7 (168 h) wurden mit den *in vivo* entwickelten Stadien von kompaktierter Morula bis expandierter Blastozyste hinsichtlich der Kopienzahlen der ausgewählten Gene verglichen.

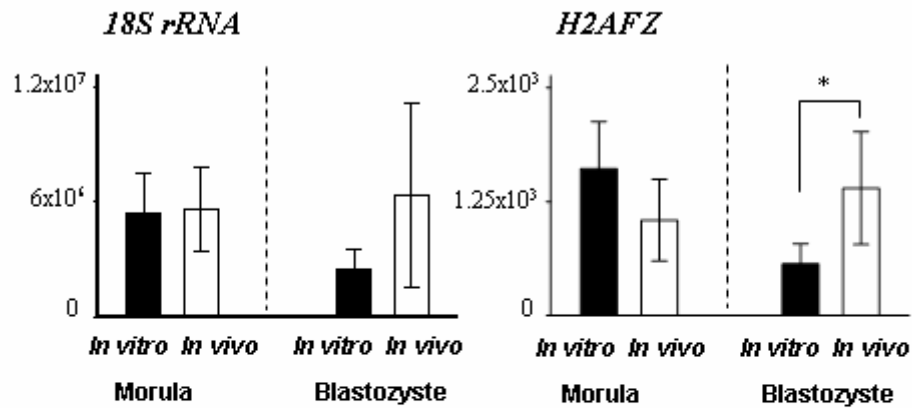
Die morphologische Untersuchung (siehe Kapitel 4.3.1.4) offenbarte eine enorme Heterogenität sowohl der *in vitro* als auch der *in vivo* Morulae und Blastozystenstadien. Um Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl und dem Auftreten von Zelluntergängen mit einzubeziehen, wurden nicht die Kopienzahlen pro Embryo sondern pro intakte Zelle (mittlere Zellzahl minus Anzahl untergehender/toter Zellen) verglichen. In den Tabellen 43 und 44 sind die Kopienzahlen pro Embryo und intakter Zelle in kompaktierten Morulae/frühen Blastozysten und nicht-expandierten/expandierten Blastozysten *in vitro* und *in vivo* aufgeführt (siehe Kapitel 8.3.2, Anhang).

Für die Referenz-Transkripte wurden unterschiedliche Kopienzahlen *in vivo* und *in vitro* gemessen (Tab. 43 und 44). In den *in vivo* entwickelten nicht-expandierten und expandierten Blastozysten wurden für beide Referenz-Transkripte deutlich höhere Kopienzahlen pro intakte Zelle gemessen. Für den Vergleich *in vitro* - *in vivo* wurden die *in vivo* Werte als "richtiger" Bezugswert angesehen. Dementsprechend wurden die *in vitro* gemessenen Werte gegenüber dem Referenz-Transkript H2AFZ durch Multiplikation mit einem entsprechenden Korrektur-

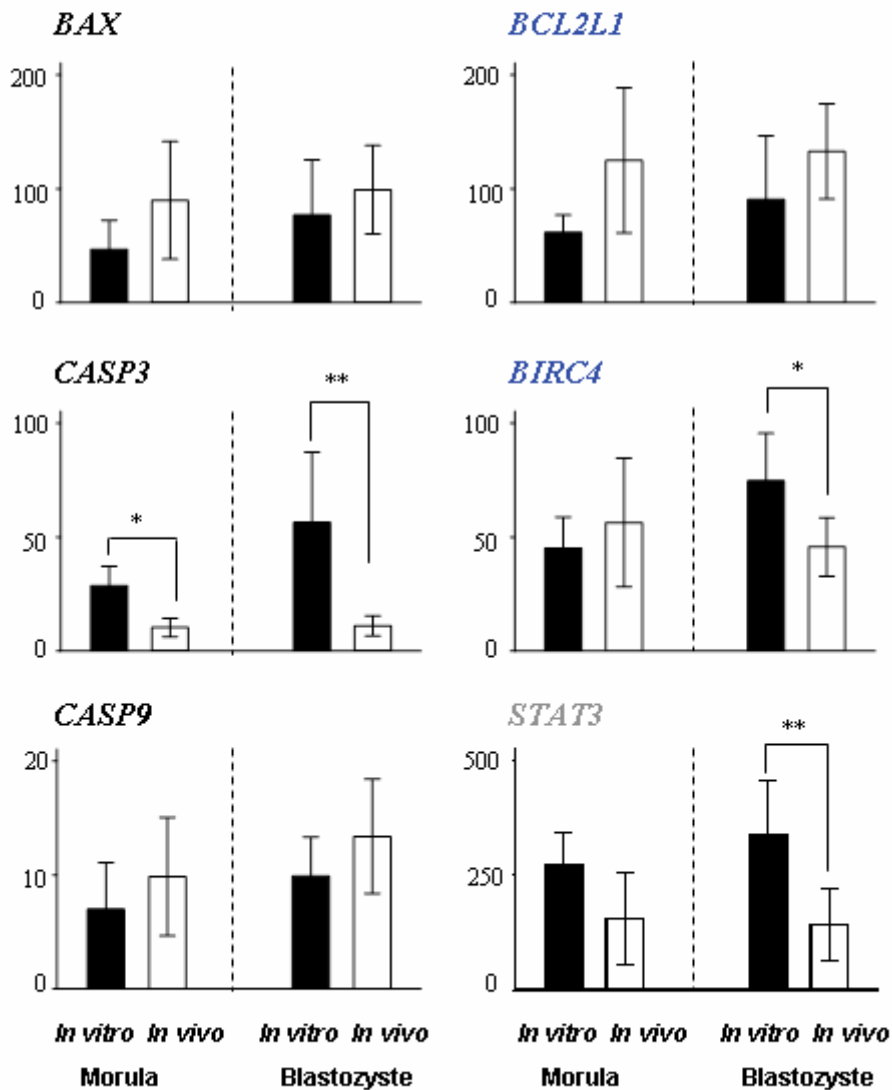
Faktor (Quotient der Kopienzahl pro intakte Zelle *in vivo* und *in vitro*) normalisiert. Der H2AFZ-Korrektur-Faktor betrug 0,65 für die Kopienzahlen kompaktierter Morulae und früher Blastozysten sowie 2,5 für die Kopienzahlen nicht-expandierter und expandierter Blastozysten.

Die normalisierten Kopienzahlen *in vitro* und *in vivo* sind in Abbildung 27 dargestellt. Für *in vivo* kompaktierte Morulae und frühe Blastozysten (mit noch nicht abgrenzbarer ICM) wurden höhere Kopienzahlen pro intakte Zelle für BAX, CASP9, BIRC4 und BCL2L1 bestimmt. Die Kopienzahlen für CASP3 und STAT3 waren dagegen in den *in vitro* kompaktierten Morulae und frühen Blastozysten höher, für CASP3 signifikant (Abb. 27). Für *in vivo* entwickelte nicht-expandierte und expandierte Blastozysten wurden mehr Kopien pro intakte Zelle für BAX, CASP9 und BCL2L1 gemessen. Die Kopienzahlen für CASP3, STAT3 und BIRC4 waren dagegen in *in vitro* produzierten nicht-expandierten Tag 6 und nicht-expandierten und expandierten Tag 7 Blastozysten signifikant höher als *in vivo* (Abb. 27). Interessanterweise waren Transkripte für den FAS-Rezeptor *in vivo* bereits in den kompaktierten Morulae knapp über der Nachweisgrenze nachweisbar, *in vitro* nur in schlüpfenden Blastozysten (Tab. 43 und 44).

Transkript-Kopienzahl pro intakte Zelle



nach Normalisierung gegenüber H2AFZ



\*  $P \leq 0.05$     \*\*  $P \leq 0.005$

**Abbildung 27: Kopienzahlen pro intakte Zelle in Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo***

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 6 (*in vitro*)/5 (*in vivo*) Proben (Morulae) bzw. 9 (*in vitro*)/5 (*in vivo*) Proben (Blastozysten); Kopienzahl pro intakte Zelle: mittlere Kopienzahl pro Embryo/mittlere Zellzahl minus Anzahl untergehender/toter Zellen; Normalisierung der *in vitro* Kopienzahlen mit einen H2AFZ-Korrektur-Faktor von 0,65 (Morulae) bzw. 2,5 (Blastozysten). Test auf signifikante Unterschiede mit dem Mann-Whitney U-Test (\* $P \leq 0,05$  bzw. \*\*  $P \leq 0,005$ ); Gen-Symbol: schwarz - pro-apoptotisch, blau - anti-apoptotisch, grau - pro- und anti-apoptotisch.

**4.5 Lokalisation von Proteinen aktiver Apoptose-assoziiierter Gene**

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Expression und zelluläre Lokalisation von Proteinen ausgewählter Apoptose-assoziiierter Gene analysiert. Die Proteine wurden nach Bindung an spezifische Antikörper mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht (siehe Kapitel 3.3.4). Für die subzelluläre Lokalisation der Signale wurden das Aktingerüst der Zelle mit Phalloidin-TRITC und die DNA der Zellkerne mit DAPI angefärbt. Gleichzeitig wurde die Expression von Ki-67 Proteinen in der Zelle dargestellt. Der Nachweis korrespondierender Proteine erfolgte für die auf mRNA-Ebene aktiven Gene *STAT3*, *BIRC4*, *BAX*, *CASP3* und *BCL2L1*. In Abhängigkeit von der Transkript-spezifischen mRNA-Abundanz wurden Embryonen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach IVF analysiert. *STAT3*-Protein wurde in Tag 3 (72 h) und 6 (144 h) IVF-Embryonen nachgewiesen. Aktive Caspase 3 war in untergehenden Zellen am Tag 6 (144 h) nach IVF nachweisbar. Für *BCL2L1*, *BIRC4* und *BAX* konnte zu den ausgewählten Untersuchungszeitpunkten kein Nachweis auf Proteinebene erfolgen (Tab. 30).

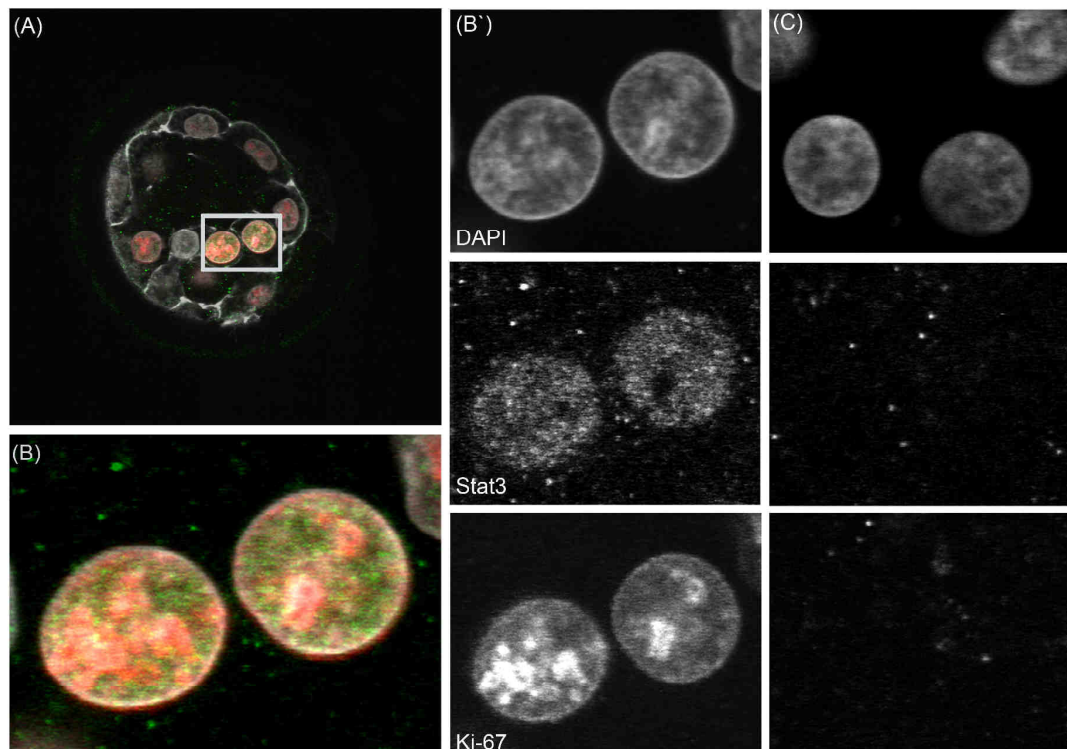
**Tabelle 30: Immunfluoreszenz zum Protein-Nachweis transkriptionell aktiver Apoptose-assoziiierter Gene**

| Zeitpunkt  | STAT3 | CASP3 | BAX | BIRC4 | BCL2L1 |
|------------|-------|-------|-----|-------|--------|
| Eizelle    | (+)   | x     | x   | -     | x      |
| d3 ( 72 h) | +     | -     | x   | x     | x      |
| d4 ( 96 h) | x     | -     | x   | x     | x      |
| d5 (120 h) | x     | x     | x   | x     | -      |
| d6 (144 h) | +     | +     | -   | -     | x      |
| d7 (168 h) | x     | x     | x   | x     | x      |

+ Nachweis von Proteinen, - fehlender Nachweis; (+) fraglich; x - nicht untersucht

### Expression von STAT 3-Protein

Im Zytoplasma von Blastomeren an Tag 3 (72 h) und 6 (144 h) IVF-Embryonen wurden punktförmige STAT3-Signale detektiert. In verschiedenen Zellkernen wurden zudem schwächere Signale mit gleichmäßiger Verteilung identifiziert. Diese Zellkerne waren gleichzeitig Ki-67 positiv (Abb. 28 A). Eine vergrößerte Darstellung der betroffenen Zellkerne mit einer Überlagerung der verschiedenen Färbungen [DAPI (weiß), Ki-67 (rot), STAT3 (grün)] ist in Abbildung 28 B gezeigt. Anhand der Grauwert-Bilder der einzelnen Farbkanäle (Abb. 28 B`) erkennt man deutlich eine Kolo-kalisation der STAT3-Signale mit dem Chromatin (DNA) unter Aussparung der Nukleoli, die intensiv Ki-67-positiv sind (Abb. 28 B`). Die Kontrollen mit Gesamt-IgG anstelle der Erst-Antikörper (STAT3, Ki-67) zeigten nur geringe unspezifische Hintergrund-Signale (Abb. 28 C).

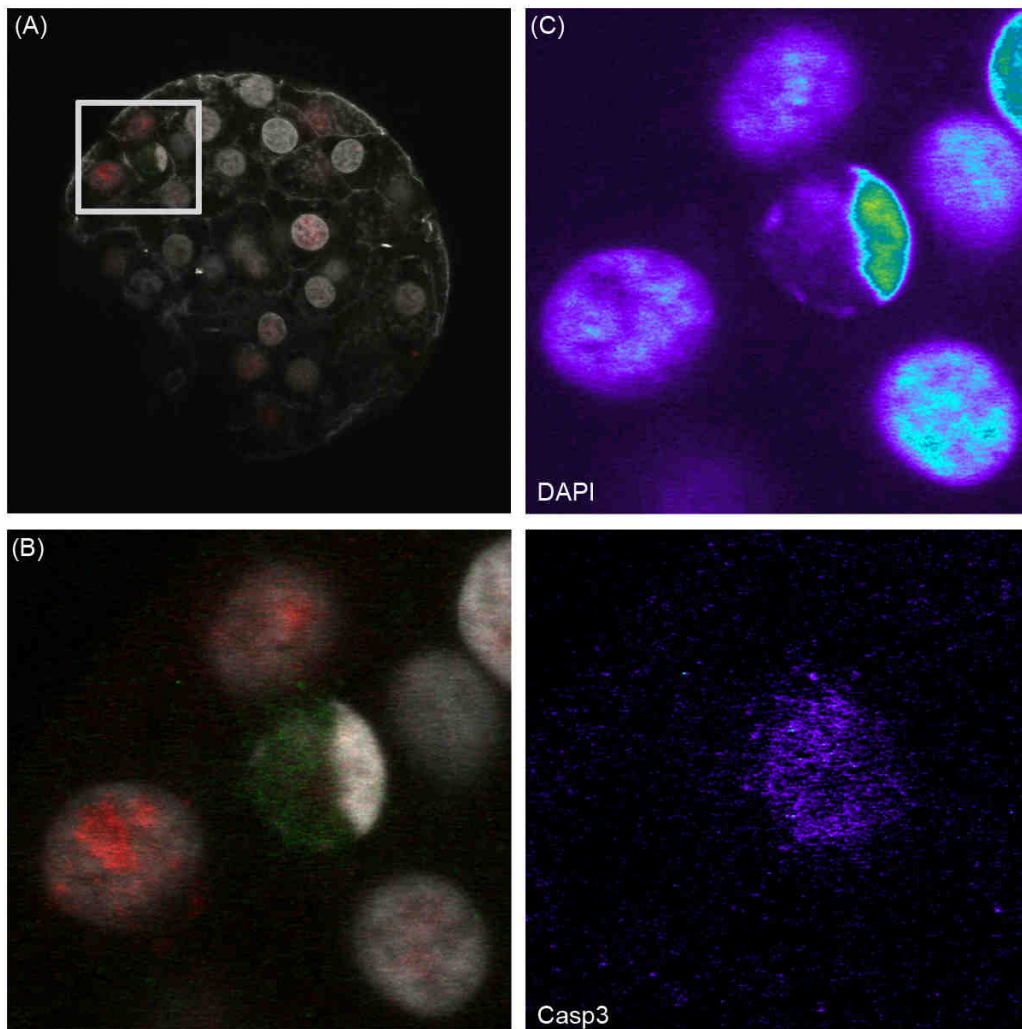


**Abbildung 28: Nachweis von STAT3-Protein in einer Tag 6 IVF-Blastozyste**

[DNA-Färbung (DAPI, weiß), F-Actin (Phalloidin, weiß), Ki-67 (rot), STAT3 (grün)]. (A) Ein optischer Schnitt mit Überlagerung der verschiedenen Farbkanäle (B) Ausschnitt (weißer Rahmen) aus (A). Auftreten von punktförmigen STAT3-Signalen im Zytoplasma und schwächeren, gleichmäßig verteilten STAT3-Signalen in Zellkernen von Blastomeren. Die betroffenen Zellkerne waren gleichzeitig Ki-67-positiv. (B`) Darstellung der Grauwertbilder der einzelnen Farbkanäle. Kolo-kalisation der STAT3-Signale mit dem Chromatin (DNA) unter Aussparung der Nukleoli, die intensiv Ki-67-positiv sind. (C) Kontrolle mit Gesamt-IgG anstelle der Erst-Antikörper (STAT3, Ki-67) zeigt nur geringe, unspezifische Hintergrund-Signale.

### Expression von aktiver Caspase 3

Schwache Signale von aktiver Caspase 3 wurden im Zytoplasma und Karyoplasma von Zellen mit beobachtetem Kernuntergang (DAPI) identifiziert. Ein zentraler optischer Schnitt durch eine frühe Tag 6 (144 h) IVF-Blastozyste zeigt einen Zellkern mit halbmondförmig fragmentiertem Chromatin, der Caspase 3-Signale im Karyoplasma aufwies (Abb 29 A). Die Vergrößerung dieses Bereiches ist in Abbildung 29 B dargestellt [DAPI (weiß), aktive CASP3 (grün), Ki-67 (rot)]. Die schwachen Caspase 3-Signale können durch eine Falschfarbendarstellung der Intensität verstärkt werden (Abb. 29 C). Aktive Caspase 3 und kondensiertes Chromatin zeigen keine Kollokalisierung.



**Abbildung 29: Nachweis aktiver Caspase 3 in einer Tag 6 IVF-Blastozyste**

[DNA-Färbung (DAPI, weiß), F-Actin (Phalloidin, weiß), aktive CASP3 (grün), Ki-67 (rot)]. (A) ein zentraler, optischer Schnitt mit Überlagerung der verschiedenen Farbkanälen (B) Ausschnitt (weißer Rahmen) aus (A). Ein Zellkern mit halbmondförmig, fragmentiertem Chromatin enthält schwache Caspase 3 Signale im Karyoplasma. (C) Verstärkung der Signale durch eine Falschfarbendarstellung der Intensität.

#### **4.6 Ultrastrukturelle Differenzierung auf der Ebene einzelner Zellen**

Mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) kann die Ultrastruktur der einzelnen Zellen und ihre Heterogenität innerhalb eines Embryos analysiert werden. Dabei wurde neben der zellulären Differenzierung nach ultrastrukturellen Indizien für programmierten Zelltod gesucht.

Insgesamt wurden 470 *in vitro* fertilisierte und kultivierte Embryonen in 15 stereomikroskopisch unterschiedenen Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 für TEM-Untersuchungen fixiert und eingebettet (Tab. 45, Anhang). Die große Anzahl von Embryonen wurde für zukünftige, weiterführende Untersuchungen gesammelt, die in Bezug zu den schon vorhandenen Ergebnissen ausgewertet werden können.

Die Präparation der Embryonen und die Analyse am TEM erfordern einen sehr hohen Arbeits- und Kosten-Aufwand. Für eine orientierende Untersuchung wurden daher zunächst von insgesamt 37 Embryonen von Tag 3 bis 7 systematisch Serien von Semi- bzw. Ultradünnschnitten angefertigt und analysiert. Um die Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* produzierten Embryonen besser einschätzen zu können, wurden parallel *in vivo* entwickelte Embryonen analysiert, die 6 bis 7 Tage nach wiederholter künstlicher Besamung von superovulierten Spendertieren nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner isoliert wurden (siehe Kapitel 3.1.2). Insgesamt wurden 20 *in vivo* Embryonen von der kompaktierten Morula bis zur expandierten Blastozyste für TEM-Analysen fixiert und eingebettet. Von 8 *in vivo* Embryonen wurden Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt und analysiert (Tab.45, Anhang). Die bislang gewonnenen Erkenntnisse dienen als Ausgangspunkt für weiterführende qualitative und quantitative Analysen.



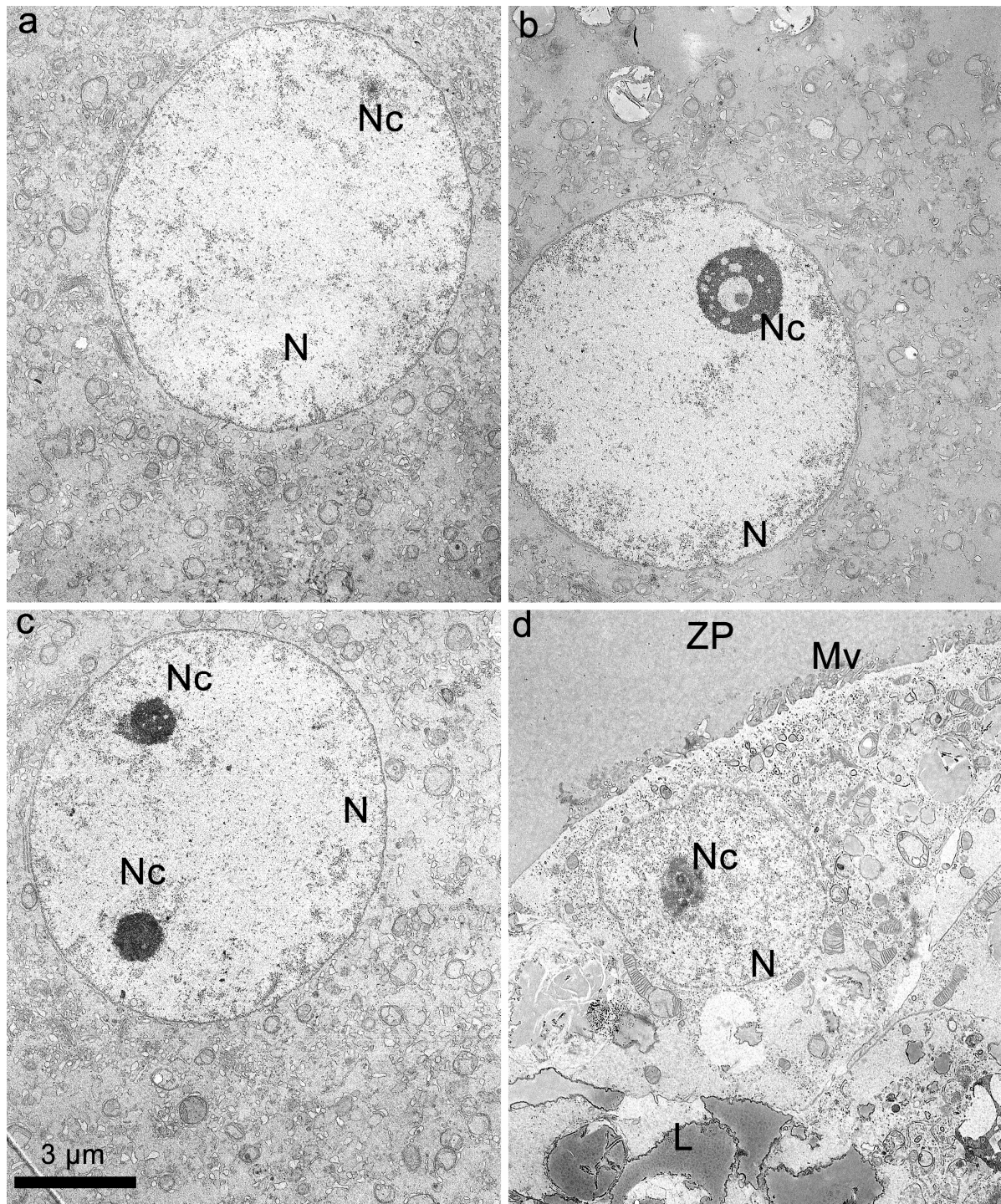
#### 4.6.1 Heterogene Entwicklung *in vitro*

Die Aufnahmen von Ultradünnschnitten (60 - 80 nm) bestätigen die enorme Variabilität der Entwicklung von Embryo zu Embryo *in vitro*. Individuelle Blastomeren unterschieden sich unter anderem hinsichtlich:

- der Entwicklung von Zellorganellen (Nucleoli, Mitochondrien etc.)
- der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten
- der Zusammensetzung des Zytoplasma (sekundäre Lysosomen, Fett-Dotter-Vakuolen etc.)

##### 4.6.1.1 Entwicklung von Nucleoli und Mitochondrien

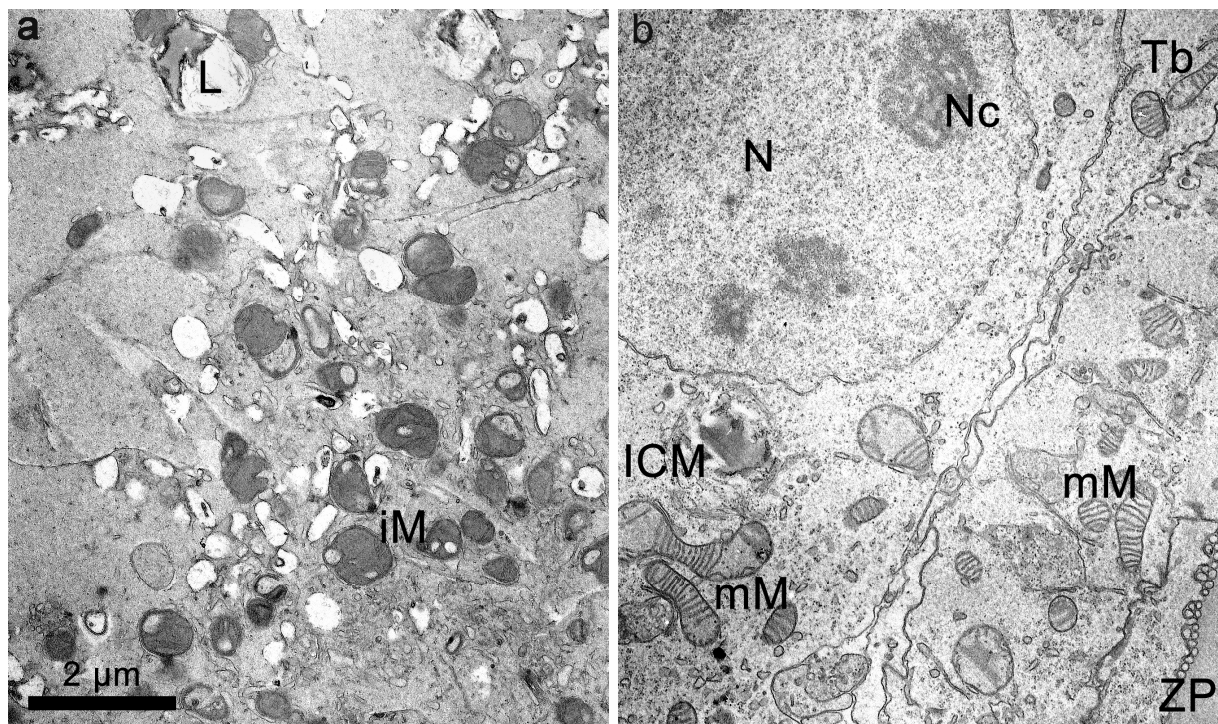
Ein Beleg für den heterogenen Entwicklungsstand von Blastomeren der ersten Zellgenerationen an Tag 3 (72 h) bis 4 (98 h) nach Zugabe der Spermien lieferte die Ultrastruktur der Nucleoli im Zellkern. Die Nucleoli werden im Verlauf der ersten Furchungsteilungen über inaktive Vorstufen neu gebildet. Sie sind für die Synthese der Ribosomen-Untereinheiten verantwortlich (Hyttel et al., 2000; Rüsse and Sinowatz, 1998). Die Ausbildung funktionsfähiger Nucleoli markiert den Beginn der Hauptgenom-Aktivierung im Embryo (Laurincik et al., 2000). In individuellen Blastomeren der ersten Zellgenerationen an Tag 3 bis 4 wurden unterschiedliche nucleoläre Strukturen beobachtet. Die Mehrzahl der Nucleoli bestand aus einer wenig bis dicht gepackten, fibrillären Masse, die einen unterschiedlichen Grad an Vakuolisierung aufwies (Abb. 30 a, b, c). Diese Strukturen entsprechen vermutlich inaktiven Nucleoli-Vorstufen (Laurincik et al., 2000). Transkriptionell aktive Nucleoli mit fibrillär-granulärer Struktur wurden erstmals in Tag 4 Embryonen beobachtet (Abb. 30 d). Die späteren Zellgenerationen in Morulae und Blastozysten enthielten einheitliche Nucleoli mit fibrillär-granulärer Struktur (Abb. 35 und 36, Kapitel 4.6.2).



**Abbildung 30: Nucleoli-Strukturen in Tag 4 Embryonen *in vitro***

(a - c) Inaktive Nucleoli-Vorstufen mit einer wenig bis dicht gepackten, fibrillären Masse und unterschiedlich starker Vakuolisierung. (d) Transkriptionell aktive Nucleoli mit fibrillär-granulärer Struktur. Abkürzungen: L - Fett-Dotter-Vakuolen, Mv - Mikrovilli, N - Nucleus, Nc - Nucleolus, ZP - Zona pellucida.

Ein wichtiger Marker für die zelluläre Entwicklung und Differenzierung ist die Reifung der Mitochondrien, die als Energieproduzenten der Zelle bezeichnet werden. Das Vorhandensein von reifen Mitochondrien im Zytoplasma ist ein Indikator der metabolischen Aktivität (Van Blerkom, 2004). Je nach Entwicklungsstadium wurde eine hohe Zahl von Mitochondrien mit unterschiedlicher Struktur im gesamten Zytoplasma beobachtet. In Blastomeren der ersten Zellgenerationen in Tag 3 und 4 Embryonen wurden überwiegend unreife Mitochondrien beobachtet, die folgende Merkmale aufwiesen: eine sphärische Gestalt, eine kontrastreiche Matrix, wenige, vorwiegend kurze Cristae sowie häufig eine bis mehrere Vakuolen (Abb. 31 a). Tag 6 und 7 Blastozysten (Abb. 31 b) zeigten überwiegend gereifte Mitochondrien. Ihre Kennzeichen waren: eine ovale bis längliche Gestalt, eine weniger kontrastreiche Matrix und viele, das gesamte Mitochondrium durchquerende Cristae. In Tag 7 Blastozysten wurden in Trophoblastzellen mehr reife Mitochondrien als in ICM-Zellen beobachtet. Teilungsstadien von Mitochondrien wurden v. a. in Tag 5 bis 7 Embryonen beobachtet. Ein Merkmal sich teilender Mitochondrien ist dabei eine hantelförmige Gestalt. Ein Anschwellen von Mitochondrien wird als ultrastrukturelles Merkmal von programmiertem Zelltod beschrieben (Green and Reed, 1998). In den Mitochondrien der untergehenden Zellen konnten keine signifikanten morphologischen Veränderungen beobachtet werden.



**Abbildung 31: Mitochondrien-Strukturen in Tag 3 und 6 Embryonen *in vitro***

(a) Unreife Mitochondrien (iM-immature mitochondria) mit sphärischer Gestalt, einer dichten Matrix, wenigen kurzen Cristae und häufig Vakuolen in einem Tag 3 Embryo (mit mehr als 12 Zellen). (b) Gereifte Mitochondrien (mM-mature mitochondria) mit ovaler bis länglicher Form, einer weniger dichten Matrix und vielen das gesamte Mitochondrium durchquerenden Cristae in einer nicht-expandierten Blastozyste von Tag 6. Abkürzungen: ICM - innere Zellmasse, L - Fett-Dotter-Vakuolen, N - Nucleus, Nc - Nucleolus, Tb - Trophoblast, ZP - Zona pellucida.

#### 4.6.1.2 Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten

Im Morulastadium beginnt die unterschiedliche Differenzierung der außen und der innen liegende Zellen in Trophoblast (TB, äußere Zellschicht) und innere Zellmasse (ICM) und die Bildung der Blastozyste (Rüsse and Sinowatz, 1998). Die Ausbildung von spezifischen Zell-Zell-Kontakten spielt dabei eine wichtige Rolle.

In Tag 6 und 7 Blastozysten wurden Zellverbindungen beobachtet:

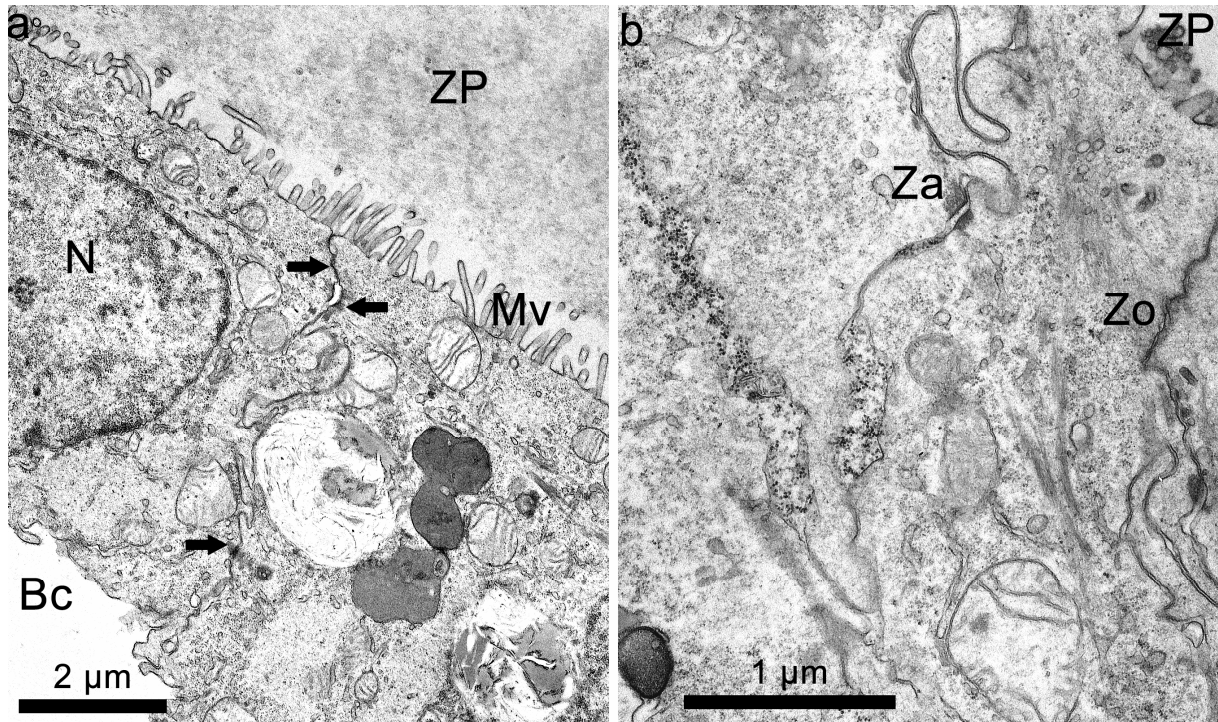
- im Trophoblasten
- an der Grenze zwischen Trophoblast und innerer Zellmasse
- in der inneren Zellmasse

Im Trophoblasten waren die Zell-Zell-Kontakte am deutlichsten ausgebildet. Die benachbarten TB-Zellen waren durch ein dichtes Netz von unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakten, die leistenförmig über den gesamten Kontaktbereich angeordnet waren, eng miteinander verbunden (Abb. 32 a). Auffällig war eine girlandenförmige Verzahnung der benachbarten Zellmembranen (Abb. 32 a und b). Zu den beobachteten Zell-Zell-Kontakten im Trophoblasten zählten:

- Tight junctions (Zonulae occludentes)
- Gürtel- und Punkt-desmosomen (Zonulae adhaerentes, Maculae adhaerentes)

Tight junctions wurden vor allem im apikalen Bereich der Trophoblastzellen beobachtet. Häufig waren mehrere Tight junctions untereinander ausgebildet. Die Zellmembranen der benachbarten Trophoblastzellen sind dabei so eng miteinander verschmolzen, dass kein Interzellularspalt sichtbar ist (Abb. 32 b). Zonulae adhaerentes wurden ebenfalls im apikalen Bereich der Zellen beobachtet, häufig im geringen Abstand unterhalb einer Zonula occludens. Eine Zonula adherens ist mit Bündeln von Aktinfilamenten im Zytoplasma verankert, während zwischen den benachbarten Zellen ein schmaler Interzellularspalt erhalten ist (Abb. 32 b). Zell-Zell-Kontakte vom Typ der Macula adhaerens sind durch einen breiten Interzellularspalt und eine

Verankerung mit weit ins Zytoplasma reichenden Intermediärfilamenten gekennzeichnet. Die Zellen in der inneren Zellmasse stehen über Gap junctions in Verbindung, die einen Stoff- und Informations-Austausch zwischen den benachbarten ICM-Zellen ermöglichen (Rüsse and Sinowatz, 1998). Ein Nachweis dieser kanalbildenden Proteinkomplexe war in den untersuchten Blastozysten nicht möglich.



**Abbildung 32: Zell-Zell-Kontakte im Trophoblast**

Expandierte Tag 7 Blastozyste *in vitro*. **(a)** Girlandenförmige Verzahnung und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Pfeile) über den gesamten Kontaktbereich benachbarter Zellmembranen. **(b)** Nachweis von Zonula occludens (Zo) und Zonula adhaerens (Za). Abkürzungen: Bc - Blastocoel, Mv - Mikrovilli, N - Nucleus, Za - Zonula adhaerens, Zo - Zonula occludens, ZP - Zona pellucida.

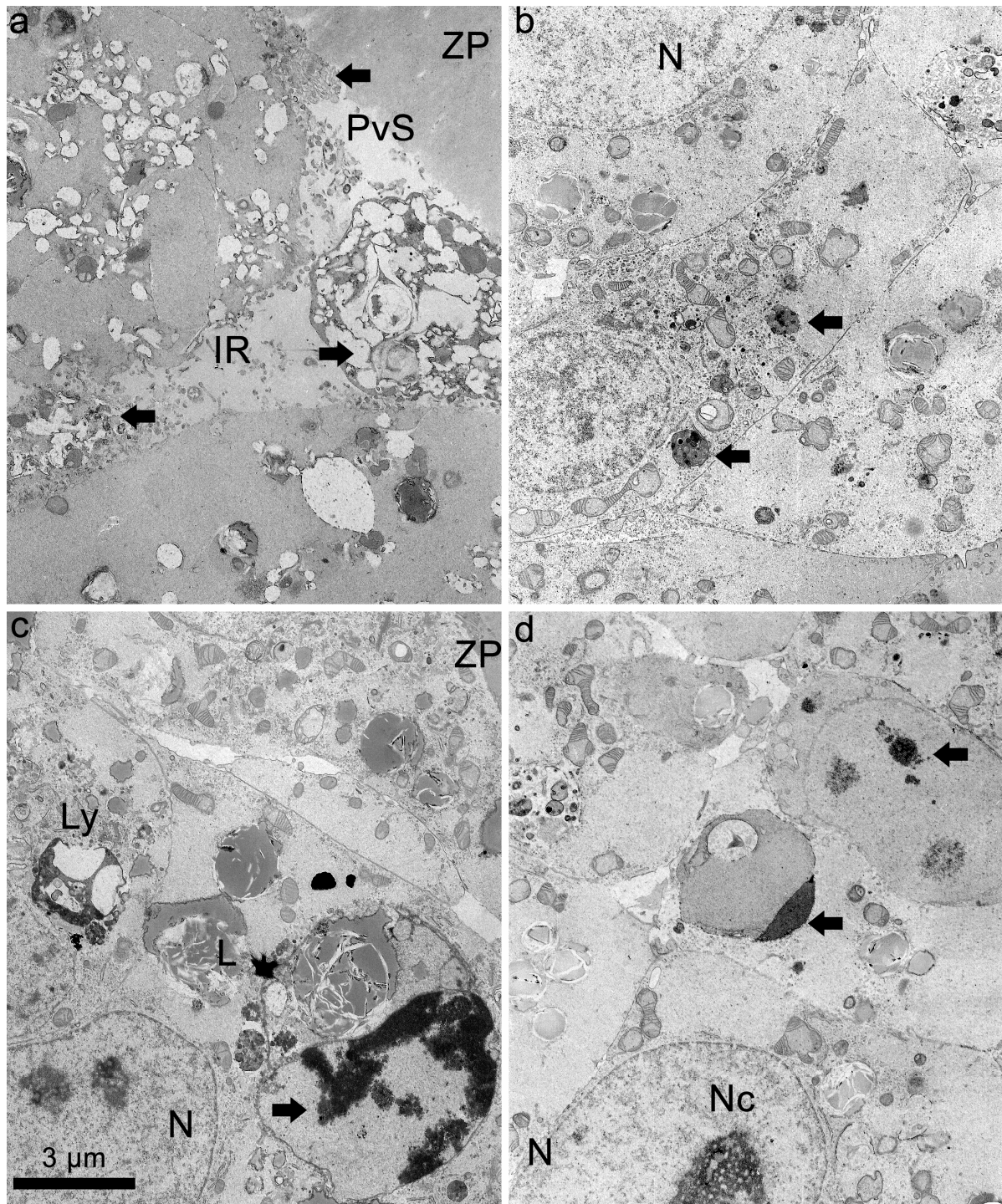
#### 4.6.1.3 Zelluntergänge

In Tag 3 bis 7 Embryonen wurden Anschnitte geschrumpfter Zellen und zellulärer Debris im Interzellularraum und perivitellinen Spalt beobachtet (Abb. 33 a). In vielen Zellen waren heterogene Vesikel und Vakuolen im Zytoplasma nachweisbar, die auf degenerative Veränderungen hinweisen.

In Tag 6 und 7 Morulae und Blastozysten wurde eine hohe Zahl von Zelluntergängen in der ICM beobachtet. In Blastozysten waren die Zelluntergänge vor allem an der Grenzschicht zum Trophoblasten sowie im Inneren der ICM lokalisiert. Dabei waren folgende morphologische Merkmale eines programmierten Zelltodes nachweisbar:

- Chromatin-Kondensation
  - partiell - entlang der Kernhülle (Abb. 33 c)
  - komplett - zu Kugel- bzw. Sichelformen (Abb. 33 d)
- Schrumpfen und Fragmentation des Zellkerns (Abb. 33 b)

Die morphologisch intakten Nachbarzellen enthielten häufig sekundäre Lysosomen, die durch ihren heterogenen Inhalt und die unterschiedlicher Elektronendichte auffielen. Sie enthielten neben verschiedenen Zellorganellen und Fett-Dotter-Anteilen auch Chromatin (Abb. 33 c). Der Nachweis von Chromatin in sekundären Lysosomen ist ein wichtiger Hinweis auf die Phagozytose untergehender Zellen durch Nachbarzellen.

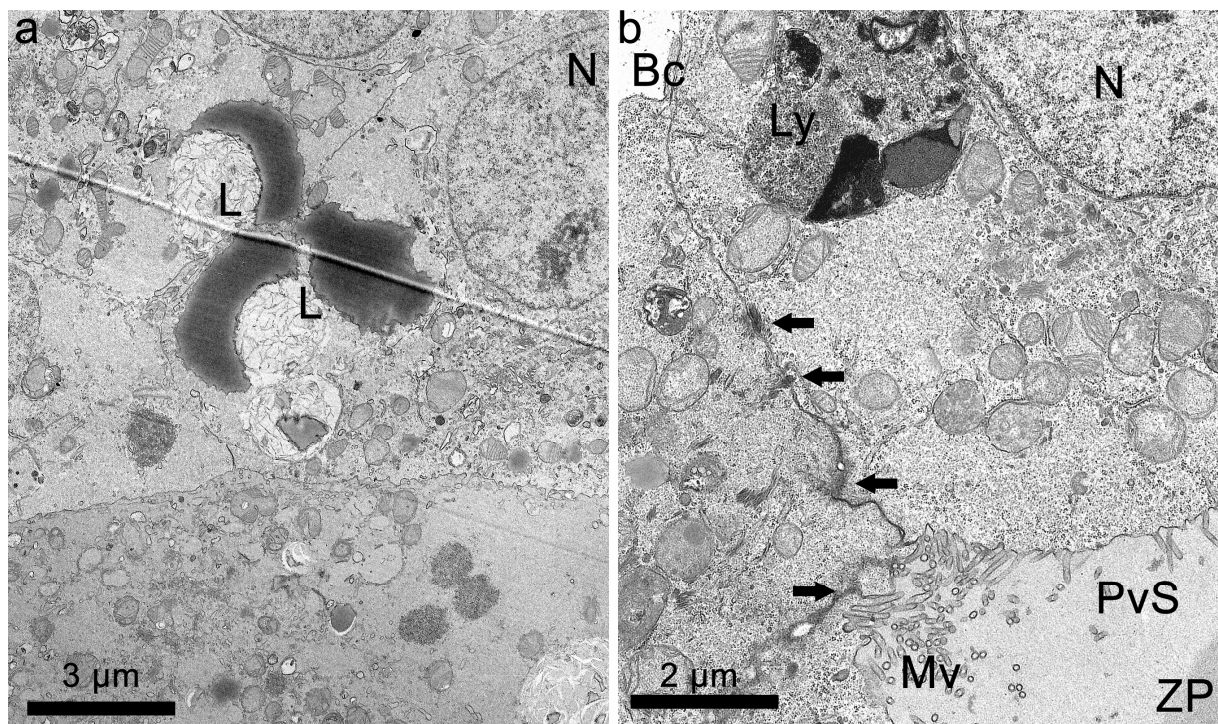


**Abbildung 33: Zelluntergänge in Tag 3 Embryonen und Tag 6 Blastozyste *in vitro***

(a) Zellulärer Debris (Pfeile) im interzellulären Raum und perivitellinen Spalt (Tag 3 Embryo). (b - d) Merkmale (Pfeile) von programmiertem Zelltod (Tag 6 Blastozyste). (b) Chromatin-Fragmente im Zytoplasma, (c) Chromatin-Kondensation entlang der Kernhülle, (d) Chromatin-Kondensation zu Kugel- bzw. Sichelform, (c) sekundäres Lysosom mit Chromatin-Fragmenten. Abkürzungen: N - Nucleus, Nc - Nucleolus, L - Fett-Dotter-Vakuolen, Ly - sekundäres Lysosom, IR - interzellulärer Raum, PvS - perivitelliner Spalt, ZP - Zona pellucida.

#### 4.6.2 Vergleich der Ultrastruktur *in vitro* und *in vivo*

*In vivo* Embryonen der kompaktierten Morula bis expandierten Blastozyste zeigten eine enorme ultrastrukturelle Heterogenität, die mit *in vitro* Embryonen vergleichbar war. *In vivo* und *in vitro* wurde eine hohe Zahl von Zelluntergängen in der ICM von Blastozysten beobachtet (Abb. 35 und 36, Bildmontagen). In den *in vitro* Embryonen wurden häufiger große Fett-Dotter-Vakuolen im Zytoplasma beobachtet. Diese könnte Folge der *in vitro* Kultur mit Serum-haltigem Medium sein (Abb. 34 a). In den untersuchten *in vivo* Blastozysten wurden zwischen den TB-Zellen mehr und deutlicher ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte beobachtet als *in vitro* (Abb. 34 b). Auffällig in den *in vivo* Blastozysten waren große, oft in Kernnähe liegende, sekundäre Lysosomen (Abb. 34 b), die ein wichtiges Indiz für die Beseitigung/Phagozytose untergehender Zellen durch Nachbarzellen sind.

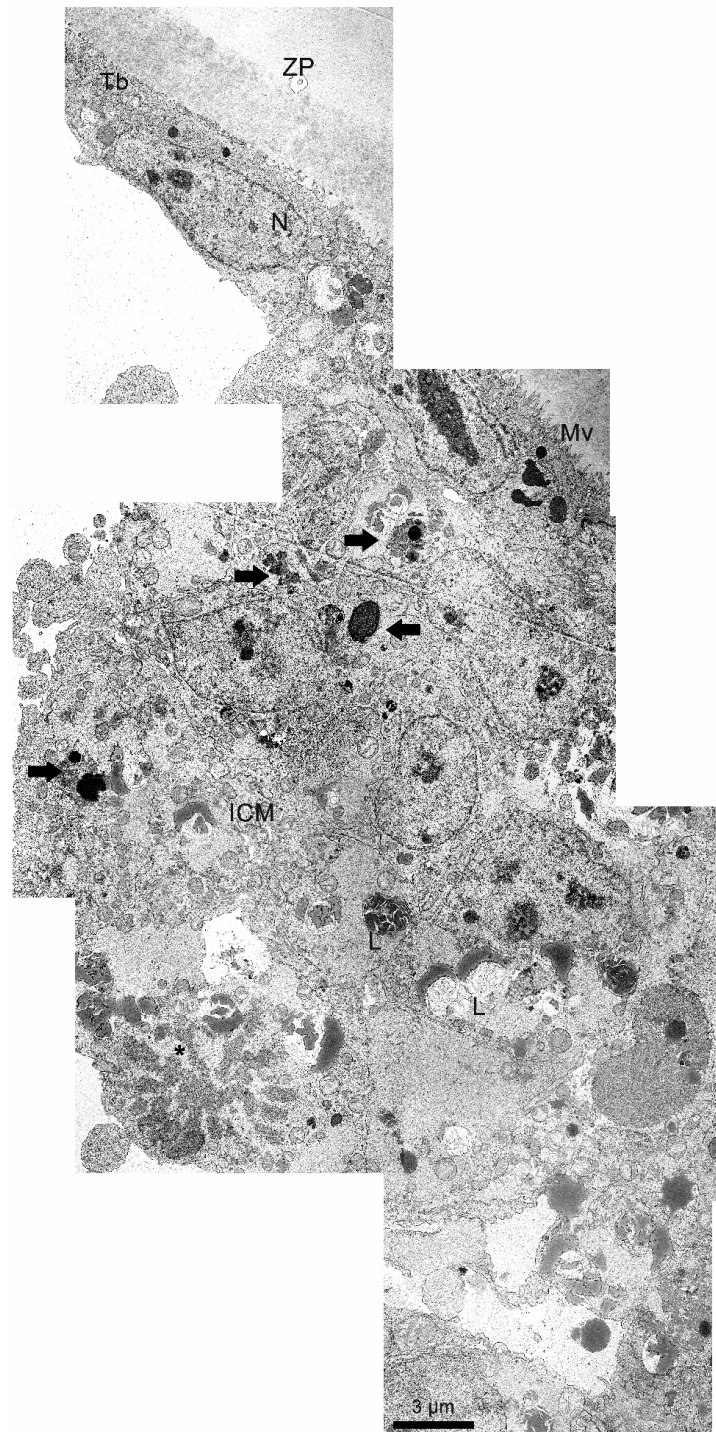


**Abbildung 34: Ultrastrukturelle Merkmale expandierter Blastozysten *in vitro* und *in vivo***

(a) Vermehrtes Auftreten von Fett-Dotter-Vakuolen *in vitro*. (b) Ein dichteres Netz von leistenförmig angeordneten Zell-Zell-Kontakten im Trophoblast (Pfeile) und große, häufig in Kernnähe liegende, sekundäre Lysosomen *in vivo*. Abkürzungen: Bc - Blastocoel, Ly - sekundäres Lysosom, L - Fett-Dotter-Vakuolen, Mv - Mikrovilli, N - Nucleus, PvS - perivitelliner Spalt, ZP - Zona pellucida.

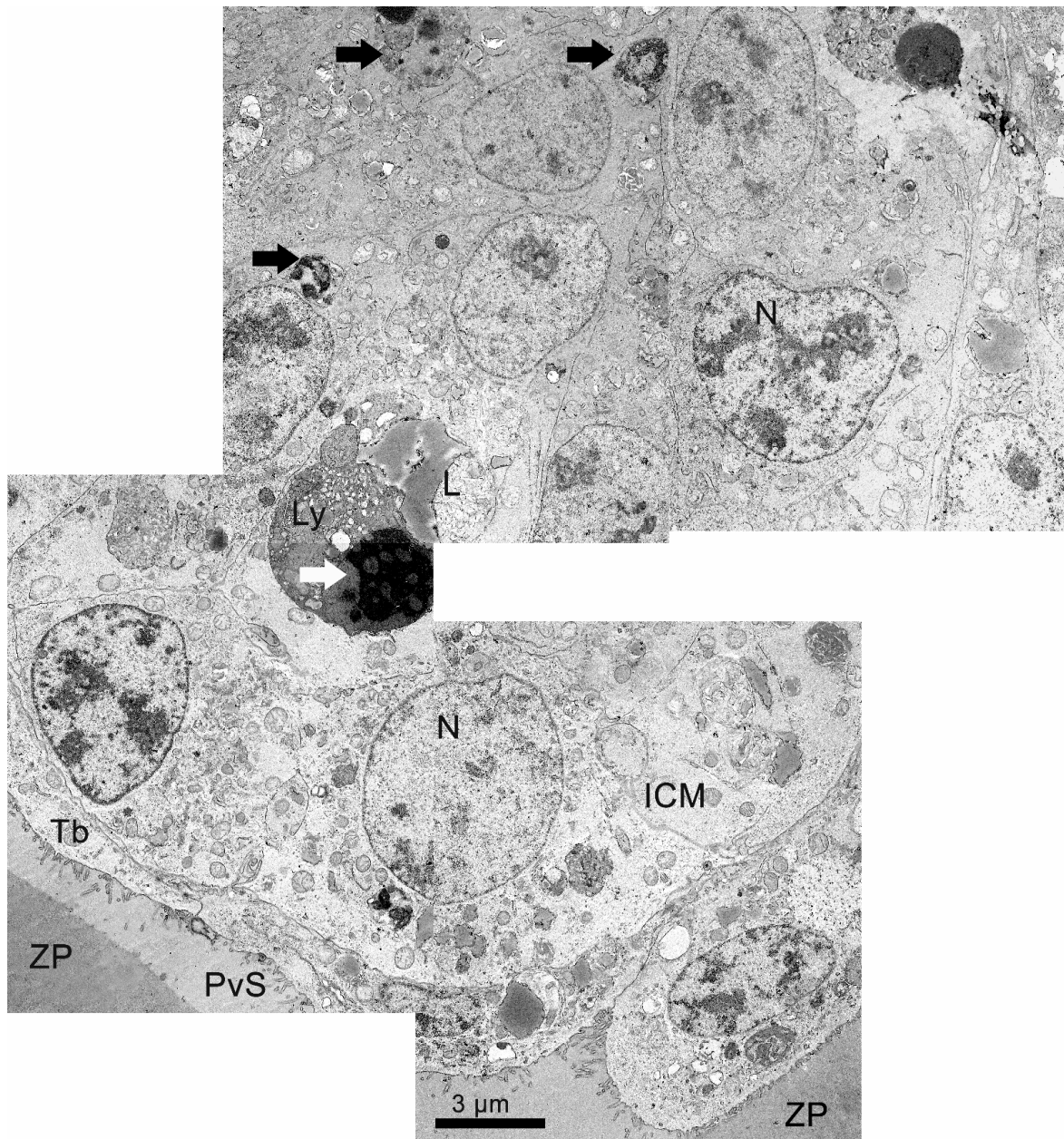
Um jedoch signifikante Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Embryonen nachzuweisen, müssen mehr Embryonen unter Anwendung von morphometrischen Methoden analysiert werden. Die Abbildungen 35 und 36 sind Bildmontagen von expandierten Blastozysten *in vitro* und *in vivo*. Sie zeigen größere zusammenhängende Areale mit Zona pellucida, Trophoblast und innerer Zellmasse.





**Abbildung 35: Ultrastrukturelle Heterogenität in Blastozysten *in vitro***

Die Montage einer expandierten Tag 7 Blastozyste zeigt ein zusammenhängendes Areal mit Zona pellucida, Trophoblast und ICM. Hohe Anzahl von Fett-Dotter-Vakuolen (L) und kondensiertem bzw. fragmentiertem Chromatin (Pfeile) in der ICM. Metaphase-Figur (\*). Abkürzungen: ICM - innere Zellmasse, L - Fett-Dotter-Vakuolen, Mv - Mikrovilli, N - Nucleus, Tb - Trophoblast, PvS - perivitelliner Spalt, ZP - Zona pellucida.



**Abbildung 36: Ultrastrukturelle Heterogenität in Blastozysten *in vivo***

Die Montage einer expandierten Tag 6-7 Blastozyste zeigt ein zusammenhängendes Areal mit Zona pellucida, Trophoblast und ICM. Nachweis von Chromatin-Kondensation und -Fragmentation (schwarze Pfeile) sowie sekundären Lysosomen (weißer Pfeil) in der ICM. Abkürzungen: ICM - innere Zellmasse, L - Fett-Dotter-Vakuolen, Ly - sekundäres Lysosom, Mv - Mikrovilli, N - Nucleus, PvS - perivitelliner Spalt, Tb - Trophoblast, ZP - Zona pellucida.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Heterogenität und Variabilität der Entwicklung individueller Embryonen - Lösungsansatz für ein kniffliges Problem

Die frühe embryonale Entwicklung bei Säugern ist gekennzeichnet durch ein hohes Maß an Variabilität und Plastizität - und (in Abhängigkeit von der Spezies) durch eine hohe Embryomortalität. Bei der Erforschung grundlegender Mechanismen der frühen embryonalen Entwicklung und der Verbesserung der Therapie-Möglichkeiten von Fruchtbarkeitsstörungen und assistierten Reproduktionstechniken (ART) stellt sich die Frage, wie eine normale Entwicklung, eine verzögerte, aber ansonsten normale Entwicklung, vorübergehende Störungen und eine abnorme bzw. abortive Entwicklung von Embryonen unterschieden werden können.

#### 5.1.1 Vorteile und Grenzen der Beobachtung *in vitro* und *in vivo*

Für die Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung beim Rind stehen Embryonen aus verschiedenen ART-Techniken zur Verfügung. Für die Verwendung von *in vitro* fertilisierten und -kultivierten Embryonen sprechen:

- die Gewinnung aus Schlachthof-Ovarien (keine Tierversuche)
- die hohe Verfügbarkeit von Embryonen
- standardisierte Bedingungen von *in vitro* Maturation, Befruchtung und Embryokultur

Nachteile des *in vitro* Produktionssystems sind:

- das Fehlen der natürlichen Selektion von Eizellen und Spermien. Im natürlichen Zyklus gelangen nur 1 - 2 gereifte Eizellen zur Ovulation. Gleichzeitig haben nur wenige Spermien, die den Eileiter zum Zeitpunkt der Ovulation erreichen, die Möglichkeit, die Eizelle zu befruchten. Für die *in vitro* Fertilisation werden Eizellen gereift, die aus der Punktion von Follikeln unterschiedlicher Größe isoliert wurden. Die Eizellen können sich dabei noch in der Entwicklungs- bzw. Reifungsphase oder bereits in Regression befinden. Das Entwicklungspotential der einzelnen, so gewonnenen Eizellen ist dementsprechend sehr variabel.
- die Bedingungen von *in vitro* Maturation, Befruchtung und Embryokultur spiegeln nur unvollkommen die Situation *in vivo* wider.

Rinderembryonen, die aus Zyklus-synchronisierten und superovulierten Färsen 7 Tage nach künstlicher Besamung durch nicht-invasive Spülung der Uterushörner (*ex vivo*) gewonnen wurden, stehen der natürlichen Entwicklung (*in vivo*) näher aufgrund einer:

- natürlichen Selektion der Eizellen durch die Ovulation, mit einer Einschränkung: Die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl von Embryonen ist praktisch nur in Verbindung mit einer hormonell induzierten Superovulation möglich. Die exogene hormonelle Stimulation beeinflusst das Wachstum der Follikel, Wachstum und Reifung der Eizellen und die Follikel-Selektion für die Ovulation (Hyttel, 1991).
- natürlichen Befruchtung und Umgebung für die sich entwickelnde Zygote.

Sie gelten als Gold-Standard/Referenz für Untersuchungen zur normalen Embryogenese *in vivo* (Niemann et al., 2002).

Zu den Nachteilen bei der Erzeugung von *in vivo* Embryonen zählen:

- ein hoher zeitlicher und finanzieller Aufwand durch den Kauf und die Unterhaltung der Spendertiere und den Einsatz von Medikamenten und Gerätschaften.
- trotz Zyklus-synchronisierter Spendertiere mit gesteuerter Follikelreifung und Ovulations-Induktion ist der Zeitpunkt der Ovulation nicht genau bestimmbar. Darüber hinaus ovulieren bei einer Superovulation die einzelnen Eizellen nicht gleichzeitig, sondern zeitlich versetzt. Deshalb wurden die Spendertiere in dieser Studie in einem Zeitraum von 24 h wiederholt künstlich besamt. Der Zeitpunkt der Befruchtung konnte so nicht genau bestimmt werden, d. h. die gleichzeitig nicht-invasiv aus dem Uterus gewonnenen Embryonen waren unterschiedlich alt. Das Zeitfenster der Untersuchung ist nach multipler Ovulation *in vivo* breiter.
- die Heterogenität der Spendertiere hinsichtlich der Bedingungen für die Befruchtung und das Embryowachstum in Eileiter und Uterus, d. h. die Bedingungen in Eileiter und Uterus können nur sehr eingeschränkt standardisiert werden.

### 5.1.2 Bestimmung des tatsächlichen Entwicklungsstandes: die Verknüpfung morphologischer und molekularer Daten

Für die Bestimmung des tatsächlichen Entwicklungsstandes wurden vergleichbare Pools von stereomikroskopisch klassifizierten *in vitro* Embryonen mit einer Kombination aus hochauflösender Mikroskopie (CLSM, TEM) und quantitativer Real-Time RT-PCR (RT-qPCR) analysiert. Die eigentliche Herausforderung besteht in der Kombination der morphologischen Analyse auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene mit der Analyse von Transkript-Abundanzen. Für eine Beurteilung der Relevanz der gewonnenen Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert.

## 5.2 Entwicklung der Zellzahl und Inzidenz von Zelltod

Unter den standardisierten Bedingungen *in vitro* wurde eine enorme Variabilität von Embryo zu Embryo hinsichtlich der Entwicklung der Zellzahl und dem Auftreten von Zelluntergängen sowohl insgesamt als auch in Bezug auf die innere Zellmasse (ICM) in Blastozysten beobachtet. Die Ursachen für den heterogenen Entwicklungsstand der Embryonen sind in dem unterschiedlichen Entwicklungspotential der Eizellen und Spermien zu suchen.

### 5.2.1 Das Entwicklungspotential von Embryonen

Die Aussagekraft der stereomikroskopischen Beurteilung lebender Embryonen - bezogen auf eine Aussage über das Entwicklungspotential (Qualität) eines einzelnen Embryos - ist auch bei erfahrenen Untersuchern sehr begrenzt, wie die Heterogenität der Embryonen innerhalb der 15 stereomikroskopisch unterschiedenen Entwicklungsstadien ergab. Bei der Anwendung assistierter Reproduktionstechniken (ART) in der Tierzucht ist eine zuverlässige Bestimmung des Entwicklungs-/Gesundheitsstatus des einzelnen lebenden Embryos - in Hinblick auf die Eignung für Kryo-Konservierung und Embryotransfer (ET) - aber ein wichtiges Ziel.

Das Entwicklungspotential von Embryonen ist über eine Beurteilung der Morphologie / Zellzahl unter dem Stereomikroskop nur schwierig zu bestimmen. Embryonen mit einer niedrigen Zellzahl zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt werden in ihrer Entwicklung als verzögert klassifiziert. Die für das Alter des Embryos niedrige Zellzahl ist in der Regel aber nicht Ausdruck einer langsameren Teilungsgeschwindigkeit der Zellen, sondern häufig zurückzuführen auf den Ausfall einzelner früher Blastomeren während der ersten drei bis vier Zellzyklen (siehe Kapitel 5.3.). Um den Ausfall zahlenmäßig zu kompensieren, sind mehr Teilungszyklen der verbliebenen Zellen und damit mehr Zeit erforderlich. Eine spannende Frage ist, ob bzw. in-

wiefern das Entwicklungspotential des Embryos dabei langfristig beeinflusst wird. Eine weitere mögliche Ursache für eine Entwicklungsverzögerung von Embryonen ist die asynchrone Teilung der Blastomeren. Dabei könnte eine ungleichmäßige Verteilung der Mitochondrien der Eizelle auf die Blastomeren eine Rolle spielen (Van Blerkom et al., 2000).

### 5.2.2 Identifizierung und Quantifizierung von Zelluntergängen

Ein grundsätzliches Problem bei der Quantifizierung von Zelluntergängen besteht darin, dass bei der Untersuchung von Embryonen zu definierten Zeitpunkten jeweils nur eine Subpopulation der bis dahin erfolgten Zelluntergänge erfasst wird. Dabei ist unklar, wie lange untergegangene Zellen im Embryo nachweisbar sind. In dieser Untersuchung wurden Zelluntergänge morphologisch nach einer DNA-Färbung mit DAPI identifiziert. Dabei wurden sowohl kondensierte, fragmentierte und degradierte Zellkerne als auch die Reste mitotischer Figuren als untergehende bzw. tote Zellen gewertet. Parallel wurde das Auftreten von DNA-Fragmentation mit TUNEL nachgewiesen. Dabei waren eindeutig nur die Zellen TUNEL-positiv, die auch im DAPI als Zelluntergänge beurteilt wurden. Gleichzeitig waren TUNEL-positive Zellen mit fehlender Kondensation von Chromatin bzw. Fragmentation des Zellkerns (DAPI) nicht eindeutig von Hintergrundfluoreszenz und offensichtlichen Färbeartefakten abgrenzbar.

Der TUNEL-Assay ist das am häufigsten angewandte Standardverfahren zur Quantifizierung von Apoptose im frühen Embryo (Neuber et al., 2002; Vandaele et al., 2006). Die eigenen Befunde bestätigen aber eine eingeschränkte Validität von TUNEL im frühen Embryo (Fabian et al., 2005). DNA-Fragmentationen sind ein gemeinsames Merkmal verschiedener Zelluntergangs-Formen und werden neben Apoptose u. a. auch bei Nekrose beobachtet (Grasl-Kraupp et al., 1995). Zudem müssen nicht alle apoptotischen Zellen die sogenannte internukleosomale DNA-Fragmentation aufweisen.

In zukünftigen Untersuchungen kann die Zuordnung multipler Chromatin-Fragmente zu einer oder mehreren Zellen erleichtert werden - durch eine Darstellung der Zellgrenzen im Embryo z. B. über das Anfärben der Actinfilamente mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin.

Über die Anzahl an Zelluntergängen und die Bedeutung im frühen Embryo ist bis jetzt wenig bekannt. Eine Ursache dafür ist, dass immer nur einzelne, nicht zusammenhängende Zeitpunkte der Präimplantations-Entwicklung betrachtet werden und nur eine Subpopulation der zu diesen Zeitpunkten auftretenden Entwicklungsstadien analysiert werden. Gleichzeitig ist die Vorauswahl der Embryonen bei den verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich. Aus

diesem Grund sind Ergebnisse wie z. B. Zelltod-Indices nur bedingt vergleichbar. Neben den Unterschieden hinsichtlich der untersuchten Entwicklungsstadien (Zeitpunkt/Qualität der Embryonen) fehlen ein standardisiertes Nachweisverfahren und einheitliche Kriterien zur Identifizierung von Zelluntergängen im frühen Embryo.

Ein Vorteil dieser Untersuchung ist die Analyse vieler, verschiedener Entwicklungsstadien während der Präimplantations-Entwicklung von Tag 3 bis 7 nach *in vitro* Fertilisation. Dabei wurden systematisch alle Embryonen hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes unter dem Stereomikroskop beurteilt und in definierte Entwicklungsstadien selektiert. Um das Auftreten und Bedeutung von Zelluntergängen im frühen Embryo genau zu analysieren, ist eine systematische Analyse der Embryonen in engen, zeitlichen Abständen (< 24 h) der Entwicklung bis zur Blastozyste notwendig.

### 5.2.3 Hinweise auf programmierten Zelltod

In Embryonen aller Entwicklungsstadien von Tag 3 bis Tag 7 wurden bei der morphologischen Analyse der DAPI-gefärbten Zellkerne mittels konfokaler Mikroskopie folgende Hinweise/Belege für programmierten Zelltod beobachtet:

- eine partielle bis komplette Kondensation von Chromatin
- eine Fragmentation des Zellkernes

Im Elektronenmikroskop konnten folgende morphologische Merkmale von programmiertem Zelltod in Tag 5 bis 7 Embryonen nachgewiesen werden:

- Abrunden und Schrumpfen der Zelle
- partielle bis komplette Kondensation von Chromatin
- Schrumpfen und Fragmentation des Zellkerns

Ein häufiger Befund waren sekundäre Lysosomen mit Chromatinfragmenten in morphologisch intakten Zellen. Dies ist ein klares Indiz für die Beseitigung/Phagozytose untergegangener Nachbarzellen.

Die in der inneren Zellmasse von Blastozysten *in vitro* und *in vivo* beobachtete hohe Inzidenz von Zelluntergängen legt nahe, dass programmierter Zelltod bei der Entwicklung der inneren Zellmasse (ICM) eine wichtige physiologische Rolle, etwa im Rahmen eines morphogenetischen "cell sorting", spielt. Falls es sich um programmierten Zelltod handelt, stellt sich die Frage nach der Initiation und Regulation. Als Auslöser für programmierten Zelltod sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten zu diskutieren:

1. Fehlende Überlebenssignale: die embryonalen Zellen sind auf Suizid vorprogrammiert. Für das Überleben der Zelle sind spezifische Überlebenssignale wie Wachstumsfaktoren und Zytokine notwendig. Bei Fehlen oder einer zu niedrigen Konzentration dieser Überlebenssignale leitet die Zelle aktiv ihren Untergang ein (Brison and Schultz, 1998; Diaz-Cueto and Gerton, 2001).
2. Aktive Apoptose-Induktion von außen - durch andere Zellen: Die embryonalen Zellen sind in ihrer Grundeinstellung auf Überleben programmiert. Der Untergang der Zelle wird aktiv durch externe Signale von anderen Zellen induziert z. B. über Death receptor-/Liganden-Systeme.

Die Frage nach Funktion, Bedeutung und Regulation von Apoptose bei der embryonalen Entwicklung bis zur Blastozyste führt zur Frage nach der Beteiligung bekannter Signalwege. Wichtige Hinweise könnte bereits die Elektronenmikroskopie liefern - beispielsweise über ultrastrukturelle Veränderungen der Mitochondrien, die eine zentrale Rolle bei der Initiation der Apoptose über den intrinsischen Signalweg spielen (Green and Reed, 1998). So wurde für apoptotische Zellen ein Anschwellen der Mitochondrien beschrieben, das allerdings erst sehr spät im Apoptose-Prozess nachweisbar ist (Ziegler and Groscurth, 2004). Nach Kroemer et al. ist das Anschwellen jedoch oftmals nur schwach ausgeprägt bzw. gar nicht nachweisbar (Kroemer et al., 2005). In dieser Untersuchung konnten keine Apoptose-typischen ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien beobachtet werden.

#### 5.2.4 Die Bedeutung von Zelluntergängen im frühen Embryo

In Tag 3 und 4 Embryonen beobachtete Zelluntergänge sind zu einem erheblichen Teil Residuen eines Teilungsstops früher Blastomeren noch vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung. Diese findet beim Rind während des 4. Zellzyklus jeweils separat in den einzelnen Blastomeren statt (Barnes and First, 1991). Eine wichtige Frage für weitere Untersuchungen ist, ob der Teilungsstop und Untergang dieser frühen Blastomeren das Ergebnis von Kontrollmechanismen und programmiertem Zelltod zur Eliminierung abnormaler Zellen (DNA-Schäden, Chromosomen-Abberationen etc.) ist (siehe Kapitel 5.3.1). Die Kontrollmechanismen und der programmierte Zelluntergang würden dabei weitestgehend auf Komponenten (Transkripten/Proteinen etc.) der Eizelle basieren. Möglicherweise werden in Abhängigkeit von der Zellgeneration und Zellzyklus-Kontrollpunkten abnormale Blastomeren durch verschiedene Zelltod-Mechanismen unterschiedlich schnell beseitigt (King and Cidlowski,



1995). So können eine unvollständige DNA-Replikation bzw. DNA-Schäden am G2/M-Übergang zu einem Prophase-Arrest führen und zur Beseitigung der betroffenen Zelle durch Apoptose. Fehler bei der Anordnung der Chromosomen in der Metaphasespindel können zunächst zu einem Metaphase-Arrest führen und später in einer mitotischen Katastrophe enden (Castedo et al., 2004).

Für eine andere, physiologische Funktion von programmiertem Zelltod ab der Bildung der Blastozyste und der Formierung der inneren Zellmasse spricht eine hohe Inzidenz von Zelluntergängen in der ICM sowohl von *in vitro* als auch *in vivo* produzierten und für den Untersuchungszeitpunkt weit entwickelten Blastozysten mit gut ausgebildetem Trophoblast. *In vitro* lag die Zahl der intakten ICM-Zellen in Tag 6 Blastozysten und schlüpfenden Tag 7 Blastozysten im Mittel bei 64, während die Zahl der Trophoblastzellen stark zunahm (siehe Kapitel 4.3.1.3). Dies deutet auf eine aktive Regulation der Zellzahl in der ICM durch programmierten Zelltod hin. Offen sind dabei folgende Fragen:

- Ist der Zelltod-Index in Blastozysten als prospektiver Parameter für das Entwicklungspotential geeignet?
- Bedeutet ein hoher Zelltod-Index eine schlechte Prognose?

In den Entwicklungsstadien an Tag 5 und 6 beobachtete Zelluntergänge sind einerseits Residuen von Fehlern aus vorangegangenen Entwicklungszeitpunkten, die noch nicht beseitigt wurden und andererseits aktuelle Zelluntergänge, die möglicherweise physiologisch im Rahmen einer normalen Entwicklung bei der Ausbildung der ICM auftreten.

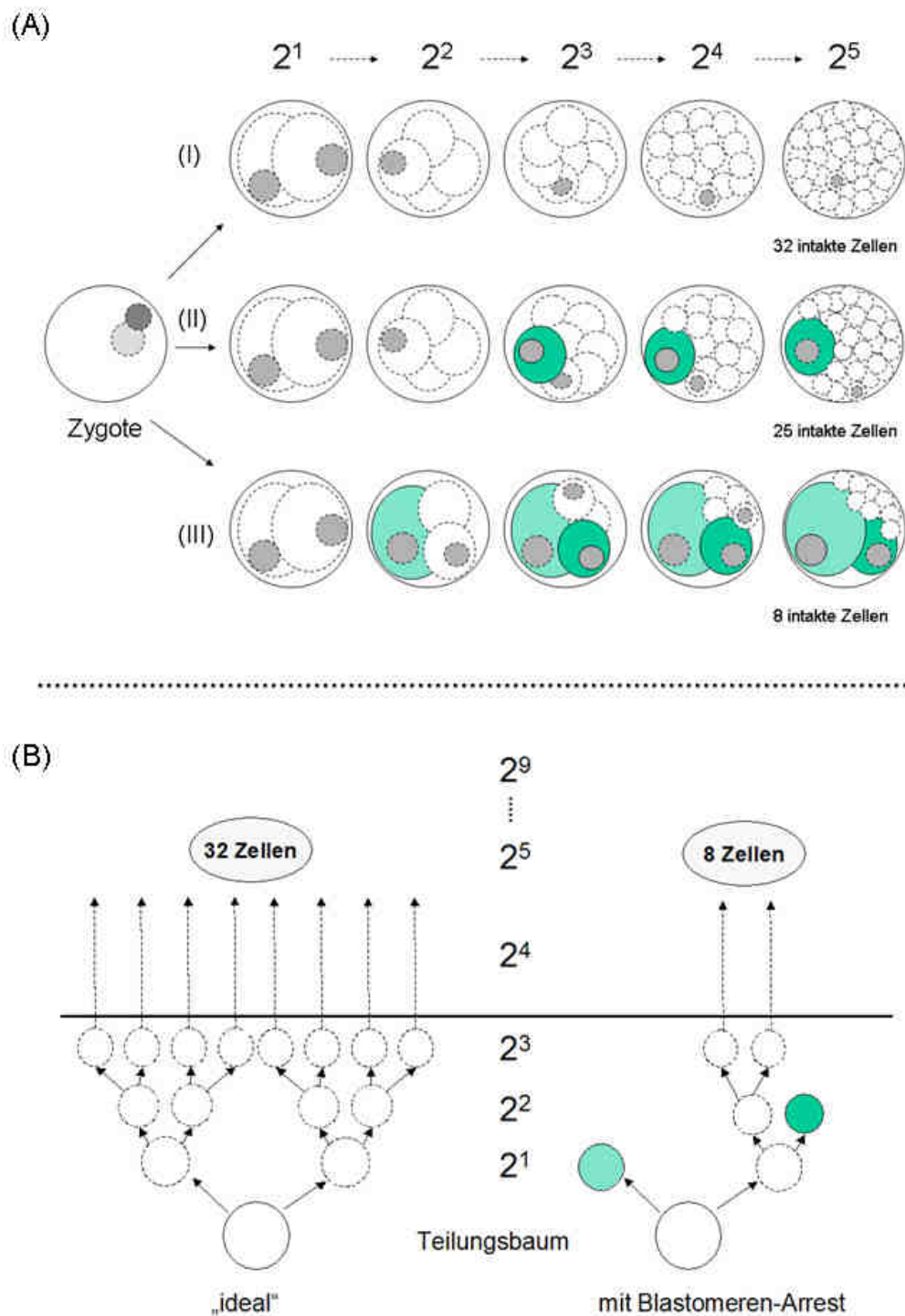
### **5.3 Der Entwicklungsstopp/Arrest/Tod/Verlust einzelner früher Blastomeren vor/während der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms**

Eine wichtige Ursache für die Heterogenität der Zellzahl ist der Entwicklungsarrest und Verlust einer oder mehrerer Blastomeren während der ersten Zellzyklen vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung. Diese findet beim Rind während des 4. Zellzyklus jeweils separat in den einzelnen Blastomeren statt (Barnes and First, 1991). Der Anstieg der Zellzahl und die weitere Entwicklung des Embryos werden durch den Ausfall von frühen Blastomeren vermutlich kritisch beeinflusst. Eine schematische Darstellung der ersten Zellteilungsgenerationen im Embryo (Abb. 37) veranschaulicht, je früher der Ausfall einzelner Blastomeren, desto:

- größer ist der Anteil ooplasmatischer Ressourcen, der verloren geht und für die weitere Entwicklung des Embryos nicht mehr zur Verfügung steht (Abb. 37 A).
- mehr potentielle Nachkommen (Zellen) fallen weg (Abb. 37 B).

Der Arrest von frühen Blastomeren endet einerseits häufig im frühen Tod des Embryos und ist andererseits die wesentliche Ursache bei einer stereomikroskopisch beobachteten Entwicklungsverzögerung (siehe Kapitel 5.2.1).

Während der ersten Zellteilungen laufen wesentliche Prozesse der epigenetischen Reprogrammierung ab. Derzeit ist nicht geklärt, wann die epigenetische Diversifizierung der einzelnen Blastomeren beginnt. In diesem Zusammenhang stellt sich beispielsweise die Frage: Hängt die Ausbildung und Entwicklung der Zellzahl in der ICM bei Ausfall einer der Blastomeren eines 8-Zell-Embryos davon ab, welche der epigenetisch bereits unterschiedlich markierten Blastomeren betroffen ist? In dieser Untersuchung zeigte sich eine enorme Variabilität in der Entwicklung der ICM. *In vitro* schwankte an Tag 7 in nicht-expandierten und somit in der in der Entwicklung verzögerten Blastozysten die Zellzahl der ICM zwischen 20 und 130 (siehe Kapitel 4.3.1.3).



**Abbildung 37: Schema des Entwicklungsstops früher Blastomeren vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung im Embryo (beim Rind im 4. Zellzyklus)**

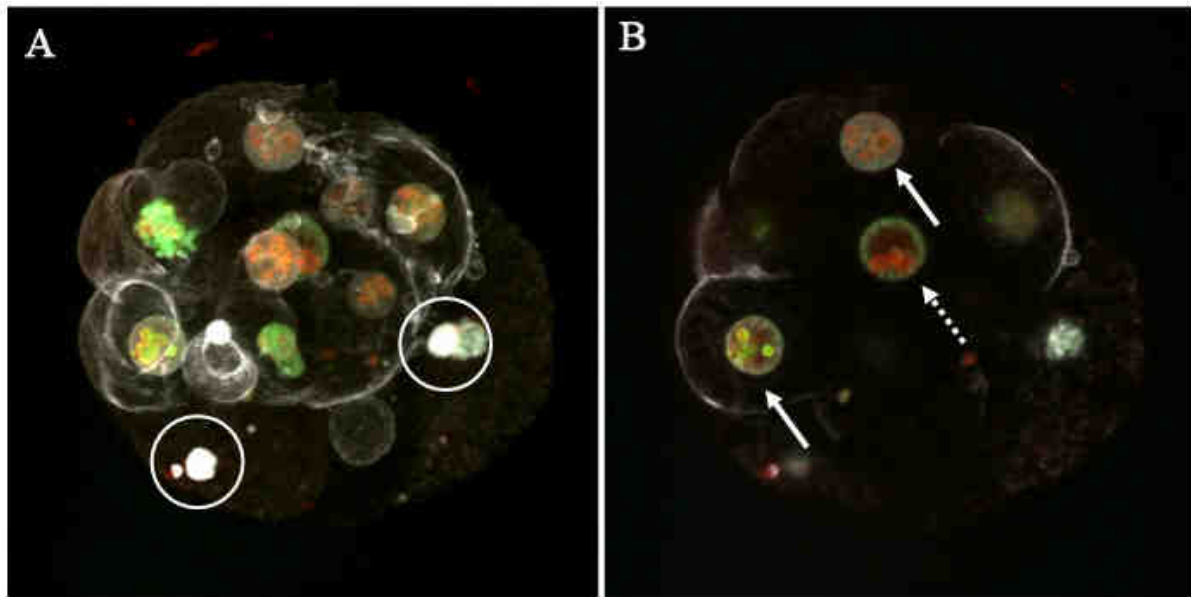
Je früher der Ausfall einzelner Blastomere, desto (A) größer ist der Verlust wichtiger ooplasmatischer Ressourcen und (B) desto niedriger ist die Anzahl an potentiellen Nachkommen. Blastomeren-Arrest: hellgrün - 1. Blastomerengeneration bzw. 2. Zellzyklus; dunkelgrün - 2. Blastomerengeneration bzw. 3. Zellzyklus; weiss - teilungsaktive Blastomeren.

### 5.3.1 Mögliche Ursachen für einen Entwicklungsstopp früher Blastomeren vor bzw. während der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms

Mögliche Ursachen für den in vielen Embryonen beobachteten Entwicklungsstopp einer oder mehrerer früher Blastomeren im Verlauf der ersten Zellteilungen sind:

- Defizite der Eizelle. Wichtige zytoplasmatische Faktoren der Eizelle für die Steuerung der embryonalen Entwicklung fehlen. Dies kann die Folge von Störungen von Eizellwachstum und -reifung oder die Folge einer bereits vor der *in vitro* Fertilisation begonnenen Regression der Eizelle sein (Merton et al., 2003).
- eine Arretierung an spezifischen Zellzyklus-Kontrollpunkten als protektiver Mechanismus zur Erkennung und Elimination von abnormalen Blastomeren.
  - Arretierte frühe Blastomeren enthalten oft auffällig große Kerne (Abb. 38 B). Ein Teil dieser großen Kerne enthält stark kondensierte und randständig angeordnete Chromosomen und befindet sich vermutlich am G2/Mitose-Übergang (Abb. 38 B: Pfeil mit gestrichelter Linie).
  - Ebenfalls häufig in arretierten frühen Blastomeren zu finden sind teils unauffällige, teils irreguläre Metaphasefiguren z. B. mit isolierten Chromosomen.
  - Theoretisch ist auch ein Zellzyklus-Arrest aufgrund „übermäßiger“ Kontrollmechanismen möglich.

Der Arrest von frühen Blastomeren ist offenbar kein *in vitro* Artefakt. Auch in den *in vivo* Embryonen wurden häufig eine oder mehrere arretierte frühe Blastomeren beobachtet. Eine wichtige Frage für weitere Untersuchungen ist, ob der Teilungsstopp und der Untergang früher Blastomeren tatsächlich das Ergebnis von Kontrollmechanismen sind. Eine genaue Analyse der beobachteten Stoppstellen könnte entscheidend zur Identifizierung spezifischer ursächlicher Eizell-Defizite und der Entwicklung diagnostischer Marker für das Entwicklungspotential von Eizellen beitragen.



**Abbildung 38: Früher Blastomeren-Arrest in einem Tag 5 IVF-Embryo**

Embryo mit einem Arrest früher Blastomeren in verschiedenen Zellzyklusstadien (Pfeile) und untergehenden Blastomeren mit kondensiertem Chromatin (Kreise). DNA-Färbung (DAPI, weiß), F-Actin (Phalloidin, weiß), MKI67 (grün) und Nucleolin (rot). (A) Z-Projektion und (B) zentraler optischer Schnitt.

#### **5.4 Transkript-Abundanz-Profile von Apoptose-assoziierten Genen**

Um die Bedeutung und Funktion von Apoptose im frühen Embryo besser zu verstehen, wurde jeweils parallel zur morphologischen Analyse an kleinen Pools von Embryonen die Expression ausgewählter Apoptose-assoziiierter Gene mittels quantitativer Real-Time RT-PCR analysiert. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen zur Expression Apoptose-assoziiierter Gene im frühen Embryo wurde in dieser Untersuchung systematisch in einem Ansatz

- eine Auswahl von Apoptose-assoziierten Genen untersucht, die vermutlich Schlüsselfunktionen bei der Initiation der Apoptose über verschiedene Signalwege (intrinsisch/extrinsisch) sowie der Regulation und Exekution der Apoptose ausüben.
- über eine absolute Quantifizierung die Kopienzahlen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Befruchtung und dem Entwicklungsstatus bestimmt.
- die Kopienzahlen mit der Zellzahl korreliert.

Für eine bessere Beurteilung der Ergebnisse an *in vitro* Embryonen wurden parallel *in vivo* Embryonen analysiert, die nach hormonell induzierter Superovulation und künstlicher Besamung am Tag 7 nicht-invasiv durch Spülung der Uterushörner isoliert wurden.

#### 5.4.1 Technische Limitationen der RT-qPCR

Die Analyse der mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time RT-PCR ist mit einer Reihe von technisch bedingten Limitationen verbunden (Bustin et al., 2005). Zu den kritischen Punkten bei Analysen an Eizellen und frühen Embryonen zählen vor allem:

- der niedrige RNA-Gehalt mit 1 - 2 ng in der Eizelle und 5 ng in der Blastozyste beim Rind (Bilodeau-Goeseels and Schultz, 1997a). Präzise und zuverlässige Daten zur RNA-Gesamtmenge, dem Anteil der rRNA-Spezies und dem Anteil der mRNA in der Eizelle und im frühen Embryo fehlen.
- Effizienz und Reproduzierbarkeit von RNA-Extraktion und Reverser Transkription.
- eine Normalisierung der Expressionsdaten über Referenz-Transkripte aufgrund der hohen Dynamik der frühen Embryonal-Entwicklung (Bettegowda et al., 2006; Mamo et al., 2007).

Die quantitativen Real-Time RT-PCR-Analysen wurden nach einem bereits an bovinen Eizellen und Embryonen etablierten Protokoll durchgeführt (Boelhauve et al., 2005). Um alle ausgewählten Gene an einem Eizell-/Embryo-Pool zu bestimmen, wurde in eine qPCR-Reaktion jeweils nur die cDNA-Menge entsprechend 1/10 Embryo-/Eizell-Äquivalent eingesetzt. Bei zu hoher Verdünnung der Ausgangsprobe besteht die Gefahr, dass nur in geringer Kopienzahl vorhandene Transkripte unter die Nachweisgrenze rutschen. Im Rahmen der in dieser Untersuchung durchgeführten, absoluten Quantifizierung wurde für jedes der untersuchten Transkripte der Messbereich der qPCR über eine Kalibrierkurve bestimmt. Dabei lag die untere Nachweisgrenze jeweils bei 20 Kopien pro Reaktionsansatz.

Die RNA-Menge ist bei der Analyse kleiner Pools von nur 5 bzw. 10 Eizellen/Embryonen zu gering, um nach der RNA-Extraktion parallel - an einem Pool - a) die RNA-Konzentration zu messen, b) die RNA-Integrität z. B. durch Mikro-Gelelektrophorese zu überprüfen und c) die Transkript-Abundanzen aller ausgewählten Transkripte zu bestimmen. Um alle ausgewählten Transkripte an einem Eizell-/Embryo-Pool analysieren zu können, wurde auf eine Überprüfung der extrahierten RNA verzichtet. Zum Schutz vor RNA-Degradation wurden die Embryonen nach ihrer stereomikroskopischen Klassifizierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren

und bei - 80 °C gelagert. Die RNA wurde unmittelbar nach der Extraktion mit Hilfe von Random-Hexamer (RH)-Primern in die stabilere, korrespondierende (c)DNA umgeschrieben.

Bei der Reversen Transkription mittels RH-Primern werden neben den embryonalen Transkripten auch die aktiven und inaktiven Eizell-spezifischen (maternalen) Transkripte erfasst. Bei der Reversen Transkription mit Poly-A-Primern werden 18S rRNA, mRNAs ohne Poly-A-Schwanz wie z. B. die mRNAs von Histon-Genen sowie inaktive, maternale Transkripte mit verkürztem Poly-A-Schwanz nicht erfasst. Die Wahl der Primer für die Reverse Transkription muss bei der Interpretation von RT-qPCR-Daten berücksichtigt werden.

Mittels einer absoluten Quantifizierung wurde die Kopienzahl pro Embryo für 2 Referenz-Transkripte und 11 mRNAs bestimmt. Das Ziel der quantitativen Real-Time RT-PCR mit einer absoluten Quantifizierung war u. a. eine Vorselektion von Kandidatengen für Studien zur Transkript- und Protein-Lokalisation mittels RNA *in situ* und Immunfluoreszenz sowie für funktionelle Untersuchungen beispielsweise mittels RNA-knock-down etc. In Abhängigkeit davon, für welches Protein (Enzym, Transkriptionsfaktor, Strukturprotein etc.) ein Transkript kodiert, könnte bereits die Kopienzahl erste wichtige Informationen zur funktionalen Relevanz liefern. Ein wesentlicher Vorteil einer absoluten Quantifizierung ist, dass die ermittelten Kopienzahlen in nachfolgenden Studien überprüft werden können bzw. als Bezugspunkt dienen. Darüber hinaus sind absolute Kopienzahlen besser geeignet, um den Verlauf von Transkript-Abundanzen zu Beginn der Embryogenese zu beobachten. Es werden keine Referenz-Transkripte benötigt. Die absoluten Kopienzahlen können mit der Zellzahl korreliert und so die Kopienzahl pro Zelle abgeschätzt werden. Eine absolute Quantifizierung von mRNA-Transkripten ist allerdings zeitaufwendig und teuer. So müssen Transkript-spezifische DNA-Standards im Vorfeld der Untersuchungen hergestellt werden. Ein kritischer Punkt sind Schwankungen in der Effizienz von RNA-Extraktion und Reverser Transkription, die z. B. mit Hilfe externer RNA-Standards erfasst und ausgeglichen werden können. In dieser Untersuchung wurde die Effizienz von RNA-Extraktion und Reverser Transkription und ihre Schwankung mit Hilfe eines externen RNA-Standards exemplarisch an Eizellen überprüft und lag bei  $28 \pm 5 \%$ . Um die tatsächlichen Kopienzahlen zu erhalten, müssen also die gemessenen Werte mit einem Korrekturfaktor von 3,6 multipliziert werden. Die Interpretation der Kopienzahlen spezifischer Transkripte ist gegenwärtig (noch?) erheblich eingeschränkt, da kaum Vergleichs- bzw. Referenzdaten vorliegen - weder von Eizellen und frühen Embryonen, noch von adulten, somatischen Zellen.

Die bislang publizierten Daten zur Expression spezifischer Transkripte in Eizellen und Embryonen basieren nahezu ausschließlich auf einer relativen Quantifizierung der Transkripte im Verhältnis zu einem Referenz-Transkript oder einem externen RNA-Standard (Wrenzycki et al., 2004). Neben Untersuchungen zu Transkript-Abundanzen an jeweils einem spezifischen Entwicklungszeitpunkt bzw. -stadium wurden auch Studien zum entwicklungsabhängigen Verlauf von Transkript-Abundanzen durchgeführt. Insbesondere dabei stellt sich die entscheidende und nicht einfach zu beantwortende Frage nach geeigneten Referenz-Transkripten (Goossens et al., 2005).

Microarray-basierte Transkriptom-Analysen an Embryonen könnten unter anderem zur Identifizierung von entwicklungsrelevanten Schlüsselgenen und Signalwegen führen (Adjaye et al., 2007). Ein schwerwiegendes Problem stellt dabei der geringe RNA-Gehalt früher Embryonen dar. Bei der Untersuchung einzelner Embryonen oder kleiner Pools muß die cDNA für die Hybridisierung amplifiziert werden. Dabei ist damit zu rechnen, dass je nach Amplifikationsverfahren die verschiedenen Transkripte jeweils mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert werden und dass Transkripte, die nur in niedriger Kopienzahl vorliegen, nicht nachgewiesen werden können (Sudheer and Adjaye, 2007). Die Ergebnisse bislang publizierter Microarray-Analysen sind aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Protokolle zur RNA-Isolierung, Reversen Transkription und Amplifikation und des Einsatzes unterschiedlicher Array-Plattformen schwierig zu bewerten und zu vergleichen (Sudheer and Adjaye, 2007).

#### 5.4.2 Zur Interpretation von Transkript-Kopienzahlen

Je nach Untersuchungszeitpunkt und Entwicklungsstadium repräsentieren die Kopienzahlen pro Embryo

- von der Eizelle stammende (maternale) Transkripte
- vom Embryo produzierte Transkripte
- die zelluläre Zusammensetzung des Embryos
  - die Anzahl der Zellen
  - den Zellteilungsbaum und die Anzahl mitotischer Teilungen, die von den einzelnen Zellen jeweils bereits durchlaufen wurden
  - den epigenetischen Status der einzelnen Zellen und ihre Differenzierung
  - den Anteil von ICM- und Trophoblast-Zellen
- eine funktionelle Adaptation an die Umgebungsbedingungen



Der Abbau maternaler und Aufbau embryonaler Transkripte im Verlauf der ersten Zellteilungen ist graduell und für jedes Gen verschieden (Bettegowda and Smith, 2007; Brevini et al., 2007). Aufgrund einer bislang fehlenden Diskriminierung zwischen maternalen und embryonalen Transkripten kann nicht unterschieden werden, wieviele Transkripte zum jeweiligen Zeitpunkt von der Mutter stammen bzw. auf die Expression durch den Embryo zurückzuführen sind. Ein Ansatz für eine mögliche Diskriminierung ist die Markierung neusynthetisierter RNA über modifizierte Nukleotide und die spezifische Isolierung beispielsweise über eine Immunpräzipitation.

Die Division der Kopienzahl eines Transkripts pro Embryo durch die Zellzahl liefert einen Schätzwert für die Kopienzahl pro Zelle. Der Beginn der embryonalen Transkription kann über ein Verlaufsprofil der Kopienzahl pro Zelle besser erfasst werden als über die Kopienzahl pro Embryo. In den Tag 3 bis 5 Embryonen wurden weniger Kopien pro Zelle bestimmt im Vergleich zur Eizelle. Die befruchtete Eizelle wird durch die Furchungsteilungen in immer kleinere Zellen zerlegt. Dabei wird das Zytoplasma der Eizelle mit den vorrätigen Transkripten auf die neugebildeten Zellen verteilt. Ein Hinweis auf den Beginn der aktiven (embryonalen) Transkription ist der Anstieg der Kopienzahl pro Zelle bei einer weiter exponentiell ansteigenden Zellzahl. Bei der Entwicklung der Morula zur schlüpfenden Blastozyste gibt die Kopienzahl pro Zelle Auskunft darüber, ob ein Anstieg der Kopienzahl pro Embryo allein aus dem Anstieg der Zellzahl bei konstanter Expression pro Zelle resultiert.

In der Blastozyste haben sich mit dem Trophoblast und der ICM zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Zellkompartimente mit unterschiedlichem Entwicklungspotential entwickelt. Zusätzlich beginnt sich das Zahlenverhältnis von ICM zu Trophoblastzellen mit der Expansion und dem Schlüpfen der Blastozyste dramatisch zugunsten des Trophoblasten zu verschieben. Für die Frage nach einem möglicherweise auftretenden programmierten Zelltod in der ICM sind v. a. die Transkripte in der ICM von Interesse. Das erfordert aber eine getrennte Analyse von ICM und Trophoblast-Zellen. ICM und Trophoblast-spezifische mRNA-Expressionsdaten wurden erstmals von Adjaye et al. mittels Microarrays bestimmt (Adjaye et al., 2007).

### 5.4.3 Diskussion der Kopienzahlen *in vitro*

#### **Referenz-Transkripte**

Diese Untersuchung zeigt erstmals, wie die Kopienzahlen von 18S rRNA und H2AFZ-mRNA im Verlauf der Entwicklung von der Eizelle bis zur schlüpfenden Blastozyste beim Rind schwanken. In nicht-expandierten Blastozysten an Tag 6 und schlüpfenden Blastozysten an Tag 7 wurden für H2AFZ relativ konstante mRNA-Kopienzahlen pro Zelle bestimmt. H2AFZ, das wohl weitgehend replikationsunabhängig transkribiert wird (Hatch and Bonner, 1990), könnte vielleicht ein geeignetes Referenzgen für die relative Quantifizierung von mRNAs mittels RT-qPCR für diesen Entwicklungsabschnitt darstellen.

Für die 18S rRNA wurden unterschiedliche Transkript-Abundanzen in Eizellen und Embryonen von Tag 3 bis 7 gemessen. Die mRNA-Kopienzahl war zu jedem untersuchten Zeitpunkt bis um den Faktor 1.000 höher im Vergleich zu den Apoptose-spezifischen Transkripten. Für die Bewältigung der Entwicklungsprozesse im frühen Embryo, beginnend mit der Aktivierung des embryonalen Genoms, wird eine hohe Zahl an 18S rRNA-Transkripten und -Proteinen benötigt. Die Transkription der 18S rRNA erfolgt durch die RNA-Polymerase I (McStay and Grummt, 2008). Die Regulation der rRNA-Synthese ist damit unabhängig von der mRNA-Synthese, die durch die RNA-Polymerase II erfolgt. Die im Vergleich zu den meisten mRNA-Transkripten extrem hohe Abundanz von 18S rRNA ist ein Nachteil bei der Verwendung als Referenztranskript für die relative Quantifizierung von mRNAs mittels RT-qPCR und die Identifizierung von geringen Abundanz-Unterschieden (Bustin, 2000; Vandesompele et al., 2002).

H2AFZ, das eine spezifische H2A-Histon-Variante kodiert, zeigte einen auffällig hohen Peak der mRNA Kopienzahlen in Tag 3 Embryonen noch vor der Haupt-Genomaktivierung. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine wichtige Funktion von H2AFZ zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung. H2AFZ wird replikationsunabhängig transkribiert (Hatch and Bonner, 1990) und spielt eine komplexe, bislang aber weitgehend ungeklärte Rolle bei der epigenetischen/Chromatin-basierten Regulation der Genexpression (Draker and Cheung, 2009; Thambirajah et al., 2009). H2AFZ-defiziente Mausembryonen sterben um den Zeitpunkt der Implantation (Faast et al., 2001).

## **Caspasen**

In dieser Untersuchung wurden mRNA-Transkripte für die Effektor-Caspase 3 und die intrinsische Initiator-Caspase 9 von der Eizelle bis zur schlüpfenden Blastozyste nachgewiesen. Untersuchungen bei verschiedenen Säuger-Spezies fanden für verschiedene Caspasen eine durchgehende mRNA-Expression in Eizellen und frühen Embryonen bis zur Blastozyste (Exley et al., 1999; Jurisicova et al., 1998; Warner et al., 1998). Die essentielle Bedeutung von Caspasen bei der fetalen Entwicklung wird an Knock-out-Mäusen deutlich. In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund führt die Defizienz von Caspase 3 zum Tod der Feten um Tag 14, die Defizienz von Caspase 9 zum Tod um den Zeitpunkt der Geburt (Zheng et al., 1999). Nach Knock-out der extrinsischen Effektor-Caspase 8 wurde ebenfalls ein Tod der Feten um Tag 14 beobachtet (Zheng et al., 1999).

Die Bedeutung der Caspasen für die Entwicklung von der Eizelle bis zur Blastozyste ist dagegen noch unklar. In dieser Untersuchung wurden für die Effektor-Caspase 3 von der Eizelle bis Tag 4 relativ konstante mRNA Kopienzahlen pro Embryo gemessen. Ab Tag 5 wurden dann deutlich mehr (embryonale) Transkripte bestimmt. Die Anzahl der gemessenen mRNA-Kopien für die intrinsische Initiator-Caspase 9 dagegen sank von der Eizelle auf Tag 3 deutlich ab, um erst in schlüpfenden Blastozysten wieder anzusteigen. Dies könnte auf eine Beteiligung von Caspase 9 an den in diesem Stadium in der ICM beobachteten Zelluntergängen hinweisen. In dieser Untersuchung waren weder in Eizellen, noch in Embryonen bis zur schlüpfenden Blastozyste Transkripte für die extrinsische Effektor-Caspase 8 nachweisbar. Das entspricht den Ergebnissen einer Untersuchung bei der Maus, die Caspase 8-Protein weder in Eizellen, noch in Blastozysten mittels Immunfluoreszenz nachweisen konnten (Kelkar et al., 2003).

## **BIRC4 - Inhibitor der Apoptose**

Für BIRC4 wurden in der Eizelle auffällig hohe mRNA-Kopienzahlen gemessen, die um den Faktor 20 höher waren im Vergleich zu den Kopienzahlen von Tag 3 IVF-Embryonen. Erst spät, an Tag 6 und 7 wurden dann wieder deutlich mehr, embryonale mRNA-Kopien gemessen. In einer früheren Untersuchung von Nino-Soto et al. wurde bereits von einer hohen Konzentration von BIRC4-mRNA in der Eizelle beim Rind berichtet. Die Autoren spekulierten über eine wichtige Rolle von BIRC4 zum Schutz vor Apoptose während der ersten Zellteilungen, ohne Belege dafür liefern zu können (Nino-Soto et al., 2007). So steht ein Nachweis von BIRC4 Protein in bovinen Eizellen und frühen Embryonen noch aus. Darüber hinaus zeigten

sich BIRC4 Knock-out-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp phänotypisch unauffällig. Die dabei beobachteten erhöhten Transkript-Abundanzen für zwei verwandten Proteine aus der IAP-Familie, cIAP (baculoviral IAP repeat-containing) 1 und 2 sprechen dafür, dass ein Ausfall von BIRC4 durch eine Überexpression verwandter Gene kompensiert werden kann (Harlin et al., 2001).

### **BCL2-Familie**

mRNA-Kopien für das anti-apoptotisch wirkende BCL2 waren in dieser Untersuchung nur in der Eizelle nachweisbar. In einer Reihe von Studien bei Maus und Mensch waren BCL2-Transkripte von der Eizelle bis zur Blastozyste nachweisbar. Dabei wurden sowohl Embryonen-Pools als auch Einzelembryonen analysiert (Exley et al., 1999; Metcalfe et al., 2004; Spanos et al., 2002; Warner et al., 1998). Eine Untersuchung an Einzelblastomeren von vitalen, arretierten sowie nicht mehr lebensfähigen 1-9 Zell-Embryonen beim Menschen konnte nur in wenigen Blastomeren vitaler Embryonen BCL2-Transkripte nachweisen (Liu et al., 2000). Daraus wurde eine mögliche Assoziation einer BCL2-mRNA-Expression und der Qualität der Embryonen abgeleitet. Beim Rind wurden mRNA-Transkripte für BCL2 in als entwicklungsfähig klassifizierten Tag 7 Blastozysten nachgewiesen (Vandaele et al., 2008).

mRNA-Kopien für BCL2L1 (ehemals *bcl-xL*), einem zu BCL2 nah verwandten Protein, mit ebenfalls anti-apoptotischer Funktion, wurden von der Eizelle bis zur Blastozyste nachgewiesen. Nach einem Abfall der mRNA-Kopienzahl von der Eizelle bis Tag 4 wurde an Tag 5 ein steiler Anstieg als Zeichen embryonaler Transkription beobachtet. Bei der Maus wurden BCL2L1-Transkripte in Eizellen und 1-, 2-, 4-, 8-Zell-Embryonen sowie Blastozysten bestimmt (Exley et al., 1999). Beim Mensch waren mRNA-Kopien für BCL2L1 dagegen nur vereinzelt in der Zygote und in 8-Zell-Embryonen nachweisbar (Metcalfe et al., 2004). Beim Rind wurde bislang eine mRNA-Expression von BCL2L1 in verschiedenen Blastozystenstadien beobachtet (Knijn et al., 2005). Möglicherweise wird beim Rind eine fehlende BCL2-Expression im frühen Embryo durch die Expression von BCL2L1 ersetzt.

mRNA-Kopien für BAX, einem pro-apoptotischen Gegenspieler von BCL2 und BCL2L1, waren in dieser Untersuchung in der Eizelle und bis auf eine Ausnahme in allen untersuchten Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 nachweisbar. Interessanterweise war in den am weitesten entwickelten Embryonen an Tag 4 kein Nachweis von mRNA-Transkripten möglich. Nach einem möglicherweise vollständigen Abbau maternaler Transkripte in diesem Stadium wurde an Tag 5 ein steiler Anstieg offenbar embryonaler BAX-Transkripte parallel zum Anstieg der BCL2L1-mRNA Expression gemessen. Eine konstitutive mRNA-Expression von BAX wurde

in Eizellen und Embryonen bis zur Blastozyste zuvor schon bei Maus und Mensch nachgewiesen (Exley et al., 1999; Metcalfe et al., 2004; Spanos et al., 2002; Warner et al., 1998). Unter der Annahme, dass eine hohe Expression von BAX ein Marker für eine eingeschränkte Vitalität und ungünstige Kulturbedingungen darstellen könnte, wurden beim Rind wiederholt relative mRNA-Abundanzen für BAX in Eizellen (Boelhauve et al., 2005) und Embryonen vom 8-16-Zell-Stadium bis zur Blastozyste bestimmt [zusammengefasst und diskutiert bei (Wrenzycki et al., 2005)].

### **FAS-Rezeptor/FAS-Ligand (FAS/FASLG)**

In dieser Untersuchung wurden für den FAS-Liganden mRNA-Transkripte nur in den *in vitro* gereiften Eizellen sicher nachgewiesen - knapp über der Nachweisgrenze von 200 Kopien pro Eizelle. mRNA-Transkripte für den FAS-Rezeptor waren *in vivo* ab der Morula und *in vitro* nur in schlüpfenden Blastozysten an Tag 7 sicher nachweisbar, nicht in Eizellen und nicht in früheren Embryonalstadien. Das Fehlen bzw. die geringe Zahl von Transkripten für FAS, FASLG und CASP8 von der gereiften Eizelle bis zur schlüpfenden Blastozyste sprechen gegen eine Bedeutung des FAS/FASLG-Systems in diesem frühen Entwicklungszeitraum beim Rind. Möglicherweise spielt jedoch der FAS/FASLG-Signalweg eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Eizelle und Cumuluszellen bzw. zwischen den Cumuluszellen. So konnten Rubio Pomar et al. beim Rind Transkripte für FAS und FASLG sowohl in *in vitro* gereiften Eizellen als auch in Cumuluszellen nachweisen. Allerdings wurden nur in den Cumuluszellen beide Proteine nachgewiesen, in Eizellen dagegen nur das Rezeptorprotein, jedoch nicht der Ligand. Demnach könnten Cumuluszellen über diesen Signalweg die Apoptose anderer Cumuluszellen aber auch der Eizelle induzieren (Rubio Pomar et al., 2004). Studien bei Maus, Ratte und Menschen lieferten widersprüchliche Daten: So konnten bei der Maus in Eizellen sowie Tag 1 und 2 Embryonen keine mRNA-Transkripte für FAS und FASLG nachgewiesen werden, allerdings in Morulae und Blastozysten (Kelkar et al., 2003). Bei der Ratte waren mRNA-Transkripte für FAS und FASLG nur in Eizellen und 2-Zell-Embryonen nachweisbar, jedoch nicht in späteren Stadien bis zur Blastozyste (Kawamura et al., 2001). Beim Menschen wurden in 4-Zell-Embryonen und fragmentierten "Überschuss"-Embryonen Transkripte für den Rezeptor und den Liganden nachgewiesen (Kawamura et al., 2001).

Der Nachweis von FAS-Rezeptor-mRNA ab der Morula *in vivo* und ab der schlüpfenden Blastozyste *in vitro* in dieser Untersuchung ist ein Hinweis für eine Funktion dieses Signalweges nach dem Schlüpfen der Blastozyste an Tag 7 bis 9 nach der Befruchtung beim Rind.

### Transkriptionsfaktor STAT3

In der Eizelle wurden im Mittel mehr als  $10^5$  mRNA-Kopien für STAT3 gemessen. In den Embryonen lagen die Kopienzahlen erheblich niedriger: in Tag 4 Embryonen bei ca.  $7 \times 10^3$  pro Embryo und in schlüpfenden Blastozysten bei ca.  $2 \times 10^4$ . STAT3 spielt offenbar bei der embryonalen Entwicklung eine essentielle Rolle (Maj and Chelmonska-Soyta, 2007). So sterben STAT3-defiziente Maus-Embryonen noch vor Beginn der Gastrulation (Takeda et al., 1997). Eine Expression von STAT3-mRNA und Protein wurde schon in Eizellen und verschiedenen Teilungsstadien bis zur Blastozyste bei Maus, Mensch und Rind beobachtet (Antczak and Van Blerkom, 1997; Antczak and Van Blerkom, 1999; Boelhauve et al., 2005). Die Funktionen von STAT3 in der Eizelle und während der frühen Embryogenese bis zur Blastozyste und im Rahmen von Apoptose sind noch weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass STAT3-Protein eine wichtige Funktion bei der Regulation von Proliferation und Apoptose beispielsweise durch die Regulation der Transkription verschiedener pro- und anti-apoptotisch wirkender Gene ausübt (Bromberg and Darnell, 2000).

#### 5.4.4 Vergleich der Kopienzahlen *in vitro* und *in vivo*

Um die Relevanz der Ergebnisse an *in vitro* produzierten Embryonen besser einschätzen zu können, wurden parallel *in vivo* produzierte Embryonen analysiert. Die *in vivo* Embryonen wurden aus superovulierten Spendertieren 6 - 7 Tage (159 - 183 h) nach wiederholter künstlicher Besamung nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen (siehe Kapitel 3.1.2). Dieser Vergleich *in vitro/in vivo* beinhaltete folgende stereomikroskopisch definierten Entwicklungsstadien: a) kompaktierte Morula/frühe Blastozyste und b) nicht-expandierte/expandierte Blastozyste. Bei dem Vergleich von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen gibt es folgende Einschränkung: Während die zu einem definierten Zeitpunkt nach *in vitro* Fertilisation gewonnenen Embryonen alle gleich alt sind, variiert das Alter der *in vivo* produzierten Embryonen, die zu einem definierten Zeitpunkt nach künstlicher Besamung aus einem Spendertier gewonnen wurden, und kann nicht genau bestimmt werden. Die Ovulation der Eizellen und auch die Befruchtung erfolgen *in vivo* nicht gleichzeitig und können nicht beobachtet werden.

Bei einem Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Embryonen stellen sich folgende Fragen:

Was bedeutet eine Messung unterschiedlicher Transkript-Abundanzen?

- unterschiedliche Effizienz von RNA-Isolation und Reverser Transkription?
- unterschiedliche Zeitfenster, d. h. unterschiedlich alte Embryonen untersucht?
- unterschiedliche Entwicklungsstadien verglichen?
- unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung?
  - Zellzahl
  - Zellteilungsmuster
  - der epigenetische Status und die Differenzierung der einzelnen Zellen
  - der Anteil von ICM- und Trophoblastzellen
  - der Anteil untergehender Zellen
- funktionelle Anpassung an unterschiedliche Umgebungsbedingungen?

Eine entscheidende Frage bei der Interpretation von Transkript-Kopienzahlen im frühen Embryo ist: Liefern die Transkript-Abundanzen/Kopienzahlen tatsächlich Informationen über ein unterschiedliches Entwicklungspotential oder stellen Sie nur eine funktionelle Adaptation an unterschiedliche Umgebungsbedingungen dar, wie unterschiedliche *in vitro* Kulturmedien oder -zusätze, ohne nachhaltige Beeinflussung der Entwicklung?

### **Vergleich von Kopienzahlen pro intakte Zelle**

Um Unterschiede in der Zellzahl und das Auftreten von Zelluntergängen in Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo* zu berücksichtigen, wurden die Kopienzahlen pro intakte Zelle (Kopienzahl pro Embryo/Gesamtzellzahl minus Anzahl an Zelluntergängen) verglichen. Die in Morulae/frühen Blastozysten gemessenen Kopienzahlen für die beiden Referenz-Transkripte 18S rRNA und H2AFZ waren *in vitro* und *in vivo* nicht signifikant unterschiedlich. In nicht-expandierten/expandierten Blastozysten wurden *in vivo* für beide Referenzgene höhere Kopienzahlen gemessen, der Unterschied war jedoch nur bei H2AFZ signifikant ( $P \leq 0.05$ ). Für den Vergleich von Transkript-Abundanzen Apoptose-assoziiierter Gene wurden die Kopienzahlen pro intakte Zelle gegenüber dem Referenz-Transkript H2AFZ normalisiert. Nach der Normalisierung traten folgende nicht signifikante bzw. signifikante Unterschiede auf: In Morulae/frühen Blastozysten wurden *in vivo* höhere Kopienzahlen pro intakte Zelle für BAX, CASP9, BCL2L1 und BIRC4 gemessen und *in vitro* eine signifikant höhere Kopienzahl

für CASP3. In nicht-expandierten/expandierten Blastozysten wurden *in vivo* höhere Kopienzahlen für BAX, CASP9 und BCL2L1 und *in vitro* eine signifikant höhere Kopienzahl für CASP3 und BIRC4 gemessen. Dabei erschien eine höhere mRNA-Kopienzahl eines proapoptischen Gens jeweils mit einer höheren Kopienzahl des Gegenspielers korreliert. Für STAT3 war *in vitro* die Kopienzahl höher - nicht signifikant in Morulae/frühen Blastozysten und signifikant in nicht-expandierten/expandierten Blastozysten.

In zahlreichen Studien wurden bereits relative Transkript-Abundanzen potentiell bedeutsamer Gene in bovinen Embryonen in Abhängigkeit vom Kulturmedium bzw. -zusätzen *in vitro* und *in vitro* versus *in vivo* analysiert [zusammengefasst bei (Lonergan et al., 2006)]. So wurden in *in vitro* kultivierten Rinderblastozysten im Vergleich zu *in vivo* erhöhte mRNA-Abundanzen für BAX (Rizos et al., 2003) und BIRC4 (Nino-Soto et al., 2007) bestimmt. Dagegen fanden Knijn et al. keine Unterschiede in der relativen mRNA-Abundanz von BAX und BCL2L1 in Blastozystenstadien beim Rind *in vitro/in vivo* (Knijn et al., 2005).

Derzeit gibt es keine Belege für eine funktionelle Relevanz der zwischen *in vitro* und *in vivo* beobachteten Unterschiede von Transkript-Abundanzen. Die parallele morphologische Analyse von Morulae und Blastozysten *in vitro* und *in vivo* ergab keine signifikanten Unterschiede in der Inzidenz von Zelluntergängen (siehe Kapitel 4.3.1.4). Die Induktion und Exekution von Apoptose kann vermutlich unabhängig von Änderungen der Transkript-Abundanz Apoptose-assoziiierter Gene erfolgen. So konnten Vandaele et al. in boviner Blastozysten *in vitro* nach Kultivierung mit Staurosporin über 24 h zur Induktion von Apoptose keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression von BAX, BCL2, CASP3, CASP7 im Vergleich zu unbehandelten Embryonen beobachten (Vandaele et al., 2008).

#### 5.4.5 mRNA-Kopienzahl – funktionale Relevanz/Protein-Abundanz?

Die mRNA-Kopienzahlen können wichtige Hinweise auf eine funktionelle Relevanz eines Gens liefern. Aus der Anzahl der mRNA-Transkripte eines Gens in einer Zelle kann jedoch nicht die Anzahl der Protein-Moleküle in der Zelle und ihre Aktivität abgeleitet werden, da die Synthese, posttranslationale Modifikation, Aktivierung, Inaktivierung und Degradation von Proteinen komplex reguliert sind (Lackner and Bahler, 2008). Gene können transkribiert werden, ohne dass die entsprechende mRNA translatiert wird. Für die Aufklärung der Funktion eines Gens in der frühen embryonalen Entwicklung sind der Nachweis und die Lokalisation



des Proteins von entscheidender Bedeutung. Beim Rind ist gegenwärtig der Nachweis spezifischer Proteine durch das Fehlen geeigneter Antikörper noch erheblich erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte sicher nur STAT3-Protein mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Signale für STAT3-Protein wurden im Zytoplasma und im Zellkern von Tag 3 Embryonen und Tag 6 Blastozysten lokalisiert, nicht aber in gereiften Eizellen. Auffällig war, dass die Zellkerne mit positiven STAT3-Signalen im Zellkern gleichzeitig Ki67 positiv waren. Bei Mensch und Maus wurde bereits STAT3-Protein mittels Immunfluoreszenz im Zytoplasma von gereiften Eizellen und in frühen Embryonen beobachtet (Antczak and Van Blerkom, 1997). Die Autoren berichten von einem starken, polaren Signal in der Eizelle und variablen Signalen in den Zellen von Morulae und Blastozysten.

Für aktiviertes Caspase 3-Protein war der Nachweis fraglich. Es wurden nur in Blastozysten vereinzelt schwache Signale im Zytoplasma von untergehenden Zellen (mit morphologischen Merkmalen von Apoptose) beobachtet, in einem kondensierten/apoptotischen Kern auch im Karyoplasma (siehe Kapitel 4.5). Gjorret et al. konnten aktiviertes Caspase 3-Protein nach 24 h Staurosporin zur Induktion von Apoptose nicht in 2-Zell-Embryonen, aber in 4-Zell-Embryonen bis Blastozysten beim Rind mittels Immunfluoreszenz nachweisen. Die Caspase 3-positiven Zellen enthielten kondensierte/apoptotische Zellkerne. Nur vereinzelt wurden zytoplasmatische Signale für aktivierte Caspase 3 in nicht-behandelten 8- und 16-Zell-Embryonen, Morulae und Blastozysten beobachtet (Gjorret et al., 2007). Dabei waren aktivierte Caspase 3-Signale sowohl im Zytoplasma als auch im Karyoplasma nachweisbar. Bislang unklar ist, wie lange aktive Caspase 3 in apoptotischen Zellen nachweisbar ist.

## 6 FAZIT und AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde mit der Visualisierung der frühen Entwicklung bis zur Blastozyste beim Rind begonnen. Insgesamt wurden 15 stereomikroskopisch unterschiedliche Entwicklungsstadien von Tag 3 bis 7 nach IVF analysiert. Als zentrale morphologische Parameter zur Bestimmung des Entwicklungspotentials von Embryonen wurden die Zellzahl, das Auftreten von Zelluntergängen, Zellteilungsmuster und die ultrastrukturelle Differenzierung analysiert. Für eine Identifizierung und Lokalisierung abnormaler und apoptotischer Zellen wurden die Blastomerenkerne hinsichtlich der Größe und Struktur genauer analysiert. Um die mögliche Rolle des Apoptose-Systems im frühen Embryo noch genauer zu untersuchen, wurden für eine Reihe von Schlüsselgenen der Apoptose die absoluten Transkript-Abundanzen bestimmt und mit der Zellzahl korreliert. Für eine bessere Beurteilung der Relevanz der Beobachtungen an *in vitro* Embryonen wurden gleichzeitig *in vivo* Embryonen analysiert, die nach hormonell induzierter Superovulation und künstliche Besamung am Tag 7 nicht-invasiv durch Spülen der Uterushörner gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.1.2).

Folgende Schlussfolgerungen lassen sich aus dieser Untersuchung ableiten:

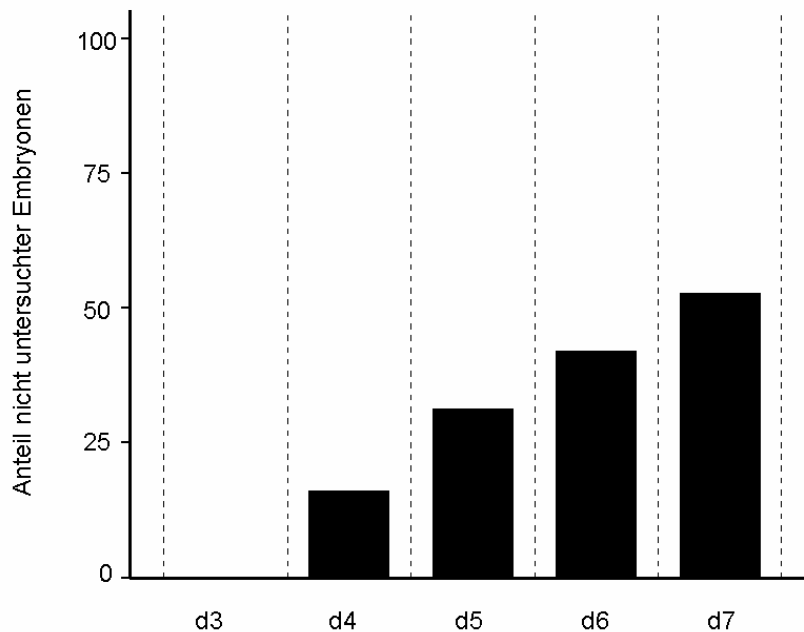
- Der Teilungsstopp und Verlust einzelner früher Blastomeren vor bzw. während der Haupt-Genomaktivierung (beim Rind im 4. Zellzyklus) beeinflusst kritisch den Anstieg der Zellzahl und die weitere Entwicklung des Embryos. Die in Tag 3 und 4 Embryonen beobachteten Zelluntergänge sind zu einem erheblichen Teil Residuen eines Teilungsstops früher Blastomeren während der ersten Zellteilungen. Eine wichtige Frage ist, ob der Teilungsstopp und Untergang dieser frühen Blastomeren das Ergebnis von Kontroll-Mechanismen und programmiertem Zelltod zur Eliminierung abnormaler Zellen ist? Um den Ausfall früher Blastomeren zahlenmäßig zu kompensieren, sind mehr Teilungszyklen der verbliebenen Zellen und damit mehr Zeit erforderlich. Eine spannende Frage ist, ob bzw. inwiefern das Entwicklungspotential des Embryos dabei langfristig beeinflusst wird. Hängt möglicherweise die Ausbildung und Entwicklung der Zellzahl im ICM bei Ausfall einer der Blastomeren eines 8-Zell-Embryos davon ab, welche der epigenetisch bereits unterschiedlich markierten Blastomeren betroffen ist?
- Die Ursachen für die heterogene Entwicklung der Embryonen unter einheitlichen Bedingungen *in vitro* sind in dem unterschiedlichen Entwicklungspotential der Eizellen und Spermien zu suchen. Die Analyse der charakteristischen Stoppstellen und kritischen Entwicklungsschritte im frühen Embryo ist ein vielversprechender Ansatz für die Identifizie-

rung spezifischer Eizell-Defizite und der Entwicklung diagnostischer Marker für das Entwicklungspotential von Eizellen. Diese Untersuchungen werden im Rahmen eines Projektes der DFG-Forschergruppe „Germ cell potential“ (FOR 1041, [www.germ-cell-potential.de](http://www.germ-cell-potential.de)) durchgeführt.

- Die in der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten *in vitro* und *in vivo* beobachtete hohe Inzidenz an Zelluntergängen (mit morphologischen Merkmalen von Apoptose) bei intaktem Trophoblast legt nahe, dass programmierter Zelltod bei der Entwicklung der ICM eine wichtige physiologische Rolle, etwa im Rahmen eines morpho-genetischen „cell sorting“, spielt.
- Der elektronenmikroskopische Nachweis von sekundären Lysosomen mit Chromatinresten ist ein starkes Indiz für eine kontrollierte Beseitigung von untergegangenen Zellen durch Nachbarzellen. Ultrastrukturelle Veränderungen, die auf eine intrinsische Aktivierung von programmiertem Zelltod über die Mitochondrien hinweisen, wurden nicht gefunden.
- Die Transkript-spezifischen Abundanz-Profile machen deutlich, dass der Abbau maternaler und der Anstieg embryonaler Transkripte im Verlauf der ersten Zellteilungen graduell und für jedes Gen spezifisch ablaufen. Die Transkript-Kopienzahlen in Morulae und Blastozysten beruhen vor allem auf einem Anstieg der Zellzahl.
- Fehlende bzw. niedrige Transkript-Abundanzen sprechen gegen eine Bedeutung des FAS/FASLG-Signalweges vor dem Blastozystenstadium. Dies schließt nicht aus, dass eine extrinsische Aktivierung von programmiertem Zelltod durch andere Death receptor/ligand-Systeme im frühen Embryo von Bedeutung ist.

Im Rahmen einer systematischen Erforschung der normalen und gestörten frühen embryonalen Entwicklung beim Rind fehlt bis jetzt eine Analyse der Entwicklungsstadien von der Zygote bis 72 Stunden nach der Befruchtung. Die Untersuchung der Embryonen in diesem Zeitraum könnte entscheidende Hinweise auf die wichtigsten Ursachen für den Teilungsstopp und Ausfall früher Blastomeren während der ersten Zellteilungen liefern. Die späteren Zeitpunkte repräsentieren zu einem großen Teil nur noch das Ergebnis vorangegangener Störungen. Die an Tag 4 bis 7 stereomikroskopisch als erheblich entwicklungsverzögert bzw. bereits degeneriert beurteilten Embryonen wurden im Rahmen dieser Untersuchung nicht analysiert. Der Anteil dieser Embryonen wurde mit zunehmendem Untersuchungszeitpunkt jedoch immer größer und betrug an Tag 7 nach IVF mehr als 50 Prozent (Abb. 39). Vom jetzigen Standpunkt aus betrachtet, erscheint es wichtig, gerade die schwer in ihrer Entwicklung gestörten

Embryonen genau zu analysieren, um den Ursachen für den frühen Tod von Embryonen auf den Grund zu gehen.



**Abbildung 39: Stereomikroskopisch erheblich entwicklungsverzögerte bzw. degenerierte Rinderembryonen an Tag 3 bis 7 *in vitro***

Eine *in situ* Hybridisierung der quantifizierten Apoptose-assoziierten Transkripte, d. h. der intrazelluläre Nachweis der Transkripte, könnte folgende wichtige Fragen klären:

- Ist ein Transkript in allen Zellen präsent oder ist die Expression auf bestimmte Zellen z. B. von ICM oder TB beschränkt?
- Gibt es Transkript-Abundanz-Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen? Wieviele Kopien eines Transkripts sind in welchen Zellen vorhanden?
- Wo sind spezifische Transkripte subzellulär lokalisiert? Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation z. B. zwischen der Eizelle und einem 4-Zell-Embryo?

Die tatsächliche Funktion eines Gens kann letztlich nur auf der Protein-Ebene aufgeklärt werden. Einen wichtigen Schritt stellen der Nachweis und die zelluläre/subzelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins einschließlich inaktiver und aktiver Formen mit Hilfe spezifischer Antikörper dar.

Die dreidimensionale Visualisierung der frühen Embryonen ist von zentraler Bedeutung bei der Erforschung der frühen Embryogenese. Eine besondere Herausforderung bei der Erforschung der Embryogenese von Säugern ist die enorme Variabilität und Heterogenität der frühen Embryonen und die daraus resultierende hohe Fehlerquote.

Die Basis für die Aufklärung grundlegender Mechanismen der frühen embryonalen Entwicklung ist die Gewinnung und Analyse vieler, fixierter Embryonen in engen, zeitlichen Abständen. Der Einsatz von Mehrfarben-Fluoreszenz zur gleichzeitigen Darstellung multipler zellulärer Strukturen ermöglicht eine bessere Beurteilung des funktionellen Status und Entwicklungspotentials der Embryonen sowie eine bessere Definition der Entwicklungsstadien. Die mikroskopische Analyse einer ausreichenden Anzahl von Embryonen kann entscheidende Hinweise auf die kritischen Entwicklungsschritte und Kontrollpunkte sowie beteiligte Signalwege auf zellulärer Ebene liefern. Die Aufklärung der tatsächlichen Bedeutung von Signalwegen und der Rolle der entscheidend beteiligten Komponenten im Rahmen der frühen embryonalen Entwicklung kann anschliessend in entsprechenden, funktionellen Studien erfolgen.

Neue Wege eröffnet die direkte mikroskopische Beobachtung der zeitlichen und räumlichen Expression von wichtigen Genen und Proteinen in lebenden Embryonen beispielsweise mit Hilfe Fluoreszenz-basierter Reportergene. Reportergene, die Schlüsselprozesse der frühen Embryonalentwicklung reflektieren, könnten auch als *in vivo* Marker für das Entwicklungspotential und den Gesundheitsstatus individueller lebender Embryonen dienen (Habermann et al., 2007).

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adjaye, J., R. Herwig, T.C. Brink, D. Herrmann, B. Greber, S. Sudheer, D. Groth, J.W. Carnwath, H. Lehrach, and H. Niemann. 2007. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiol Genomics*. 31:315-27.
- Anguita, B., L. Vandaele, B. Mateusen, D. Maes, and A. Van Soom. 2007. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*. 67:537-49.
- Antczak, M., and J. Van Blerkom. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod*. 3:1067-86.
- Antczak, M., and J. Van Blerkom. 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod*. 14:429-47.
- Aschkenazi, S., S. Straszewski, K.M. Verwer, H. Foellmer, T. Rutherford, and G. Mor. 2002. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod*. 66:1853-61.
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)*. 4:581-96.
- Bachvarova, R.F. 1992. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell*. 69:895-7.
- Badr, H., G. Bongioni, A.S. Abdoon, O. Kandil, and R. Puglisi. 2007. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*. 15:355-67.
- Barnes, F.L., and N.L. First. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 29:117-23.
- Baumann, C.G., D.G. Morris, J.M. Sreenan, and H.J. Leese. 2007. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev*. 74:1345-53.
- Bavister, B.D. 2002. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*. 124:181-96.
- Beier, H.M. 1998. Entwicklung und Differenzierung des Embryos. *Gynäkologie*. 31:307-315.
- Berg, U.a.B., G. 1989. In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilisation of oocytes and subsequent in vitro culture. *Zuchthygiene*. 24:134 - 139.
- Bettegowda, A., O.V. Patel, J.J. Ireland, and G.W. Smith. 2006. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone

- H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev.* 73:267-78.
- Bettegowda, A., and G.W. Smith. 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci.* 12:3713-26.
- Betts, D.H., and W.A. King. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology.* 55:171-91.
- Bilodeau-Goeseels, S., and G.A. Schultz. 1997a. Changes in ribosomal ribonucleic acid content within in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod.* 56:1323-9.
- Bilodeau-Goeseels, S., and G.A. Schultz. 1997b. Changes in the relative abundance of various housekeeping gene transcripts in in vitro-produced early bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 47:413-20.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-55.
- Blank, M., and Y. Shiloh. 2007. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle.* 6:686-95.
- Boelhauve, M., F. Sinowatz, E. Wolf, and F.F. Paula-Lopes. 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod.* 73:737-44.
- Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans, and M.A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 27:147-58.
- Bratton, S.B., J. Lewis, M. Butterworth, C.S. Duckett, and G.M. Cohen. 2002. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 9:881-92.
- Brevini, T.A., F. Cillo, S. Antonini, V. Tosetti, and F. Gandolfi. 2007. Temporal and spatial control of gene expression in early embryos of farm animals. *Reprod Fertil Dev.* 19:35-42.
- Brison, D.R., and R.M. Schultz. 1998. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. *Biol Reprod.* 59:136-44.
- Bromberg, J. 2000. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Res.* 2:86-90.
- Bromberg, J., and J.E. Darnell, Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 19:2468-73.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:269-90.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25:169-93.

- Bustin, S.A., V. Benes, T. Nolan, and M.W. Pfaffl. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol.* 34:597-601.
- Byrne, A.T., J. Southgate, D.R. Brison, and H.J. Leese. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil.* 117:97-105.
- Byrne, A.T., J. Southgate, D.R. Brison, and H.J. Leese. 2002a. Effects of insulin-like growth factors I and II on tumour-necrosis-factor-alpha-induced apoptosis in early murine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 14:79-83.
- Byrne, A.T., J. Southgate, D.R. Brison, and H.J. Leese. 2002b. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev.* 62:489-95.
- Castedo, M., J.L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema, and G. Kroemer. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 23:2825-37.
- Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature.* 184(Suppl 7):466-7.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Cikala, M., B. Wilm, E. Hobmayer, A. Bottger, and C.N. David. 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol.* 9:959-62.
- Corcoran, D., T. Fair, S. Park, D. Rizos, O.V. Patel, G.W. Smith, P.M. Coussens, J.J. Ireland, M.P. Boland, A.C. Evans, and P. Lonergan. 2006. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction.* 131:651-60.
- Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 22:8590-607.
- de la Monte, S.M., Y.K. Sohn, N. Ganju, and J.R. Wands. 1998. P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab Invest.* 78:401-11.
- Dekel, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 234:19-25.
- Deveraux, Q.L., and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-52.
- Diaz-Cueto, L., and G.L. Gerton. 2001. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res.* 32:619-26.
- Donovan, M., and T.G. Cotter. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1644:133-47.
- Draker, R., and P. Cheung. 2009. Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z. *Biochem Cell Biol.* 87:19-25.



- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.
- Ducibella, T., S. Kurasawa, P. Duffy, G.S. Kopf, and R.M. Schultz. 1993. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol Reprod*. 48:1251-7.
- Ducibella, T., T. Ukena, M. Karnovsky, and E. Anderson. 1977. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol*. 74:153-67.
- Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 68:383-424.
- Evsikov, A.V., J.H. Graber, J.M. Brockman, A. Hampl, A.E. Holbrook, P. Singh, J.J. Eppig, D. Solter, and B.B. Knowles. 2006. Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes Dev*. 20:2713-27.
- Exley, G.E., C. Tang, A.S. McElhinny, and C.M. Warner. 1999. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 61:231-9.
- Faast, R., V. Thonglairoam, T.C. Schulz, J. Beall, J.R. Wells, H. Taylor, K. Matthaei, P.D. Rathjen, D.J. Tremethick, and I. Lyons. 2001. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*. 11:1183-7.
- Fabian, D., J. Koppel, and P. Maddox-Hyttel. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. 64:221-31.
- Fair, T., P. Hyttel, and T. Greve. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*. 42:437-42.
- Farin, P.W., A.E. Crosier, and C.E. Farin. 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*. 55:151-70.
- Farin, P.W., B.D. Slenning, and J.H. Britt. 1999. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*. 52:659-70.
- Fernandez-Gonzalez, R., M.A. Ramirez, A. Bilbao, F.R. De Fonseca, and A. Gutierrez-Adan. 2007. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev*. 74:1149-56.
- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*. 50:225-32.
- Frei, R.E., G.A. Schultz, and R.B. Church. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil*. 86:637-41.

- Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493-501.
- Gjorret, J.O., D. Fabian, B. Avery, and P. Maddox-Hyttel. 2007. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 74:961-71.
- Gjorret, J.O., H.M. Knijn, S.J. Dieleman, B. Avery, L.I. Larsson, and P. Maddox-Hyttel. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* 69:1193-200.
- Goossens, K., M. Van Poucke, A. Van Soom, J. Vandesompele, A. Van Zeveren, and L.J. Peelman. 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine pre-implantation embryos. *BMC Dev Biol.* 5:27.
- Grasl-Kraupp, B., B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch, and R. Schulte-Hermann. 1995. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 21:1465-8.
- Green, D.R. 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell.* 94:695-8.
- Green, D.R., and J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-12.
- Grimm, S. 2003. Programmierter Zelltod. Die Apoptose. *Chemie in unserer Zeit.* 37:172-178.
- Groisman, I., M.Y. Jung, M. Sarkissian, Q. Cao, and J.D. Richter. 2002. Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell.* 109:473-83.
- Gualtieri, R., and R. Talevi. 2003. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction.* 125:251-8.
- Gutierrez-Adan, A., D. Rizos, T. Fair, P.N. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente, M.P. Boland, and P. Lonergan. 2004. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev.* 68:441-8.
- Haaf, T. 2001. The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo. *Chromosome Res.* 9:263-71.
- Habermann, F.A., A. Wuensch, F. Sinowatz, and E. Wolf. 2007. Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. *Theriogenology.* 68 Suppl 1:S116-24.
- Hake, L.E., and J.D. Richter. 1997. Translational regulation of maternal mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 1332:M31-8.
- Hamatani, T., M.G. Carter, A.A. Sharov, and M.S. Ko. 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell.* 6:117-31.

- Handyside, A.H., and S. Hunter. 1986. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Arch Dev Biol.* 195:519-526.
- Harlin, H., S.B. Reffey, C.S. Duckett, T. Lindsten, and C.B. Thompson. 2001. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 21:3604-8.
- Hatch, C.L., and W.M. Bonner. 1990. The human histone H2A.Z gene. Sequence and regulation. *J Biol Chem.* 265:15211-8.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-6.
- Heyman, Y. 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 45:353-61.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh, and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 10:413-7.
- Holm, P., P.J. Booth, and H. Callesen. 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction.* 123:553-65.
- Hyttel, P., H. Callesen, and T. Greve. 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil.* 76:645-56.
- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., and Schmidt, M. 1991. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology.* 35:91-108.
- Hyttel, P., J. Laurincik, D. Viuff, T. Fair, V. Zakhartchenko, C. Rosenkranz, B. Avery, D. Rath, H. Niemann, P.D. Thomsen, K. Schellander, H. Callesen, E. Wolf, R.L. Ochs, and T. Greve. 2000. Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci.* 60-61:49-60.
- Hyttel, P., D. Viuff, B. Avery, J. Laurincik, and T. Greve. 1996. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 108:263-70.
- Hyttel, P., D. Viuff, T. Fair, J. Laurincik, P.D. Thomsen, H. Callesen, P.L. Vos, P.J. Hendriksen, S.J. Dieleman, K. Schellander, U. Besenfelder, and T. Greve. 2001. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction.* 122:21-30.
- Hyttel, P., K.P. Xu, S. Smith, H. Callesen, and T. Greve. 1987. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat Embryol (Berl).* 176:35-40.
- Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88:347-54.
- Jimenez, A., N. Madrid-Bury, R. Fernandez, S. Perez-Garnelo, P. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente, and A. Gutierrez-Adan. 2003. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 65:180-7.

- Juriscicova, A., M. Antenos, S. Varmuza, J.L. Tilly, and R.F. Casper. 2003. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 9:133-41.
- Juriscicova, A., K.E. Latham, R.F. Casper, R.F. Casper, and S.L. Varmuza. 1998. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev.* 51:243-53.
- Kanka, J. 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology.* 59:3-19.
- Kawamura, K., J. Fukuda, H. Kodama, J. Kumagai, A. Kumagai, and T. Tanaka. 2001. Expression of Fas and Fas ligand mRNA in rat and human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod.* 7:431-6.
- Kawamura, K., N. Sato, J. Fukuda, H. Kodama, J. Kumagai, H. Tanikawa, Y. Shimizu, and T. Tanaka. 2003. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol.* 256:331-41.
- Kelkar, R.L., S.J. Dharma, and T.D. Nandedkar. 2003. Expression of Fas and Fas ligand protein and mRNA in mouse oocytes and embryos. *Reproduction.* 126:791-9.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.
- Khurana, N.K., and H. Niemann. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.* 62:847-56.
- King, K.L., and J.A. Cidlowski. 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem.* 58:175-80.
- Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 14:5579-88.
- Knijn, H.M., C. Wrenzycki, P.J. Hendriksen, P.L. Vos, E.C. Zeinstra, G.C. van der Weijden, H. Niemann, and S.J. Dieleman. 2005. In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 17:775-84.
- Knoll, M., and E. Ruska. 1932. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik.* 78:318-339.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Koths, D.J. Kwiatkowski, and L.T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278:294-8.
- Kroemer, G., W.S. El-Deiry, P. Golstein, M.E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M.V. Blagosklonny, W. Malorni, R.A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, and G.

- Melino. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2:1463-7.
- Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J.L. Vayssiere, and B. Mignotte. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9:1277-87.
- Kruip, T., and J.H. Den Daas. 1997. In vitro Produced and Cloned Embryos: Effects on Pregnancy, Parturition and Offspring. *Theriogenology.* 47:43-52.
- Lackner, D.H., and J. Bahler. 2008. Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol.* 271:199-251.
- Laurincik, J., P.D. Thomsen, A. Hay-Schmidt, B. Avery, T. Greve, R.L. Ochs, and P. Hyttel. 2000. Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biol Reprod.* 62:1024-32.
- Lazzari, G., C. Wrenzycki, D. Herrmann, R. Duchi, T. Kruip, H. Niemann, and C. Galli. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.* 67:767-75.
- Leibfried, L., and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci.* 48:76-86.
- Lequarre, A.S., J.M. Feugang, O. Malhomme, I. Donnay, A. Massip, F. Dessy, and A. Van Langendonck. 2001. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol Reprod Dev.* 58:45-53.
- Liu, H.C., Z.Y. He, C.A. Mele, L.L. Veeck, O. Davis, and Z. Rosenwaks. 2000. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet.* 17:521-33.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.
- Lonergan, P., T. Fair, D. Corcoran, and A.C. Evans. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology.* 65:137-52.
- Lonergan, P., D. Rizos, A. Gutierrez-Adan, P.M. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente, and M.P. Boland. 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod.* 69:1424-31.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94:481-90.
- Maj, T., and A. Chelmonska-Soyta. 2007. Pleiotropy and redundancy of STAT proteins in early pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 42:343-53.

- Mamo, S., A.B. Gal, S. Bodo, and A. Dinnyes. 2007. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol.* 7:14.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, and D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-56.
- Matwee, C., D.H. Betts, and W.A. King. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote.* 8:57-68.
- McStay, B., and I. Grummt. 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:131-57.
- Melino, G., R.A. Knight, and D.R. Green. 2001. Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ.* 8:1-3.
- Melino, G., R.A. Knight, and P. Nicotera. 2005. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2:1457-62.
- Memili, E., T. Dominko, and N.L. First. 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 51:36-41.
- Memili, E., and N.L. First. 1998. Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol Reprod Dev.* 51:381-9.
- Memili, E., and N.L. First. 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod.* 61:1198-207.
- Merton, J.S., A.P. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh, L. Kaal, P.L. Vos, and S.J. Dieleman. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology.* 59:651-74.
- Metcalf, A.D., H.R. Hunter, D.J. Bloor, B.A. Lieberman, H.M. Picton, H.J. Leese, S.J. Kimber, and D.R. Brison. 2004. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Mol Reprod Dev.* 68:35-50.
- Minsky, M. 1961. Microscopy Apparatus, USA.
- Misirlioglu, M., G.P. Page, H. Sagirkaya, A. Kaya, J.J. Parrish, N.L. First, and E. Memili. 2006. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18905-10.
- Motlik, J., V. Kopečný, P. Trávník, and J. Pivko. 1984. RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biol Cell.* 50:229-35.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
- Neuber, E., C.M. Luetjens, A.W. Chan, and G.P. Schatten. 2002. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology.* 57:2193-202.
- Niemann, H., C. Wrenzycki, A. Lucas-Hahn, T. Brambrink, W.A. Kues, and J.W. Carnwath. 2002. 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.
- Nino-Soto, M.I., P.K. Basrur, and W.A. King. 2007. Impact of in vitro production techniques on the expression of X-linked genes in bovine (*bos taurus*) oocytes and pre-attachment embryos. *Mol Reprod Dev.* 74:144-53.
- Nothias, J.Y., S. Majumder, K.J. Kaneko, and M.L. DePamphilis. 1995. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem.* 270:22077-80.
- Park, S.Y., E.Y. Kim, K. Jeon, X.S. Cui, W.D. Lee, N.H. Kim, S.P. Park, and J.H. Lim. 2007. Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 74:582-90.
- Paula-Lopes, F.F., and P.J. Hansen. 2002. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:37-42.
- Pellestor, F. 1995. The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos. *Hum Reprod Update.* 1:581-5.
- Pique, M., J.M. Lopez, S. Foissac, R. Guigo, and R. Mendez. 2008. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell.* 132:434-48.
- Plante, L., C. Plante, D.L. Shepherd, and W.A. King. 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev.* 39:375-83.
- Pomar, F.J., K.J. Teerds, A. Kidson, B. Colenbrander, T. Tharasanit, B. Aguilar, and B.A. Roelen. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology.* 63:2254-68.
- Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 135:1441-55.
- Reed, J.C. 1995. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol.* 7:541-6.
- Reichenbach, H.-D. 2003. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31:28-50.

- Richter, J.D. 2008. Breaking the code of polyadenylation-induced translation. *Cell*. 132:335-7.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, P. Moreira, C. O'Meara, T. Fair, A.C. Evans, M.P. Boland, and P. Lonergan. 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. *Mol Reprod Dev*. 69:381-6.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De La Fuente, M.P. Boland, and P. Lonergan. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 68:236-43.
- Rizos, D., P. Lonergan, M.P. Boland, R. Arroyo-Garcia, B. Pintado, J. de la Fuente, and A. Gutierrez-Adan. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*. 66:589-95.
- Robert, C., S. McGraw, L. Massicotte, M. Pravetoni, F. Gandolfi, and M.A. Sirard. 2002. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 67:1465-72.
- Robertson I, N.R. 1998. Certification of the embryo  
103-134 pp.
- Rubio Pomar, F.J., B.A. Roelen, K.A. Slot, H.T. van Tol, B. Colenbrander, and K.J. Teerds. 2004. Role of Fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes in vitro. *Biol Reprod*. 71:790-6.
- Ruska, E. 1987. Nobel lecture. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Biosci Rep*. 7:607-29.
- Rüsse, I., and F. Sinowatz. 1998. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Blackwell Science.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Schier, A.F. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*. 316:406-7.
- Spanos, S., S. Rice, P. Karagiannis, D. Taylor, D.L. Becker, R.M. Winston, and K. Hardy. 2002. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction*. 124:353-63.
- Stanton, J.A., A.B. Macgregor, and D.P. Green. 2003. Gene expression in the mouse preimplantation embryo. *Reproduction*. 125:457-68.
- Stitzel, M.L., and G. Seydoux. 2007. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science*. 316:407-8.



- Stojkovic, M., S.A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P.B. Goncalves, and E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.* 64:904-9.
- Sudheer, S., and J. Adjaye. 2007. Functional genomics of human pre-implantation development. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 6:120-32.
- Tadros, W., A.L. Goldman, T. Babak, F. Menzies, L. Vardy, T. Orr-Weaver, T.R. Hughes, J.T. Westwood, C.A. Smibert, and H.D. Lipshitz. 2007. SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell.* 12:143-55.
- Tadros, W., and H.D. Lipshitz. 2005. Setting the stage for development: mRNA translation and stability during oocyte maturation and egg activation in *Drosophila*. *Dev Dyn.* 232:593-608.
- Takahashi, I., E. Kobayashi, H. Nakano, C. Murakata, H. Saitoh, K. Suzuki, and T. Tamaoki. 1990. Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther.* 255:1218-21.
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3801-4.
- Telford, N.A., A.J. Watson, and G.A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 26:90-100.
- Thambirajah, A.A., A. Li, T. Ishibashi, and J. Ausio. 2009. New developments in post-translational modifications and functions of histone H2A variants. *Biochem Cell Biol.* 87:7-17.
- Thibier, M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev.* 45:235-42.
- Tsafriiri, A., M.E. Lieberman, K. Ahren, and H.R. Lindner. 1976. Dissociation between LH-induced aerobic glycolysis and oocyte maturation in cultured Graafian follicles of the rat. *Acta Endocrinol (Copenh).* 81:362-6.
- Van Blerkom, J. 2004. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction.* 128:269-80.
- Van Blerkom, J., P. Davis, and S. Alexander. 2000. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod.* 15:2621-33.

- van Soom, A., M.T. Ysebaert, and A. de Kruif. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 47:47-56.
- van Wagtenonk-de Leeuw, A.M., E. Mullaart, A.P. de Roos, J.S. Merton, J.H. den Daas, B. Kemp, and L. de Ruigh. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology.* 53:575-97.
- Vandaele, L., K. Goossens, L. Peelman, and A. Van Soom. 2008. mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci.* 106:168-73.
- Vandaele, L., B. Mateusen, D. Maes, A. de Kruif, and A. Van Soom. 2006. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? *Theriogenology.* 65:1691-703.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034.
- Vardy, L., and T.L. Orr-Weaver. 2007. Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. *Trends Cell Biol.* 17:547-54.
- Vasudevan, S., E. Seli, and J.A. Steitz. 2006. Metazoan oocyte and early embryo development program: a progression through translation regulatory cascades. *Genes Dev.* 20:138-46.
- Vaux, D.L., and S.J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell.* 96:245-54.
- Vigneault, C., S. McGraw, L. Massicotte, and M.A. Sirard. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod.* 70:1701-9.
- Viuff, D., B. Avery, T. Greve, W.A. King, and P. Hyttel. 1996. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev.* 43:171-9.
- Viuff, D., T. Greve, B. Avery, P. Hyttel, P.B. Brockhoff, and P.D. Thomsen. 2000. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol Reprod.* 63:1143-8.
- Viuff, D., P.J. Hendriksen, P.L. Vos, S.J. Dieleman, B.M. Bibby, T. Greve, P. Hyttel, and P.D. Thomsen. 2001. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. *Biol Reprod.* 65:204-8.
- Warner, C.M., G.E. Exley, A.S. McElhinny, and C. Tang. 1998. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. *J Exp Zool.* 282:272-9.
- Warzych, E., J. Peippo, M. Szydlowski, and D. Lechniak. 2007. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci.* 97:334-43.

- Wassarman, P.M., W.J. Josefowicz, and G.E. Letourneau. 1976. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J Cell Sci.* 22:531-45.
- Weil, M., M.D. Jacobson, H.S. Coles, T.J. Davies, R.L. Gardner, K.D. Raff, and M.C. Raff. 1996. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol.* 133:1053-9.
- White, J.G., W.B. Amos, and M. Fordham. 1987. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol.* 105:41-8.
- Wolf, E., G.J. Arnold, S. Bauersachs, H.M. Beier, H. Blum, R. Einspanier, T. Frohlich, A. Herrler, S. Hiendleder, S. Kolle, K. Prella, H.D. Reichenbach, M. Stojkovic, H. Wenigerkind, and F. Sinowatz. 2003. Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Domest Anim.* 38:276-89.
- Wrenzycki, C. 2007. Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie.* 4:234-239.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskinetepe, A. Martins, Jr., S. Sirisathien, B. Brackett, and H. Niemann. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 16:893-901.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, A. Lucas-Hahn, K. Korsawe, E. Lemme, and H. Niemann. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev.* 17:23-35.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, A. Lucas-Hahn, E. Lemme, K. Korsawe, and H. Niemann. 2004. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci.* 82-83:593-603.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284:555-6.
- Wyllie, A.H. 1995. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 5:97-104.
- Yang, H.W., K.J. Hwang, H.C. Kwon, H.S. Kim, K.W. Choi, and K.S. Oh. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod.* 13:998-1002.
- Yang, M.Y., and R. Rajamahendran. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim Reprod Sci.* 70:159-69.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis, and H.R. Horvitz. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 75:641-52.

---

Zheng, T.S., S. Hunot, K. Kuida, and R.A. Flavell. 1999. Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* 6:1043-53.

Ziegler, U., and P. Groscurth. 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 19:124-8.

## 8 ANHANG

### 8.1 Herstellung von IVP-Stamm-Medien

Die Herstellung der IVP-Stamm-Medien erfolgte mit steril filtriertem Reinstwasser (Milli-RO Plus 60, Millipore, Schwalbach, Deutschland). Nach Einstellung der Osmolarität und Sterilfiltration waren die Stamm-Medien bei 5 °C Lagerung einen Monat haltbar. Die in Material und Methoden (siehe Kapitel 3.2.1) genannten IVP-Medien wurden 1 - 2 h vor Gebrauch frisch hergestellt, steril filtriert und bei 37 °C vorinkubiert.

#### Material und Geräte:

- Östrogen-Rinderserum (OCS): Eigenproduktion am Institut für molekulare Tierzucht
- Einmalspritzen ERSTA, 5 ml (*Kat.-Nr. 10020010, Zefa, Deutschland*)
- Millex GP Filtereinheit, 0,22 µm (*Kat.-Nr. Z.SLGV025LS, Zefa, Deutschland*)
- Osmometer, Digital L (*Roebing, Deutschland*)
- pH-Messgerät, pH 96 (*WTW, Deutschland*)
- Analysenwaage (*Satorius, Deutschland*)

**Tabelle 31: Modifiziertes Parker-Medium (MPM), 280 - 300 mOsm**

| Chemikalien  | Menge  |
|--|--------|
| <b>Lösung 1:</b>                                       |        |
| Kalzium-Lactat ( <i>Sigma, K-4388</i> )                | 60 mg  |
| H <sub>2</sub> O                                       | 10 ml  |
| <b>Lösung 2:</b>                                       |        |
| NaHCO <sub>3</sub> ( <i>Sigma, N-5761</i> )            | 300 mg |
| Hepes ( <i>Sigma, H-3375</i> )                         | 140 mg |
| Pyruvat ( <i>Sigma, P-2256</i> )                       | 25 mg  |
| Gentamycin ( <i>Sigma, G-1264</i> )                    | 110 µl |
| Medium 199 mit L-Glutamin ( <i>Invitrogen, 21180</i> ) | 100 ml |
| <b>Lösung 3:</b>                                       |        |
| Lösung 1   | 10 ml  |
| Lösung 2   | 100 ml |

**Tabelle 32: Modifiziertes Tyrode's Medium für Sperm-TALP; pH 7,4 und 300 mOsm**

| Chemikalien  | Menge (mg)   |
|--|--------------|
| NaCl ( <i>Sigma, S-5886</i> )  | 580,0        |
| NaHCO <sub>3</sub> ( <i>Sigma, S-5761</i> )                                | 209,0        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, S-9638</i> ) | 4,0          |
| Hepes ( <i>Sigma, H-6147</i> )   | 238,0        |
| Phenol Rot ( <i>Sigma, P-4633</i> )  | 1,0          |
| Na-Lactat Sirup 60% ( <i>Sigma, L-4263</i> )                               | 365,0 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, M-2393</i> )            | 31,0         |
| CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, C-7902</i> )            | 38,4         |
| H <sub>2</sub> O   | auf 100,0 ml |

**Tabelle 33: Modifiziertes Tyrode's Medium für Fert-TALP; 280 - 300 mOsm**

| Chemikalien  | Menge (mg)   |
|--|--------------|
| NaCl ( <i>Sigma, S-5886</i> )  | 666,0        |
| KCL ( <i>Sigma, P-5405</i> )   | 23,5         |
| NaHCO <sub>3</sub> ( <i>Sigma, S-5761</i> )                                  | 210,3        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, S-9638</i> ) | 4,7          |
| Penicillin G ( <i>Sigma, P-4687</i> )  | 6,5          |
| Phenol Rot ( <i>Sigma, P-4633</i> )  | 1,0          |
| 60% Na-Lactat Sirup ( <i>Sigma, L-4263</i> )                                 | 186,0 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, M-2393</i> )              | 10,0         |
| CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, C-7902</i> )              | 39,7         |
| H <sub>2</sub> O   | auf 100,0 ml |

**Tabelle 34: SOF (Synthetic oviduct fluid); pH 7,2 - 7,3 und 270 - 280 mOsm**

| Chemikalien   | Menge (mg)   |
|---|--------------|
| NaCl ( <i>Sigma, S-5886</i> )                                   | 629,2        |
| KCL ( <i>Sigma, P-5405</i> )                                    | 53,4         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( <i>Sigma, P-8416</i> )        | 16,2         |
| CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, C-7902</i> ) | 24,8         |
| MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, M-2393</i> ) | 9,6          |
| NaHCO <sub>3</sub> ( <i>Sigma, S-5761</i> )                     | 210,6        |
| Phenol Rot ( <i>Sigma, P-4633</i> )                             | 0,14         |
| Na-Pyruvat ( <i>Sigma, S-4562</i> )                             | 36,3         |
| L-Glutamin ( <i>Invitrogen, 25030-032</i> )                     | 500,0 µl     |
| 60% Na-Lactat Sirup ( <i>Sigma, L-4263</i> )                    | 47,1 µl      |
| H <sub>2</sub> O  | auf 100,0 ml |

**Tabelle 35: 1x Phosphat-Puffer; pH 7,4 und 280 mOsm**

| Chemikalien  | Menge (mg)    |
|--|---------------|
| NaCl ( <i>Sigma, S-5886</i> )  | 8,0           |
| KCl ( <i>Sigma, P-5405</i> )   | 0,2           |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, S-9638</i> ) | 1,15          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( <i>Sigma, P-8416</i> )                       | 0,2           |
| CaCl <sub>2</sub>  | 0,1           |
| MgCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O ( <i>Sigma, M-2393</i> )                | 0,1           |
| H <sub>2</sub> O   | auf 1000,0 ml |

## 8.2 Quantitative Parameter der Embryo-Gewinnung

Tabelle 36: *In vitro* Produktion von Rinderembryonen

| Zeitpunkt* | Versuch             | Ovarien | Eizellen <sup>1</sup> | UFOs <sup>2</sup> | ≥ 2-Zeller | T-Rate <sup>3</sup> | B-Rate <sup>4</sup> |
|------------|---------------------|---------|-----------------------|-------------------|------------|---------------------|---------------------|
| 3 (72)     | 1                   | 20      | 126                   | 15                | 111        | 88                  | -                   |
|            | 2                   | 50      | 191                   | 49                | 142        | 74                  | -                   |
|            | 3                   | 50      | 197                   | 45                | 152        | 77                  | -                   |
|            | gesamt <sup>Δ</sup> | 120     | 514                   | 109               | 405        | 80                  | -                   |
| 4 (96)     | 1                   | 85      | 268                   | 24                | 244        | 91                  | -                   |
|            | 2                   | 80      | 335                   | 25                | 310        | 93                  | -                   |
|            | 3                   | 50      | 240                   | 34                | 206        | 86                  | -                   |
|            | gesamt              | 215     | 843                   | 83                | 760        | 90                  | -                   |
| 5 (120)    | 1                   | 80      | 302                   | 39                | 263        | 87                  | -                   |
|            | 2                   | 90      | 380                   | 35                | 346        | 91                  | -                   |
|            | 3                   | 90      | 380                   | 39                | 345        | 91                  | -                   |
|            | 4                   | 75      | 182                   | 19                | 163        | 89                  | -                   |
|            | gesamt              | 335     | 1.244                 | 132               | 1.117      | 90                  | -                   |
| 6 (144)    | 1                   | 85      | 383                   | 56                | 327        | 85                  | 31                  |
|            | 2                   | 100     | 325                   | 27                | 298        | 92                  | 30                  |
|            | 3                   | 80      | 298                   | 36                | 262        | 88                  | 19                  |
|            | gesamt              | 265     | 1.006                 | 119               | 887        | 88                  | 27                  |
| 7 (168)    | 1                   | 90      | 210                   | 19                | 191        | 91                  | 53                  |
|            | 2                   | 100     | 355                   | 30                | 325        | 92                  | 31                  |
|            | 3                   | 80      | 198                   | 18                | 180        | 91                  | 31                  |
|            | 4                   | 50      | 236                   | 22                | 214        | 91                  | 33                  |
|            | gesamt              | 320     | 999                   | 89                | 910        | 91                  | 37                  |

\*Tag (Stunden) nach Zugabe der Spermien zu den *in vitro* gereiften Eizellen; <sup>Δ</sup>Summe bzw. Mittelwert; <sup>1</sup>potentiell befruchtete Eizellen für die *in vitro* Kultur, <sup>2</sup> UFOs (unfertilized oocytes): nicht befruchtete Eizellen bzw. nicht geteilte Zygoten; <sup>3</sup> Teilungsrate (T-Rate, %): ≥ 2-Zell-Embryonen am Tag 3 nach IVF, Blastozysten-Rate (B-Rate, %): Blastozystenstadien am Tag 7 nach IVF



**Tabelle 37: Gewinnung von *in vivo* Rinderembryonen**

| Spendertier | Versuch | Anzahl isolierter Eizellen/Embryonalstadien |                   |                          |        |             |
|-------------|---------|---|-------------------|--------------------------|--------|-------------|
|             |         | Gesamt                                      | UFOs <sup>1</sup> | degeneriert <sup>2</sup> | Morula | Blastozyste |
| 1           | 1       | 0   | 0                 | 0                        | 0      | 0           |
|             | 2       | 9   | 2                 | 0                        | 3      | 4           |
| 2           | 1       | 5   | 2                 | 0                        | 2      | 1           |
|             | 2       | 17  | 0                 | 1                        | 7      | 9           |
| 3           | 1       | 20  | 2                 | 0                        | 4      | 14          |
|             | 2       | 16  | 1                 | 5                        | 5      | 5           |
| 4           | 1       | 9   | 4                 | 0                        | 3      | 2           |
|             | 2       | 9   | 4                 | 0                        | 0      | 5           |
| 5           | 1       | 7   | 0                 | 0                        | 3      | 4           |
|             | 2       | 11  | 0                 | 1                        | 8      | 2           |
| 6           | 1       | 14  | 1                 | 0                        | 1      | 12          |
|             | 2       | 11  | 0                 | 0                        | 6      | 5           |
| 7           | 1       | 5   | 0                 | 5                        | 0      | 0           |
|             | 2       | 2   | 0                 | 2                        | 0      | 0           |
| 8           | 1       | 11  | 7                 | 1                        | 3      | 0           |
|             | 2       | 18  | 8                 | 5                        | 2      | 3           |
| 9           | 1       | 18  | 15                | 1                        | 2      | 0           |
|             | 2       | 8   | 2                 | 0                        | 2      | 4           |
| 10          | 1       | 11  | 0                 | 6                        | 5      | 0           |
|             | 2       | 18  | 8                 | 5                        | 5      | 0           |

<sup>1</sup>UFOs (unfertilized oocytes): nicht befruchtete Eizellen bzw. nicht geteilte Zygoten, <sup>2</sup> degenerierte (tote) Embryonen

### 8.3 Transkript-Abundanzen (absolute Kopienzahlen)

#### 8.3.1 Externer Standard

**Tabelle 38: Kopienzahl von Hämoglobin- $\alpha$  (HBA) in Rinder-Eizellen**

| Biologisches Replikat* | qPCR-Reaktion | Kopienzahl (%) <sup>□</sup>    |
|------------------------|---------------|--------------------------------|
| 1                      | 1             | 10.030 (31)                    |
|                        | 2             | 11.890 (37)                    |
|                        | 3             | 10.373 (32)                    |
| 2                      | 4             | 7.160 (22)                     |
|                        | 5             | 9.440 (29)                     |
|                        | 6             | 9.185 (29)                     |
| 3                      | 7             | 7.320 (23)                     |
|                        | 8             | 7.220 (23)                     |
|                        | 9             | 7.820 (24)                     |
| Mittelwert             |               | 8.940 $\pm$ 1.815 (28 $\pm$ 5) |

\*9 Proben von jeweils 10 *in vitro* gereiften Eizellen - 3 biologische Replikate mit jeweils 3facher Wiederholung. Jede qPCR wurde als Triplett-Ansatz durchgeführt. Hämoglobin- $\alpha$  (HBA) mRNA-Konzentration: 0,01 pg bzw. 32.100 Kopien/Eizelle, Zugabe zu jeder Eizell-Probe vor der RNA-Extraktion; <sup>□</sup>in qPCR bestimmte Anzahl HBA-Kopien (prozentuale Anteil an 32.100 Kopien).

## 8.3.2 Referenz-/Apoptose-assoziierte Transkripte

**Tabelle 39: Kopienzahlen spezifischer Transkripte in Rinder-Eizellen/-Embryonen *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>stereomikroskopi-<br>sche Klassifizie-<br>rung | Zellen<br>pro<br>Embryo<br>* | Kopienzahl pro Eizelle/Embryo          |  |  |
|--|------------------------------|--|--|--|
|  |                              | 18S rRNA                               | H2AFZ                                  | STAT3                                  |
| <b>Eizelle</b>   |                              | $1.50 \times 10^8 \pm 4.7 \times 10^7$ | $1.2 \times 10^3 \pm 450$              | $1.7 \times 10^5 \pm 5.0 \times 10^4$  |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>  |                              |  |  |  |
| 2 - 7 Zellen   | 7                            | $0.85 \times 10^8 \pm 6.6 \times 10^7$ | $0.82 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$ | $2.3 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^4$  |
| 8 - 12 Zellen  | 9                            | $0.94 \times 10^8 \pm 2.5 \times 10^7$ | $1.8 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^4$  | $3.0 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$  |
| > 12 Zellen  | 15                           | $0.83 \times 10^8 \pm 3.8 \times 10^7$ | $1.6 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$  | $2.2 \times 10^4 \pm 7.4 \times 10^3$  |
| gesamt <sup>Δ</sup>  | 10                           | $0.87 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^7$ | $1.5 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$  | $2.5 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$  |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>  |                              |  |  |  |
| 6 - 12 Zellen  | 12                           | $0.54 \times 10^8 \pm 0.6 \times 10^7$ | $0.37 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$ | $0.8 \times 10^4 \pm 3.6 \times 10^3$  |
| 13 - 20 Zellen   | 17                           | $0.93 \times 10^8 \pm 9.1 \times 10^7$ | $0.22 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^3$ | $0.55 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^3$ |
| > 20 Zellen  | 21                           | $0.88 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^7$ | $0.38 \times 10^5 \pm 3.1 \times 10^4$ | $0.71 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^3$ |
| gesamt   | 16                           | $0.78 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^7$ | $0.34 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^4$ | $0.68 \times 10^4 \pm 3.3 \times 10^3$ |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>   |                              |  |  |  |
| 6 - 20 Zellen  | 27                           | $2.3 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^8$  | $0.82 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^4$ | $1.2 \times 10^4 \pm 5.7 \times 10^3$  |
| Morula <sup>+</sup>  | 35                           | $2.4 \times 10^8 \pm 6.3 \times 10^7$  | $1.1 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$  | $1.0 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^3$  |
| komp. Morula   | 47                           | $3.6 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$  | $1.2 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^4$  | $1.6 \times 10^4 \pm 4.8 \times 10^3$  |
| gesamt   | 34                           | $2.8 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$  | $1.0 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^4$  | $1.3 \times 10^4 \pm 4.6 \times 10^3$  |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>   |                              |  |  |  |
| komp. Morula   | 69                           | $3.7 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$  | $0.98 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^4$ | $2.7 \times 10^4 \pm 9.7 \times 10^3$  |
| frühe Blastozyste  | 84                           | $3.9 \times 10^8 \pm 5.2 \times 10^7$  | $1.3 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^4$  | $3.2 \times 10^4 \pm 5.8 \times 10^3$  |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 131                          | $3.4 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^8$  | $0.85 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$ | $1.8 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^3$  |
| gesamt   | 94                           | $3.7 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$  | $1.0 \times 10^5 \pm 4.0 \times 10^4$  | $2.5 \times 10^4 \pm 8.3 \times 10^3$  |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>   |                              |  |  |  |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 120                          | $1.8 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^7$  | $0.48 \times 10^5 \pm 6.6 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^4 \pm 230$              |
| exp. Blastozyste   | 169                          | $4.5 \times 10^8 \pm 2.4 \times 10^8$  | $0.89 \times 10^5 \pm 4.1 \times 10^4$ | $2.4 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$  |
| schl. Blastozyste  | 218                          | $6.5 \times 10^8 \pm 4.0 \times 10^8$  | $1.4 \times 10^5 \pm 7.8 \times 10^4$  | $3.2 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$  |
| gesamt   | 162                          | $4.3 \times 10^8 \pm 3.1 \times 10^8$  | $0.91 \times 10^5 \pm 5.8 \times 10^4$ | $2.3 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$  |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten je Entwicklungsstadium; \*Mittelwert zur Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle; <sup>Δ</sup>Mittelwert aus den drei Entwicklungsstadien pro Untersuchungszeitpunkt; <sup>+</sup>pre-kompaktiert; <sup>°</sup>nicht-expandiert; Abkürzungen: komp. - kompaktiert, exp. - expandiert, schl. - schlüpfend

**Tabelle 40: Kopienzahlen spezifischer Transkripte in Rinder-Eizellen/-Embryonen *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>stereomikroskopi-<br>sche Klassifizie-<br>rung | Zellen<br>pro<br>Embryo<br>* | Kopienzahl pro Eizelle/Embryo         |                                       |                                       |
|--|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|  |                              | BAX                                   | CASP3                                 | CASP9                                 |
| <b>Eizelle</b>   |                              | $4.1 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^3$ | $930 \pm 650$                         | $1.6 \times 10^3 \pm 700$             |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>  |                              |                                       |                                       |                                       |
| 2 - 7 Zellen   | 7                            | <i>n.d.</i>                           | <i>n.d.</i>                           | <i>n.d.</i>                           |
| 8 - 12 Zellen  | 9                            | $660 \pm 280$                         | $790 \pm 490$                         | $430 \pm 120$                         |
| > 12 Zellen  | 15                           | $470 \pm 220$                         | $750 \pm 100$                         | $400 \pm 170$                         |
| gesamt <sup>Δ</sup>  | 10                           | $560 \pm 250$                         | $880 \pm 400$                         | $420 \pm 140$                         |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>  |                              |                                       |                                       |                                       |
| 6 - 12 Zellen  | 12                           | $340 \pm 110$                         | $640 \pm 150$                         | $220 \pm 10$                          |
| 13 - 20 Zellen   | 17                           | $370 \pm 160$                         | $750 \pm 340$                         | $300 \pm 120$                         |
| > 20 Zellen  | 21                           | <i>n.d.</i>                           | $760 \pm 130$                         | $320 \pm 200$                         |
| gesamt   | 16                           | $355 \pm 123$                         | $720 \pm 200$                         | $290 \pm 130$                         |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>   |                              |                                       |                                       |                                       |
| 6 - 20 Zellen  | 27                           | $2.2 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^3 \pm 670$             | $390 \pm 210$                         |
| Morula <sup>+</sup>  | 35                           | $2.3 \times 10^3 \pm 120$             | $1.6 \times 10^3 \pm 310$             | $420 \pm 80$                          |
| komp. Morula   | 47                           | $3.4 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^3$ | $1.7 \times 10^3 \pm 830$             | $520 \pm 240$                         |
| gesamt   | 34                           | $2.6 \times 10^3 \pm 980$             | $1.5 \times 10^3 \pm 610$             | $440 \pm 180$                         |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>   |                              |                                       |                                       |                                       |
| komp. Morula   | 69                           | $4.4 \times 10^3 \pm 3.3 \times 10^3$ | $2.8 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^3$ | $660 \pm 360$                         |
| frühe Blastozyste  | 84                           | $5.7 \times 10^3 \pm 2.4 \times 10^3$ | $3.3 \times 10^3 \pm 300$             | $850 \pm 640$                         |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 131                          | $4.0 \times 10^3 \pm 2.6 \times 10^3$ | $3.5 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$ | $470 \pm 150$                         |
| gesamt   | 94                           | $4.7 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^3$ | $3.2 \times 10^3 \pm 860$             | $660 \pm 410$                         |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>   |                              |                                       |                                       |                                       |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 120                          | $2.5 \times 10^3 \pm 600$             | $1.6 \times 10^3 \pm 580$             | $320 \pm 30$                          |
| exp. Blastozyste   | 169                          | $5.8 \times 10^3 \pm 4.6 \times 10^3$ | $4.0 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^3$ | $810 \pm 230$                         |
| schl. Blastozyste  | 218                          | $17 \times 10^3 \pm 8.6 \times 10^3$  | $5.5 \times 10^3 \pm 3.3 \times 10^3$ | $2.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$ |
| gesamt   | 162                          | $7.4 \times 10^3 \pm 7.5 \times 10^3$ | $3.7 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^3$ | $1.0 \times 10^3 \pm 910$             |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten je Entwicklungsstadium; \*Mittelwert zur Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle; <sup>Δ</sup>Mittelwert aus den drei Entwicklungsstadien pro Untersuchungszeitpunkt; <sup>+</sup>pre-kompaktiert; <sup>°</sup>nicht-expandiert; Abkürzungen: komp. - kompaktiert, exp. - expandiert, schl. - schlüpfend, *n.d.* - nicht detektiert

**Tabelle 41: Kopienzahlen spezifischer Transkripte in Rinder-Eizellen/-Embryonen *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>stereomikroskopi-<br>sche Klassifizierung | Zellen<br>pro<br>Embryo<br>* | Kopienzahl pro Eizelle/Embryo |   |   |
|---|------------------------------|-------------------------------|---|---|
|   |                              | BCL2                          | BCL2L1  | BIRC4   |
| <b>Eizelle</b>  |                              | 360 ± 143                     | 9.3 x 10 <sup>3</sup> ± 3.5 x 10 <sup>3</sup> | 2.2 x 10 <sup>4</sup> ± 8.2 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>                                     |                              |                               |   |   |
| 2 - 7 Zellen  | 7                            | <i>n.d.</i>                   | 7.6 x 10 <sup>3</sup> ± 7.8 x 10 <sup>3</sup> | 960 ± 840                                     |
| 8 - 12 Zellen   | 9                            | 290 ± 95                      | 5.5 x 10 <sup>3</sup> ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> | 740 ± 160                                     |
| > 12 Zellen   | 15                           | <i>n.d.</i>                   | 2.9 x 10 <sup>3</sup> ± 1.5 x 10 <sup>3</sup> | 710 ± 310                                     |
| gesamt <sup>Δ</sup>                                     | 10                           | <i>n.d.</i>                   | 5.0 x 10 <sup>3</sup> ± 3.9 x 10 <sup>3</sup> | 780 ± 390                                     |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>                                     |                              |                               |   |   |
| 6 - 12 Zellen   | 12                           | <i>n.d.</i>                   | 1.4 x 10 <sup>3</sup> ± 330                   | 660 ± 630                                     |
| 13 - 20 Zellen  | 17                           | <i>n.d.</i>                   | 1.5 x 10 <sup>3</sup> ± 1.2 x 10 <sup>3</sup> | 650 ± 640                                     |
| > 20 Zellen   | 21                           | <i>n.d.</i>                   | 1.4 x 10 <sup>3</sup> ± 1.2 x 10 <sup>3</sup> | 780 ± 390                                     |
| gesamt  | 16                           | <i>n.d.</i>                   | 1.4 x 10 <sup>3</sup> ± 870                   | 690 ± 680                                     |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>                                    |                              |                               |   |   |
| 6 - 20 Zellen   | 27                           | <i>n.d.</i>                   | 6.8 x 10 <sup>3</sup> ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> | 530 ± 240                                     |
| Morula <sup>+</sup>                                     | 35                           | <i>n.d.</i>                   | 9.3 x 10 <sup>3</sup> ± 3.3 x 10 <sup>3</sup> | 740 ± 260                                     |
| komp. Morula  | 47                           | <i>n.d.</i>                   | 12 x 10 <sup>3</sup> ± 6.0 x 10 <sup>3</sup>  | 800 ± 200                                     |
| gesamt  | 34                           | <i>n.d.</i>                   | 9.6 x 10 <sup>3</sup> ± 4.3 x 10 <sup>3</sup> | 690 ± 240                                     |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>                                    |                              |                               |   |   |
| komp. Morula  | 69                           | <i>n.d.</i>                   | 6.0 x 10 <sup>3</sup> ± 1.7 x 10 <sup>3</sup> | 4.6 x 10 <sup>3</sup> ± 1.3 x 10 <sup>3</sup> |
| frühe Blastozyste                                       | 84                           | <i>n.d.</i>                   | 7.3 x 10 <sup>3</sup> ± 1.8 x 10 <sup>3</sup> | 5.0 x 10 <sup>3</sup> ± 1.7 x 10 <sup>3</sup> |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                | 131                          | <i>n.d.</i>                   | 5.6 x 10 <sup>3</sup> ± 3.7 x 10 <sup>3</sup> | 4.2 x 10 <sup>3</sup> ± 1.0 x 10 <sup>3</sup> |
| gesamt  | 94                           | <i>n.d.</i>                   | 6.3 x 10 <sup>3</sup> ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> | 4.6 x 10 <sup>3</sup> ± 1.3 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>                                    |                              |                               |   |   |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                | 120                          | <i>n.d.</i>                   | 2.4 x 10 <sup>3</sup> ± 330                   | 2.8 x 10 <sup>3</sup> ± 560                   |
| exp. Blastozyste  | 169                          | <i>n.d.</i>                   | 6.4 x 10 <sup>3</sup> ± 4.3 x 10 <sup>3</sup> | 4.7 x 10 <sup>3</sup> ± 1.9 x 10 <sup>3</sup> |
| schl. Blastozyste                                       | 218                          | <i>n.d.</i>                   | 14 x 10 <sup>3</sup> ± 1.0 x 10 <sup>4</sup>  | 6.2 x 10 <sup>3</sup> ± 2.8 x 10 <sup>3</sup> |
| gesamt  | 162                          | <i>n.d.</i>                   | 7.4 x 10 <sup>3</sup> ± 7.3 x 10 <sup>3</sup> | 4.6 x 10 <sup>3</sup> ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwert ± Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten je Entwicklungsstadium; \*Mittelwert zur Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle; <sup>Δ</sup>Mittelwert aus den drei Entwicklungsstadien pro Untersuchungszeitpunkt; <sup>+</sup>pre-kompaktiert; <sup>°</sup>nicht-expandiert; Abkürzungen: komp. - kompaktiert, exp. - expandiert, schl. - schlüpfend, *n.d.* - nicht detektiert

**Tabelle 42: Kopienzahlen spezifischer Transkripte in Rinder-Eizellen/-Embryonen *in vitro***

| Zeitpunkt/<br>stereomikrosko-<br>pische Klassifi-<br>zierung | Zellen<br>pro<br>Embryo<br>* | Kopienzahl pro Eizelle/Embryo |             |             |
|--|------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
|  |                              | FAS                           | FASLG       | CASP8       |
| <b>Eizelle</b>   |                              | <i>n.d.</i>                   | 370 ± 140   | <i>n.d.</i> |
| <b>Tag 3 (72 h)</b>  |                              |                               |             |             |
| 2 - 7 Zellen   | 7                            | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| 8 - 12 Zellen  | 9                            | <i>n.d.</i>                   | 280 ± 80    | <i>n.d.</i> |
| > 12 Zellen  | 15                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| gesamt <sup>Δ</sup>  | 10                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| <b>Tag 4 (96 h)</b>  |                              |                               |             |             |
| 6 - 12 Zellen  | 12                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| 13 - 20 Zellen   | 17                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| > 20 Zellen  | 21                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| gesamt   | 16                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| <b>Tag 5 (120 h)</b>   |                              |                               |             |             |
| 6 - 20 Zellen  | 27                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| Morula <sup>†</sup>  | 35                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| komp. Morula   | 47                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| gesamt   | 34                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| <b>Tag 6 (144 h)</b>   |                              |                               |             |             |
| komp. Morula   | 69                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| frühe Blastozyste  | 84                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 131                          | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| gesamt   | 94                           | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| <b>Tag 7 (168 h)</b>   |                              |                               |             |             |
| Blastozyste <sup>°</sup>                                     | 120                          | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| exp. Blastozyste   | 169                          | <i>n.d.</i>                   | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| schl. Blastozyste  | 218                          | 540 ± 50                      | <i>n.d.</i> | <i>n.d.</i> |
| gesamt   | 162                          |                               |             |             |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwert ± Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten je Entwicklungsstadium; \*Mittelwert zur Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle; <sup>Δ</sup>Mittelwert aus den drei Entwicklungsstadien pro Untersuchungszeitpunkt; <sup>†</sup>pre-kompaktiert; <sup>°</sup>nicht-expandiert; Abkürzungen: komp. - kompaktiert, exp. - expandiert, schl. - schlüpfend, *n.d.* - nicht detektiert

**Tabelle 43: Transkript-Kopienzahlen in kompaktierten Morulae und frühen Blastozysten beim Rind *in vitro* und *in vivo***

| Transkript | Kopienzahl pro Embryo                 |                                       | Kopienzahl pro intakte Zelle                           |  |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
|            | <i>In vitro</i>                       | <i>In vivo</i>                        | <i>In vitro</i><br>(intakte Zellzahl: 70) <sup>°</sup> | <i>In vivo</i><br>(intakte Zellzahl: 100) <sup>°</sup> |
| 18S rRNA   | $3.7 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$ | $5.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$ | $5.5 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$                  | $5.6 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$                  |
| H2AFZ      | $1.1 \times 10^5 \pm 4.1 \times 10^4$ | $1.0 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$ | $1.6 \times 10^3 \pm 520$                              | $1.0 \times 10^3 \pm 450$                              |
| STAT3      | $2.9 \times 10^4 \pm 7.7 \times 10^3$ | $1.6 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^3$ | $420 \pm 110$ *  | $160 \pm 102$  |
| BAX        | $5.0 \times 10^3 \pm 2.6 \times 10^3$ | $9.0 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$ | $70 \pm 40$  | $90 \pm 52$  |
| CASP3      | $3.1 \times 10^3 \pm 400$ **          | $1.0 \times 10^3 \pm 400$             | $44 \pm 13$ **   | $10 \pm 4$   |
| CASP9      | $750 \pm 480$                         | $900 \pm 520$                         | $11 \pm 6$   | $10 \pm 5$   |
| BCL2       | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>   |
| BCL2L1     | $6.6 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^4 \pm 6.4 \times 10^3$ | $95 \pm 24$  | $120 \pm 57$   |
| BIRC4      | $4.8 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$ | $5.6 \times 10^3 \pm 2.8 \times 10^3$ | $70 \pm 20$  | $56 \pm 28$  |
| FAS        | <i>n. d.</i>                          | $290 \pm 270$                         | <i>n. d.</i>   | $3 \pm 3$  |
| FASLG      | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>   |
| CASP8      | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>                          | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>   |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 6 (*in vitro*)/5 (*in vivo*) qPCR-Reaktionen; <sup>°</sup>Mittelwert zur Berechnung der Kopienzahl pro intakte Zelle; n. d. – nicht detektiert; Nachweis signifikanter Unterschiede mit dem Student's *t*-test bzw. Mann-Whitney *U*-Test: \**P* < 0,05; \*\* *P* < 0,005; H2AFZ-Korrekturfaktor: Multiplikation der *in vitro* Kopienzahlen pro intakte Zelle mit 0,65 (Quotient der Kopienzahl pro intakter Zelle *in vivo* und *in vitro*)

**Tabelle 44: Transkript-Kopienzahlen in Blastozysten/expandierten Blastozysten beim Rind *in vitro* und *in vivo***

| Transkript | Kopienzahl pro Embryo                  |  | Kopienzahl pro intakte Zelle                           |   |
|------------|--|--|--|---|
|            | <i>In vitro</i>                        | <i>In vivo</i>                           | <i>In vitro</i><br>(intakte Zellzah: 128) <sup>°</sup> | <i>In vivo</i><br>(intakte Zellzah: 117) <sup>°</sup> |
| 18S rRNA   | $3.2 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$  | $9.3 \times 10^8 \pm 4.4 \times 10^8$    | $2.5 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^6$                  | $8.0 \times 10^6 \pm 4.4 \times 10^6$                 |
| H2AFZ      | $0.74 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$ | $1.6 \times 10^5 \pm 7.2 \times 10^4$ *  | 570 ± 220  | $1.4 \times 10^3 \pm 620$ *                           |
| STAT3      | $1.8 \times 10^4 \pm 8.6 \times 10^3$  | $1.7 \times 10^4 \pm 9.0 \times 10^3$    | 135 ± 50   | 140 ± 80  |
| BAX        | $0.41 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^3$ *  | 30 ± 20  | 100 ± 40 **   |
| CASP3      | $3.0 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^3$  | $1.3 \times 10^3 \pm 520$ *              | 23 ± 12 *  | 11 ± 4  |
| CASP9      | 530 ± 260                              | $1.6 \times 10^3 \pm 580$ **             | 4 ± 1  | 13 x 5 **   |
| BCL2       | <i>n. d.</i>                           | <i>n. d.</i>                             | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>  |
| BCL2L1     | $0.48 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^3$ | $1.6 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^3$ ** | 36 ± 20  | 130 ± 40 **   |
| BIRC4      | $3.9 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$  | $5.4 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^3$    | 30 ± 10  | 46 ± 13 *   |
| FAS        | <i>n. d.</i>                           | 270 ± 380                                | <i>n. d.</i>   | 2 ± 3   |
| FASLG      | <i>n. d.</i>                           | <i>n. d.</i>                             | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>  |
| CASP8      | <i>n. d.</i>                           | <i>n. d.</i>                             | <i>n. d.</i>   | <i>n. d.</i>  |

Transkript-Kopienzahlen: Mittelwerte ± Standardabweichung aus 6 (*in vitro*)/5 (*in vivo*) qPCR-Reaktionen; <sup>°</sup>Mittelwert zur Berechnung der Kopienzahl pro intakte Zelle; n. d. - nicht detektiert; Nachweis signifikanter Unterschiede mit dem Student's *t*-test bzw. Mann-Whitney *U*-Test: \*P < 0,05; \*\* P < 0,005; H2AFZ-Korrekturfaktor: Multiplikation der *in vitro* Kopienzahlen pro intakte Zelle mit 2,5 (Quotient der Kopienzahl pro intakter Zelle *in vivo* und *in vitro*)



## 8.4 Sequenzanalyse der Transkript-spezifischen DNA-Fragmente

### **BAX (BCL2-associated X protein, Acc.-ID: U92569)**

Primer se GCA GAG GAT GAT CGC AGC TG

Primer as CCA ATG TCC AGC CCA TGA TG

GCAGAGGATGATCGCAGCTGTGGACACAGACTCTCCCCGAGAGGTCTTTTTCCGA  
GTGGCGGCTGAAATGTTTTCTGACGGCAACTTCAACTGGGGCCGGGTTGTCGCCC  
TTTTCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGCTCAAGGCCCTGTGCACCAAGGTGCCCGA  
GTTGATCAGGACCATCATGGGCTGGACATTGG

### **BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2, Acc.-ID: AF515848)**

Primer se CTT CGC CGA GAT GTC CAG TC

Primer as CAC CAC CGT GGC GAA GC

GACTTCTCTCGGCGCTACCGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGTCAGCTGCACCT  
GACGCCCTTCACCGCGAGGGGACGCTTCGCCACGGTGGTG

### **BCL2L1 (BCL2-like 1, Acc.-ID: AB238936)**

Primer se CGT GGA AAG CGT AGA CAA GGA G

Primer as GTA GAG TTC CAC AAA AGT GTC CCA G

CGTGGAAAGCGTAGACAAGGAGATGCAGGTATTGGTGAGTCGGATCGCAACTTGG  
ATGGCCACTTACCTGAATGACCACCTAGAGCCTTGGATCCAGGAGAACGGCGGCT  
GGGACACTTTTGTGGAAGTCTAC

### **BIRC4 (baculoviral IAP repeat-containing 4, Acc.-ID: AF458770)**

Primer se GAAGCACGGATCATTACATTTGG

Primer as CCTTCACCTAAAGCATAAAATCCA

CCTTCACCTAAAGCATAAAATCCAGCTCTCGCAAGCTGCTCCTTGTTAACGGAGTA  
CATCCACGTCCCAAATGTAATGATCCGTGCTTC

**CASP3 (Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase, Acc.-ID: AY575000)**

Primer se CTG GAA AAC CCA AAC TTT TCA TTA TTC

Primer as GCC AGG AAA AGT AAC CAG GTG C

CTGGAAAACCCAAACTTTTCATTATTCAGGCCTGCCGAGGCACAGAACTGGACTG  
TGGTATTGAGACAGACAGTGGTGCTGAGGATGACATGGCCTGTCAGAAAATACCA  
GTTGAGGCAGACTTCTTGTACGCATATTCTACAGCACCTGGTTACTTTTCCTGGC

**CASP8 (Caspase 8, apoptosis related cysteine peptidase, Acc.-ID: AY575000)**

Primer se: GGCCATGTCAGACTCTCCAGAAC

Primer as: CGAAAGGTCTTATCCAAAGCGTC

GGCCATGTCAGACTCTCCAGAACAGGACAGTGAGTTGCAGACATCTGACACAGTT  
TACCGAATGACAAGGAAACCTCGGGGATACTGTTTGATCTTTAACAATTATGATTTT  
AGCATAGCACGGAAGCAGGTGCCTGAACTTCACGACCTTAAGGATAGGACTGGAA  
CAGACTTTGATGCAGACGCTTTGGATAAGACCTTTTCG

**CASP9 (Caspase 9, apoptosis related cysteine peptidase, Acc.-ID: NM\_032996)**

Primer se CGACGCTTCCACCTGCTG

Primer as CACAATTCTCTCGACGGACACAG

CACAATTCTCTCGACGGACACAGGACATCCATCTGTGCCATAAACAGCCCCTGGGA  
ACTGGAGGTGGCTGGCCTGACAGCCGTGAGACAGGATGACCACCATGCAGCAGTC  
CAGAGCGCTGTGGTCCTGCCGCGCCAGCTGCATCAAAGCCTGGACCATTTGCTTG  
GCAGTCAGGTCACATTTACCTCCACCACAACTGCAGCAGGTGGAAGCGTCG

**FAS (TNF receptor superfamily, member 6, Acc.-ID: U34794)**

Primer se GCA ACT CTG CAG CCT CAA ATG

Primer as CAT CTA TTT TGG CTT CCT CCA TAC C

GCAACTCTGCAGCCTCAAATGATGAAGGGAGGCAACTGAATTTAACAGATGTTGA  
CTTGGGTAAATATATCCCTAGTATTGCTGAACAAATGAGAATAACTGAAGTTAAAGA  
GTTTRTTCCGGAAGAACGGTATGGAGGAAGCCAAAATAGATG

**FASLG (Fas ligand, TNF superfamily, Acc.-ID AB035802)**

Primer se TCC ACC AGC CAA AGG CAT AC

Primer as GAT GGA TCT TGA GTT GAG CTT GC

GATGGATCTTGAGTTGAGCTTGCCTGTTGAATGAGCTGCTTTTTTCAGTTCCTTTTT  
CTCAGAGGGTGGACTGGGGTGACCTATTTGCTTCTCAAAGATGATGCTGTATGCC  
TTGGCTGGTGGA

**STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3, acute-phase response factor, Acc.-ID: AJ620655)**

Primer se CTGCAGCAGAAGGTTAGCTACAAA

Primer as TTCTAACAGCTCCACGATTCTCT

TTCTAACAGCTCCACGATTCTCTCCTCCAGCATTGGCCGGTGCTGTACAATGGGG  
TCCCCTTTGTAGCTAACCTTCTGCTGCAG

**18S rRNA (18S ribosomal RNA, Acc.-ID: DQ066896)**

Primer se AAACGGCTACCACATCCAAGG

Primer as GCGGAAGGATTTAAAGTGGACTC

AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGAC  
CCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAAT  
TGGAATGAGTCCAATTTAAATCCTTCCGC

**H2AFZ (H2A histone family, member Z, Acc.-ID: NM174809)**

Sequenzierung bei Boelhaue et al. (Boelhaue et al., 2005).

## 8.5 Quantitative Parameter der Embryonen für TEM-Analysen

**Tabelle 45: Anzahl fixierter Embryonen für TEM-Analysen**

| Zeitpunkt, Tag (h)* | Anzahl Embryonen    |               |
|---------------------|---------------------|---------------|
|                     | fixiert/eingebettet | angeschnitten |
| <i>In vitro</i>     |                     |               |
| 3 (72)              | 117                 | 3             |
| 4 (96)              | 110                 | 6             |
| 5 (120)             | 90                  | 4             |
| 6 (144)             | 70                  | 12            |
| 7 (168)             | 83                  | 12            |
| gesamt              | 470                 | 37            |
| <i>In vivo</i>      |                     |               |
| 6-7 (159-183)       | 20                  | 8             |

\*nach Zugabe der Spermien *in vitro* bzw. künstlicher Besamung *in vivo*; TEM - Transmissions-Elektronenmikroskopie

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz für die Möglichkeit danken, an seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen. Vielen Dank für die wissenschaftliche Unterstützung und das Gefühl, jederzeit mit Fragen willkommen zu sein.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer für die Betreuung der Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie.

Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf danke ich für die Möglichkeit, einen (nicht unerheblichen) praktischen Teil der Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen. Für eine überbrückende finanzielle Unterstützung möchte ich mich ebenfalls bedanken. Zudem möchte ich mich für sein Interesse, die Unterstützung und Ideen bedanken, die zum Fortschreiten der Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank für die gute Betreuung, Geduld, Ausdauer und Unterstützung in den letzten 4 ½ Jahren möchte ich Dr. Felix Habermann aussprechen. Der eigenen Arbeit kritisch zu begegnen, sie stets zu hinterfragen und (scheinbar) komplizierte Sachverhalte auf das Wesentliche zu reduzieren - das sind meine prägensten Erinnerungen an unsere bisherige Zusammenarbeit.

Dr. Marc Boelhauve danke ich für die gute Zusammenarbeit, vor allem bei der Planung und Durchführung der quantitative Real-Time RT-PCR Analysen.

Tausendfacher Dank an meinen Trauzeugen Thomas Henke. Er konnte meine Vorstellung einer farblichen Darstellung der Genexpressions-Daten hervorragend umsetzen.

Christine (Neumüller) - herzlichen Dank für die fleißige Produktion elektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie die Unterstützung bei der Auswertung.

Melanie Pansa danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der „Verarbeitung der Embryonen“ sowie ihre unbekümmernden und aufmunternden Kommentare.

Für ihre Freundschaft sowie ehrliche und kritische Meinung vielen Dank an Katja Ebach.

Für das kritische Lesen des Manuskripts - vielen Dank an Dr. Susanne Alteneder, Dr. Barbara Schick und Katja Ebach.

Herzlichsten Dank für die nette Aufnahme, Hilfsbereitschaft und Unterstützung während meiner Zeit im Moorversuchsgut an alle Mitarbeiter und ganz besonders an: Dr. Marc Boelhauve,

Tuna Gungör, Dr. Myriam Reichenbach, Dr. Horst-Dieter Reichenbach, Christian, Thorsten, Dr. Nick Klymiak, Dr. Christina Schessl, Dr. Karina Zitta (*auch für die schöne/aufregende Woche in Paris*), Katrin Wallner, Dr. Annegret Wunsch und Dr. V. Zakhartchenko. Für die zahlreichen netten Gespräche und Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Sissi Stärk und Angelika Kammerer bedanken.

Vielen Dank dem Graduiertenkolleg (GRK) 1029 der Tiermedizinischen Fakultät der LMU und den verantwortlichen Personen für die vielfältigen Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Weiterbildung (Vorlesungen, Seminare, Praktika, Vorträge ect.), der Gelegenheit zur wiederholten Präsentation von Ergebnissen im Rahmen des GRK (Progress report, Retreat) und auf verschiedenen Kongressen sowie den Einblick in die Forschungsarbeit anderer Arbeitsgruppen und das Kennenlernen einer Vielzahl netter Kollegiaten, Betreuer und assoziierten Personen.

Meiner Mutter Gitta und ihrem Mann Peter möchte ich danken für ihre jahrelange und bedingungslose Unterstützung sowohl finanzieller als auch ideeller Art, vor allem während der Ausbildung und des Studiums.

Mein größter Dank gilt meinem langjährigen Lebensgefährten und heutigen Ehemann Lars - für sein Verständnis, seine Unterstützung und die manchmal dringend benötigten Ablenkung, das äußerst kritische Korrigieren des Manuskripts v. a. der aufgeführten Zahlenwerte sowie für den notwendigen Freiraum zur Beendigung der Dissertation. *Seine „Leidenszeit“ neigt sich dem Ende.*

**LEBENS LAUF**

Sandra Leidenfrost

Heinrich-Wieland-Strasse 59

81735 München

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 21.10.1976  
Geburtsort: Eisenach  
Familienstand: verheiratet (geb. Richter)

Schul Ausbildung

09/82 - 07/86 Grunds chule Mosbach  
09/86 - 07/91 Ferdinand-Heizmann-Schule, Wutha-Farnroda  
09/91 - 07/95 Albert-Schweitzer Gymnasium, Ruhla

Berufsausbildung

08/95 - 02/98 Pharmazeutisch-Technische-Assistentin (PTA)  
Medizinische Fachschule Mühlhausen

Hochschulausbildung

09/98 - 08/2002 Biologie-Studium, Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena

09/02 - 08/03 Diplomarbeit am Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena  
Arbeitsgruppe: Zell- und Molekularbiologie  
(Prof. H.P. Saluz)

Thema: Chlamydia trachomatis - eine Studie zur Apoptose.

seit 05/05 Promotion am Lehrstuhl für Tieranatomie II, insbesondere  
Allgemeine Anatomie, Embryologie und Histologie der Vete-  
rinär-Medizinischen Fakultät der LMU München (Prof. Dr.  
Dr. Dr. F. Sinowatz)

Thema: Zellentwicklung, Zelltod und die Expression Apop-  
tose-assoziiierter Gene in der frühen Embryogenese beim  
Rind.

05/05 - 04/08 Stipendium - Graduiertenkolleg GRK 1029:  
Funktionelle Genomforschung in der Tiermedizin

**Berufstätigkeit**

06/98 - 08/98 PTA, Stadtapotheke Eisenach

09/98 - 07/02 Angestellte im elterlichen Betrieb: Gitta Kritzmöller - Herstellung und Montage von Einbauschalern, Mosbach

08/02 - 09/02 Studentische Hilfskraft, Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena

09/03 - 04/05 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Augenklinik, FSU Jena  
Arbeitsgruppe: Experimentelle Ophthalmologie  
(Dr. D. Schweitzer)

seit 05/08 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tieranatomie II, insbesondere Allgemeine Anatomie, Histologie und Embryologie, LMU München (Prof. Dr. Dr. Dr. F. Sinowatz)

**Hobbies**

Rennrad fahren, Wandern, Laufen, Kunst und Fotografie



Teile der Dissertation wurden als Kongressbeiträge vorgestellt (Abstracts):

**Richter S, Boelhaue M, Habermann FA, Wolf E, Sinowatz F (2006):**

Analysis of cell development and cell death in early bovine embryos using confocal laser scanning microscopy and transmission electron microscopy. 39th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 31<sup>nd</sup> Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine, 15.2.-18.02.2006, Hannover (Abstr), *Reprod. Dom. Anim.* Vol. 41 (Suppl. 1), p. 29, Berlin: Blackwell, 2006. (Poster)

**Leidenfrost S, Boelhaue M, Neumüller C, Habermann FA, Wolf E, Sinowatz F (2007):**

Analysis of cell development, cell death and transcription of apoptosis-associated genes in early bovine embryos. 40th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 32<sup>nd</sup> Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine, 22. - 24.02.2007, Berlin (Abstr), *Reprod. Dom. Anim.* Vol. 42 (Suppl.), p. 1-36, Berlin: Blackwell, 2007. (Vortrag)

**Leidenfrost S, Boelhaue M, Neumüller C, Habermann FA, Wolf E, Sinowatz F (2007):**

Expression of apoptosis genes during early bovine development. 2nd International Meeting on Mammalian Embryogenomics, 17. - 20.10.2007, Paris, France. (Vortrag)

**Leidenfrost S, Neumüller, C, Boelhaue, M, Habermann, F, Wolf, E, Sinowatz, F (2008):**

Analysis of cell development, cell death and the transcription of apoptosis-associated genes in early bovine embryos. XXIIth EAVA Congress, Budapest, Hungary. (Poster)

**Leidenfrost S, Boelhaue M, Reichenbach H-D, Habermann FA, Wolf E, Sinowatz F (2009):**

Developmental heterogeneity of early bovine embryos *in vitro* and *in vivo*. 42th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 34<sup>nd</sup> Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine, 26. - 27.02.2009, Leipzig (Abstr), *Reprod. Dom. Anim.* Vol. 44 (Suppl. 1), p. 22, Berlin: Blackwell, 2009. (Vortrag)

---

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Die Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

.....

München, den ..... 2010

(Unterschrift des Antragstellers)