

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum
(Vorstand: Prof. Dr. Eckhard Wolf)

und

aus dem Institut für Tieranatomie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie (II), insbesondere Allgemeine Anatomie, Histologie und
Embryologie
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz)

**Untersuchungen zur epigenetischen
Reprogrammierung nach somatischem Zellkerntransfer
beim Rind mit Hilfe eines Oct4-EGFP-
Reportergenkonstruktes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Annegret Wünsch
aus Filderstadt-Plattenhardt

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
2. Korreferent:	Priv.Doiz. Dr. W. Breuer
3. Korreferentin:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann
4. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Kerntransfer	4
2.1.1	Allgemeines	4
2.1.2	Anwendungen des Kerntransfers.....	4
2.1.3	Klonierungserfolg.....	5
2.1.4	Pathologische Befunde bei geklonten Tieren	7
2.1.5	Einflussfaktoren beim Kerntransfer.....	7
2.1.6	Reprogrammierung nach dem SCNT	8
2.2	Der Transkriptionsfaktor Oct4.....	9
2.2.1	Allgemeines	9
2.2.2	Zielgene	10
2.2.3	Regulation.....	12
2.2.4	Expression bei der Maus	13
2.2.5	Expression beim Rind.....	15
2.2.6	Funktion von Oct4.....	16
2.2.7	<i>Oct4</i> -Promotor und Methylierung.....	17
2.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	19
2.3.1	Allgemeines	19
2.3.2	GFP – Das grün fluoreszierende Protein	19
2.3.2.1	Geschichte und Allgemeines	19
2.3.2.2	Struktur	20
2.3.2.3	Stabilität	20
2.3.2.4	GFP als Reporter	23
2.3.3	Epifluoreszenzmikroskopie	25
2.3.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	25

2.3.4.1	Allgemeines	25
2.3.4.2	Prinzip	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Geräte.....	28
3.1.2	Chemikalien	29
3.1.3	Enzyme und sonstige Reagenzien	30
3.1.4	Zusätze für die Zellkultur	30
3.1.5	Molekulargewichtsstandards für DNA.....	31
3.1.6	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial	31
3.1.7	Verwendete Software	32
3.2	Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien.....	32
3.2.1	Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)	32
3.2.2	Cutting Buffer.....	32
3.2.3	Puffer für Agarosegele.....	33
3.2.3.1	10x TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA)	33
3.2.3.2	1x TBE-Laufpuffer	33
3.2.3.3	6x Probenpuffer für DNA.....	33
3.2.4	Molekulargewichtsstandard	33
3.2.5	dNTPs 1mM.....	33
3.2.6	10x dNTP-Mix U	33
3.2.7	20x SSC (Standard Sodium Citrate) pH 7,0	34
3.2.8	Denaturierungslösung und Transferpuffer: 0,4 N NaOH - Southern Blot .	34
3.2.9	Waschlösung Southern Blot: 2x SSC/0,1 % SDS	34
3.2.10	Waschlösung Southern Blot: 1x SSC/0,1 % SDS.....	34
3.2.11	Methanol-Eisessig	35
3.2.12	Lösungen für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	35

3.2.12.1	70 % Formamid/2x SSC pH 7,4	35
3.2.12.2	0,05 % Tween/2x SSC	35
3.2.12.3	DAPI - 4',6-Diamidino-2-phenylindole	35
3.2.13	Paraformaldehyd (4 %)	35
3.2.14	PBS-PVP (1 mg/ml)	36
3.2.15	Hoechst 33342-Lösung (5 mg/ml)	36
3.2.16	Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur	36
3.2.16.1	Fetales Kälberserum (FKS)	36
3.2.16.2	Nährmedium für fetale bovine Fibroblasten	36
3.2.16.3	PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)	36
3.2.16.4	PBS mit Penicillin/Streptomycin	37
3.2.16.5	2xTrypsin/EDTA	37
3.2.16.6	Geneticin-Lösung (G418) 100 mg/ml	37
3.3	Oligonukleotide	37
3.4	Zellen	38
3.5	Methoden	38
3.5.1	Expressionsvektoren	38
3.5.1.1	Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP	38
3.5.1.2	Neomycin-Resistenzgen: pBKS/FRT-Neo-FRT	39
3.5.1.3	Restriktionsenzymverdau	39
3.5.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.5.2	Zellkultur	40
3.5.2.1	Kultivierung von Zellen	40
3.5.2.2	Passagieren von Zellen	40
3.5.2.3	Kryokonservierung von Zellen	40
3.5.2.4	Auftauen von Zellen	41
3.5.2.5	Transfektion von Zellen	41
3.5.2.6	Selektion von Zellklonen	42
3.5.2.7	Kerntransfer (Somatic cell nuclear transfer – SCNT)	42
3.5.2.8	Isolierung von Primärzellen aus Feten	43

3.5.3	Identifikation GOF18- Δ PE-EGFP-transgener Zellklone	44
3.5.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Zellen.....	44
3.5.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
3.5.3.3	Southern Blot - alkalischer Transfer	46
3.5.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	50
3.5.4.1	Chromosomenpräparation.....	50
3.5.4.2	Spreitung der Metaphasechromosomen.....	51
3.5.4.3	Herstellung der DNA-Sonden für FISH.....	51
3.5.4.4	Denaturierung der Chromosomen	57
3.5.4.5	Hybridisierung	57
3.5.4.6	Waschen	57
3.5.4.7	Antikörperfärbung – Biotin-Avidin-Methode	58
3.5.4.8	Gegenfärben der Chromosomen und Eindecken der Präparate	58
3.5.4.9	Mikroskopische Auswertung.....	58
3.5.5	Mikroskopische Untersuchung der Kerntransfer-Embryonen	59
3.5.5.1	Dokumentation am Epifluoreszenzmikroskop.....	59
3.5.5.2	Fixierung	59
3.5.5.3	Hoechst-Färbung	59
3.5.5.4	Einbettung der Embryonen für CLSM.....	59
3.5.5.5	Konfokale Untersuchung der Embryonen	60
3.5.5.6	Quantitative Analyse der EGFP-Fluoreszenz	60
3.5.5.7	Zählung der Zellkerne	61
3.6	Statistik.....	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Stabil GOF18-ΔPE-EGFP-transfizierte bovine fetale Fibroblasten (BFFGOF).....	63
4.1.1	Nachweis der GOF18- Δ PE-EGFP-Integration mittels PCR und Southern Blot.....	63
4.1.2	Überprüfung auf Oct4-EGFP-Expression in transgenen Fibroblasten	64

4.1.3	Orientierende Untersuchung zur Oct4-EGFP-Expression in frühen SCNT-Embryonen	65
4.1.4	Überprüfung des Karyotyps und Nachweis der chromosomalen Integration des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	67
4.2	Analyse der Oct4-EGFP-Expression in SCNT-Embryonen von Zellklon BFFGOF12 mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.....	69
4.2.1	Entwicklungsstand von SCNT-Embryonen 4, 6 und 8 Tage nach Kerntransfer	69
4.2.2	Überprüfung der Spezifität der EGFP-Fluoreszenz	69
4.2.3	Aktivierung von Oct4-EGFP an Tag 4.....	70
4.2.4	Variable GOF18- Δ PE-EGFP-Expression in Tag 6 Embryonen.....	71
4.2.5	Beziehung zwischen der Anzahl der Zellkerne und der Höhe EGFP-Expression in Tag 4 Embryonen.....	73
4.2.6	Zellkernzahl, Zellkernmorphologie und Höhe der Oct4-EGFP-Expression an Tag 6	74
4.3	Entwicklung von SCNT-Embryonen von Zellklon BFFGOF12 <i>in vivo</i>	77
4.4	Die Expression von Oct4-EGFP in SCNT-Embryonen aus Fibroblasten der zweiten Generation („second round“ SCNT).....	77
4.5	Embryonaler Kerntransfer von Blastomeren (BNT) aus Tag 5 Morulae nach Kerntransfer mit BFFGOF12 und FeGOF451-1.....	80
5	Diskussion	82
5.1	Herstellung und Charakterisierung stabil GOF18-ΔPE-EGFP-transfizierter boviner fetaler Fibroblasten (BFFGOF).....	82
5.2	Analyse der Oct4-EGFP-Expression in SCNT-Embryonen von transfizierten fetalen Fibroblasten (Zellklon BFFGOF12).....	85
5.2.1	Spezifität der EGFP-Fluoreszenz	85

5.2.2	Tag 4 nach SCNT	86
5.2.3	Tag 6 nach SCNT	87
5.2.4	Tag 8 nach SCNT	89
5.3	Die fetale Entwicklung von SCNT-Embryonen <i>in utero</i>.....	90
5.4	Die Expression von Oct4-EGFP in SCNT-Embryonen aus Fibroblasten der zweiten Generation („second round“ SCNT).....	91
5.5	Embryonaler Kerntransfer von Blastomeren (BNT) aus Tag 5 Morulae nach Kerntransfer mit BFFGOF12 und FeGOF451-1.....	92
5.6	Offene Fragen	92
5.7	Fazit und Ausblick	93
6	Zusammenfassung	96
7	Summary.....	98
8	Abbildungsverzeichnis.....	100
9	Tabellenverzeichnis.....	102
10	Abkürzungsverzeichnis.....	104
11	Literaturverzeichnis.....	110
12	Danksagung	141
13	Lebenslauf	143

1 Einleitung

Kerne von somatischen Zellen können durch Transfer in eine entkernte Eizelle zur Totipotenz reprogrammiert werden (Wilmut et al. 1997). Die Geburt des Klonschafes Dolly (Wilmut et al. 1997), dem ersten Tier, das durch Kerntransfer aus einer differenzierten somatischen Zelle („somatic cell nuclear transfer“, SCNT) entstanden ist, weckte große Erwartungen im Bezug auf a) die Weiterentwicklung der Biotechnologie bei Nutztieren, b) die Erzeugung transgener Tiere als Modellsystem für die Erforschung von Krankheiten und Entwicklung von Medikamenten, zur Herstellung von Proteinen („gene pharming“) oder als Organspender für die Xenotransplantation, sowie c) die Entwicklung der Stammzelltherapie.

Obwohl SCNT in einer Vielzahl von Spezies erfolgreich durchgeführt wurde, variiert die Effizienz dieser Technik erheblich von Spezies zu Spezies (Shi et al. 2003). Die höchsten Erfolgsraten wurden beim Rind berichtet und die Gesamtzahl der weltweit klonierten Rinder wird auf mehrere tausend Tiere geschätzt (Kues & Niemann 2004). Trotzdem ist die Biotechnik SCNT auch beim Rind mit großen Verlusten und krankhaften Veränderungen bei Feten und Kälbern behaftet (Galli et al. 1999; Hill et al. 1999; Renard et al. 1999; Wells et al. 1999; Hill et al. 2000b; Zakhartchenko et al. 2001). Es wird angenommen, dass eine unvollständige oder fehlerhafte epigenetische Reprogrammierung des somatischen Spenderkerns nach Transfer in eine enukleierte Eizelle wesentlich dafür verantwortlich ist (Shi et al. 2003).

Der POU-Transkriptionsfaktor Oct4, der als Pluripotenzmarker angesehen wird, wird in der Präimplantationsphase exprimiert und spielt eine essentielle Rolle für die korrekte Entwicklung des Embryos. Mausembryonen, denen dieses Protein fehlt, sind nicht in der Lage Blastozysten mit pluripotenten Zellen in der inneren Zellmasse („inner cell mass“, ICM) zu bilden (Nichols et al. 1998). Das *Oct4*-Gen wurde nach SCNT bei der Maus in den meisten Blastozysten fehlerhaft exprimiert, was mit der Folge einer reduzierten Entwicklungsfähigkeit assoziiert war (Boiani et al. 2002). Dieser Defekt konnte teilweise durch die Aggregation von klonierten Embryonen und die daraus resultierende Erhöhung der Anzahl epigenetisch normaler Zellen behoben werden (Boiani et al. 2003).

In *in vitro* fertilisierten (IVF) Rinderembryonen wurde im 16-Zell-Stadium ein Anstieg der *OCT4*-mRNA beobachtet, der darauf hinweist, dass der *OCT4*-Promotor ein oder

zwei Zellzyklen nach der embryonalen Genomaktivierung angeschaltet wird (Kurosaka et al. 2004). Wie bei der Maus wurde in bovinen Blastozysten die *OCT4*-mRNA nur in der ICM nachgewiesen (Kurosaka et al. 2004), obwohl OCT4-Protein auch im Trophektoderm von frühen Blastozysten detektiert wurde (van Eijk et al. 1999; Kirchhof et al. 2000). In Tag 12 Blastozysten vom Rind ist das OCT4-Protein nur noch im Epiblast nachweisbar (Vejlsted et al. 2005).

Angesichts der wichtigen Rolle von Oct4 für die Entwicklungskapazität von klonierten Mausembryonen (Boiani et al. 2002; Bortvin et al. 2003) und des bekannten Expressionsmusters von *OCT4* in IVF-Rinderembryonen (van Eijk et al. 1999; Kirchhof et al. 2000; Vejlsted et al. 2005), ist die Promotoraktivierung dieses Gens ein vielversprechender Marker zur Überwachung der Reprogrammierung von somatischen Kernen beim bovinen SCNT.

In transgenen Mausembryonen spiegelte die Expression eines Reportergenkonstruktes mit EGFP unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen von *Oct4* (GOF18- Δ PE-EGFP) die Expression des endogenen *Oct4*-Gens wider (Szabo et al. 2002), was eine elegante Möglichkeit bietet, die *Oct4*-Promotor-Aktivität in lebenden Embryonen zu überwachen. Dasselbe Reporterkonstrukt wurde in Rinder- und Schweinezygoten mikroinjiziert und die Expression in Embryonen beider Spezies im Blastozysten-Stadium beobachtet. Auf diese Weise wurde die prinzipielle Funktionalität der regulatorischen *Oct4*-Region der Maus in anderen Säugerspezies gezeigt (Kirchhof et al. 2000).

Um die Vorgänge der Reprogrammierung des Spenderzellkerns in bovinen SCNT-Embryonen genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieses Dissertationsprojektes folgende Ziele gesetzt:

- a) Herstellung mit GOF18- Δ PE-EGFP (Oct4-EGFP) stabil transfizierter boviner fetaler Fibroblasten.
- b) Untersuchung der Aktivierung von Oct4-EGFP nach Kerntransfer.
- c) Embryotransfer (ET) der EGFP-exprimierenden Embryonen und Untersuchung von Feten an Tag 34 nach SCNT.
- d) Isolierung fetaler Oct4-EGFP-transgener Fibroblasten-Zelllinien (zweite Generation) und Untersuchung der Oct4-EGFP-Inaktivierung. Überprüfung der Aktivierung nach erneutem („second round“) SCNT.
- e) Untersuchung der Oct4-EGFP-Aktivität nach Reklonierung.

In Abbildung 1.1 sind die experimentellen Ansätze, um diese Ziele zu verfolgen dargestellt. Die Ziele dieser Arbeit bilden einen ersten Schritt für ein weiter gestecktes Ziel, nämlich die Entwicklung eines Modellsystems zur Entschlüsselung der wesentlichen Mechanismen der Reprogrammierung des Genoms beim Rind.

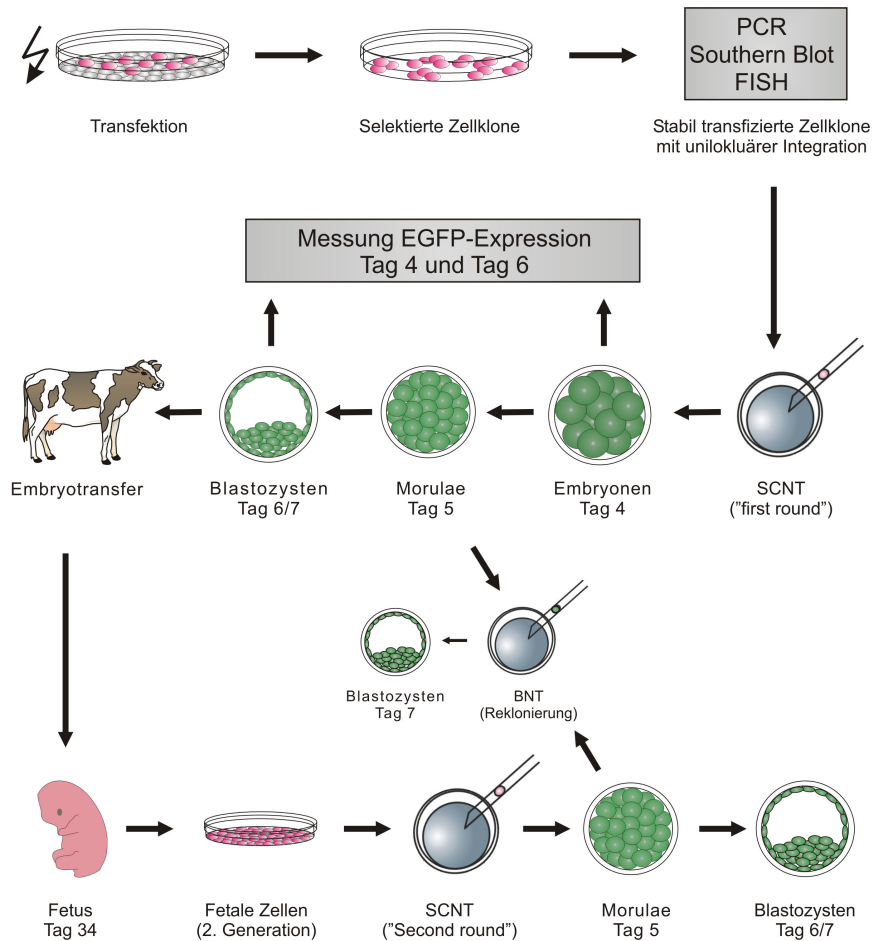


Abbildung 1.1: Experimenteller Ansatz.

1. Herstellung stabil mit $GOF18-\Delta PE-EGFP$ transfizierter boviner fetaler Fibroblasten (rosa) mittels Elektroporation.
2. Verwendung genotypisierter Zellklone für SCNT („first round“) und Messung der EGFP-Expression (grün) an Tag 4 und Tag 6.
3. Transfer EGFP-exprimierender Embryonen auf synchronisierte Empfängertiere, Gewinnung von Feten an Tag 34 und Isolierung Oct4-EGFP-transgener Fibroblasten.
4. Verwendung Oct4-EGFP-transgener Fibroblasten der zweiten Generation im SCNT („second round“) und Untersuchung der Oct4-EGFP-Aktivierung.
5. Verwendung von Morulae aus SCNT mit Oct4-EGFP-transgenen Fibroblasten der ersten und zweiten Generation („first and second round SCNT“) als Blastomeren-spender für die Reklonierung.

2 Literaturübersicht

2.1 Kerntransfer

2.1.1 Allgemeines

Das Generieren von Tieren durch den Transfer eines Zellkerns einer so genannten Spenderzelle in eine entkernte Eizelle wurde in den letzten Jahrzehnten mehrfach erfolgreich durchgeführt („nuclear transfer“, NT). Mitte der 1980er wurden die ersten geklonten Lämmer geboren (Willadsen 1986), die aus der Fusion von embryonalen, noch undifferenzierten Zellen aus einem 16-Zell-Embryo und einer entkernten Eizelle entstanden. Auch Zellen aus der inneren Zellmasse von expandierten bovinen Blastozysten führten nach Transfer in eine entkernte Eizelle zur Entwicklung und Geburt von lebenden Tieren (Keefer et al. 1994).

Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass das Klonen von Tieren auch mit kultivierten embryonalen Zellen (Campbell et al. 1996b), fetalen somatischen Zellen (Trounson et al. 1998) und verschiedenen Zelltypen aus adulten Tieren (Wilmut et al. 1997; Vignon et al. 1998; Wells et al. 1999) möglich ist. Bisher wurden geklonte Tiere von vielen verschiedenen Spezies geboren. Tabelle 2.1 zeigt Beispiele der bisher lebend geborenen geklonten Tiere, die aus dem Kerntransfer somatischer Zellen („somatic cell nuclear transfer“, SCNT) entstanden sind.

2.1.2 Anwendungen des Kerntransfers

Die DNA-Mikroinjektion in die Vorkerne befruchteter Eizellen stellt das klassische Verfahren des Gentransfers bei landwirtschaftlichen Nutztieren dar (Brem et al. 1985; Hammer et al. 1985). Diese Methode hat aber entscheidende Nachteile: sie ist vergleichsweise aufwendig und darüber hinaus ist insbesondere die Erfolgsquote hinsichtlich des Anteils der erzeugten transgenen Tiere beim Rind relativ gering (Wall 1996).

Die Verwendung kultivierter Zellen für den Kerntransfer bietet die Möglichkeit, Spenderzellen in Kultur genetisch zu verändern, sei es durch zufällige Integration (Schnieke et al. 1997; Cibelli et al. 1998) oder durch gezielte Veränderungen im Genom (McCreath et al. 2000), um eine große Menge an Spenderzellen für die Herstellung geklonter Tiere mit bestimmten genetischen Merkmalen zu erzeugen.

Eine Anwendung ist beispielsweise die Produktion von wertvollen rekombinanten Proteinen über die Milch von geklonten Tieren, wie z. B. den humanen Faktor IX, Kasein und Immunglobuline (Schnieke et al. 1997; Kuroiwa et al. 2002; Brophy et al. 2003; Lee et al. 2003). Über den Knockout von Genen, die Proteine kodieren, die bei der Organabstoßung nach der Xenotransplantation eine Rolle spielen, wird derzeit versucht Schweine mit besseren Voraussetzungen als Organspender für die Xenotransplantation zu generieren (Dai et al. 2002; Lai et al. 2002). Bei der Herstellung transgener Tiere haben sich Fibroblasten beim Rind (Cibelli et al. 1998; Zakhartchenko et al. 2001), Schaf (Schnieke et al. 1997) und Schwein (Park et al. 2002; Lee et al. 2003) als sehr geeignet erwiesen. Im Bereich der landwirtschaftlichen Nutztiere ist auch eine Verbesserung der Konstitution der Tiere, die Erzeugung von Krankheitsresistenzen und die Optimierung von Produktmenge und -qualität von Interesse. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet für den Kerntransfer ist die Konservierung wertvoller und vom Aussterben bedrohter Tierarten oder Rassen (Saegusa 1998; Wells et al. 1998; Li et al. 2006).

2.1.3 Klonierungserfolg

Obwohl der Kerntransfer einige lebende Tiere bei verschiedenen Spezies hervorgebracht hat, ist die Effizienz sehr gering und die Verluste sind sehr hoch.

Die meisten Verluste ereignen sich im ersten Drittel der Trächtigkeit. In einer Studie beim Rind wurde beobachtet, dass Trächtigkeiten mit geklonten Embryonen in 80 % der Fälle zwischen Tag 30 und 60 abbrachen, die Hälfte zwischen Tag 30 und 40 und die andere Hälfte zwischen Tag 40 und 60 (Hill et al. 2000a). Auch im zweiten und dritten Drittel der Trächtigkeit mit NT-Embryonen waren die Verluste im Vergleich zu IVF-Trächtigkeiten größer, wobei die Verlustrate nach Verwendung von adulten Zellen größer war als mit embryonalen oder fetalen Zellen (Saegusa 1998; Heyman et al. 2002).

Tabelle 2.1: Erfolgreiche Kerntransfers mit somatischen Zellen bei verschiedenen Spezies

Jahr	Spezies	Zelltyp	Referenz
1995	Schaf	epithelähnliche Zellen	Campbell et al. (1996b)
1996	Schaf	Milchdrüsenepithelzellen	Wilmut et al. (1997)
	Schaf	fetale Fibroblasten	Wilmut et al. (1997)
1998	Rind	fetale Fibroblasten	Cibelli et al. (1998)
	Rind	Eileiterepithelzellen	Kato et al. (1998)
	Maus	Cumuluszellen	Wakayama et al. (1998)
1999	Ziege	fetale Fibroblasten	Baguisi et al. (1999)
2000	Gaur	adulte Fibroblasten	Lanza et al. (2000)
	Schwein	Cumuluszellen	Polejaeva et al. (2000)
2001	Mouflon	Granulosazellen	Loi et al. (2001)
2002	Kaninchen	Cumuluszellen	Chesne et al. (2002)
	Katze	Cumuluszellen	Shin et al. (2002)
2003	Maultier	fetale Fibroblasten	Woods et al. (2003)
	Pferd	adulte Fibroblasten	Galli et al. (2003)
	Ratte	fetale Fibroblasten	Zhou et al. (2003)
2005	Hund	adulte Hautzellen	Lee et al. (2005)

Bei der Beurteilung der Effizienzen nach dem Kerntransfer wird die Anzahl der lebend geborenen Tiere auf die Anzahl der transferierten Embryonen bezogen. Die daraus errechneten Erfolgsraten liegen beim Rind zwischen 4 % und 87 %, beim Schaf zwischen 3 % und 18 %, bei der Ziege zwischen 3 % und 10 %, beim Schwein zwischen 0,2 % und 7 % und bei der Maus zwischen 0,3 % und 3,7 % (Shi et al. 2003). Wenn nun die Anzahl der lebenden Nachkommen auf die Gesamtzahl der verwendeten Eizellen bezogen wird, liegt die Effizienz meist nur bei unter 1 % (Wilmut et al. 1997; Wakayama et al. 1998; Zakhartchenko et al. 1999; Kato et al. 2000; Polejaeva et al. 2000; Wakayama & Yanagimachi 2001). Beim Vergleich der Effizienzen zwischen den verschiedenen Studien ist die große Variationsbreite auffällig. Der direkte Vergleich zwischen den einzelnen Studien ist schwierig, da es sich teilweise um sehr unterschiedliche NT-Protokolle handelte und eine variierende

Anzahl von Embryonen in unterschiedlichen Stadien auf die Empfängertiere übertragen wurde.

2.1.4 Pathologische Befunde bei geklonten Tieren

Es wird angenommen, dass eine Fehlentwicklung der Plazenta ein wichtiger Grund für die Verluste von geklonten Feten ist (Cibelli et al. 1998; Baguisi et al. 1999; Wells et al. 1999; Kubota et al. 2000). Bei geklonten Feten und Neugeborenen, in erster Linie bei Schaf und Rind, konnten viele pathologische und klinische Befunde erhoben werden, wie Kreislaufstörungen, Plazentaödeme, Hydroallantois, respiratorische Symptome, Dysfunktionen des Immunsystems, Missbildungen der Niere und Missbildungen des Gehirns, Vergrößerung der Leber, vergrößerte oder fehlende Cotyledonen der Plazenta, sowie ein erhöhtes Gewicht von Feten, Plazenta und Neugeborenen (Garry et al. 1996; Hill et al. 1999; Hill et al. 2000b; de Sousa et al. 2001). Bereits die *in vitro* Kultur von Rinderembryonen wurde mit einem abnormen Phänotyp in Verbindung gebracht (Willadsen et al. 1991; Keefer et al. 1994; Behboodi et al. 1995; Farin & Farin 1995; Wilson et al. 1995; Lazzari et al. 2002), der „large offspring syndrome“ (LOS) genannt wird. Dieses Syndrom kommt beim Rind allerdings bei Trächtigkeiten mit NT-Embryonen häufiger vor als bei solchen aus *in vitro* produzierten (IVP) Embryonen (Behboodi et al. 1995; Farin & Farin 1995; Sinclair et al. 1995). Dieses Syndrom wurde auch bei der Maus beobachtet (Eggan et al. 2001; Fernandez-Gonzalez et al. 2004).

Klonrinder, die die neonatale Phase überleben können aber auch physiologisch normal und gesund sein (Lanza et al. 2001). Chavatte-Palmer et al. (2002) schlossen aus ihren klinischen Untersuchungen, dass es nicht möglich ist, innerhalb der ersten 50 Tage nach der Geburt bei einem gesund wirkenden Kalb auf einen normalen physiologischen Status zu schließen.

2.1.5 Einflussfaktoren beim Kerntransfer

Der Kerntransfer besteht aus verschiedenen Schritten, die Einfluss auf den Erfolg haben, wie der Ursprung der Eizellen (Wells et al. 1998; Bruggerhoff et al. 2002; Piedrahita et al. 2002), die E nukleationsmethode (Vajta et al. 2001; Oback et al. 2003), das Aktivierungsprotokoll und die Fusionsmethode (Galli et al. 2002), sowie die Fusionszeit (Wells et al. 1998; Akagi et al. 2003). Weiterhin spielen eventuell

Faktoren, die die Spenderzelle betreffen, eine Rolle: das Gewebe, aus dem die Zellen gewonnen wurden (Kato et al. 2000), der Differenzierungsgrad (Heyman et al. 2002; Eggan et al. 2004; Hochedlinger et al. 2004; Panelli et al. 2004), das Alter des Spenders (Hill et al. 2000b) sowie Zellkulturbedingungen und -dauer (Kubota et al. 2000; Ogura et al. 2000; Hill et al. 2001; Cho et al. 2002; Gao et al. 2003; Powell et al. 2004). Daneben ist die Koordination des Zellzyklusstatus von Spenderzelle und Empfängereizelle ein besonders wichtiger Punkt für eine erfolgreiche Klonierung (Barnes et al. 1993; Campbell et al. 1993; Campbell et al. 1996a; Kasinathan et al. 2001; Gibbons et al. 2002; Wells et al. 2003).

2.1.6 Reprogrammierung nach dem SCNT

Beim Klonen mit einem somatischen Zellkern muss der differenzierte Status der Spenderzelle in einen totipotenten Status reprogrammiert werden, d.h. Gene, die für die spezifische Funktion der Zelle nötig waren müssen abgeschaltet und Gene, die für die embryonale Entwicklung erforderlich sind müssen angeschaltet werden (Gurdon & Colman 1999). Epigenetische Mechanismen spielen eine entscheidende Rolle bei der Reprogrammierung, weshalb auch von der epigenetischen Reprogrammierung gesprochen wird. Der Ausdruck Epigenetik bedeutet wörtlich übersetzt „außerhalb der konventionellen Genetik“, und wird heutzutage verwendet, um die Untersuchung stabiler Änderungen des Genexpressions-Potenzials zu beschreiben, die während der Entwicklung und Zellproliferation stattfinden (Jaenisch & Bird 2003). Die epigenetische Reprogrammierung betrifft nach dem SCNT unter anderem folgende Bereiche: DNA-Methylierung, genomisches Imprinting, X-Chromosom-Inaktivierung, Histonmodifikationen und Mechanismen, die zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führen (Shi et al. 2003).

Es gibt viele Hinweise dafür, dass die Reprogrammierung nach dem SCNT unvollständig oder fehlerhaft abläuft, was zu abnormen Mustern der DNA-Methylierung (Bourc'his et al. 2001; Dean et al. 2001; Kang et al. 2001; Ohgane et al. 2001), der Chromatin-Modifikation (Santos et al. 2003), der X-Chromosom-Inaktivierung (Xue et al. 2002) und der Expression von geprägten („imprinted“) und nicht geprägten Genen (Daniels et al. 2000; Daniels et al. 2001; Rideout, III et al. 2001; Wrenzycki et al. 2001; Humpherys et al. 2002) führt. Bei murinen SCNT-Embryonen aus Cumuluszellen wurde beispielsweise das *Oct4*-Gen, das für die Erhaltung der Pluripotenz notwendig ist, zwar zum richtigen Zeitpunkt aktiviert, zeigte aber in den meisten

Blastozysten eine fehlerhafte räumliche Verteilung der Transkripte (Boiani et al. 2002). Beispielsweise waren die *Oct4*-Transkripte nur bei 34 % der SCNT-Embryonen auf die ICM beschränkt. In einer aktuellen Studie bei der Maus, die Fibroblasten und Cumuluszellen als Spenderzellen verwendeten, wurden SCNT-Blastozysten immunzytochemisch untersucht und mit dem Ergebnis, dass die *Oct4*-Expression in vielen SCNT-Embryonen fehlerhaft war oder fehlte (Kishigami et al. 2006). Auch Gene mit dem gleichen entwicklungsabhängigen Expressionsmuster wie *Oct4* wurden nach SCNT von murinen Cumuluszellen ebenfalls fehlerhaft exprimiert (Bortvin et al. 2003).

2.2 Der Transkriptionsfaktor Oct4

2.2.1 Allgemeines

Das Gen *Oct4*, auch *Oct3* und *Pou5f1* genannt, kodiert einen Transkriptionsfaktor, der zur POU (Pit-Oct-Unc) Familie gehört (Schöler et al. 1990b). Die Transkriptionsfaktoren dieser Familie sind durch die POU-Domäne (Herr et al. 1988) gekennzeichnet, die ursprünglich in den Säugerproteinen Pit-1 (Bodner et al. 1988; Ingraham et al. 1988), Oct1 (Sturm et al. 1988), Oct2 (Clerc et al. 1988; Ko et al. 1988; Muller et al. 1988; Scheidereit et al. 1988) und dem *Caenorhabditis elegans*-Protein Unc-86 (Finney & Ruvkun 1990) identifiziert wurde. Die POU-Domäne besteht aus 145 bis 160 Aminosäuren und setzt sich aus zwei Teilen zusammen, der POU-spezifischen Domäne (POU_s) aus 75 bis 82 Aminosäuren und der POU-Homeodomäne (POU_H) aus 60 Aminosäuren (Herr et al. 1988). Eine variable Linkerregion verknüpft die beiden Subdomänen und ermöglicht, dass diese unabhängig voneinander die DNA-Bindungsstelle kontaktieren können (Verrijzer & van der Vliet 1993; Wegner et al. 1993; Ryan & Rosenfeld 1997). So genannte Oktamer-bindende Proteine („octamer-binding“, Oct), von denen die meisten zur Familie der POU-Proteine gehören, binden an eine Oktamersequenz (ATGCAAAT) und können dadurch die betreffenden Zielgene aktivieren (Verrijzer et al. 1990; Verrijzer et al. 1992; Klemm et al. 1994). Ursprünglich wurde die Oktamersequenz als Bindungsstelle des Oct1-Proteins im Promotor des Histon H2B-Gens charakterisiert (Sturm et al. 1988; Sturm & Herr 1988).

Oct4 wurde auf mRNA- bzw. Proteinebene bisher bei folgenden Spezies genauer untersucht: Maus (Schöler et al. 1989; Rosner et al. 1990; Palmieri et al. 1994), Rind

(van Eijk et al. 1999; Kirchhof et al. 2000), Schwein (Kirchhof et al. 2000), Mensch (Takeda et al. 1992; Cauffman et al. 2005) und Rhesusaffe (Mitalipov et al. 2003). Das murine und bovine Oct4-Protein sind einander mit 81,7 % Übereinstimmung sehr ähnlich (van Eijk et al. 1999). Bei Maus, Rind und Mensch ist die chromosomale Umgebung des Genortes hoch konserviert und die Syntenie mit dem Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Locus („major histocompatibility complex“, MHC) erhalten. Bei der Maus liegt das Gen auf Chromosom 17 innerhalb oder benachbart zum MHC-Locus (Schöler et al. 1990a), beim Rind auf Chromosom 23 ebenfalls in der MHC-Region (van Eijk et al. 1999) und beim Menschen auf Chromosom 6 innerhalb oder nahe beim MHC-Locus (Takeda et al. 1992; Guillaudeux et al. 1993).

2.2.2 Zielgene

Oct4-Protein reguliert die nachfolgend aufgelisteten Gene über verschiedene Mechanismen (Yuan et al. 1995; Saijoh et al. 1996; Ben Shushan et al. 1998; Botquin et al. 1998; Nishimoto et al. 1999; Du et al. 2001; Tomioka et al. 2002):

- *Fgf-4* („fibroblast growth factor 4“)
- *Utf1* („undifferentiated embryonic cell transcription factor 1“)
- *Sox2* („SRY-box containing gene 2“)
- *Fbx15* („F-box protein 15“)
- *Rex1* (*Zfp42*, „zinc finger protein 42“)
- *Osteopontin* (*OPN/Spp1*: „secreted phosphoprotein 1“)

Häufig aktiviert Oct4 das Zielgen zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Sox2, wie z. B. das *Fgf4*-Gen, das als erstes gemeinsames Zielgen entdeckt wurde (Sturm et al. 1988; Sturm & Herr 1988; Yuan et al. 1995). *Utf1* und *Fbx15*, sowie *Sox2* und *Oct4* selbst werden ebenfalls durch Sox2/Oct4 reguliert (Nishimoto et al. 1999; Tomioka et al. 2002; Tokuzawa et al. 2003; Chew et al. 2005; Okumura-Nakanishi et al. 2005). Seit kurzem ist bekannt, dass in murinen und humanen embryonalen Stammzellen („embryonic stem cells“, ES-Zellen) auch *Nanog* durch Oct4 and Sox2 reguliert wird (Rodda et al. 2005).

Fgf4 gehört zur FGF-Genfamilie, die mittlerweile mindestens 23 Mitglieder umfasst und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („fibroblast growth factors“, FGFs) kodieren (Itoh & Ornitz 2004; Yu & White 2005). *Fgf4* wird in der ICM des Mausembryos exprimiert, wo es vermutlich bedeutsam für die Zellproliferation ist (Feldman et al.

1995). *In vitro* ist das Fgf4-Protein ebenso wichtig für die Proliferation von Trophoblastzellen (Tanaka et al. 1998).

Sox2 gehört zur Sox-Genfamilie, die Transkriptionsfaktoren mit einer HMG-Domäne („high mobility group“) kodieren (Kamachi et al. 2000). Bei der Maus wurde eine Expression des *Sox2*-Gens in Zellen der ICM, des Epiblasten, in den Keimzellen und in den multipotenten Zellen des extraembryonalen Ektoderms nachgewiesen (Li et al. 1998a; Zappone et al. 2000; Avilion et al. 2003).

Das Gen *Rex1*, auch *Zfp42* genannt, kodiert ein Zinkfingerprotein und wird bei der Maus in der ICM von Blastozysten, in embryonalen Stamm- und embryonalen Karzinomzellen („embryonic carcinoma cells“, EC-Zellen) exprimiert (Ben Shushan et al. 1998).

Osteopontin kodiert ein Protein der extrazellulären Matrix und wird in verschiedenen Zelltypen der Niere, des Knochens sowie des Innenohrs und in einigen anderen Geweben exprimiert (Denhardt & Guo 1993). In der embryonalen Entwicklung konnte eine Expression ab dem Morulastadium nachgewiesen werden, die später auf das primitive Endoderm beschränkt ist (Botquin et al. 1998).

Utf1 wird bei der Maus in der ICM, im primitiven Ektoderm und in extraembryonalem Gewebe exprimiert (Okuda et al. 1998).

Fbx15 kodiert ein Protein mit einem F-box Motiv (Winston et al. 1999), das aus 42 bis 48 Aminosäuren besteht und das Protein Skp1 binden kann. Exprimiert wird es bei der Maus in ES-Zellen, im frühen Embryo und später im Hoden (Tokuzawa et al. 2003).

Nanog, ein Transkriptionsfaktor mit einer Homeobox, hat wesentliche Funktionen bei der Erhaltung von pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse und von ES-Zellen (Mitsui et al. 2003). *Nanog*-Transkripte erscheinen bei der Maus erstmalig im Morulastadium vor der Bildung der Blastozyste (Mitsui et al. 2003; Chambers & Smith 2004) und sind in der weiteren Entwicklung auf die ICM (Wang et al. 2003) und nachfolgend auf Zellen des Epiblasten beschränkt (Hart et al. 2004).

Weitere Zielgene von OCT4 kodieren die α - und β -Untereinheiten des hCGs (humanes Chorion-Gonadotropin; Liu & Roberts 1996; Liu et al. 1997). Diese beiden Zielgene von OCT4, die im humanen Trophektoderm (TE) exprimiert werden, werden in Choriokarzinomzellen durch OCT4 inaktiviert.

Beim Menschen wurde gezeigt, dass in embryonalen Karzinomzellen das Gen für den PDGF („platelet-derived growth factor“)- α -Rezeptor ebenfalls von OCT4 reguliert

wird, indem OCT4 in undifferenzierten Zellen an das Oktamermotiv des Promotors P2 bindet (Kraft et al. 1996).

2.2.3 Regulation

Durch die Analyse von *lacZ*-Reportertransgenen unter der Kontrolle von verschiedenen genomischen *Oct4*-Fragmenten der Maus konnten regulatorische Regionen identifiziert werden, die für die *Oct4*-Expression in verschiedenen Zellen des frühen Mausembryos notwendig sind (Yeom et al. 1996). Diese Regionen umfassen den Promotor, der innerhalb der ersten 250 bp des Transkriptionsstartpunktes liegt und eine Anhäufung von überlappenden Bindungsstellen enthält, die durch spezifische DNA-Bindungsproteine erkannt werden. Dazu gehören eine GC-Box, die Mitglieder der Sp1-Transkriptionsfaktorfamilie binden kann, und drei sich wiederholende „hormone-response elements“ (HREs; Schoorlemmer et al. 1994; Sylvester & Schöler 1994). Der proximale Enhancer (PE) liegt ungefähr 1,2 kb stromaufwärts, ist für die *Oct4*-Expression im Epiblasten verantwortlich (Yeom et al. 1996) und beinhaltet zwei cis-aktive Sequenzen, 1A und 1B (Okazawa et al. 1991). Der distale Enhancer (DE) liegt ungefähr 2 kb stromaufwärts und reguliert die Expression in der Morula, der Blastozyste, in den primordialen Keimzellen („primordial germ cells“, PGCs; Vorläuferzellen der Gameten) und in ES-Zellen (Yeom et al. 1996). Innerhalb dieses Enhancers wurde eine Sequenz gefunden, die der Sequenz 1A des PEs ähnlich ist und die Bezeichnung 2A erhielt (Minucci et al. 1996). Erst vor kurzem wurde ein neues *cis*-Element, 2B, entdeckt, das ~30 bp stromabwärts von 2A liegt (Okumura-Nakanishi et al. 2005). In Abbildung 2.1 ist die genomische Struktur des *Oct4*-Gens dargestellt.

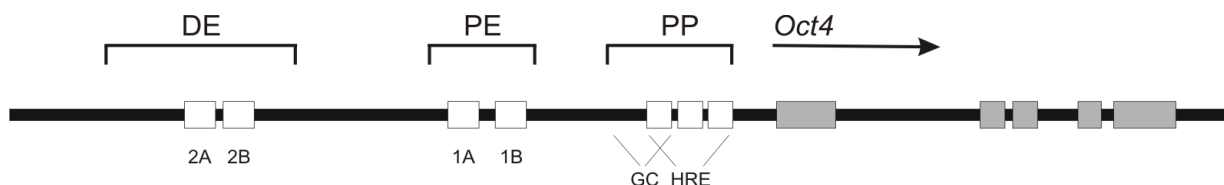


Abbildung 2.1: Genomische Struktur des *Oct4*-Gens.

Der ~24 kb lange Abschnitt beinhaltet regulatorische Elemente, wie den Promotor mit den „hormone-responsive elements“ (HREs) und der GC-Box, den proximalen Enhancer (PE) mit den cis-aktiven Elementen 1A und 1B und den distalen Enhancer (DE) mit den cis-aktiven Elementen 2A und 2B. Das Gen selbst ist in 5 Exons unterteilt, die als graue Boxen dargestellt sind. Modifiziert nach Ovitt & Schöler 1998.

Der Vergleich der stromaufwärts liegenden Sequenzen bei Mensch, Rind und Maus ergab vier konservierte Regionen („conserved regions“, CR) von CR1 bis CR4, wobei CR2 und CR3 im PE und CR4 im DE liegt (Nordhoff et al. 2001).

2.2.4 Expression bei der Maus

Bei der Maus ist die *Oct4*-Expression am besten untersucht. Der Transkriptionsfaktor wurde zuerst in Extrakten von ES- und EC-Zellen entdeckt (Lenardo et al. 1989; Schöler et al. 1989; Okamoto et al. 1990), was zu der Vermutung führte, dass Oct4 in der frühen embryonalen Entwicklung eine Rolle spielen könnte. Untersuchungen zeigten, dass das *Oct4*-Gen während der embryonalen Entwicklung exprimiert wird (Schöler et al. 1989; Okamoto et al. 1990; Rosner et al. 1990; Schöler et al. 1990b). In der unbefruchteten Eizelle sind *Oct4*-Transkripte und -Protein vorhanden, wobei nach der Befruchtung das Protein im weiblichen Vorkern lokalisiert ist (Schöler et al. 1989; Rosner et al. 1990; Yeom et al. 1991; Palmieri et al. 1994). Die Menge an *Oct4*-mRNA geht nach der Befruchtung drastisch zurück (Yeom et al. 1991), was für fast alle untersuchten maternalen Transkriptionsfaktoren typisch ist. Untersuchungen, die die Lokalisation des Proteins in den ersten Entwicklungsstadien des Embryos betreffen, sind teilweise widersprüchlich. Zunächst wurde Oct4-Protein in 2-Zell-Embryonen nachgewiesen (Palmieri et al. 1994). In einer späteren Untersuchung war das Protein erst im 8-16-Zellstadium detektierbar (Liu et al. 2004), was das Ergebnis einer Untersuchung von Embryonen von Oct4-GFP-transgenen („green fluorescent protein“) Mäusen bestätigte, bei denen ab dem 8-Zellstadium GFP nachgewiesen werden konnte (Yoshimizu et al. 1999). Letztendlich lässt sich zusammenfassen, dass die embryonale *Oct4*-Expression der Maus um das 8-Zellstadium aktiviert wird mit einem signifikanten Anstieg an mRNA und Protein im Zellkern (Yeom et al. 1991; Palmieri et al. 1994; Kurosaka et al. 2004; Liu et al. 2004). Im Morulastadium sind *Oct4*-mRNA und Oct4-Protein in allen Zellen vorhanden. Wenn sich die äußeren Zellen des Embryos zum TE differenzieren, wird *Oct4* in den TE-Zellen abgeschaltet und die Expression auf die Zellen der ICM beschränkt (Okamoto et al. 1990; Rosner et al. 1990; Schöler et al. 1990a; Palmieri et al. 1994). Nach der Implantation wurde die Expression von *Oct4* nur im primitiven Ektoderm beobachtet (Rosner et al. 1990; Schöler et al. 1990a; Yeom et al. 1996). In der weiteren Entwicklung wird es nur in den PGCs exprimiert (Yeom et al. 1996).

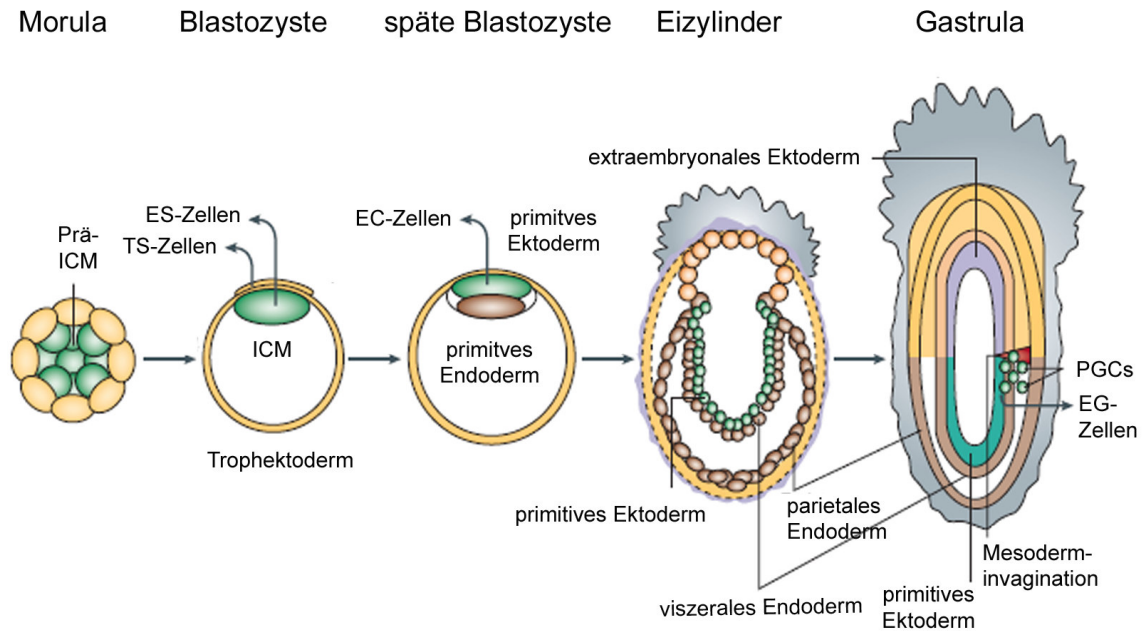


Abbildung 2.2: Oct4-Expression im Mausembryo von der Morula bis zur Gastrula.

Die grün markierten Zellen markieren pluripotente Zellen, die *Oct4* exprimieren. Die Blastozyste enthält die ICM, die aus der Prä-ICM der Morula hervorgeht und das Trophektoderm. In diesem Stadium findet *in vivo* die Implantation statt. *In vitro* können embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen) gewonnen werden. Aus der ICM bildet sich in der expandierten Blastozyste das primitive Ekto- und Endoderm. Aus dem primitiven Ektoderm können embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen) abgeleitet werden. In der weiteren *in vivo* Entwicklung folgt die Gastrulation mit der Bildung der Mesoderm-schicht zwischen Ekto- und Endoderm und der Bildung der primordialen Keimzellen (PGCs) aus denen wiederum embryonale Keimzellen („embryonic germ cells“, EG-Zellen) etabliert werden können. Modifiziert nach Boiani & Schöler 2005.

Die *Oct4*-Expression in den Zellen der Keimbahn wird geschlechtsspezifisch in verschiedenen Stadien der Gametogenese herunterreguliert (Pesce et al. 1998). In weiblichen Tieren wird *Oct4* bis Tag 15,5 pc (post coitum) exprimiert und herunterreguliert, wenn die Eizellen in das Zygotän/Pachytän der meiotischen Prophase 1 eintreten. Bei männlichen Tieren wird es in postproliferativen Prospermatogonien bis nach der Geburt exprimiert. Wenn die Spermatogenese beginnt, wird *Oct4* weiterhin in den Spermatogonien A exprimiert, aber in der weiteren Reifung herunterreguliert. In unbefruchteten Eizellen wird *Oct4* nach der Arretierung im Diplotän der meiotischen Prophase 1 - ein bis drei Tage nach der

Geburt - wieder angeschaltet. Das Protein ist dann in niedrigen Mengen bis zur Eizellreifung vorhanden (Palmieri et al. 1994; Pesce et al. 1998). In Abbildung 2.2 ist das Auftreten von Oct4-Protein im Mausembryo ab dem Morulastadium bis zur Gastrulation dargestellt.

2.2.5 Expression beim Rind

Beim Rind ist die *OCT4*-Expression bei weitem noch nicht so gut untersucht wie bei der Maus. Transkript und Protein sind auch beim Rind in der Eizelle und in der frühen embryonalen Entwicklung vorhanden (van Eijk et al. 1999; Daniels et al. 2000; Kirchhof et al. 2000; Park et al. 2003; Kurosaka et al. 2004; Vigneault et al. 2004; Degrelle et al. 2005; Vejlsted et al. 2005). Allerdings ist beim Rind das *OCT4*-Protein im Präimplantationsembryo nicht auf die pluripotenten Zellen beschränkt, sondern wurde in Blastozysten bis Tag 10 sowohl in Zellen der ICM als auch des TE (van Eijk et al. 1999; Kirchhof et al. 2000) und in Tag 12 und Tag 14 Embryonen nur noch in den Epiblastzellen nachgewiesen (Vejlsted et al. 2005). *OCT4*-mRNA wurde in Tag 7 und Tag 12 bis Tag 17 Embryonen in Zellen der ICM bzw. des Epiblasten und bis Tag 12 in Zellen des TE nachgewiesen (Degrelle et al. 2005), wobei in einer anderen Studie in Tag 7 Embryonen im TE bereits keine *OCT4*-mRNA mehr gefunden wurde (Kurosaka et al. 2004).

Eine mögliche Erklärung für die Persistenz des *OCT4*-Proteins in den Zellen des TE beim Rind könnte in der unterschiedlichen embryonalen Entwicklung bei Rind und Maus liegen (Kurosaka et al. 2004). Die Implantation erfolgt beim Rind später als bei der Maus. Die Blastozyste wächst vor der Implantation durch starke Proliferation des TE zu einem langen fadenförmigen Gebilde heran. Das bovine *OCT4*-Protein hemmt eventuell Zellen der extraembryonalen Entwicklungsreihe in der Präimplantationsentwicklung und lässt damit eine Proliferation des TE vor der Implantation zu. Degrelle et al. (2005), die *OCT4*-Transkripte auch noch im TE von Tag 12 Embryonen nachweisen konnten, spekulieren, dass die Anwesenheit von *OCT4*- und *NANOG*-Transkripten im TE einen langsamen Differenzierungs-Phänotyp im TE des Rinderembryos unterstützen. Im Gegensatz zur Maus wurden *OCT4*-Transkripte beim Rind ab dem 16-Zellstadium nachgewiesen (Kurosaka et al. 2004).

In Abbildung 2.3 ist vereinfacht das Auftreten von Oct4-Protein bis zum Blastozystenstadium und die Hochregulation der *Oct4*-mRNA im 8-16-Zellstadium bei Maus und Rind dargestellt.

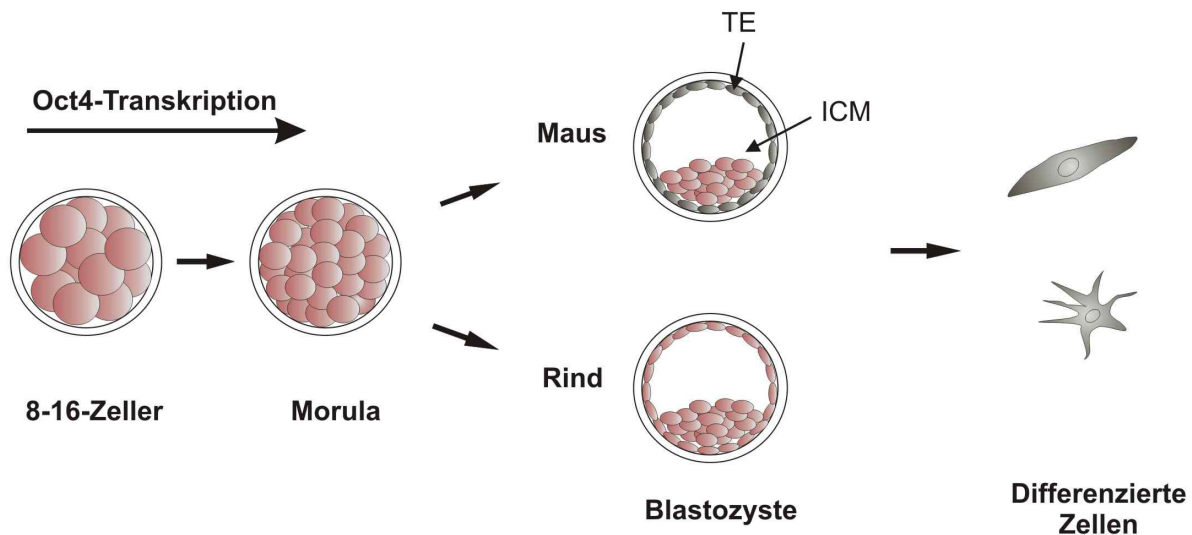


Abbildung 2.3: Oct4-Protein im frühen Maus- und Rinderembryo.

Oct4-Protein enthaltende Zellen sind rosa dargestellt. Das Trophektoderm (TE) bei der Maus, sowie differenzierte somatische Zellen enthalten kein *Oct4*-Protein (grau). Das *Oct4*-Transkript wird bei der Maus ab dem 8-Zeller (Palmieri et al. 1994; Kurosaka et al. 2004; Liu et al. 2004) und beim Rind ab dem 16-Zeller (Kurosaka et al. 2004) hochreguliert.

2.2.6 Funktion von Oct4

Um die Funktion von *Oct4* genauer zu untersuchen, wurden durch homologe Rekombination in ES-Zellen und Erzeugung von Keimbahnchimären *Oct4*-knockout Mäuse generiert (Nichols et al. 1998). *Oct4*-defiziente Embryonen entwickelten sich zwar bis zum Blastozystenstadium, waren aber nicht zur Implantation fähig. Außerdem enthielten die Blastozysten in der ICM keine pluripotenten Zellen, sondern in den Zellen der ICM konnte ein TE-spezifisches Protein nachgewiesen werden. *Oct4* scheint somit für die Entwicklung der pluripotenten Zellen des Embryos notwendig zu sein. Auch für das Überleben der PGCs scheint *Oct4* essentiell zu sein, denn eine keimzellspezifische Deletion von *Oct4* führte zur Apoptose der Keimzellen (Kehler et al. 2004). Die Bedeutung des *Oct4*-Levels für die Entwicklungspotenz wurde an ES-Zellen der Maus untersucht (Niwa et al. 2000). Es stellte sich heraus, dass das Schicksal von ES-Zellen von einer bestimmten Menge an *Oct4*-Protein abhängt. Differenzierung findet bei einer *Oct4*-Proteinmenge von 50 % über oder unter dem normalen Level statt, wobei ein Anstieg zur Bildung von primitivem Endoderm und Mesoderm und eine Reduktion zur Bildung von Trophektoderm führte. Es wird also eine definierte Menge an *Oct4* benötigt, um die Selbsterneuerung der

Stammzellen aufrecht zu erhalten und eine Hoch- oder Herunterregulierung führt zur Entwicklung in verschiedene Richtungen.

Eine Theorie über das Wirken von Oct4 in pluripotenten ES-Zellen und im Epiblast (primitives Ektoderm) postuliert, dass TE-spezifische Gene, wie z. B. das Gen für die *hCG* α - und β -Untereinheiten (Liu & Roberts 1996; Liu et al. 1997) und das *IFNT* (Interferon Tau; Ezashi et al. 2001) inaktiv sind und erst aktiviert werden, wenn *Oct4* herunterreguliert wird (Roberts et al. 2004). OCT4 hemmt nämlich die Wirkung von ETS2 auf das bovine *IFNT* und bei sinkender *OCT4*-Expression wird das bovine *IFNT* durch ETS2 aktiviert (Ezashi et al. 2001).

Erst vor kurzem fanden Niwa et al. (2005) heraus, dass Oct4 die Expression des Transkriptionsfaktors *Cdx2* („Caudal-related homeobox 2“), der an der Bildung des Trophektoderms in Mausblastozysten beteiligt ist, blockiert und somit eine Differenzierung der embryonalen Zellen zum Trophektoderm verhindert. In ES-Zellen der Maus führte ein Herunterregulieren der *Oct4*-Expression hingegen zu einer vermehrten Expression von *Cdx2*, und eine Überexpression von *Cdx2* wiederum zur Hemmung der *Oct4*-Expression, was mit einer Differenzierung in TS-Zellen einherging. Imakawa et al. (2006) wiederum untersuchten die Expression vom ovinen *IFNT* und *CDX2* in kotransfizierten NIH3T3-Zellen (murine Fibroblasten-Zelllinie) und kamen zu der Schlussfolgerung, dass CDX2 die Expression vom ovinen *IFNT* reguliert.

Aufgrund der vorliegenden Daten und des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters von *Oct4* im Embryo (Rosner et al. 1990; Schöler et al. 1990a; Palmieri et al. 1994; Yeom et al. 1996) wird Oct4 eine wichtige Funktion in der frühen embryonalen Entwicklung zugeschrieben und gilt bei der Maus als Marker für pluripotente Zellen.

2.2.7 Oct4-Promotor und Methylierung

Im Genom von Vertebraten wird die DNA hauptsächlich an den Cytosin-Resten von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) methyliert (Gruenbaum et al. 1981). Ungefähr 70 % der CpGs sind methyliert, hauptsächlich in Heterochromatin und repetitiven Sequenzen wie retrotransposablen Elementen (Yoder et al. 1997a). Die Bildung diverser Zelltypen eines Organismus wird durch die Bildung eines zellspezifischen DNA-Methylierungsmusters begleitet (Shiota et al. 2002).

Die Methylierung der CpGs geht mit Änderungen der Chromatinstruktur und einer Hemmung der Genexpression einher (Keshet et al. 1986; Antequera et al. 1990; Bird

1995; Yoder et al. 1997b). CpG-Methylierung kann die Genexpression auf zwei mögliche Arten beeinflussen: direkt durch Veränderung von Erkennungs- und Bindungsstellen für Proteine (Meehan et al. 1992; Bell & Felsenfeld 2000; Holmgren et al. 2001) oder indirekt dadurch, dass die Transkription durch die Bindung von methyl-CpG-Bindungsproteinen gehemmt wird (Nan et al. 1997; Nan et al. 1998; Ng et al. 1999; Bell & Felsenfeld 2000; Holmgren et al. 2001; Bird 2002). Bei der genomweiten Untersuchung der DNA-Methylierungsmuster von ES-, TS-Zellen, Keimzellen aus dem Hoden und einigen somatischen Geweben der Maus (Shiota et al. 2002) ergab sich, dass viele Gene gewebeabhängig methylierte Regionen („tissue dependent methylated regions“ - T-DMRs) aufweisen. Der Zusammenhang zwischen der Methylierung der regulatorischen Region von *Oct4* und der transkriptionellen Aktivität wurde mehrfach untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die *Oct4*-Expression durch eine Methylierung der regulatorischen Region beeinflusst wird (Gidekel & Bergman 2002; Hattori et al. 2004; Simonsson & Gurdon 2004; Marikawa et al. 2005; Taranger et al. 2005; Yamazaki et al. 2006). *Oct4* enthält T-DMRs, die in Zellen, die das Gen exprimieren, hypomethyliert und in differenzierten Zellen, die es nicht exprimieren dagegen hypermethyliert sind (Hattori et al. 2004). Außerdem reaktivierte die Änderung epigenetischer Modifikationen, wie DNA-Methylierung und Histonacetylierung die *Oct4*-Expression in murinen TS- und NIH/3T3-Zellen (Hattori et al. 2004). Eine Reaktivierung des *Oct4*-Gens findet auch beim SCNT statt. Bei geklonten Mäusen wurde gezeigt, dass während der ersten Teilungen die Demethylierung des *Oct4*-Promotors als stufenweiser Prozess abläuft und eine Verzögerung in der Entwicklung mit einer vermehrten Methylierung einhergeht (Yamazaki et al. 2006). Interessanterweise konnte eine Eizelle des Frosches *Xenopus laevis* das *Oct4*-Gen nach Transfer eines somatischen Kerns der Maus durch eine aktive DNA-Methylierung aktivieren (Simonsson & Gurdon 2004). Auch die Behandlung von differenzierten epithelialen 293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) mit Extrakten aus EC-Zellen (NCCIT-Zellen; undifferenzierte humane Teratokarzinomzelllinie) führte zur Aktivierung der *Oct4*-Transkription und zur Demethylierung des Promotors (Taranger et al. 2005).

2.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Allgemeines

Fluoreszenz ist die nach dem Fluorit (Flussspat) benannte Form der Lumineszenz von gasförmigen, flüssigen oder festen Stoffen (Brockhaus 2006). Wenn ein Fluorophor Licht absorbiert, wird die gesamte Energie eines Photons auf das Fluorophor übertragen und ein Elektron kann ein höheres Energieniveau erreichen. Es entsteht ein angeregtes Atom oder Molekül, das sehr kurzlebig ist und schnell – in der Regel nach einigen Nanosekunden - wieder in seinen energieärmeren Grundzustand unter Verlust der überschüssigen Energie zurückfällt (Murphy 2001b; Lichtman & Conchello 2005). Die Energie kann beispielsweise in Form von Fluoreszenz abgegeben werden, die allerdings eine niedrigere Wellenlänge aufweist, da bei diesem Prozess Energie verloren geht. Die Differenz zwischen absorbierter und emittierter Wellenlänge wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Diese Verschiebung macht es möglich, mittels geeigneter Filter im Strahlengang des Mikroskops das emittierte Licht vom Anregungslicht zu trennen und so ein fluoreszierendes Objekt bei schwarzem Hintergrund sichtbar zu machen.

2.3.2 GFP – Das grün fluoreszierende Protein

2.3.2.1 Geschichte und Allgemeines

Die Entdeckung dieses Proteins liegt mittlerweile über vier Jahrzehnte zurück. Im Jahr 1962 fanden Wissenschaftler heraus, dass das chemilumineszente Protein Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria* nach Anregung mit UV-Licht mit einem grün fluoreszierenden Protein assoziiert ist (Shimomura et al. 1962). Bald darauf veröffentlichten diese Autoren das Emissionsspektrum des grün fluoreszierenden Proteins („green fluorescent protein“, GFP), mit einem Maximum bei 508 nm (Johnson et al. 1962). Interessanterweise hat die grüne Biolumineszenz von *Aequorea* ihr Maximum bei 508 nm, während die Chemilumineszenz von purem Aequorin blau ist mit einem Maximum bei 480 nm, und damit nah am Anregungsmaximum von GFP liegt. GFP konvertiert somit die blaue Chemilumineszenz von Aequorin in eine grüne Fluoreszenz. Bei anderen Coelenteraten (Hohltieren) wie *Obelia* und der Koralle *Renilla* konnte ebenfalls eine solche Farbverschiebung festgestellt werden (Morin & Hastings 1971). Schließlich konnten Morise et al. (1974) die

Vermutung des strahlungsfreien Energietransfers bestätigen. Nach Aufreinigung, Kristallisierung und Messung des Absorptionsspektrums von GFP zeigten sie, dass Aequorin seine Lumineszenzenergie auf GFP übertragen kann. Aequorin ist allerdings nicht für die Fluoreszenz von GFP notwendig, da gereinigtes GFP durch Anregung mit UV-Licht grün fluoreszieren kann (Chalfie et al. 1994). Prasher et al. (1992) gelang es dann, das kodierende Gen zu klonieren. Es wurde gezeigt, dass die Expression des Gens auch in anderen Organismen Fluoreszenz erzeugt (Chalfie et al. 1994; Inouye & Tsuji 1994a). Das GFP-Gen enthält also alle Informationen für die Synthese des Chromophors. Die Einsatzmöglichkeiten von GFP sind ausgesprochen vielfältig wie z. B. die Markierung von Proteinen oder Analyse der Genexpression in lebenden Zellen (Tsien 1998). Die Tatsache, dass GFP für die Fluoreszenz kein exogenes Substrat benötigt, ist ein weiterer entscheidender Vorteil und hat unter anderem dazu beigetragen, dass GFP bei einer wachsenden Anzahl von Spezies erfolgreich als Reporter für Genexpression eingesetzt wurde (Kain et al. 1995).

2.3.2.2 Struktur

Die Untersuchung der Struktur des GFP-Proteins ergab, dass die 238 Aminosäuren eine Zylinderstruktur („ β -can“) ausbilden, bei der 11 β -Stränge eine α -Helix umgeben, die das Chromophor enthält (siehe Abbildung 2.4), das ausschlaggebend für die Fluoreszenz ist (Ormo et al. 1996; Yang et al. 1996a). Bei dem Chromophor handelt es sich um p-Hydroxybenzylidon-Imidazolinon, das sich autokatalytisch aus einer Sequenz des Proteins bildet, und zwar der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 (Prasher et al. 1992; Cody et al. 1993). Diese Struktur bedingt die Stabilität des Proteins. Die Einbettung des Chromophors in das Zentrum des Zylinders schützt es vor schädigenden Reagenten.

2.3.2.3 Stabilität

GFP unterliegt auch bei intensiver Beleuchtung mit einem Fluoreszenzmikroskop weniger dem Fotobleichen als Fluorescein (Wang & Hazelrigg 1994; Niswender et al. 1995). Bei den Wellenlängen von 450 bis 490 nm sind das Wildtyp-GFP (wt-GFP) und "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) relativ stabil. Geringes Fotobleichen tritt bei wt-GFP nach Anregung mit 340 bis 390 nm oder 395 bis 440 nm auf (Chalfie et al. 1994; Niswender et al. 1995).

Für die Fluoreszenz muss im GFP das Tyr-66 oxidiert sein (Heim et al. 1994). Stark reduzierende Stoffe, wie z. B. 2 mM Eisensulfat wandeln GFP in eine Form um, die

nicht fluoresziert, was durch Sauerstoff wieder umgekehrt werden kann (Inouye & Tsuji 1994b). Schwach reduzierende Substanzen, wie z. B. 2 % β -Mercaptoethanol, und 10 mM L-Cystein haben keinen Einfluss auf die GFP-Fluoreszenz (Inouye & Tsuji 1994b).

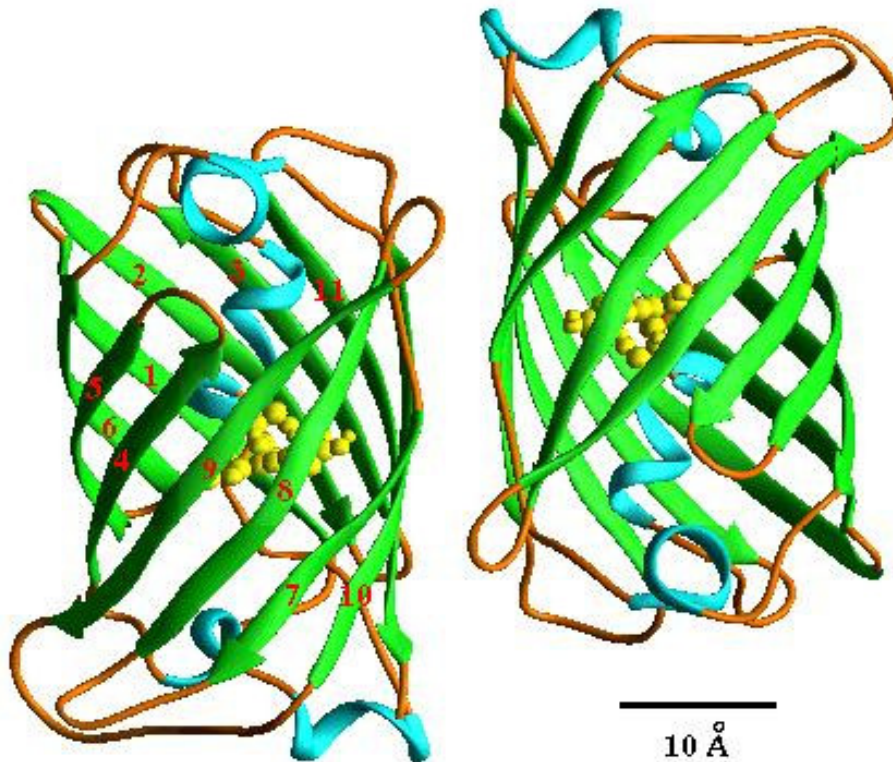


Abbildung 2.4: Die so genannte „ β -can“-Struktur von GFP

Nach Yang et al. 1996a.

Die Fluoreszenz von wt-GFP ist zwischen pH 5.5 und pH 12 stabil (Bokman & Ward 1981), die von EGFP jedoch nur zwischen pH 7,0 und pH 11,5 (Patterson et al. 1997). Die GFP-Fluoreszenz ist stabil nach Fixierung mit Glutaraldehyd und Formaldehyd, allerdings gegenüber einigen Nagellacken empfindlich (Chalfie et al. 1994; Wang & Hazelrigg 1994).

GFP-Protein ist resistent gegenüber Hitze ($T_m = 70\text{ °C}$), alkalischem pH, Detergentien, organischen Lösungsmitteln und den meisten Proteasen (Bokman & Ward 1981; Ward 1981). Die Bildung des GFP-Chromophors scheint temperaturempfindlich zu sein. In GFP-exprimierenden Säugerzellen wurde gezeigt, dass diese stärker fluoreszieren, wenn sie bei 30 bis 33 °C, statt bei 37 °C kultiviert wurden (Bokman & Ward 1981; Ogawa et al. 1995; Pines 1995).

Mutagenesestudien an GFP brachten Varianten mit verbesserter Proteinfaltung und günstigeren Expressionseigenschaften hervor. Die Geschwindigkeit der Bildung des Chromophors wurde durch den Austausch einer Aminosäure, und zwar Ser⁶⁵ → Thr⁶⁵ (S65T), von 2 auf 0,45 Stunden beschleunigt (Heim et al. 1995). Durch Konversion von Codons des wt-GFP konnte die Expression für den Einsatz in bestimmten Organismen verbessert werden (Tsien 1998). Die Dimerisierung von GFP bei hohen Konzentrationen wurde durch die Mutationen Ala²⁰⁶ → Lys²⁰⁶, Leu²²¹ → Lys²²¹ oder Phe²²³ → Arg²²³ behoben (Zacharias et al. 2002). Das Absorptionsspektrum von wt-GFP weist zwei Gipfel, einen größeren bei 395 nm und einen kleineren bei 475 nm auf, die zu einem einzigen Maximum bei 489 nm umgewandelt werden konnten, indem durch eine Aminosäure-Substitution Serin an Position 65 durch ein Threonin, Alanin, Glycin, Cystein oder Leucin ausgetauscht wurde (Delagrave et al. 1995; Heim et al. 1995).

Die GFP-Variante EGFP zeichnet sich durch verschiedene Charakteristika aus, die zu einer Verbesserung in der Anwendung führten, wie die S65T-Mutation (Ser⁶⁵ → Thr⁶⁵), die mit einer starken Fluoreszenz einhergeht (Heim et al. 1995) und die Mutation Phe⁶⁴ → Leu⁶⁴, die zu einer Verringerung der Temperaturempfindlichkeit führte (Cormack et al. 1996). Beim destabilisierten EGFP (dEGFP) wurden die Aminosäuren 422 bis 461 der Degradationsdomäne der Ornithin Decarboxylase der Maus (MODC) mit dem C-terminalen Ende von EGFP fusioniert (Li et al. 1998b). dEGFP bietet mit 2 Stunden Halbwertszeit (HWZ) einen Vorteil gegenüber dem originalen EGFP, dessen geschätzte HWZ bei über 24 Stunden liegt einen entscheidenden Vorteil bei der Beobachtung von dynamischen Prozessen (Li et al. 1998b).

Eine weitere GFP-Mutante ist das blau fluoreszierende Protein (BFP), bei dem die Aminosäure Tyr⁶⁶ durch Histidin ersetzt wurde und das Absorptionsmaximum bei 384 nm und das Emissionsmaximum bei 448 nm liegt (Heim et al. 1994). Durch Austausch der Aminosäure Tyr⁶⁶ durch Trp⁶⁶ entstand das cyan fluoreszierende Protein (CFP) mit einem Spektrum zwischen BFP und EGFP (Heim et al. 1994). Das gelb fluoreszierende Protein (YFP) weist ein Absorptionsmaximum bei 505 nm auf und fluoresziert im gelben Bereich mit einem Maximum bei 530 nm, das es mittlerweile, wie auch das CFP und BFP, als „enhanced“ (EYFP, ECFP und EBFP; Angres & Green 1996; Yang et al. 1996b) und destabilisierte Varianten gibt (Clontech 2001). Ein Ausschnitt von wt-GFP-Abkömmlingen mit ihren verschiedenen

Absorptions- und Emissionsspektren ist in Abbildung 2.5 dargestellt, inklusive DsRed einem GFP-ähnlichen Protein aus der Koralle *Discosoma sp.* (Matz et al. 1999).

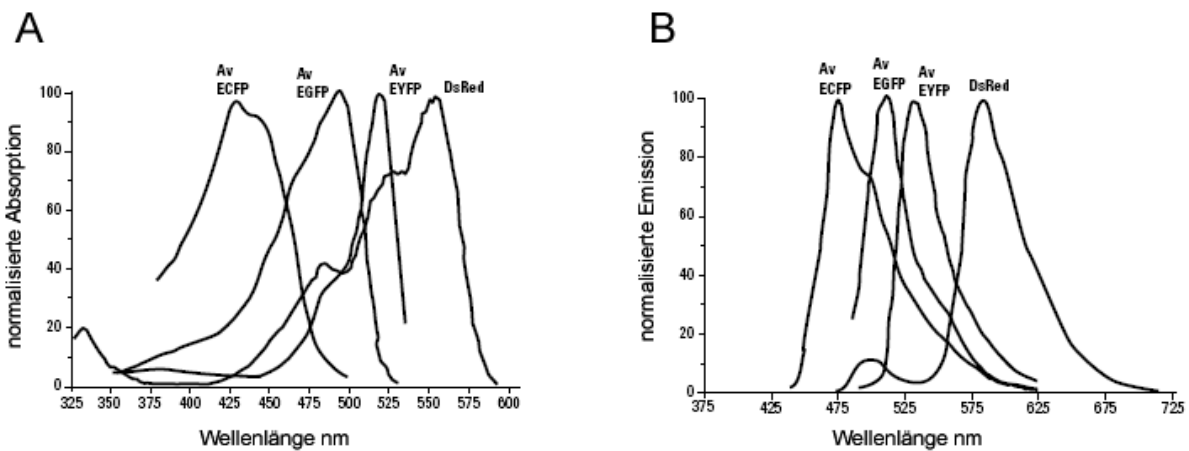


Abbildung 2.5: Die Absorptions- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe.

EGFP, ECFP und EYFP sind alles Varianten von GFP aus Aequorea victoria (Av). DsRed ist ein GFP-ähnliches Protein aus einer Koralle. Nach Clontech 2001.

2.3.2.4 GFP als Reporter

GFP, das direkt fluoreszenzmikroskopisch durch Anregung mit blauem oder UV-Licht nachgewiesen werden kann und seine Fluoreszenzeigenschaften auch als Teil eines Fusionsproteins behält, eröffnete vielfältige Anwendungsmöglichkeiten (Chalfie et al. 1994). GFP lässt sich sowohl an den N- als auch C-Terminus verschiedener löslicher und membrangebundener Proteine koppeln (Cubitt et al. 1995). Die Kopplung von GFP mit einem Protein wurde an einer Vielzahl von Proteinen und in Zellen von verschiedenen Organismen durchgeführt (Bokman & Ward 1981; Brand 1995; Lim et al. 1995; Marshall et al. 1995; Ogawa et al. 1995; Pines 1995; Webb et al. 1995).

Eine häufige Anwendung von GFP ist die Verknüpfung mit einem Promotor für die Untersuchung der räumlichen, zeitlichen und speziesspezifischen Aktivität des Promotors in Zellen und Organismen (Amsterdam et al. 1995; Ikawa et al. 1995; Zhuo et al. 1997; Lemaire-Vieille et al. 2000). Die Identifizierung transgener Embryonen mittels GFP stellt eine sehr einfache, nicht-invasive, schnelle Methode bei der Maus (Ikawa et al. 1995; Takada et al. 1997; Kato et al. 1999) und dem Rind dar (Chan et al. 1999; Murakami et al. 1999; Hofmann et al. 2003).

GFP-Systeme wurden auch verwendet, um verschiedene Bedingungen für den Kerntransfer auszutesten, wie z. B. die Auswirkung der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen, Zellgrößen und Zellpassagenummern beim Rind (Bhuiyan et al. 2004; Cho et al. 2004).

Ein Beispiel für die Verwendung von GFP als Reporter unter der Kontrolle eines Promotors ist die Verknüpfung von EGFP mit dem *Oct4*-Promotor. Yeom et al. (1996) fanden heraus, dass bei der Maus ein 18 kb großes genomisches *Oct4*-Fragment („genomic *Oct4* fragments“, GOF), bestehend aus stromaufwärts liegenden regulatorischen Bereichen und dem *Oct4*-Gen die endogene *Oct4*-Expression widerspiegelt. Als Reportergen wurde das *lacZ*-Gen verwendet, das für weitere Studien durch EGFP ersetzt wurde und transgene Mäuse mit GOF18/GFP erzeugt wurden (Yoshimizu et al. 1999). Die von Szabo et al. (2002) generierte GOF18- Δ PE-EGFP-transgene Mauslinie OG2 fand in vielen weiteren Studien Verwendung (Boiani et al. 2002; Do & Schöler 2004; Boiani et al. 2005; Eckardt et al. 2005; Kues et al. 2005). Beispielsweise wurde die Lokalisation und Höhe der *Oct4*-Expression in Kerntransferembryonen der Maus (Boiani et al. 2002) und die Auswirkung von Kulturbedingungen auf die *Oct4*-Expression (Boiani et al. 2005) untersucht. Do & Schöler (2004) konnten zeigen, dass Zellkerne embryonaler Stammzellen in der Lage sind somatische Zellen von *Oct4*-EGFP-transgenen Mäusen zu reprogrammieren. Ebenso führte der Transfer von *Oct4*-EGFP-transgenen Cumuluszellen in Blastomeren von Embryonen im 2- und 4-Zellstadium zur Aktivierung des Reportergens (Eckardt et al. 2005). Kues et al. (2005) fanden in somatischen Explantaten von Feten eine Subpopulation an Zellen, die bei entsprechender Behandlung Eigenschaften von Stammzellen aufwiesen. Zahlreiche Studien untersuchten mittels des *Oct4*-EGFP-Konstruktes *Oct4*-Expression in Keimzellen der Maus (Anderson et al. 2000; Ohbo et al. 2003; Ohmura et al. 2004). Beim Rind und Schwein wurde das Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP in Zygoten mikroinjiziert, um die Aktivierung in der Präimplantationsentwicklung *in vitro* zu untersuchen (Kirchhof et al. 2000). Sogar beim Japankärpfling (Hong et al. 2004) wurde ein *Oct4*-GFP-Reportergenkonstrukt mit den genomischen *Oct4*-Fragmenten der Maus erfolgreich eingesetzt. Ein *Oct4*-GFP-Konstrukt mit dem humanen *OCT4*-Promotor wurde verwendet, um ES-Zellen des Menschen stabil zu transfizieren (Gerrard et al. 2005).

2.3.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Beim Epifluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 2.6) dient das Objektiv sowohl der Vergrößerung und Abbildung, als auch der Fluoreszenzanregung (Lichtman & Conchello 2005). Als Lichtquelle dienen in der Regel Xenon- oder Quecksilber-Bogenlampen (Lichtman & Conchello 2005). Durch ein Anregungsfilter gelangt selektiv nur Licht einer definierten Wellenlänge für die Fluoreszenzanregung auf die Probe. Durch einen dichroitischen Spiegel und einen Emissionsfilter wird das vom Präparat ausgesandte längerwellige Fluoreszenzlicht getrennt von dem kürzerwelligeren Anregungslicht, das vom Präparat reflektiert wird. Selektiv wird nur das Fluoreszenzlicht einer definierten Wellenlänge in das Okular oder eine Kamera geleitet.

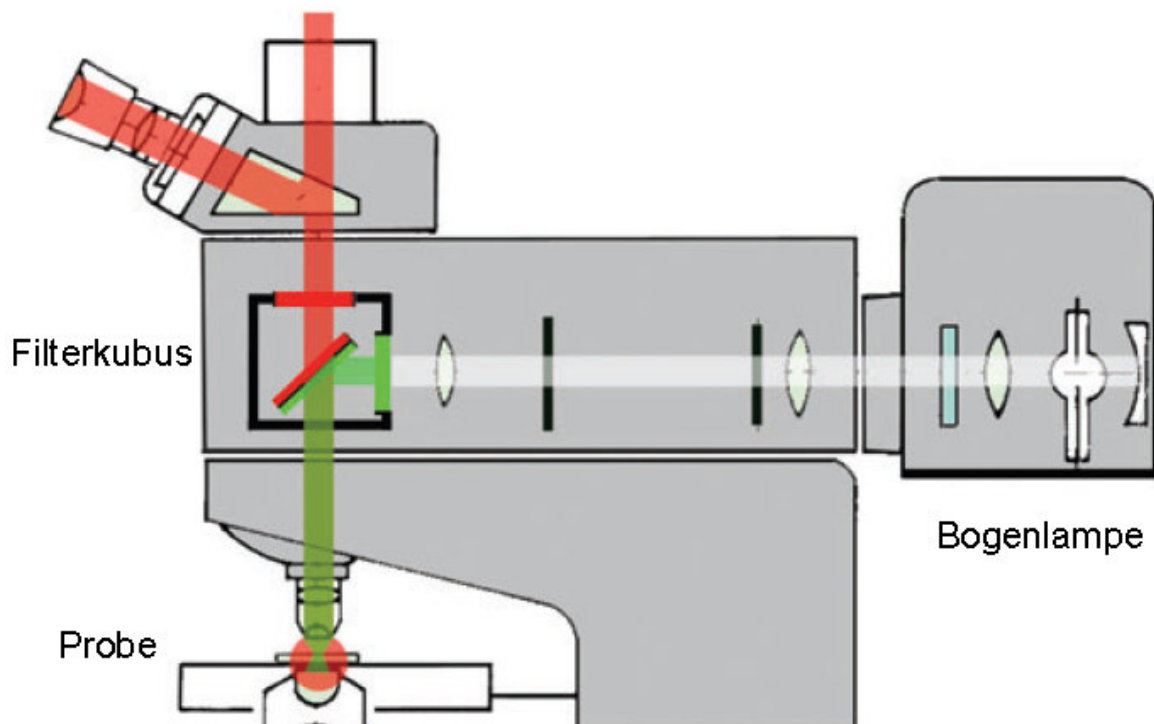


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops.

Modifiziert nach Lichtman & Conchello 2005.

2.3.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

2.3.4.1 Allgemeines

Die konfokale Mikroskopie wurde ursprünglich 1955 von Marvin Minsky entwickelt und 1957 zum Patent angemeldet (Minsky 1961). Trotz der Fortschritte in der

optischen Technologie dauerte es weitere 15 Jahre bevor der erste Rasterscan an einem Objekt durchgeführt wurde (Wilke 1985). Mit der Erfindung des Lasers 1960 (Mainman 1960) waren erstmals monochromatische Lichtquellen hoher Helligkeit in einem Format verfügbar, das den Einbau in Instrumente ermöglichte.

2.3.4.2 Prinzip

Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie wird ein Präparat mit einem fokussierten Laserstrahl rasterförmig abgetastet.

Das konfokale Mikroskop ist ein integriertes System, bestehend aus einem Mikroskop, Laserlichtquellen, einer Scan-Einheit mit optischen und elektronischen Elementen, sowie einem Computer inklusive Software und Monitor (Murphy 2001a).

Die Scan-Einheit besteht aus folgenden Komponenten:

- Eingänge für eine oder mehrere externe Laserquellen
- Fluoreszenzfiltersets
- ein Galvanometer-basierter Raster Scanning Mechanismus
- eine oder mehrere Lochblenden („pinholes“)
- Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier Tube, PMT).

Ein konfokales Laser Scanning Mikroskop funktioniert wie nachfolgend erklärt (Pawley 1995; Conchello & Lichtman 2005) und in Abbildung 2.7 mittels einer schematischen Zeichnung (Zeiss 2003) dargestellt. Ein Laserstrahl wird durch ein Objektiv auf eine fluoreszierende Probe fokussiert. Die Mischung aus reflektiertem Anregungslicht und Emissionslicht wird durch das gleiche Objektiv eingefangen und über einen dichroitischen Spiegel in Richtung PMT geleitet. Das reflektierte Licht wird durch den dichroitischen Spiegel abgelenkt, wohingegen die emittierte längerwellige Fluoreszenz durch den Spiegel zum PMT Detektor gelangt. Mit Hilfe der Lochblende („pinhole“), die konjugiert (konfokal) zur Fokusebene angeordnet ist, wird selektiv nur das aus der jeweiligen lateralen und axialen Position des Laserfokus stammende Emissionslicht gesammelt und zum Detektor geleitet, während das nicht aus der Fokusebene stammende Emissionslicht ausgeblendet wird (und nicht zum Detektor gelangt). Durch Verschieben der Fokusebene lässt sich das gesamte dreidimensionale Objekt in einer Serie digitaler optischer Schnitte abbilden. Diese können anschließend digital verarbeitet und quantitativ analysiert werden

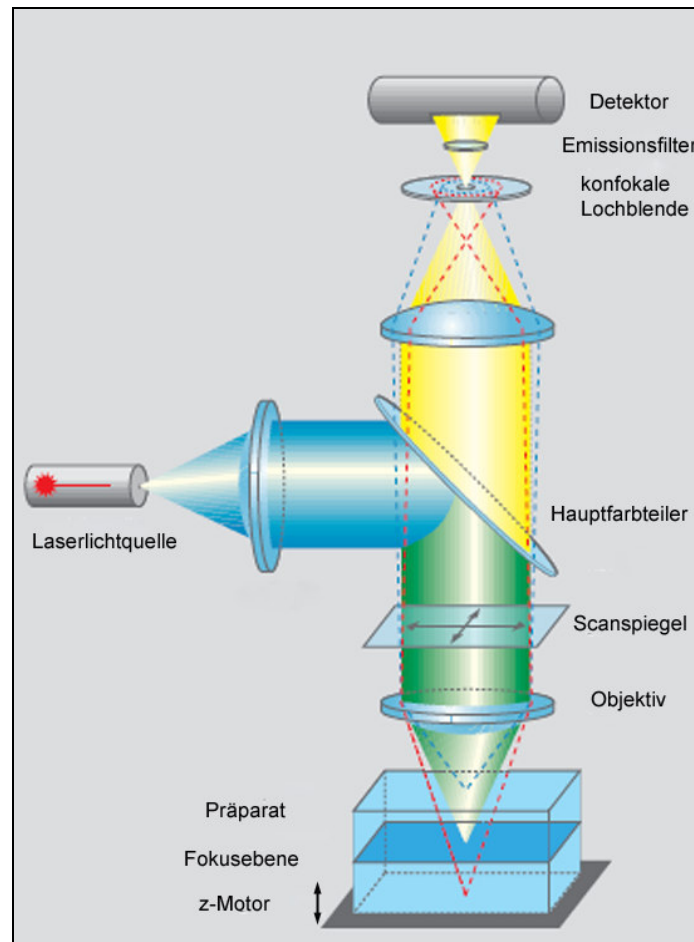


Abbildung 2.7: Bestandteile eines Laser Scanning Mikroskops von Zeiss.

Der Laserstrahl wird durch ein Objektiv in das Präparat fokussiert. Eine Kombination von Hauptfarbteiler (HFT), NebenfARBteiler (NFT) und Emissionsfilter (EF) bestimmt den Fluoreszenz-Strahlengang. Der HFT trennt Anregungslicht (Laser) und Fluoreszenzemission, der NFT spaltet die Fluoreszenzemission in Spektralbereiche auf und der EF bestimmt den Spektralbereich der in einem Kanal detektiert wird. Über eine konfokal zum Laserfokus angeordnete Lochblende („pinhole“) wird Emissionslicht, das nicht aus der Fokusebene stammt, ausgeblendet. Rasterförmig wird die Präparatfläche mit Hilfe eines Scanspiegels von dem fokussierten Laserstrahl Pixel für Pixel abgetastet. An jedem Rasterpunkt werden vom Detektor (PMT) nur die Photonen registriert, die aus der jeweiligen lateralen und axialen Position des Laserfokus emittiert werden. Mit Hilfe des z-Motors wird die Fokusebene im Präparat verschoben. Nach Zeiss (2003).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, München
Färbekasten nach Hellendahl	Roth, Karlsruhe
Gelkammern für Agarosegele	MWG-Biotech, Ebersberg
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Illuminator Eagle Eye II	Stratagene, Heidelberg
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
MS1 Minishaker	IKA, Wilmington, USA
Nucleofector™	Amaxa, Köln
Neubauer Zählkammer	MAGV, Rabenau-Londorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Spektrophotometer	Beckman, Palo Alto, USA
SpeedVac (Vacuum Concentrator)	Bachofer, Reutlingen
Phosphorimager Storm 860	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationszähler LS6500	Beckman, Palo Alto, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transferpettor	Brand, Wertheim

Mikroskope und Kameras

Axiocam HR	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Leitz DM IL Mikroskop	Leica, Wetzlar
LSM 510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Stereomikroskop Stemi SV6	Zeiss, Oberkochen

Thermocycler

Biometra Uno II Thermoblock	Biometra, Göttingen
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen

GS-6K	Beckman, München
Tischzentrifugen mit Kühlung (5417R)	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet worden.

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EB-Puffer	Qiagen, Hilden
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Lösung: 1 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PVP 40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
SDS ultrapure	ICN, Irvine, USA
Spermidine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe

3.1.3 Enzyme und sonstige Reagenzien

Avidin Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
α -[³² P]-dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DAKO Hybridisierungslösung	Dako, Glostrup, Denmark
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Roche, Mannheim
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid-Hyb Buffer [®]	Amersham Biosciences, Weiterstadt
Restriktionsenzyme und -puffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Restriktionsenzyme und -puffer	New England Biolabs, Boston
TAMRA-dUTP	Applied Biosystems
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Wizard genomic DNA purification kit [®]	Promega, Wisconsin, USA
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.1.4 Zusätze für die Zellkultur

Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	
+ Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Human Dermal Fibroblast Nucleofector [™] Solution	Amaxa, Köln

Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Molekulargewichtsstandards für DNA

Gene Ruler™ (1 kb DNA Ladder)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder Plus)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III-Marker,	MBI Fermentas, St. Leon Roth
pUC Mix Marker 8	MBI Fermentas, St. Leon Roth

3.1.6 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser für CLSM, Dicke 1.170 ± 0.01 mm	Karl Hecht AG, Sondheim,
Fixo Gum	Marabu, Tamm
Gel-Blotting-Papiere (GB002) (Whatman-Papier)	Schleicher & Schüll, Dassel
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Kulturflaschen mit Filter	Nunc, Wiesbaden
Gelochte Klebefolie	Mactac, Stow, USA
MicroSpin™ S-300 HR Columns	Amersham, Freiburg
Millex GP 22 µm (Filter)	Millipore, Schwalbach
Multiwellplatten für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Nucleofector™ Kunststoffpipette	Amaxa, Köln
Nylonmembran Biodyne® B	Pall, Portsmouth, England
Objektträger Super Frost® Plus	Roth, Karlsruhe
Parafilm® M	American Can Company, Greenwich, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Saran® Wrap-Folie	Dow Chemical Company, Midland, USA
Storage Phosphor Screen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Transferpettor-Caps	Brand, Wertheim
4-well Multischale	Nunc, Wiesbaden

Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.7 Verwendete Software

Axio Vision 4.2	Zeiss, Oberkochen
ImageJ 1.34s	National Institutes of Health (http://rsb.info.nih.gov/ij/), Bethesda, USA
Image Quant 5.0	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
LSM Software 3.2	Zeiss, Oberkochen
Primer Express 2	Applied Biosystems, Darmstadt

3.2 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien

Anmerkung: Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, durch eine Milliporeanlage vollentsalztes Wasser, bezeichnet als Aqua bidest.

3.2.1 Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)

20 mg Proteinase K
 1 ml Aqua bidest.
 aliquotiert; Lagerung bei -20 °C

3.2.2 Cutting Buffer

2,5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
 5,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 1,0 ml 5 M NaCl
 250 µl 1 M DTT
 127 µl Spermidine (500 mg/ml)
 ad 50 ml Aqua bidest.
 Lagerung bei 4 °C

3.2.3 Puffer für Agarosegele

3.2.3.1 10x TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA)

108 g Tris-Base
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,0)
ad 1000 ml Aqua bidest.
autoklaviert

3.2.3.2 1x TBE-Laufpuffer

100 ml 10x TBE
ad 1000 ml Aqua bidest.

3.2.3.3 6x Probenpuffer für DNA

3 ml Glycerin
7 ml Aqua bidest.
1 Spatelspitze Bromphenolblau
aliquotiert, Lagerung bei 4-8 °C
alternativ: 6x Ladepuffer (MBI Fermentas)

3.2.4 Molekulargewichtsstandard

20 µl jeweiliger Standard
20 µl 6x Laufpuffer
80 µl Aqua bidest.

3.2.5 dNTPs 1mM

dNTP-Mix 10 mM: Stocklösung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM) und Aqua bidest.

Herstellung 1 mM dNTP-Mix durch Verdünnung 1:10 mit Aqua bidest.
aliquotiert und Lagerung bei -20 °C;

3.2.6 10x dNTP-Mix U

20 µl dATP (100 mM)
20 µl dCTP (100 mM)

20 µl dGTP (100 mM)
 16 µl dTTP (100 mM)
 ad 1000 µl Aqua bidest.
 aliquotiert; Lagerung bei - 20 °C
 dATP, dCTP, dGTP Endkonzentration: 2 mM
 dTTP Endkonzentration: 1,6 mM

3.2.7 20x SSC (Standard Sodium Citrate) pH 7,0

175,3 g NaCl
 88,2 g Na-Citrat
 ad 1000 ml Aqua bidest.
 mit HCl auf pH 7,0 eingestellt

3.2.8 Denaturierungslösung und Transferpuffer: 0,4 N NaOH - Southern Blot

80 ml 5 N NaOH
 ad 1000 ml Aqua bidest.

3.2.9 Waschlösung Southern Blot: 2x SSC/0,1 % SDS

Tabelle 3.1: Waschlösung: 2x SSC/0,1 % SDS

	125 ml (1 Röhrchen)	250 ml (2 Röhrchen)	375 ml (3 Röhrchen)
20x SSC [ml]	12,5	25	37,5
10 % SDS [ml]	1,25	2,5	3,75
H ₂ O [ml]	111,25	222,5	333,75

3.2.10 Waschlösung Southern Blot: 1x SSC/0,1 % SDS

Tabelle 3.2: Waschlösung: 1x SSC/0,1 % SDS

	125 ml (1 Röhrchen)	250 ml (2 Röhrchen)	375 ml (3 Röhrchen)
20x SSC [ml]	12,5	25	37,5
10 % SDS [ml]	2,5	5	7,5
H ₂ O [ml]	235	470	705

3.2.11 Methanol-Eisessig

1 Teil Eisessig

3 Teile Methanol

frisch angesetzt vor weiterer Verwendung bei -20 °C gelagert

3.2.12 Lösungen für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

3.2.12.1 70 % Formamid/2x SSC pH 7,4

10 ml 20x SSC

70 ml Formamid

ad 100 ml Aqua bidest.

mit HCl auf pH 7,4 eingestellt; Lagerung bei -20 °C

3.2.12.2 0,05 % Tween/2x SSC

500 µl Tween

10 ml 20x SSC

ad 100 ml Aqua bidest.

Lösung frisch angesetzt.

3.2.12.3 DAPI - 4',6-Diamidino-2-phenylindole

200 ng/ml in 2x SSC, pH 7.0

Lagerung in dunklem Gefäß bei 4 °C

3.2.13 Paraformaldehyd (4 %)

4 g Paraformaldehyd

ad 100 ml PBS

zum Lösen einige Tropfen 2,5 N NaOH zugeben

gelöst bei 55 °C (im Wasserbad)

mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

aliquotiert und gelagert bei -20 °C

3.2.14 PBS-PVP (1mg/ml)

500 mg PVP 40
ad 500 ml PBS
steril filtriert

3.2.15 Hoechst 33342-Lösung (5 mg/ml)

100 mg Hoechst 33342
ad 20 ml Aqua bidest.
aliquotiert und gelagert bei -20 °C
Verdünnung auf 1 µg/ml mit PBS-PVP vor Gebrauch

3.2.16 Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur

Kulturmedien, Zusätze und FKS für die Zellkultur wurden mit einem Filter GP Express Plus Membran (SCGPT01RE) (0,22 µm) der Firma Millipore steril filtriert.

3.2.16.1 Fetales Kälberserum (FKS)

FKS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56 °C inaktiviert, steril filtriert und aliquotiert; Lagerung bei -20 °C.

3.2.16.2 Nährmedium für fetale bovine Fibroblasten

Dulbecco Modified Eagle Medium (High Glucose/L-Glutamax) mit
10 % FKS
1 % nichtessentielle Aminosäuren (100x)
1 % L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin und Streptomycin (100x)
0,1 mM β-Mercaptoethanol
steril filtriert und Lagerung bei 4 °C

3.2.16.3 PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

136 mM NaCl
8,1 mM Na₂HPO₄
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
steril filtriert und autoklaviert

3.2.16.4 PBS mit Penicillin/Streptomycin

PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin (100x); steril filtriert, Lagerung bei 4 °C

3.2.16.5 2xTrypsin/EDTA

1 Volumenanteil 10x Trypsin/EDTA

4 Volumenanteile PBS

aliquotiert, Lagerung bei -20 °C

3.2.16.6 Geneticin-Lösung (G418) 100 mg/ml

G418 in DMEM gelöst;

steril filtriert und aliquotiert, Lagerung bei -20 °C

3.3 OligonukleotideOligonukleotide für Genotypisierung

GOFGFP4 5' - CCTTGATGCCGTTCTTCTGCT - 3'

GOFGFP3 5' - CCCTAGGTGAGCCGTCTTTCC - 3'

Oligonukleotide für Southern Blot und Sequenzierung

EGFP5 5' - TACGGCAAGCTGACCCTGAAG - 3'

EGFP3 5' - AGGACCATGTGATCGCGCTTC - 3'

Oligonukleotide für FISH

Sonde für das Reporter-genkonstrukt GOF18-ΔPE-EGFP:

FISH4fw 5' - CCATCGCCTAAAGTTGCC - 3'

FISH4rev 5' - TCCGATGCCAAATGACCAT - 3'

FISH5fw 5' - ATCTCACAAGGTGCCCCACC - 3'

FISH5rev 5' - CAGAACCCACGACATCACTC - 3'

FISH8fw 5' - GAAGCTTTGTGAACTTGGCGG - 3'

FISH8rev 5' - TGCAAGGGATGGTGTCTTGTCT - 3'

EGFP5 5' - TACGGCAAGCTGACCCTGAAG - 3'

EGFP3 5' - AGGACCATGTGATCGCGCTTC - 3'

FISH10fw 5' - GCCTGGATTGTTTCGGCCT - 3'

FISH10rev 5' - CATCGGTATCCACTCGCACC - 3'

FISH11fw 5' - CCTTTGTGGAGCACCTCAGC - 3'

FISH11rev 5' - CCAAATGTCCATGCCCCAG - 3'

FISH12fw	5' - GGTGGAGGAAGCCGACAACA - 3'
FISH12rev	5' - ACCAGGGTCTCCGATTTGC - 3'
OCT4se	5' - GGGTCAAGTCCAGGTCGCTA - 3'
OCT4as	5' - TCCAGTGAGCTACAAGCCCAG - 3'
OCT2se	5' - GCCAGAGGGTACCAGATGTCA - 3'
OCT2as	5' - TTGCCTGCATGATTGGGTATC - 3'
OCT1se	5' - ACCCAATCATGCAGGCAAAC - 3'
OCT1as	5' - TGCTCCACCCACAAGAAACC - 3'

Sonde für Positivkontrolle, Locus *D6Z1*:

F1: 2083_up	5' - GAGGGGAAATGATTGCATTG - 3'
2084_dn	5' - GAAACCCTGATGACCAGCAT - 3'
F2: 2085_up	5' - CTTCTGGGAGTCTGGGAGTG - 3'
2086_dn	5' - CTTGGAAC TTTGGCCTTGAG - 3'
F3: 2089_up	5' - GGGGACAAGGAAACACCATA - 3'
2092_dn	5' - CCACCACCCAAGGTTACAGT - 3'

3.4 Zellen

Für die Transfektion wurden bovine fetale Fibroblasten verwendet, die aus einem 42 Tage alten Rinderfetus isoliert wurden. Es handelt sich um eine weibliche Fibroblastenkultur mit der Bezeichnung BFF116.

3.5 Methoden

3.5.1 Expressionsvektoren

3.5.1.1 Reporter-genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP

Das verwendete Genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP wurde im EMBL (Europäisches Molekularbiologisches Labor, Heidelberg, Abtl. Prof. Dr. H. Schöler) erstellt und für diese Untersuchungen von Prof. Niemann (Mariensee) zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt (siehe Abbildung 3.1) besteht aus einem 18 kb großen *Oct4*-Fragment („genomic Oct4 fragment“, GOF) der Maus mit einer Deletion im proximalen Enhancer (PE). Die Promotorregion mit einer Größe von 8,7 kb wurde mit der

codierenden Sequenz von EGFP („enhanced green fluorescent protein“; pEGFP-1, Clontech) verknüpft. Das gesamte Konstrukt hat eine Größe von 21,2 kb.

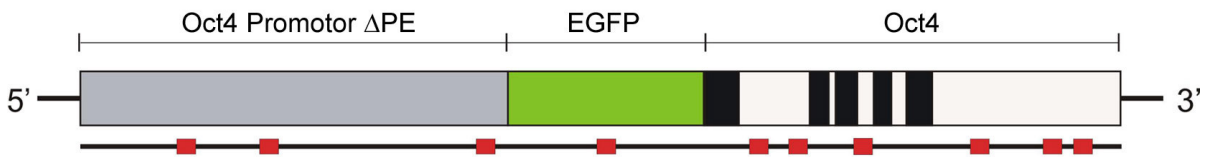


Abbildung 3.1: Das 21,2 kb große Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP.

Die Promotorregion von Oct4 mit einer Deletion im proximalen Enhancer (Δ PE) ist mit dem EGFP-Gen (Clontech) fusioniert. Im codierenden Bereich von Oct4 sind die Introns als weiße Abschnitte und die Exons als schwarze Kästchen dargestellt. Die roten Kästchen stellen die Hybridisierungsstellen der GOF18- Δ PE-EGFP-spezifischen FISH-Sonde dar.

3.5.1.2 Neomycin-Resistenzgen: pBKS/FRT-Neo-FRT

Dieses Gen kodiert eine Aminoglykosid-Phosphotransferase, die zu einer Resistenz gegenüber Geneticin (G418) oder Neomycin führt. Mit Hilfe dieses Selektionsmarkers ist es möglich, stabil transfizierte Zellen durch Antibiotika-Behandlung zu selektieren. Das Plasmid wurde von Jessica Gorski und Kevin R. Jones (University of Colorado, USA) zur Verfügung gestellt. FRT („FLP recognition target“)-Linker wurden an ein ca. 1,9 kb großes PGKneo (Phosphoglyceratkinase) *EcoRI-HindIII*-Fragment ligiert. Die Größe des Plasmids pBKS/FRT-Neo-FRT beträgt insgesamt ca. 5 kb (PBKS: Bluescript KS Vektor).

3.5.1.3 Restriktionsenzymverdau

3.5.1.3.3 GOF18- Δ PE-EGFP

Das Plasmid (10 μ g) wurde mit *NotI* (30 U) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.1.3.4 pBKS/FRT-Neo-FRT

Das Plasmid (4 μ g) wurde mit *HindIII* (10 U) und *EcoRI* (10 U) bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Proben wurden direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mittels Gelelektrophorese (0,7 %iges TBE-Agarosegel) wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt (Durchführung der Agarosegelelektrophorese siehe Abschnitt 3.5.3.2.4). Das Gel wurde fotografisch unter UV-Licht dokumentiert, das benötigte DNA-Fragment unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraktions Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration wurde in einem 1 %igen TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1 µg des Molekulargewichtsstandards Lambda/*HindIII*+*EcoRI* abgeschätzt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Zellkultur

Es wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank gearbeitet. Die Medien und das PBS wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

3.5.2.1 Kultivierung von Zellen

Die bovinen fetalen Fibroblasten wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ in Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturflaschen oder -schalen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums, wobei das Medium abgesaugt und neues Medium in entsprechender Menge zugegeben wurde.

3.5.2.2 Passagieren von Zellen

Ab einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2x Trypsin/EDTA (soviel bis der Boden bedeckt war) und Inkubation bei 37 °C für 1 bis 2 min lösten sich die Zellen von der Zellkulturschale. Trypsin spaltet die Aminosäuren Arginin und Lysin. EDTA bindet zweiwertige Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, welche zellbindende Membranproteine stabilisieren. Der Proteaseinhibitor Alpha-1-Antitrypsin im FKS stoppt die Reaktion. Die vierfache Menge an Medium wurde zum Stoppen zu den Zellen gegeben, die Suspension in ein Gefäß überführt und bei 500 g 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

3.5.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Ab einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen kryokonserviert. Es wurde zunächst wie beim Passagieren vorgegangen mit Waschen, Trypsinieren, Stoppen

und Zentrifugation (siehe Abschnitt 3.5.2.2). Nach dem Absaugen wurde das Zellsediment in FKS resuspendiert und in ein Kryoröhrchen zum vorgelegten DMSO, einem Kryoprotektivum, gegeben. Bei der Kryokonservierung betrug der Anteil an DMSO am Gesamtvolumen 10 %. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde zügig gemischt und das Röhrchen auf Trockeneis gestellt. Die Menge an FKS richtete sich nach der Menge der einzufrierenden Zellen bzw. der Größe der Zellkulturflasche oder -schale. Zellen von einer 12-, 24-, 48- und 96-well Platte wurden in 450 µl FKS und 50 µl DMSO in 1,0 ml Kryoröhrchen und größere Zellmengen in 900 µl FKS und 100 µl DMSO in 1,8 ml Kryoröhrchen konserviert.

Die Lagerung erfolgte zunächst für mindestens 24 h bei -80 °C und später im flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

3.5.2.4 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zügig durch Auf- und Abpipettieren mit 37 °C-warmem Medium aufgetaut, in ein Gefäß überführt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert und ausgesät.

3.5.2.5 Transfektion von Zellen

Für die Herstellung stabiler Zellklone wurden Fibroblasten der Zelllinie BFF116 mit dem Resistenzgen- und Reportergenkonstrukt mit dem Nucleofector™ elektroporiert. Bei einer Elektroporation wird ein kurzer elektrischer Impuls zum Einbringen von DNA in Zellen verwendet. Es wurde eine Kotransfektion durchgeführt, bei der nicht-verknüpfte DNA-Fragmente integriert werden können. Zellklone mit positivem Integrationsereignis werden mittels Antibiotikum selektiert. Das Neomycin-Resistenzgen FRT-Neo-FRT und das Reportergenkonstrukt GOF18-ΔPE-EGFP wurden in einem Mengenverhältnis von 1:10 verwendet. FRT-Neo-FRT-DNA (300 ng) und GOF18-ΔPE-EGFP-DNA (3 µg) wurden nach der Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 3.5.1.4) in einem Reaktionsgefäß vereint und wegen des großen Volumens im „SpeedVac“ (Vacuum Concentrator) eingedampft und in 5 µl EB-Puffer (Qiagen) resuspendiert.

Bei dem Nucleofector™ sind Programme mit Elektroporationsbedingungen voreingestellt, von denen die effektivsten im Vorfeld durch eine transiente Transfektion mit einem GFP-tragenden Plasmid (pCMV-GFP; CMV: Cytomegalievirus) ausgetestet wurden.

Für einen Ansatz wurden die Zellen in der 3. Passage geerntet und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zu 5×10^5 Zellen wurden die 5 μ l DNA-Lösung (3,3 μ g) mit den Genkonstrukten und 100 μ l Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Solution pipettiert. Danach erfolgte die Elektroporation mit dem Programm U23. Die elektroporierten Zellen wurden mit 1 ml Medium in einer speziellen Plastikpipette (Amaxa) auf eine 6-well Platte überführt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

3.5.2.6 Selektion von Zellklonen

Drei Tage nach der Elektroporation waren die Zellen ca. 90 % konfluent und wurden geerntet. Für die Selektion der Zellen wurden diese in Medium mit einer Geneticin (G418)-Konzentration von 1,0 mg/ml mit 2000 Zellen pro well auf 96-well Platten ausgesät. G418 gehört zu den Aminoglycosid-Antibiotika und ist ein Gentamicin-Derivat, welches mit Kanamycin und Neomycin verwandt ist. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel mit dem Selektionsmedium durchgeführt. Nach ca. einer Woche waren alle Zellen gestorben, die kein Neomycin-Resistenzgen integriert hatten und schwammen im Überstand, wohingegen resistente Zellklone adhärente Kolonien gebildet hatten. Diese Zellklone wurden nummeriert und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert, um dann auf 48-well Platten überführt zu werden. Von diesen Zellklonen wurde ein Teil kryokonserviert und der andere Teil noch einige Zeit kultiviert, um genug Material für die Genotypisierung zur Verfügung zu haben.

3.5.2.7 Kerntransfer (Somatic cell nuclear transfer – SCNT)

Stabil transfizierte Klone, sog. BFFGOF, wurden nach der Genotypisierung (siehe Abschnitt 3.5.3) mit Nachweis des Reporter-genkonstruktes für den Kerntransfer (SCNT) verwendet. Die Zellen wurden einige Tage vor dem Transfer aufgetaut, kultiviert und mit einer Konfluenz von 60 % bis 90 % für den Kerntransfer verwendet. Dieser wurde von Dr. Valeri Zakhartchenko am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Zakhartchenko et al. 1999). Die Kerntransfer-Embryonen wurden bis zu acht Tage kultiviert. Bei den Altersangaben der Embryonen ist zu beachten, dass Tag 1 dem Tag nach dem NT entspricht.

Die hergestellten SCNT-Embryonen wurden dann folgendermaßen weiterverwendet:

1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und Beurteilung (siehe Abschnitt 0)
2. Embryotransfer (ET)
3. Reklonierung von Blastomeren aus Tag 5 SCNT-Morulae (BNT).

Für den Embryotransfer wurden Tag 7 Embryonen durch Dr. Hendrik Wenigerkind vom Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie auf synchronisierte Empfängertiere übertragen (Hofmann et al. 2004). Der BNT wurde ebenfalls von Dr. Valeri Zakhartchenko am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie durchgeführt (Zakhartchenko et al. 1999).

3.5.2.8 Isolierung von Primärzellen aus Feten

Am Tag 34 nach dem Kerntransfer wurden trächtige Tiere am Schlachthof in München geschlachtet und die Uteri mit den Feten gewonnen. Im Labor wurden die Feten entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS/Penicillin/Streptomycin maximal 2 h aufbewahrt. Die Präparation der Feten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden die Fruchthüllen entfernt. Es folgte die Dekapitation, Entfernung der Extremitäten und die Entnahme der Eingeweide. Alle entfernten Anteile wurden für die spätere DNA-Isolierung und Genotypisierung bei -20 °C gelagert. Zwischen den verschiedenen Präparationsschritten wurde der Fetus immer wieder in PBS/Penicillin/Streptomycin in einer Zellkulturschale gewaschen. Zum verbliebenen Teil des Fetus wurde 500 µl 2x Trypsin/EDTA mit einer Temperatur von 37 °C gegeben und der Fetus mit einer Schere so weit wie möglich zerkleinert. Nach nochmaliger Zugabe von 500 µl erwärmtem 2x Trypsin/EDTA erfolgte die Inkubation im Brutschrank (37 °C) für 5 min. Nach wiederholtem Auf- und Abpipettieren wurde die Gewebemasse für weitere 2 min inkubiert. Die Suspension wurde dann in ein Reaktionsgefäß mit 5 ml Fibroblasten-Medium überführt. Nach einigen Minuten hatten sich die Gewebestückchen auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt und der Überstand, der die vereinzelt Zellen enthielt, wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Beide Gefäße wurden mit Medium auf das gleiche Volumen von 5 ml aufgefüllt und bei 500 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die vereinzelt Zellen in einer Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser, die Gewebestückchen in Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dann weiter kultiviert, passagiert und kryokonserviert. Durch PCR,

Southern Blot (wie in 3.5.3 beschrieben) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (wie in 3.5.4 beschrieben) wurde die genomische Integration des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP überprüft.

3.5.3 Identifikation GOF18- Δ PE-EGFP-transgener Zellklone

3.5.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben, geerntet und die Pellets in 2 ml Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Für die DNA-Isolierung wurde je nach Menge der Zellen 400 μ l (6-well Platte) bzw. 800 μ l (10-cm Schale) Mastermix (siehe Tabelle 3.3) zugegeben und bei 55 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 3.3: Mastermix

Cutting Buffer	375 μ l
20 % SDS	20 μ l
Proteinase K (20 mg/ml)	5 μ l
Gesamtvolumen	400 μ l

Am nächsten Tag erfolgte die Fällung der DNA mit 400 μ l bzw. 800 μ l 2-Propanol. Danach wurde bei 20800 *g* 10 min bei 10 °C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das DNA-Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets an der Luft wurde in 20 - 50 μ l EB-Puffer je nach Pelletgröße resuspendiert. Die Lösung der DNA erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Vor der weiteren Verwendung wurde eine DNA-Konzentrationsmessung an einem Spektrophotometer mit einer Verdünnung von 1:50 durchgeführt. Eine Lösung mit 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA hat eine Absorptionsvermögen (optische dichte, OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Quotient der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm dient der Beurteilung der Reinheit der DNA. Die Ratio (260/280 nm) der in dieser Arbeit verwendeten DNA lag zwischen 1,8 und 2,0 und entsprach somit reiner DNA.

3.5.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine einfache Methode dar einen bestimmten DNA-Abschnitt mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primer) zu vervielfältigen.

Mittels PCR sollte überprüft werden, welche, der auf das Neomycin-Resistenzgen selektierten Zellklone auch das Reporter-genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP integriert hatten.

3.5.3.2.3 PCR-Bedingungen

Die folgenden GOF18- Δ PE-EGFP-spezifischen Primer wurden eingesetzt: GOFGFP4 und GOFGFP3.

Tabelle 3.4: Reaktionsansatz

	GOFGFP3/GOFGFP4
Aqua bidest.	7,65 μ l
Q-Solution (Qiagen)	4 μ l
10x Puffer (Qiagen)	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 μ l
dNTPs (1 mM)	1 μ l
sense Primer (2 μ M)	1 μ l
antisense Primer (2 μ M)	1 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,1 μ l
DNA-Probe	2 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Für die PCR wurden aus der isolierten genomischen DNA (BFFGOF-DNA; siehe Abschnitt 3.5.3.1) Verdünnungen mit 50 ng/ μ l hergestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen mit einem Endvolumen von 20 μ l auf Eis angesetzt. Als Positivkontrolle diente DNA des GOF18- Δ PE-EGFP-Plasmids mit einer Konzentration von 0,5 ng/ μ l. Als Negativkontrolle wurde zum einen ein Reaktionsansatz ohne DNA verwendet („non template control“, NTC), zum anderen wurde genomische DNA aus nicht-transfizierten bovinen fetalen Fibroblasten (Wildtyp, Wt) mit einer Konzentration von 50 ng/ μ l eingesetzt.

Tabelle 3.5: Reaktionsbedingungen

GOFGFP3/GOFGFP4			
Denaturierung	94 °C	3 min	35x
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing	63 °C	30 sec	
Extension	72 °C	1 min	
Finale Extension	72 °C	10 min	

Nach Durchlaufen der Zyklen wurde das PCR-Produkt im Thermocycler auf 4 °C abgekühlt. Die Probe wurde dann kurzfristig bei 4 °C und längerfristig bei -20 °C gelagert. Die weitere Untersuchung erfolgte mittels Gelelektrophorese.

3.5.3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Strängen nach ihrer Größe. Die Gelmatrix funktioniert wie ein Sieb. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit bei linearisierten doppelsträngigen DNA-Molekülen im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts verhält. Die Länge der aufgetrennten Nukleinsäuren kann mit Molekulargewichtsstandards bestimmt werden.

Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und unter ultraviolettem Licht fluoresziert, wodurch die DNA im Agarosegel sichtbar gemacht werden kann.

Für die Herstellung von TBE-Agarosegelen wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE in der Mikrowelle aufgekocht. Sowohl Laufpuffer, als auch die Gellösung wurden mit Ethidiumbromid (9 µl/l) versetzt. Die Proben wurden mit einem sechstel Volumenanteil 6x Ladepuffer versetzt, um den Fortschritt der Gelelektrophorese abschätzen zu können. Die Proben und eine entsprechende Menge vom Molekulargewichtsstandard wurden in die Geltaschen pipettiert mit nachfolgender Gelelektrophorese. Alle Gele wurden unter Verwendung des Stratagene Eagleeye II bei 366 nm dokumentiert.

3.5.3.3 Southern Blot - alkalischer Transfer

Der Southern Blot dient der Übertragung von DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran, mit der weitere Analysen möglich sind.

3.5.3.3.3 Restriktionsenzymverdau

Genomische DNA (10 µg) isoliert aus BFFGOF und GOF18-ΔPE-EGFP-Plasmid-DNA (500 ng) wurden mit 10 U (BFFGOF) bzw. 2,5 U (Plasmid) *Hind*III in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für das weitere Vorgehen wurde 1/5 der *Hind*III-verdauten Plasmid-DNA verwendet. Alle Proben wurden mit 6x Ladepuffer (MBI Fermentas) versetzt und für die Gelelektrophorese verwendet.

3.5.3.3.4 Gelelektrophorese

Die Proben wurden in einem 0,7 %igen TBE-Gel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandards wurden der 1 kb- und der λ /*Eco*RI+*Hind*III-Marker verwendet.

3.5.3.3.5 Transfer von restriktionsenzymverdauter DNA (Blotten)

Das TBE-Gel wurde fotografisch unter UV-Licht mit einem Lineal dokumentiert. Danach wurde das Gel zur Depurinierung in 0,25 M HCl geschwenkt, bis die blaue Farbe des Ladungspuffers nach gelb umgeschlagen war, was nach ca. 15 bis 20 min erfolgte. Dann erfolgte das Waschen des Gels mit Aqua bidest. gefolgt von der Denaturierung durch Schwenken in 0,4 N NaOH-Lösung für 30 min. Anschließend wurde die verdaute genomische DNA mittels eines alkalischen Kapillartransfers auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne® B 0,45 µm) übertragen.

Beim Aufbau des Southern Blots (siehe Abbildung 3.2) wurde auf eine Glasschale, die mit Transferpuffer gefüllt war, eine Glasplatte gelegt. Auf die Glasplatte kam ein Streifen Whatman-Papier, der auf beiden Seiten in den Transferpuffer hing und mindestens so breit wie das Agarosegel war. Auf dieses Papier wurde das zugeschnittene Agarosegel mit den Öffnungen der Geltaschen nach unten ohne Luftblasen platziert. Auf das Gel kam eine Nylonmembran in Gelgröße. Der Rand des Gels wurde mit Saranfolie bedeckt. Auf die Nylonmembran wurden wiederum zwei Whatman-Papiere, gefolgt von mehreren Zentimetern saugfähigem Papier gelegt. Zur Unterstützung des Transfers bildete ein Gewicht von ca. 1 kg den Abschluß. Nach 24 h war der Transfer beendet. Die Nylonmembran wurde beschriftet und die rechte untere Ecke zur späteren Orientierung abgeschnitten. Danach wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt und auf einem Whatman-Papier einige Minuten getrocknet. Anschließend wurde die transferierte DNA mittels UV-Licht (120 J/cm²) quervernetzt. Es folgte die sofortige Verwendung oder Lagerung bei RT zwischen zwei Whatman-Papieren.

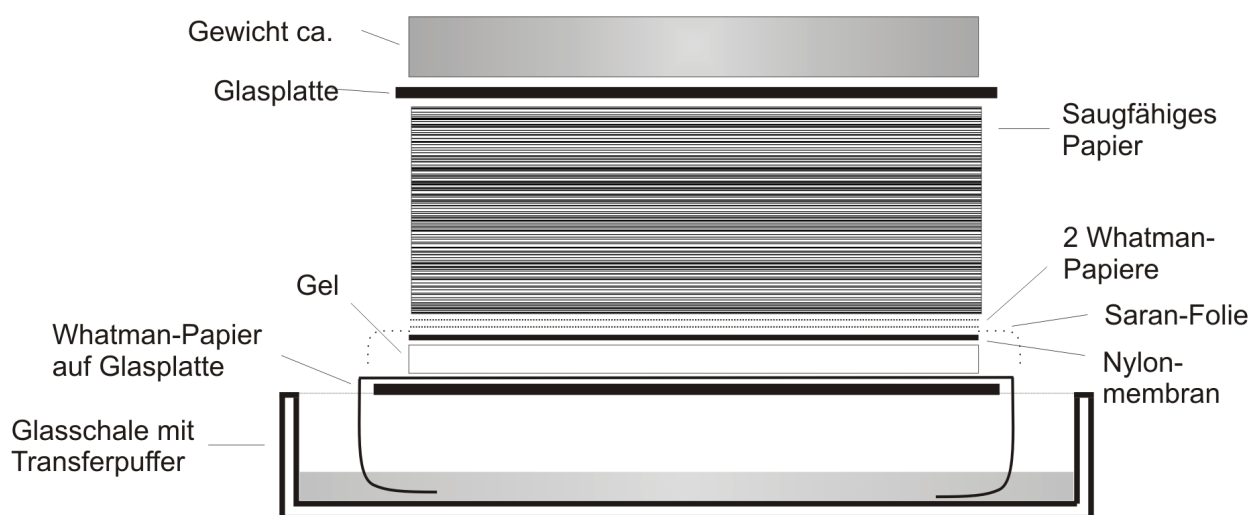


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern Blots.

3.5.3.3.6 Sondenherstellung

Die Sonde mit 544 bp Länge wurde mittels PCR mit den Primern EGFP5 und EGFP3 hergestellt, wobei als Matrize das Plasmid mit GOF18- Δ PE-EGFP mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l diente.

Tabelle 3.6: Reaktionsansatz

	EGFP5/EGFP3
Aqua bidest.	31,6 μ l
10x Puffer (Qiagen)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3,15 μ l
dNTPs (1 mM)	2,5 μ l
sense Primer (2 μ M)	2,5 μ l
antisense Primer (2 μ M)	2,5 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l
Plasmid-DNA	2,5 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3.5.

Das PCR-Produkt wurde mit 10 μ l 6x Laufpuffer versetzt, auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese gefolgt von Gelextraktion (siehe Abschnitt 3.5.1.4) aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1.4 über Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard Lambda/ *Hind*III+*Eco*RI.

3.5.3.3.7 Sequenzierung der Sonde

Für die Sequenzierung wurde ca. 50 ng der Sonde und der Primer EGFP3 (2 µM) verwendet. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Langen) vom Sequenzierservice der Arbeitsgruppe Blum (LAFUGA Genomics, Genzentrum, München) durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (National Center for Biotechnology Information) mit den Sequenzen öffentlicher Datenbanken (GenBank) abgeglichen.

3.5.3.3.8 Radioaktive Markierung der Sonde

Die für die Markierung verwendete Methode war das „random priming“. Dabei wird die zu markierende doppelsträngige DNA denaturiert und mit Zufallshexameren bzw. –nonameren hybridisiert. Als Polymerase dient das Klenow Fragment der DNA-Polymerase. Die Markierung erfolgte durch Einbau von radioaktiven Nukleotiden.

60 ng der hergestellten Sonde wurden mit dem Rediprime II Random Prime Labelling System entsprechend den Herstellerangaben mit 50 µCi ³²P-dCTP radioaktiv markiert. Über eine MicroSpinTM S-300 HR Säule wurden die nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Von der markierten Sonde wurde eine 1:100-Verdünnung hergestellt und 5 µl davon für die Messung der radioaktiven Strahlung pro Minute (cpm, counts per minute = Impulse pro Minute) mit dem Szintillationszähler gemessen. Die Berechnung des cpm-Wertes pro µl Sonde erfolgte nach folgender Formel, wobei Cerenkov ein Korrekturfaktor für die Messung ohne Szintillationsflüssigkeit ist:

$$\text{cpm}/\mu\text{l} = \text{cpm} \times 20 \text{ (Verdünnung)} \times 1,55 \text{ (Cerenkov)}$$

3.5.3.3.9 Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion

Die Nylonmembran mit den DNA-Fragmenten wurde mit der Prähybridisierungslösung Rapid-Hyb Buffer[®] 2 h bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Diese Inkubation diente der Absättigung freier positiver Ladungen auf der Membran, um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden. Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde mit einer Konzentration von 2×10^6 cpm pro ml Rapid-Hyb Buffer[®] verwendet. Die entsprechende Menge der markierten Sonde wurde 5 min bei 95 °C denaturiert, für mindestens 3 min auf Eis gestellt und dann direkt zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungssofen.

Am darauf folgenden Tag wurden zwei Waschschrirte durchgeföhrt, um die unspezifisch gebundenen Sonden zu entfernen. Beide Waschlösungen wurden frisch hergestellt. Der erste Waschrirrit erfolgte mit 2x SSC/0,1 % SDS für 20 min bei RT. Der zweite mit 1x SSC/0,1 % SDS für 2x 5 min bei 65 °C. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für die Exposition auf einen „Storage Phosphor Screen“ aufgebracht. Die Signale wurden mit dem Phosphor-Imager (Storm 860) ausgelesen.

3.5.3.3.10 Strippen der Membran

Um die Membran erneut mit einer radioaktiv markierten Sonde zu hybridisieren, musste die zuvor verwendete Sonde durch Strippen entfernt werden.

Die feuchte Membran wurde mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung versetzt und im Hybridisierungsöfen bei Raumtemperatur gerollt. Nach 10 min wurde die Lösung erneuert und die Membran bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur weiter gerollt. Falls nach diesem Vorgehen die verbliebene Reststrahlung zu hoch war, wurde das Strippen wiederholt. Bis zur Weiterverwendung der Membran wurde diese in Folie eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt.

3.5.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) ist es möglich Nukleinsäuresequenzen durch markierte komplementäre Sequenzen innerhalb von Zellen, Chromosomen und Gewebepreparationen zu detektieren und zu lokalisieren. Bei der FISH werden spezifische DNA-Sequenzen mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden nachgewiesen. Mit Hilfe von Mehrfachmarkierungen unter der Verwendung von verschiedenen Farbstoffen ist der gleichzeitige Nachweis von mehreren Sequenzen möglich.

3.5.4.1 Chromosomenpreparation

Die zu präparierenden Zellen wurden in 250 ml-Zellkulturflaschen in 12 ml Medium kultiviert und 1 - 4 Tage vor der Präparation passagiert. Die Präparation erfolgte bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 %, wenn sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befanden. Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, die Zellen mit 12 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1,5 ml 2x Trypsin/EDTA 1 bis 2 min abgelöst. Zur Hemmung des Trypsins wurde das zuvor abgenommene Medium wieder zu den abgelösten Zellen gegeben. Die

Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 8 min bei 500 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1,5 ml abgesaugt, und das Zellsediment durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Nach langsamer Zugabe einer 37 °C-warmen 75 mM KCl-Lösung und Mischen durch zweimaliges Invertieren folgte eine Inkubation bei 37 °C für 15 min. Die hypotone Lösung führt zu einer Quellung der Zellen. Die Zellen wurden 8 min bei 500 *g* zentrifugiert, der Überstand wieder bis auf 1,5 ml abgesaugt, und das Zellsediment durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Die Fixierung erfolgte dann durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem Methanol-Eisessig-Gemisch (Fixativ) bis auf 10 ml. Die Zellsuspension wurde mindestens 30 min bei -20 °C in dem Fixativ gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Präparation mehrmals (mindestens fünf mal) mit frisch hergestelltem eiskaltem Fixativ gewaschen und in einem Volumen von 1 bis 1,5 ml Methanol-Eisessig bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt verwendet.

3.5.4.2 Spreitung der Metaphasechromosomen

Die sauberen Objektträger (OT) wurden vor dem Auftropfen der Zellsuspension über einem Wasserbad bei 65 °C erwärmt. Aus der kalten Zellsuspension wurden 9 µl entnommen und auf den vorgewärmten OT aufgetropft. Anzahl und Spreitung der Metaphasen wurden in einem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Nach Lagerung über 1 bis 3 Tage bei RT wurden die OT für die FISH verwendet.

3.5.4.3 Herstellung der DNA-Sonden für FISH

In Zweifarben-Hybridisierungen wurden folgende Sonden für FISH verwendet:

1. Die transgenspezifische Sonde bestand aus 10 DNA-Fragmenten, die innerhalb des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP hybridisierten und mit TAMRA (6-Carboxyl-Tetramethyl-Rhodamin)-dUTP in einer PCR markiert wurden.
2. Als Positivkontrollsonde wurden DNA-Fragmente verwendet, die auf dem Rinderchromosom 6 in einem subzentromerischen Block von komplexer repetitiver DNA binden und als Kontrolle für eine erfolgreiche Hybridisierungsreaktion dienten. Diese waren mit Biotin-16-dUTP markiert.

Die TAMRA-gekoppelte transgenspezifische Sonde wurde nach der Hybridisierung direkt mittels Fluoreszenzdetektion, die Biotin-markierte Positivkontrollsonde

indirekt mit einem fluorochromierten Avidin-Konjugat (Alexa Fluor[®] 488) nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.5.4.7).

3.5.4.3.3 Transgenspezifische Sonde

Insgesamt wurden 10 TAMRA-dUTP markierte DNA-Fragmente hergestellt (siehe Tabelle 3.7), die vor der Hybridisierung zu einer transgenspezifischen Sonde vereinigt wurden. Die Gesamtlänge, die mit den DNA-Fragmenten abgedeckt wurde betrug 5,7 kb.

Tabelle 3.7: DNA-Fragmente der transgenspezifischen Sonde

Fragmentbezeichnung	Länge [bp]
FISH4	652
FISH5	724
FISH8	601
EGFP3/5	544
FISH10	603
FISH11	603
FISH12	501
OCT1	500
OCT2	500
OCT4	508
Total	5736

Primerkombination 1 und 2

Es wurden Multiplex-PCRs mit verschiedenen Kombinationen von Primern durchgeführt (siehe Tabelle 3.8).

Für die Kombination 1 wurde als Matrize das Plasmid mit GOF18- Δ PE-EGFP mit einer Konzentration von 2 ng/ μ l, also insgesamt 4 ng DNA eingesetzt. Als Matrize für die Kombination 2 wurde 1 μ l des jeweiligen PCR-Produktes aus den Einzel-PCRs mit den einzelnen Primerpaaren (Matrizen-PCR) verwendet (siehe Tabelle 3.9). Die PCR-Produkte aus den Einzel-PCRs wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.8: Primerkombinationen Multiplex-PCRs

Kombination 1	Kombination 2
FISH12fw/rev	FISH10fw/rev
FISH11fw/rev	FISH8fw/rev
FISH4fw/rev	EGFP5/3
FISH5fw/rev	

Tabelle 3.9: Reaktionsansatz für die Herstellung der Matrize für die Kombination 2 für jedes einzelne Primerpaar (Matrizen-PCR)

	FISH10fw/rev FISH8fw/rev EGFP5/3
Aqua bidest.	11,65 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl
dNTPs (1 mM)	1 µl
sense Primer (4 µM)	1 µl
antisense Primer (4 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Plasmid-DNA	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 3.10: Reaktionsansatz für Markierungs-PCR

	Kombination 1	Kombination 2
Aqua bidest.	3,4 µl	4,4 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl	1,6 µl
10x dNTP-Mix U	2 µl	2 µl
sense Primer 1	1 µl	1 µl
antisense Primer 1	1 µl	1 µl
sense Primer 2	1 µl	1 µl
antisense Primer 2	1 µl	1 µl
sense Primer 3	1 µl	1 µl
antisense Primer 3	1 µl	1 µl
sense Primer 4	1 µl	-
antisense Primer 4	1 µl	-
TAMRA-dUTP (400 µM)	0,8 µl	0,8 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl
Plasmid-DNA/PCR-Produkt	2 µl	3 µl
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl

Die Reaktionsbedingungen waren für die Matrizen-Herstellungs- und Markierungs-PCR dieselben.

Tabelle 3.11: Reaktionsbedingungen für die Matrizen- und Markierungs-PCR

Denaturierung	94 °C	3 min	35x
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing	60 °C	30 sec	
Extension	72 °C	30 sec	
Finale Extension	72 °C	10 min	

OCT1se/as, OCT2se/as, OCT4se/as

Für die Herstellung der DNA-Fragmente mit diesen Primern wurden Einzel-PCRs durchgeführt. Als Matrize für diese wurde wiederum das Plasmid GOF18-ΔPE-EGFP mit einer Konzentration von 2 ng/µl verwendet.

Tabelle 3.12: Reaktionsansatz für Markierungs-PCR

	OCT1se/as OCT2se/as OCT4se/as
Aqua bidest.	9,4 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
10x dNTP-Mix U	2 µl
sense Primer (4 µM)	1 µl
antisense Primer (4 µM)	1 µl
TAMRA-dUTP (400 µM)	0,8 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Plasmid-DNA	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3.11

3.5.4.3.4 DNA-Fragmente der Positivkontrollsonde

Es wurde eine Multiplex-PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

F1: 2083_up/2084_dn

F2: 2085_up/2086_dn

F3: 2089_up/2092_dn

Als Matrize wurden 2 µl PCR-Produkt aus einer PCR mit den einzelnen Primerpaaren verwendet (Matrizen-PCR). Die PCR zur Herstellung der Matrizen für die Markierungs-PCR wurde mit genomischer DNA aus den Zellen BFF116 (Wildtyp) durchgeführt. Für die Markierungs-PCR wurde jeweils 1 µl des jeweiligen PCR-Produktes eingesetzt.

Tabelle 3.13: Reaktionsansatz für die Matrizen-PCR

	2083_up/2084_dn
	2085_up/2086_dn
	2089_up/2092_dn
Aqua bidest.	7,65 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl
dNTPs (1 mM)	1 µl
sense Primer (2 µM)	1 µl
antisense Primer (2 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Matrize	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 3.14: Reaktionsansatz für Markierungs-PCR

Aqua bidest.	4,4 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
10x dNTP-Mix U	2 µl
sense Primer 1 (4 µM)	1 µl
antisense Primer 1 (4 µM)	1 µl
sense Primer 2 (4 µM)	1 µl
antisense Primer 2 (4 µM)	1 µl
sense Primer 3 (4 µM)	1 µl
antisense Primer 3 (4 µM)	1 µl
Biotin-16-dUTP (50 nmol)	0,8 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
PCR-Produkt	3 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 3.15: Reaktionsbedingungen für Matrizen- und Markierungs-PCR.

Denaturierung	94 °C	3 min	35x
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing	60 °C	30 sec	
Extension	72 °C	15 sec	
Finale Extension	72 °C	10 min	

3.5.4.3.5 Ansatz der Hybridisierungslösung

Die markierten DNA-Fragmente der transgenspezifischen Sonde wurden mit denen der Positivkontrollsonde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und das 1,5-fache Volumen von 100 %igem Ethanol zur Fällung der DNA dazugegeben. Die Probe wurde gemischt und 20 min bei RT stengelassen. Es folgte die Zentrifugation bei 20800 *g* und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT im Dunkeln getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 48 µl DAKO Hybridisierungspuffer. Zum Lösen der DNA wurde die Lösung im Dunkeln für 1 bis 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

3.5.4.4 Denaturierung der Chromosomen

Metaphasepräparate (siehe Abschnitt 3.5.4.2) wurden für 35 bis 45 sec in 70 % Formamid/2x SSC, pH 7,4, bei 70 °C in einer Küvette im Wasserbad inkubiert, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. Es folgte die sofortige Überführung in 70 % Ethanol. Es folgte eine Alkoholreihe von je 2x 2 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol. Nach dem letzten Schritt wurden die OT an der Luft getrocknet.

3.5.4.5 Hybridisierung

Die Lösung mit den Sonden wurde für 10 min bei 75 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Auf die trockenen OT wurden 10 µl Sonden-Hybridisierungslösung gegeben. Ein Deckglas mit 22x22 mm wurde vorsichtig auf den Tropfen gegeben und der Rand mit Fixo Gum abgedichtet. In einer feuchten Kammer (Wasserbad) wurden die Objektträger bei 37 °C 2 bis 4 Tage inkubiert.

3.5.4.6 Waschen

Nach der Hybridisierung wurde der Klebefilm (Fixo Gum) entfernt. Falls sich das Deckglas nicht mit abgelöst hatte, wurden die OT für ein paar Minuten in

0,05 % Tween/2x SSC (37 °C) gestellt. Das Deckglas löste sich dann von selbst. Es folgten zwei Waschschrte für 5 min in 0,05 % Tween/2x SSC bei 37 °C. Danach wurde 2x 5 min in 0,1x SSC stringent bei 60 °C gewaschen.

3.5.4.7 Antikörperfärbung – Biotin-Avidin-Methode

Avidin Alexa Fluor 488 mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde mit 0,05 % Tween/2x SSC 1:500 verdünnt. 50 bis 100 µl der Antikörperlösung wurden auf die feuchten OT pipettiert und diese mit Parafilm bedeckt. Die Inkubation erfolgte abgedunkelt für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C (Brutschrank oder Wasserbad). Zum Abschluss wurde 2x 5 min in 0,05 % Tween/2x SSC (37 °C) gewaschen.

3.5.4.8 Gegenfärben der Chromosomen und Eindecken der Präparate

Um die DNA anzufärben wurden die OT 5 min in einer DAPI-Lösung mit einer Konzentration von 200 ng/ml in 2x SSC in einem dunklen Gefäß bei RT inkubiert. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) färbt doppelsträngige DNA. Nach der Färbung wurden die OT mit Aqua bidest. vorsichtig abgespült und lichtgeschützt zum Trocknen aufgestellt. Auf die getrockneten OT wurde 1 Tropfen Vectashield gegeben und ein Deckglas 24x60 mm (Dicke 1.170 ± 0.01 mm) vorsichtig darauf gelegt. Vectashield ist eine „Antifade“-Lösung und verhindert das rasche Ausbleichen der Fluoreszenz. Überschüssiges Vectashield wurde mit einem saugfähigen Tuch vom Rand entfernt und das Deckglas mit Nagellack am OT fixiert und abgedichtet. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

3.5.4.9 Mikroskopische Auswertung

Die Chromosomen wurden mit einem CLSM (LSM Meta 510) und einem 63x PlanApochromat Öl-Immersionsobjektiv, NA (numerische Apertur) 1,4 untersucht.

Tabelle 3.16: Anregungs- und Emissionswellenlängen

Farbstoff	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionsfilter [nm]
DAPI	364	Bandpass (BP) 385 - 470
Avidin Alexa Fluor	488	Langpass (LP) 560
TAMRA	543	Bandpass (BP) 505 - 530

In Tabelle 3.16 sind Wellenlängen für die Anregung und die Filter für die Messung der Emission dargestellt.

3.5.5 Mikroskopische Untersuchung der Kerntransfer-Embryonen

3.5.5.1 Dokumentation am Epifluoreszenzmikroskop

Die Embryonen wurden aus dem Brutschrank entnommen, in PBS-PVP (1mg/ml) in eine 4-well-Multischale überführt. Die EGFP-Fluoreszenz wurde mit dem Mikroskop Axiovert 200M mit dem Zeiss-GFP-Filter (Filterset 13; Anregungsfilter: BP 470/20, Beamsplitter: FT 495, Emissionsfilter: BP 505 - 530) untersucht. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 103 die einem Spektrum von 400 - 750 nm umfasst. Mit der CCD (charge-coupled device)-Farbkamera AxioCam HR und der Axio Vision Software wurden digitale Aufnahmen gemacht.

3.5.5.2 Fixierung

Für weitere Untersuchungen wurden die Embryonen in 4 %iges Paraformaldehyd (PFA) überführt und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die fixierten Embryonen wurden einmal mit PBS-PVP gewaschen und entweder direkt weiter verarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in PBS-PVP gelagert.

3.5.5.3 Hoechst-Färbung

Hoechst 33342 (Bisbenzimid H 33342) ist ein membranpermeabler DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der vorwiegend an AT-reiche DNA-Sequenzen bindet und nicht interkaliert. Er kann sowohl für die Färbung lebender, als auch fixierter Zellen verwendet werden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 346 nm, das Emissionsmaximum bei 460 nm.

Die PFA-fixierten Embryonen wurden mit Hoechst (1µg/ml) in PBS-PVP 20 min bis 2 h in der Lösung im Dunkeln gefärbt. Danach folgte die Einbettung.

3.5.5.4 Einbettung der Embryonen für CLSM

Um die dreidimensionalen Strukturen der Embryonen zu bewahren, wurde ein Stück gelochte Klebefolie (Dicke ~ 200 µm, Lochdurchmesser 2 mm) auf ein Deckglas 24x76 mm, Dicke $1,7 \pm 0,01$ mm geklebt. Unter einem Stereomikroskop wurde mit einem Transferpettor jeweils ein Embryo in eine Vertiefung platziert. Nach Auffüllen der Vertiefungen mit Vectashield wurde darauf ein kleines Deckglas (24x40 mm)

montiert und am Rand mit Nagellack versiegelt. Das große Deckglas wurde mit der freien Seite nach außen mit Nagellack auf einem Objektträger befestigt.

3.5.5.5 Konfokale Untersuchung der Embryonen

Die Embryonen wurden mit einem CLSM (LSM Meta 510) und einem 40x PlanApochromat Öl-Immersionsobjektiv, NA 1,3, untersucht. Das verwendete System bestand aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 200M), vier Lasern (UV-, Argon- und zwei Heliumlasern), einem Laserscanmodul und einem Computer. Das System ermöglicht grundsätzlich die Lokalisation von bis zu vier verschiedenen Fluorochromen und das Scannen (konfokales Prinzip) der Präparate mit anschließender dreidimensionaler Rekonstruktion der Morphologie und/oder Quantifizierung der Fluorochrome. Die Anregung erfolgte für den Hoechst-Farbstoff bei 364 nm und für EGFP bei 488 nm. Die Emissionen wurden mit Bandpass-Filtern für die Bereiche 385 - 470 nm und 505 - 530 nm detektiert. Es wurden Bildstapel optischer Serienschritte (optische Dicke 1 μm , Abstand 3,5 μm) aufgenommen.

Um EGFP-Fluoreszenz sicher von etwaiger Autofluoreszenz zu differenzieren, wurde an jedem Embryo das Emissionsspektrum bei Anregung mit 488 nm Wellenlänge analysiert und mit dem Emissionsspektrum von EGFP verglichen. Dazu wurden mittels eines polychromatischen 32-Kanal-Detektors (Meta-Detektor, Zeiss) so genannte Lambda-Stacks, mit den Koordinaten x , y und λ , aufgenommen, bestehend aus 20 Einzelbildern (Kanälen) einer Schnittebene, die jeweils 10,7 nm breite Spektralbereiche zwischen 505 und 719 nm repräsentieren.

3.5.5.6 Quantitative Analyse der EGFP-Fluoreszenz

Die Intensität der EGFP-Fluoreszenz wurde mit der Software ImageJ analysiert. An zentralen optischen Schnitten wurden über der von Blastomeren belegten Gesamtfläche (d. h. ohne Blastocoel) die Intensitätswerte aller Pixel bei einem 8 bit Bild mit 256 Werten (0 bis 255) ausgelesen (siehe Abbildung 3.3). Um die EGFP-Fluoreszenz der verschiedenen Embryonen zu vergleichen und in Beziehung zur Kernzahl zu setzen, wurden die Medianwerte verwendet. Der Median ist derjenige Wert einer sortierten Stichprobe, der genau in der Mitte liegt und somit die Stichprobe in zwei gleich große Hälften teilt.

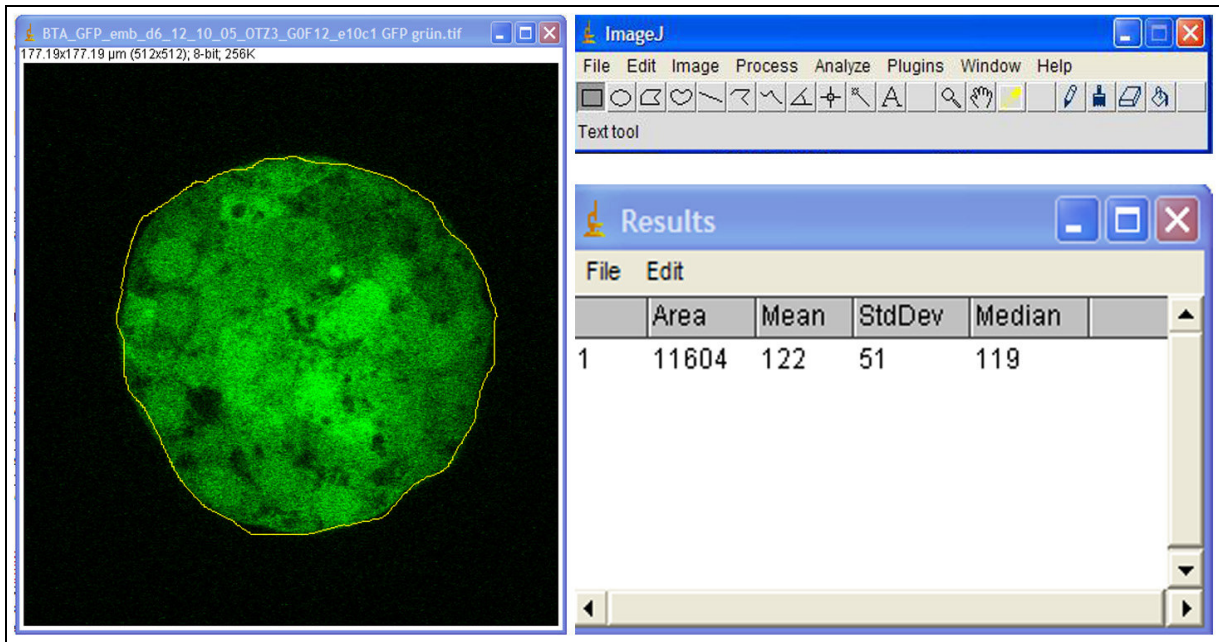


Abbildung 3.3: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität mit ImageJ.

Über der von Blastomeren belegten Gesamtfläche des Embryos (gelb umrandete „region of interest“ - ROI) wurden die Werte der Pixel gemessen und in einem Ergebnisfenster der Medianwert angegeben.

3.5.5.7 Zählung der Zellkerne

Die Anzahl der mit Hoechst-Farbstoff gefärbten Zellkerne pro Embryo wurde an den mit dem CLSM aufgenommenen Bildstapeln aus jeweils 37 bis 70 optischen Schnitten bestimmt.

Zur besseren Erkennung der Zellkerngrenzen wurde eine Sobel-Filterung (ImageJ Software) durchgeführt, die Kanten zwischen Flächen konstanter Intensitätswerte darstellt. Die so entstandenen Kantenbilder wurden invertiert. Sukzessive wurde jede Schnittebene mit der darunter liegenden Nachbarebene verglichen und jeder erstmals angeschnittene Zellkern gezählt (siehe Abbildung 3.4).

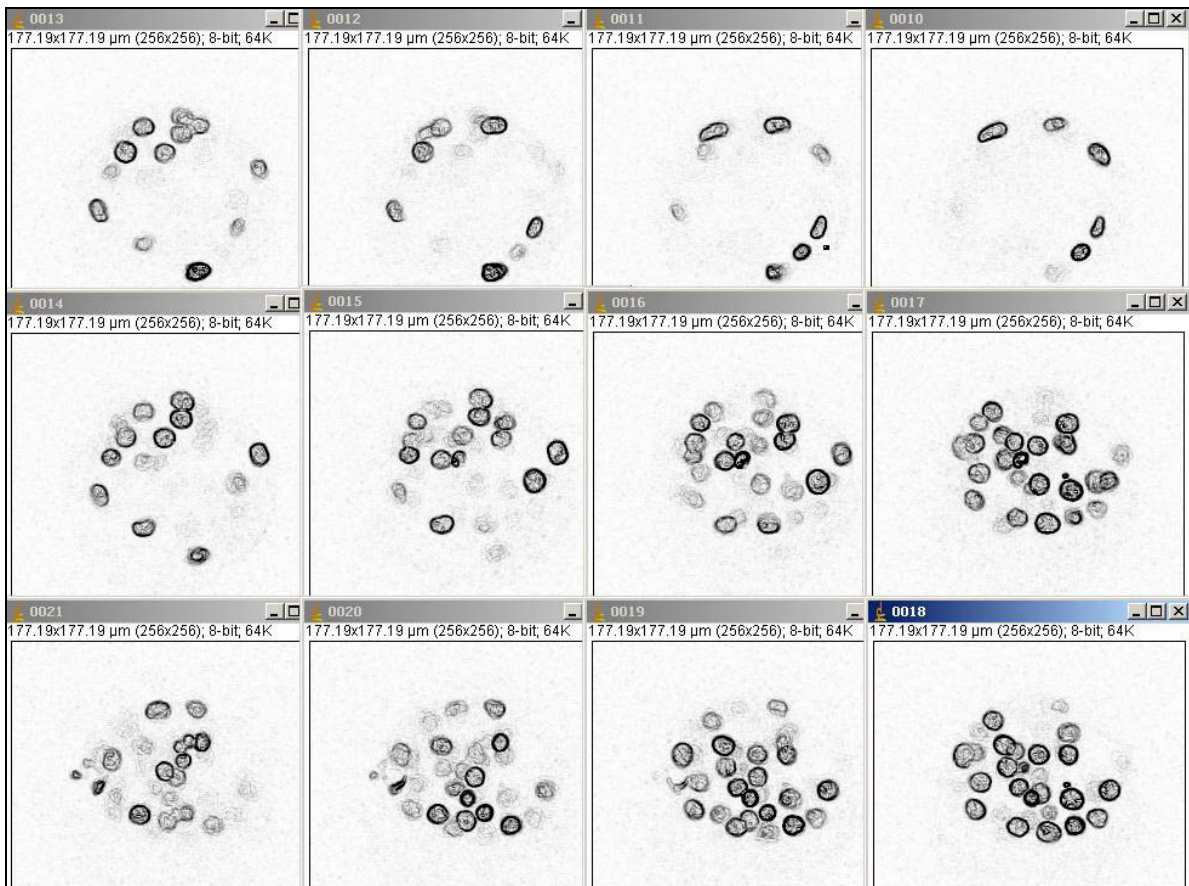


Abbildung 3.4: Zellkernzählung.

Zur besseren Erkennung der Zellkerngrenzen wurde eine Sobel-Filterung (ImageJ Software) durchgeführt, die Kanten zwischen Flächen konstanter Intensitätswerte darstellt. Die Kantenbilder wurden invertiert. Im Vergleich aufeinander folgender Schnittbilder wurden neu hinzukommende Kerne gezählt.

3.6 Statistik

Folgende statistischen Werte wurden mit Excel (Microsoft) bestimmt:

- Korrelationskoeffizienten (von Pearson) inklusive der Überprüfung der Signifikanz
- Regressionsgleichungen und -geraden
- Mittelwerte und Standardabweichungen
- Student'scher T-Test; ungepaart, zweiseitig

4 Ergebnisse

4.1 Stabil GOF18- Δ PE-EGFP-transfizierte bovine fetale Fibroblasten (BFFGOF)

4.1.1 Nachweis der GOF18- Δ PE-EGFP-Integration mittels PCR und Southern Blot

Die PCR Analyse von 113 G418-resistenten BFF-Kolonien ergab 16 Zellklone mit einem GOF18- Δ PE-EGFP-spezifischen Amplifikat von 600 bp, die als BFFGOF bezeichnet wurden. In Abbildung 4.1 A und B sind zwei Fotos eines Agarose-Gels nach einer PCR mit dem Primerpaar GOFGFP 3/4 mit 21 der 113 getesteten DNA-Proben dargestellt. Bei sieben der dargestellten Proben war das Amplifikat mit 600 bp nachweisbar. Als Positivkontrolle diente Plasmid-DNA (GOF18- Δ PE-EGFP). Bei den Negativkontrollen handelte es sich zum einen um einen Reaktionsansatz mit DNA aus nicht-transfizierten Fibroblasten (Wildtyp, Wt) und zum anderen um einen Reaktionsansatz ohne DNA-Matrize („non template control“, NTC). Die anderen neun positiven Zellklone ergaben das gleiche Ergebnis, sind hier aber nicht abgebildet. Nur ein Teil der Proben, die in der PCR getestet wurden, wurden ebenfalls mittels Southern Blot Analyse untersucht, da mindestens 7 μ g DNA für ein Experiment nötig waren und nicht alle Zellklone ein ausreichendes Wachstumspotential besaßen, um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Eine Southern Blot Analyse wurde bei 16 der 113 Zellklone mit einer EGFP-spezifischen Sonde von 545 bp (Primerpaar EGFP3/5) durchgeführt. Die gewählten Schnittstellen lagen innerhalb von GOF18- Δ PE-EGFP, so dass von dem Restriktionsenzym *HindIII* ein 3200-bp langes Fragment herausgeschnitten wurde. Die Sequenzierung der Sonde und der Abgleich der erhaltenen Sequenz mit der von EGFP lieferte eine hundertprozentige Übereinstimmung. In Abbildung 4.1 C ist zu sehen, dass bei sieben Zellklonen eine Hybridisierungsbande bei 3200 bp nachweisbar war. Das Ergebnis der PCR konnte somit bestätigt werden. Es wurde auch eine DNA-Probe von nicht-transfizierten Fibroblasten untersucht, die ein negatives Ergebnis lieferte (hier nicht abgebildet).

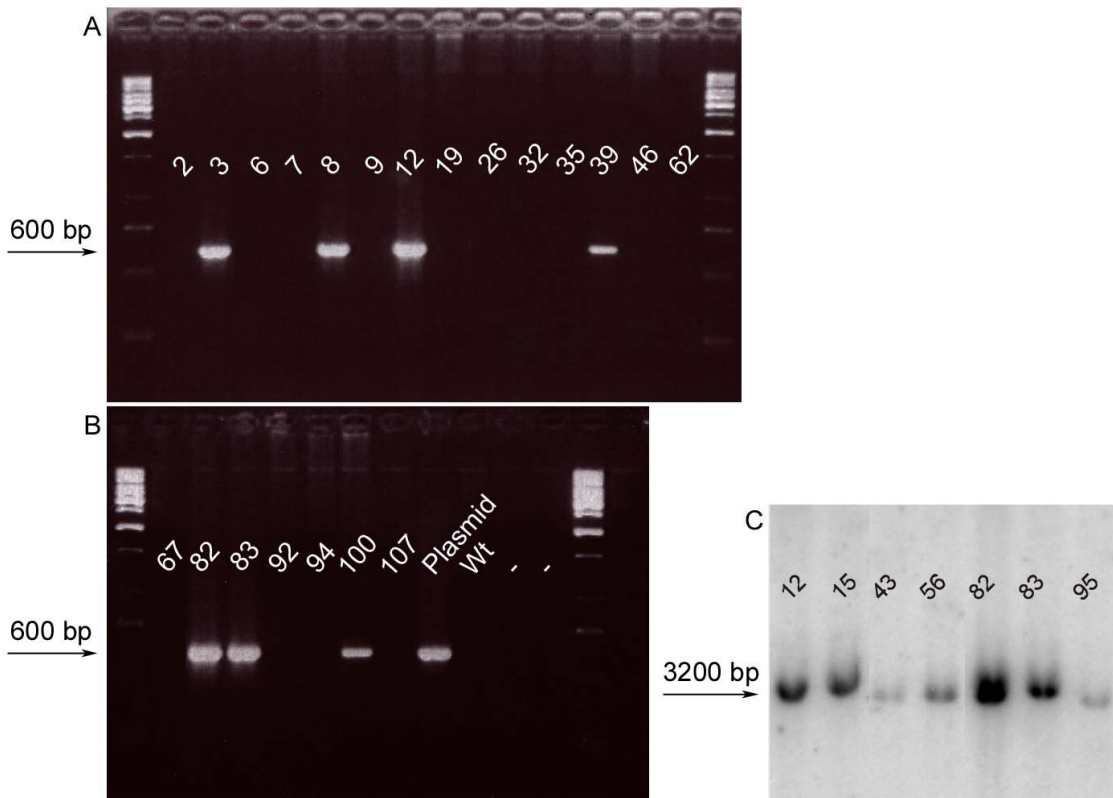


Abbildung 4.1: Identifizierung GOF18- Δ PE-EGFP-transgener Zellklone.

Die PCR-Analyse (A-B) ergab bei 16 Zellklonen, von denen hier sieben dargestellt sind, ein spezifisches Fragment von 600 bp im Agarose-Gel identisch mit der Positivkontrolle (Matrize: Plasmid). Die beiden Negativkontrollen (Wt und -) zeigten keine Bande (B). Molekulargewichtsstandard: 1-kb Ladder. In der Southern Blot Analyse (C) wurde bei sieben Zellklonen ein positives Hybridisierungssignal bei der 3200 bp Bande detektiert. Wt: Wildtyp; -: NTC („non template control“).

4.1.2 Überprüfung auf Oct4-EGFP-Expression in transgenen Fibroblasten

Die 16 GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Zellklone (BFFGOF) wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe und einem geeigneten Bandpassfilterset (Filterset Nr. 13, Zeiss) auf EGFP-Fluoreszenz hin untersucht, um nur die Zellen zu selektieren, die zwar das Reporter-genkonstrukt beinhalten, es aber nicht exprimieren, da der *Oct4*-Promotor in normalen differenzierten Zellen nicht aktiv ist. Bei keinem der 16 Zellklone war EGFP-Fluoreszenz nachweisbar, das Reporter-genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP somit inaktiv, wie von normalen differenzierten Zellen erwartet. Abbildung 4.2 zeigt als repräsentatives Beispiel BFFGOF12.

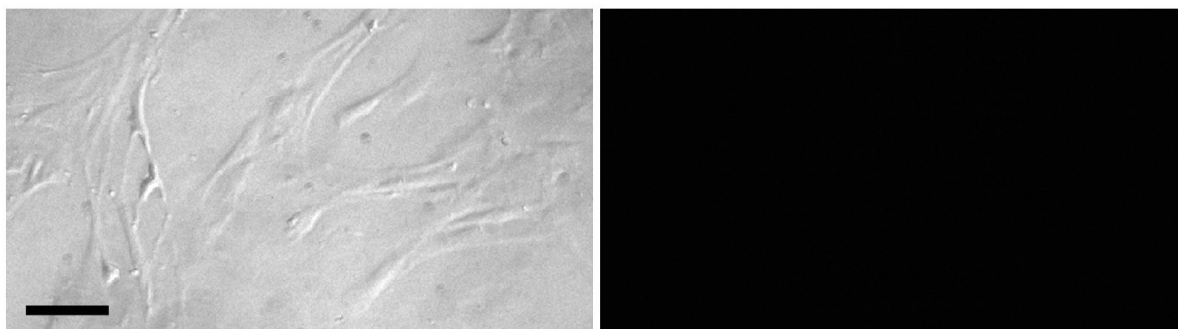


Abbildung 4.2: Überprüfung von GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Zellklonen auf EGFP-Fluoreszenz.

Zellklon BFFGOF12 ist repräsentativ für alle 16 Zellklone. Links: Phasenkontrast. Rechts: Fluoreszenzbild. Bei keinem Zellklon war EGFP-Fluoreszenz detektierbar. Maßstabsbalken: 100 μ m.

4.1.3 Orientierende Untersuchung zur Oct4-EGFP-Expression in frühen SCNT-Embryonen

Von den 16 GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Zellklonen (BFFGOF) wurden sechs in einem Vorversuch für SCNT verwendet. Drei Zellklone lieferten Embryonen ohne nachweisbare EGFP-Fluoreszenz. SCNT-Embryonen von den drei transgenen Zellklonen BFFGOF3, -12 und -82 zeigten eindeutige EGFP-Fluoreszenz. Dies wurde in jeweils mindestens drei Wiederholungsexperimenten bestätigt. Dadurch wurde die Funktionsfähigkeit des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP beim Rind gezeigt. Die Embryonen wurden an Tag 6 (BFFGOF3 und -12) und an Tag 7 (BFFGOF82) an einem Epifluoreszenzmikroskop untersucht und dokumentiert wie in Abbildung 4.3 dargestellt.

Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

1. In der Entwicklung früh stehende Embryonen (< acht Zellen) zeigten keine EGFP-Expression (siehe Pfeile in Abbildung 4.3 C, F, I).
2. EGFP war in Tag 6 und 7 Embryonen sowohl in der inneren Zellmasse (ICM), als auch im Trophektoderm (TE) nachweisbar (siehe Abbildung 4.3 E).

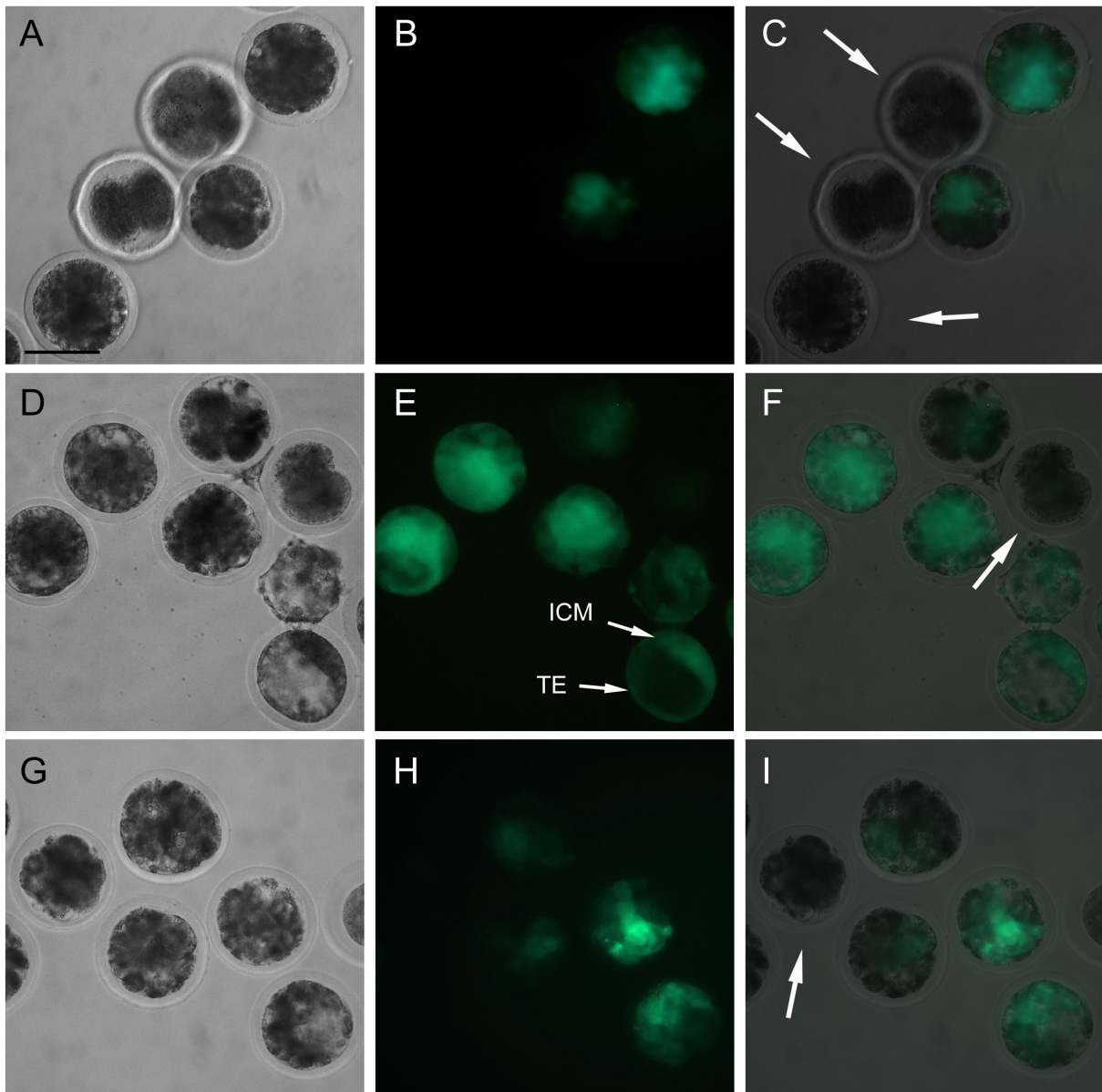


Abbildung 4.3: Grün fluoreszierende Embryonen aus SCNT-Vorversuchen.

EGFP-Fluoreszenz bei Tag 6 Embryonen, die sich von BFFGOF3 (A-C) und von BFFGOF12 (D-F) ableiten, und Tag 7 Embryonen nach SCNT mit BFFGOF82 (G-I). Embryonen, die früh (< acht Zellen) in der Entwicklung stehen geblieben zeigten keine EGFP-Fluoreszenz und sind mit Pfeilen markiert (C, F, I). EGFP war stets sowohl in der inneren Zellmasse (ICM), als auch im Trophektoderm (TE) nachweisbar (E). Maßstabsbalken: 100 μ m.

4.1.4 Überprüfung des Karyotyps und Nachweis der chromosomalen Integration des Reportergenkonstruktes GOF18-ΔPE-EGFP mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

BFFGOF-Zellklone, aus denen sich nach dem Kerntransfer EGFP-exprimierende Embryonen entwickelten (BFFGOF3, -12 und -82) wurden mittels Karyotyp- und FISH-Analyse näher charakterisiert, um einen Zellklon mit normalem Karyotyp für weitere Untersuchungen auszuwählen. Außerdem sollte die Anzahl und Lokalisation der GOF18-ΔPE-EGFP-Integrationsorte im Genom bestimmt werden.

Eine Übersicht über die Anzahl der beurteilten Chromosomen und die Passage in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Chromosomenpräparation befanden gibt Tabelle 4.1. Die Chromosomen wurden aus Zellen in der 11. - 13. Passage präpariert und 11 - 22 Metaphasen nach der DAPI-Färbung untersucht. BFFGOF12 und -82 wiesen jeweils einen normalen weiblichen Karyotyp ($2n = 60, XX$) auf und Zellklon BFFGOF3 zeigte einen instabilen Karyotyp ($2n = 58 - 62, XX, XXX, XXXX$). Eine Metaphase des Zellklons BFFGOF3 in Abbildung 4.4 weist beispielsweise drei X-Chromosomen (Pfeile) bei insgesamt 61 Chromosomen auf.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Karyotyp-Analyse von GOF18-ΔPE-EGFP-transgenen Zellklonen

BFFGOF	Passage	n	Karyotyp
3	12	22	58 – 62, XX, XXX, XXXX
12	13	11	60, XX
82	11	14	60, XX

n: Anzahl ausgezählter Metaphasen

Die Untersuchung der Metaphasen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ergab bei allen drei getesteten Zellklonen jeweils eine unilokuläre („single locus“) Integration des Reportergenkonstruktes sichtbar als je ein Signal auf beiden Schwesterchromatiden (siehe Abbildung 4.5 A-C). Als Positivkontrolle wurde Locus *D6Z1* auf Chromosom 6 angefärbt.

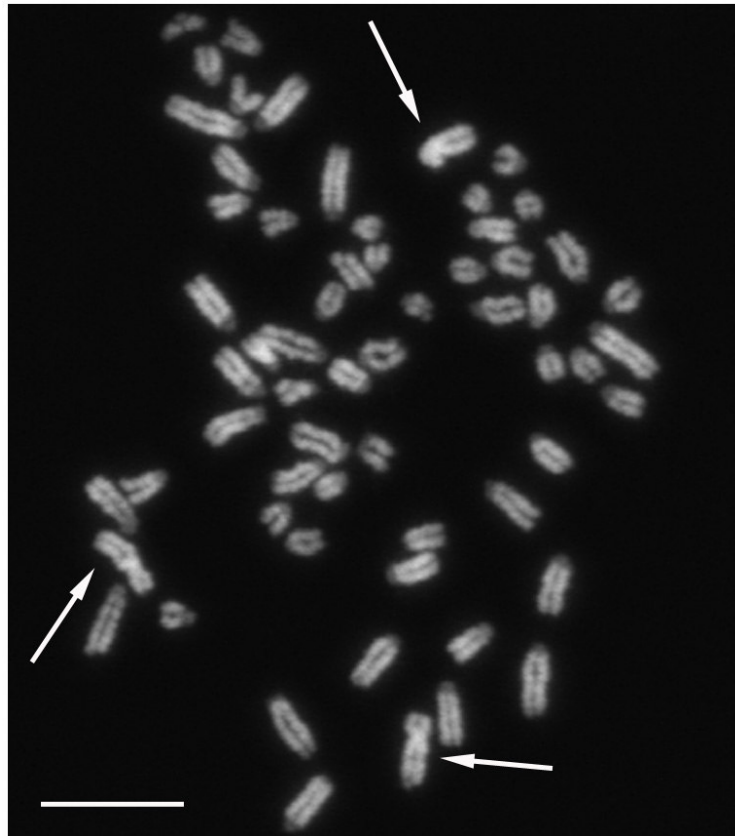


Abbildung 4.4: Karyotyp-Untersuchung GOF18- Δ PE-EGFP-transfizierter Zellen am Beispiel von Zellklon BFFGOF3.

Insgesamt enthält diese Metaphase 61 Chromosomen inklusive drei X-Chromosomen (Pfeile). Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 10 μ m.

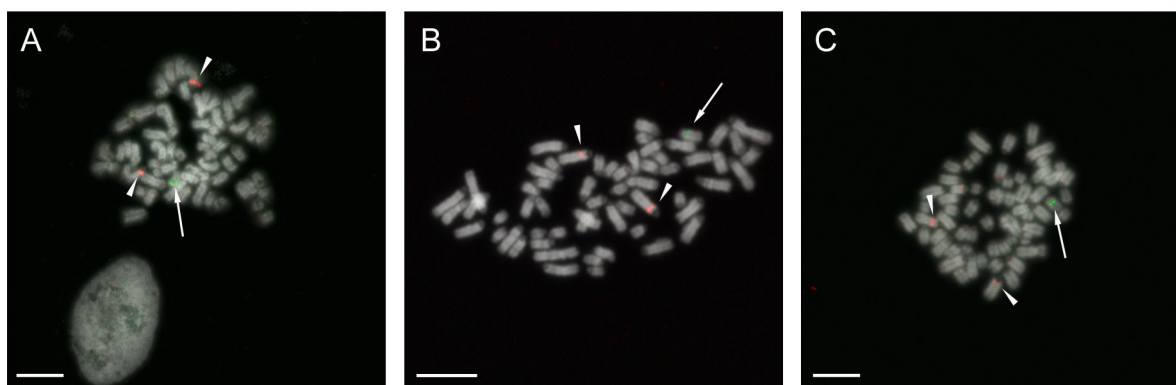


Abbildung 4.5: Nachweis der unilokulären Integration des Oct4-Reportergenkonstruktes mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

Die Pfeile markieren das Chromosom mit dem GOF18- Δ PE-EGFP-spezifischen Signal (grün) in Metaphasen-Chromosomen von BFFGOF3 (A), BFFGOF12 (B) und BFFGOF82 (C). Als Positivkontrolle wurde Locus D6Z1 auf Chromosom 6 angefärbt (Pfeilspitzen). Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Der Zellklon BFFGOF12 wurde aufgrund der folgenden Eigenschaften für die weiteren Untersuchungen ausgewählt:

- normaler Karyotyp
- unilokuläre Integration des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP
- Aktivierung des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP nach SCNT

4.2 Analyse der Oct4-EGFP-Expression in SCNT-Embryonen von Zellklon BFFGOF12 mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

4.2.1 Entwicklungsstand von SCNT-Embryonen 4, 6 und 8 Tage nach Kerntransfer

Insgesamt wurden 245 Kerntransfers unter Verwendung des Zellklons BFFGOF12 in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Fusionsrate betrug $96\% \pm 1\%$. In jedem Experiment wurden fusionierte Kerntransferkomplexe zufällig in drei Gruppen zur Untersuchung an den Tagen 4, 6 und 8 eingeteilt. Insgesamt wurden 73 Tag 4, 53 Tag 6 und 45 Tag 8 Embryonen untersucht. An jedem der drei untersuchten Zeitpunkte variierte der Entwicklungsstand und damit die Anzahl der Zellkerne erheblich von Embryo zu Embryo (siehe Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3). Bei den Tag 4 Embryonen war eine Bandbreite von 1 - 30 Zellkernen vertreten, wobei 36 % 9 - 30 Zellkerne aufwiesen. An Tag 6 variierte die Anzahl der Zellkerne bei den Embryonen von 1 - 206. Die Anzahl der Blastozysten (im CLSM beginnende Blastocoelbildung oder später) lag bei 20 (37 %) mit 45 bis 206 Zellkernen ($107,3 \pm 50,4$; Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die Gruppe der Tag 8 Embryonen enthielt 22 (49 %) Blastozysten, wobei der überwiegende Anteil am Schlüpfen war, und 23 (51 %) Embryonen mit ca. 1 - 15 Zellkernen, wobei letztere keine EGFP-Expression aufwiesen. Die Tag 8 Embryonen wurden nicht weiter im Detail untersucht.

4.2.2 Überprüfung der Spezifität der EGFP-Fluoreszenz

Um EGFP-Fluoreszenz sicher von etwaiger Autofluoreszenz zu differenzieren, wurde mit einem polychromatischen Mehrkanaldetektor an jedem Embryo das Emissionsspektrum bei Anregung mit 488 nm Wellenlänge analysiert. Das an den Embryonen beobachtete Emissionsspektrum deckte sich mit dem Emissions-

spektrum von EGFP (Clontech 2001). Abbildung 4.6 zeigt in einer zentralen optischen Schnittebene eines Tag 6 SCNT Embryos sechs, jeweils 10,7 nm breite Emissionsbereiche zwischen 505 und 612 nm. Zur besseren Darstellung der Intensitätsabstufungen wurde eine Falschfarbenkodierung verwendet (ImageJ Software).

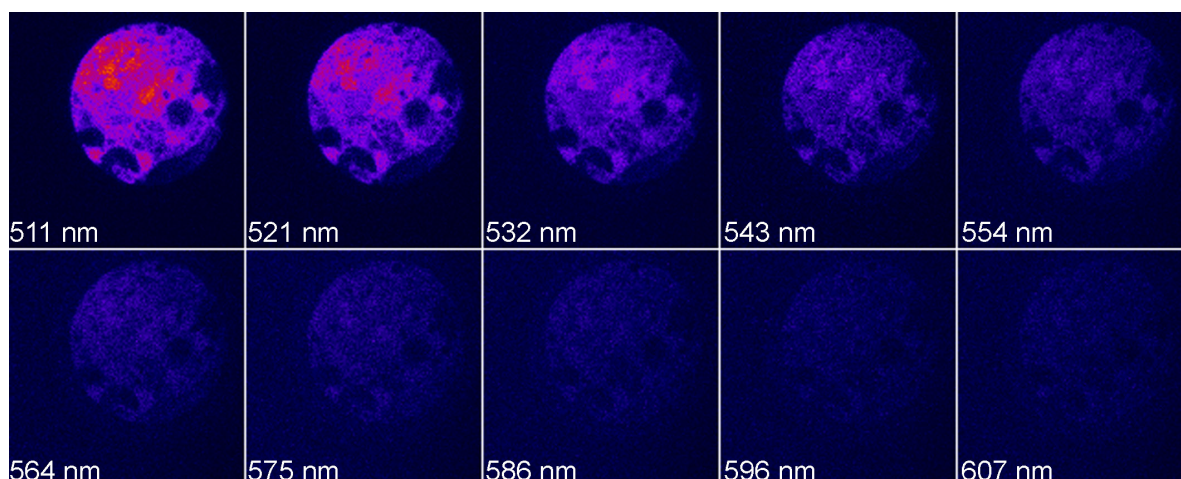


Abbildung 4.6: Überprüfung des Emissionsspektrums an einem Tag 6 SCNT-Embryo.

In einer zentralen optischen Schnittebene sind sechs, jeweils 10,7 nm breite Emissionsbereiche zwischen 505 und 612 nm dargestellt. Der Wert im Bild entspricht der Wellenlänge (gerundet), die ca. in der Mitte der Bandbreite liegt. Zur besseren Darstellung der Intensitätsabstufungen wurde eine Falschfarbenkodierung verwendet (ImageJ Software).

4.2.3 Aktivierung von Oct4-EGFP an Tag 4

Die Tag 4 Kerntransferembryonen wurden nach der Anzahl der Zellkerne in Gruppen eingeteilt und die Anteile der EGFP-exprimierenden Embryonen ermittelt (siehe Tabelle 4.2). In Embryonen mit weniger als neun Zellkernen wurde keine EGFP-Expression beobachtet. Dies spricht dafür, dass der *Oct4*-Promotor in Blastomeren nicht vor Ende des dritten Zellzyklus aktiv war. Neun von 13 Embryonen (69 %) mit 9 - 16 Zellkernen zeigten EGFP-Fluoreszenz in einer oder mehreren Blastomeren, wohingegen in allen Tag 4 Embryonen mit 17 - 30 Zellkernen EGFP-Expression nachweisbar war. In Abbildung 4.7 C-D und G-H ist in allen Blastomeren EGFP-Fluoreszenz sichtbar, während die Intensität zwischen den einzelnen Blastomeren deutlich variiert. In Abbildung 4.7 (D, H, L, P) wurde eine Falschfarbenkodierung zur besseren Darstellung der Intensitätsabstufungen gewählt (siehe Abschnitt 4.2.2).

Tabelle 4.2: Auswertung der Tag 4 Embryonen: Anzahl von Zellkernen und Anteil der EGFP-exprimierenden Embryonen

Anzahl Zellkerne	Anzahl Embryonen	Anzahl Embryonen mit EGFP-Expression (%)
1 - 4	38	0
5 - 8	8	0
9 - 16	13	9 (69)
17 - 30	14	14 (100)
Gesamt	73	23 (32)*

* Bezogen auf die Gesamtzahl der Tag 4 Embryonen (n = 73)

4.2.4 Variable GOF18-ΔPE-EGFP-Expression in Tag 6 Embryonen

Von den 53 an Tag 6 evaluierten Embryonen hatten 31 (52 %) weniger als neun Kerne und wiesen keine EGFP-Expression auf. In den restlichen Tag 6 Embryonen war die EGFP-Expression deutlich stärker als in Tag 4 (Abbildung 4.7 K-L) und Tag 8 (Abbildung 4.7 O-P) Embryonen.

Die Fluoreszenzintensitäten der Tag 6 Embryonen wurden an zentralen optischen Schnitten der Embryonen bestimmt. In Tabelle 4.3 sind die EGFP-exprimierenden Embryonen, die ausgewertet wurden mit Entwicklungsstadium, Zellkernzahl und Medianwert der EGFP-Fluoreszenz aufgelistet. Die Anzahl der Zellkerne bei den EGFP-exprimierenden Embryonen lag zwischen 22 und 206 ($100,5 \pm 52$; Mittelwert \pm Standardabweichung), wobei sich die meisten EGFP-exprimierenden Embryonen im Blastozystenstadium (im CLSM beginnende Blastocoelbildung und später) befanden. Die mediane Fluoreszenzintensität der EGFP-exprimierenden Embryonen lag zwischen 22 und 119 ($42,9 \pm 27,2$; Mittelwert \pm Standardabweichung) und schwankte damit um den Faktor 5,4.

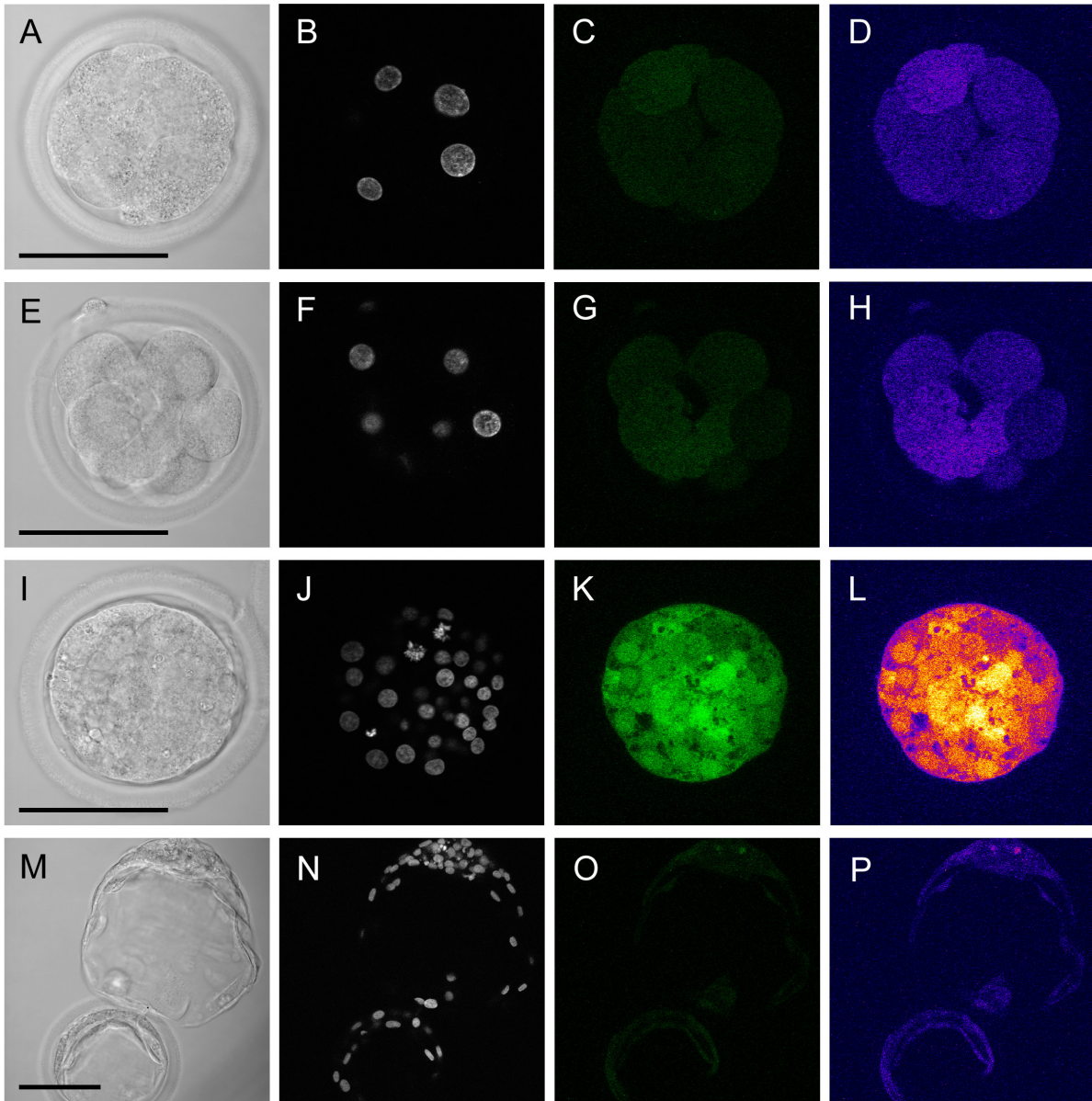


Abbildung 4.7: Untersuchung der EGFP-Fluoreszenz in Tag 4, 6 und 8 Embryonen mittels CLSM.

Die Embryonen sind folgendermaßen abgebildet: im Durchlicht (**A, E, I, M**); Darstellung der Hoechst gefärbten Kerne (**B, J, F, M**); Darstellung von EGFP in grün (**C, G, K, O**) und in einer Falschfarbenkodierung (**D, H, L, P**), um die Intensitätsabstufungen besser darzustellen. Die beiden dargestellten Tag 4 Embryonen mit zwölf (**A-D**) und 21 (**E-H**) Zellkernen zeigten in allen Blastomeren EGFP-Expression, wobei die Intensität der EGFP-Fluoreszenz zwischen den einzelnen Blastomeren innerhalb des Embryos deutlich variierte (siehe z. B. **H**). Eine deutliche Zunahme der Intensität war in den Tag 6 (**I-L**) Embryonen zu verzeichnen. In Tag 8 Embryonen (**M-P**) erschien die Fluoreszenzintensität wieder schwächer als an Tag 6. Es ist jeweils eine zentrale optische Schnittebene mit einer Schnittdicke von 1 μm abgebildet. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Maßstabsbalken: 100 μm .

Tabelle 4.3: Anzahl der Zellkerne und EGFP-Fluoreszenz in Tag 6 SCNT-Embryonen von BFFGO12

Embryo-Nr.	Anzahl Zellkerne	Mediane Fluoreszenz	Entwicklungsstadium
E1	22	24	22-Zeller
E2	44	38	Morula
E3	45	82	Blastozyste
E4	47	60	Blastozyste
E5	58	28	Blastozyste
E6	64	31	Blastozyste
E7	69	48	Blastozyste
E8	70	47	Blastozyste
E9	75	33	Blastozyste
E10	82	22	Schlüpfende Blastozyste
E11	83	33	Blastozyste
E12	86	52	Blastozyste
E13	89	39	Blastozyste
E14	104	94	Blastozyste
E15	121	103	Blastozyste
E16	121	66	Blastozyste
E17	127	40	Blastozyste
E18	148	33	Blastozyste
E19	159	119	Blastozyste
E20	190	43	Expandierte Blastozyste
E21	201	86	Blastozyste
E22	206	43	Schlüpfende Blastozyste
Median	84,5	43,0	
MW ± SA	100,5 ± 52,8	52,9 ± 27,3	

MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung

4.2.5 Beziehung zwischen der Anzahl der Zellkerne und der Höhe EGFP-Expression in Tag 4 Embryonen

Um die Beziehung zwischen Zellkernzahl und Höhe der EGFP-Expression bei Tag 4 SCNT-Embryonen zu untersuchen, wurde an jedem Embryo die Fluoreszenzintensität an einem zentralen optischen Schnitt bestimmt. Die Medianwerte lagen im Bereich von sieben bis 33 und schwankten damit um den Faktor 4,7. In Embryonen mit weniger als neun Zellkernen war, wie schon erwähnt, kein EGFP nachweisbar

(Tabelle 4.2). Zellkernzahl und EGFP-Fluoreszenz wiesen eine mittlere positive Korrelation ($r = 0,62$, $P < 0,05$) auf. In Abbildung 4.7 ist mittels eines Diagrammes die Beziehung zwischen EGFP-Expression und Anzahl der Zellkerne dargestellt.

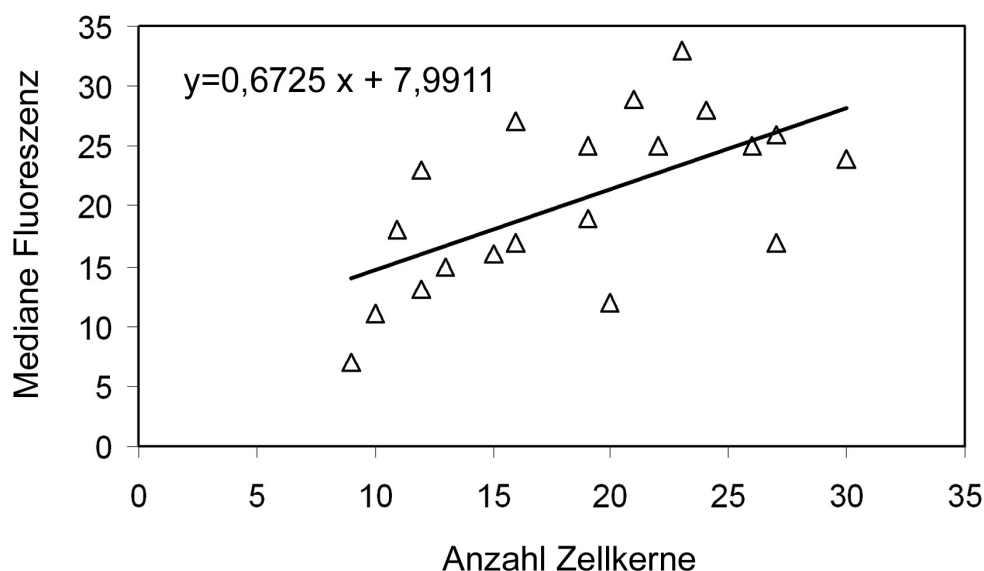


Abbildung 4.8: Beziehung zwischen EGFP-Expression und Anzahl der Zellkerne in Tag 4 SCNT-Embryonen.

Mit steigender Zellkernzahl nimmt die Fluoreszenzintensität, repräsentiert durch die Medianwerte, zu. Embryonen mit weniger als neun Zellkernen zeigten keine EGFP-Expression und sind deshalb im Diagramm nicht berücksichtigt.

4.2.6 Zellkernzahl, Zellkernmorphologie und Höhe der Oct4-EGFP-Expression an Tag 6

Um den Zusammenhang zwischen EGFP-Fluoreszenzintensität und Anzahl der Zellkerne darzustellen wurden in dem Diagramm in Abbildung 4.9 die Medianwerte der Fluoreszenzintensität eines zentralen optischen Schnittes gegen die Anzahl der Zellkerne jedes einzelnen Embryos aufgetragen. Mit zunehmender Zellkernzahl zeigten die Embryonen eine höhere mediane Fluoreszenzintensität. Die positive Korrelation ($r = 0,34$) erreichte allerdings nicht Signifikanzniveau ($P = 0,12$). Die medianen Fluoreszenzwerte variierten stark, wobei auffiel, dass bei vergleichbarer Zellkernzahl Embryonen mit einer hohen EGFP-Fluoreszenz (E14, E15, E19, E21 - obere Gruppe in Abbildung 4.9) gleichmäßigere Zellkerne und weniger kondensierte und fragmentierte Zellkerne aufwiesen, als Embryonen mit schwächerer EGFP-

Fluoreszenz (E17, 19, 20, 22 - untere Gruppe in Abbildung 4.9). Von je drei Embryonen aus der oberen und unteren Gruppe sind in Abbildung 4.9 die Zellkerne und die EGFP-Fluoreszenz in zwei separaten Bildern dargestellt. Für die Darstellung der Zellkerne wurde eine Z-Projektion (ImageJ Software) der einzelnen Schnittebenen durchgeführt, d.h. alle Zellkerne aus den einzelnen optischen Schnitten wurden in eine Ebene projiziert.

Abnormale Kerne, d. h. Zellkernuntergänge bestehend aus kondensierten und fragmentierten Zellkernen wurden in der oberen (E14, 15, 19, 21) und unteren (E17, E18, E20, E22) Gruppe gezählt und die Ergebnisse in Tabelle 4.4 aufgelistet. Die Anzahl der abnormalen Zellkerne wurden und auf die Gesamtkernzahl, die sowohl die normalen als auch abnormalen Zellkerne beinhaltet, bezogen. In den vier Embryonen mit hoher EGFP-Expression betrug der Anteil abnormaler Kerne im Mittel nur 1,9 %, während in den vier Embryonen mit deutlich geringerer EGFP-Expression der Anteil bei 8,0 %, also mehr als dem Vierfachen lag.

Tabelle 4.4: Anteil abnormer Zellkerne in Embryonen mit hoher (grau unterlegt) und geringerer EGFP-Fluoreszenz

	Embryo-Nr.	Anzahl Zellkerne	Anzahl Abnorme Kerne (%)	
hohe EGFP-Fluoreszenz	E14	104	1	(1,0)
	E15	121	1	(0,8)
	E19	159	1	(0,6)
	E21	201	10	(5,0)
	MW ± SA	146,3 ± 43,1	3,3 ± 4,5	(1,9 ± 2,1)
geringere EGFP-Fluoreszenz	E17	127	12	(9,4)
	E18	148	13	(8,8)
	E20	190	15	(7,9)
	E22	206	12	(5,8)
	MW ± SA	176,8 ± 36,6	13 ± 1,4	(8,0 ± 1,6)

MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung

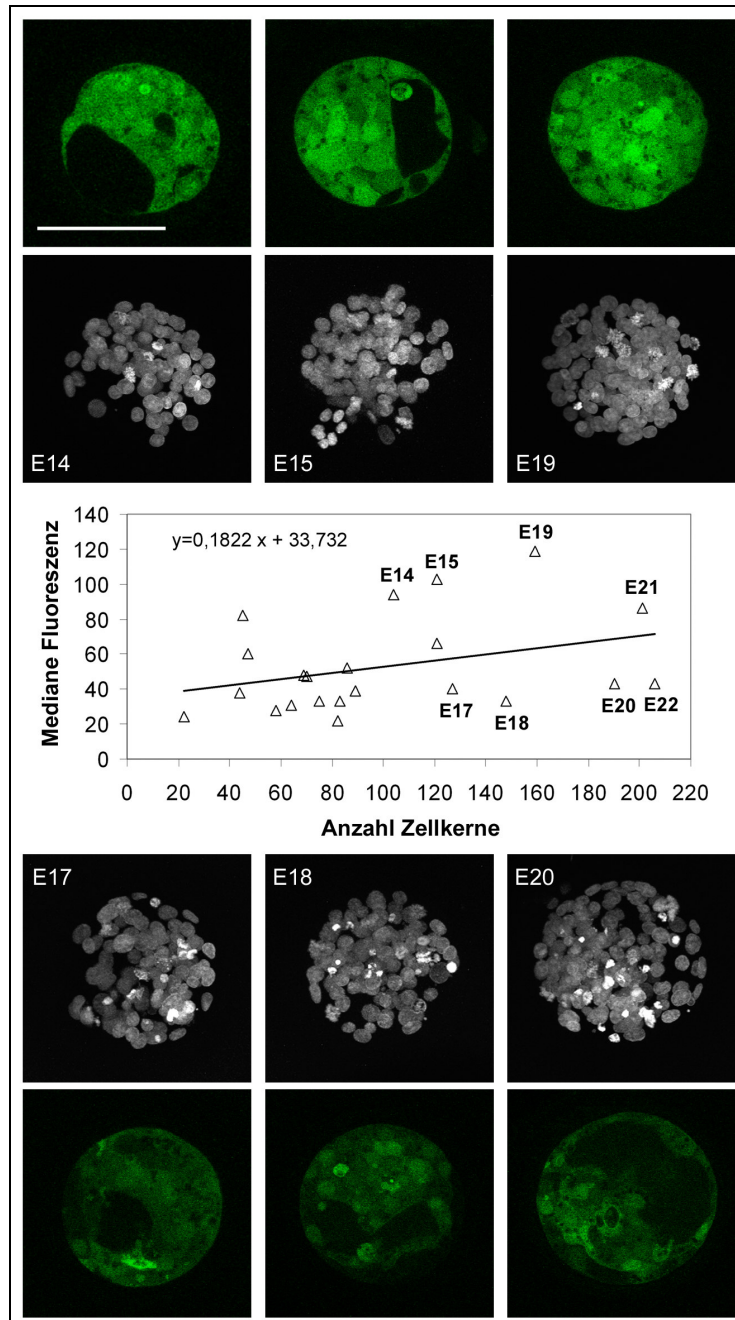


Abbildung 4.9: Quantitative Auswertung der EGFP-Fluoreszenz, Beurteilung der Zellkernzahl und -morphologie von Tag 6 SCNT-Embryonen.

Im Diagramm sind die Medianwerte der Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellkerne aufgetragen. Die Embryonen **E14**, **E15**, **E19** und **E21** (obere Gruppe) weisen im Vergleich zu den Embryonen **E17**, **E18**, **E20** und **E21** (untere Gruppe) bei ähnlicher Zellkernzahl eine erheblich höhere EGFP-Fluoreszenz auf. Gleichzeitig erscheinen die Zellkerne homogener und die Anzahl untergegender Zellkerne (kondensierte und fragmentierte Zellkerne) ist geringer. Die Embryonen sind mit diesen Bezeichnungen auch in Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 aufgeführt. Darstellung der Zellkerne: Z-Projektion aller Schnittebenen. Darstellung der EGFP-Fluoreszenz: zentraler optischer Schnitt mit 1 µm Schnittdicke. Maßstabsbalken: 100 µm.

4.3 Entwicklung von SCNT-Embryonen von Zellklon BFFGOF12 *in vivo*

Insgesamt wurden zwölf Kerntransfer-Embryonen (zehn schlüpfende und zwei expandierte Blastozysten) aus dem Zellklon BFFGOF12 am Tag 7 auf vier synchronisierte Empfängertiere übertragen (drei Embryonen pro Empfängertier). Zwei Trächtigkeiten wurden etabliert und die beiden trächtigen Empfängertiere am Tag 34 geschlachtet. Die beiden gewonnen Uteri enthielten ein bzw. zwei Feten, die als 451-1 (siehe Abbildung 4.10 A), 451-2 und 454 bezeichnet wurden. Alle drei Feten waren gleichmäßig entwickelt und erschienen nach makroskopischer Beurteilung normal mit einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von ca. 1,8 cm.

4.4 Die Expression von Oct4-EGFP in SCNT-Embryonen aus Fibroblasten der zweiten Generation („second round“ SCNT)

Um die Stabilität der Integration des Reporter-genkonstruktes nach dem SCNT zu untersuchen, wurden Fibroblastenkulturen aus jedem der drei BFFGOF12-Feten isoliert. Diese Fibroblasten der zweiten Generationen werden im Folgenden als FeGOF451-1, FeGOF451-2 und FeGOF454 bezeichnet. Mittels PCR (Abbildung 4.11 A) und Southern Blot Analyse (Abbildung 4.11 B) wurde in allen drei Fibroblastenkulturen das Reporter-genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP nachgewiesen. Als Beleg einer wirksamen Abschaltung des *Oct4*-Promotors von GOF18- Δ PE-EGFP - analog zum endogenen *OCT4*-Promotor - ließ sich keine EGFP-Fluoreszenz in den isolierten Fibroblasten nachweisen. Abbildung 4.10 B und C zeigen stellvertretend die Fibroblasten FeGOF451-1, aufgenommen mit einem Epifluoreszenzmikroskop und einer CCD-Kamera. Karyotypanalyse und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von FeGOF451-1 und FeGOF454 (Abbildung 4.10 D: FeGOF451-1) belegten einen normalen Karyotyp ($2n = 60, XX$) und eine unilokuläre Integration von GOF18- Δ PE-EGFP wie bei dem Primärklon BFFGOF12.

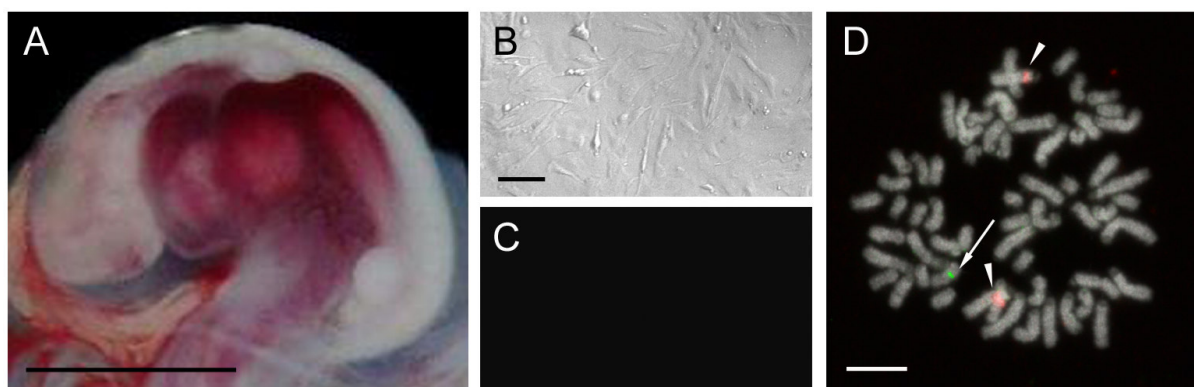


Abbildung 4.10: 34 Tage alter Fetus (451-1) nach SCNT von Zellklon BFFGOF12.

(A) Einer (451-1) der drei gewonnenen Feten, die nach makroskopischer Untersuchung normal entwickelt waren. Maßstabsbalken: 6,5 mm. (B-C) Fibroblasten isoliert aus dem in (A) abgebildeten Fetus (FeGOF451-1) ohne detektierbare EGFP-Expression. (B) Hellfeld; Maßstabsbalken: 100 μ m. (C) Fluoreszenzbild. (D) Nachweis der stabilen unilokulären („single locus“) Integration des Reportertransgens (Pfeil) durch FISH auf Metaphasechromosomen, der aus dem Fetus isolierten Fibroblasten. Als Positivkontrolle wurde Locus D6Z1 auf Chromosom 6 angefärbt (Pfeilspitzen). Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Für den SCNT wurden FeGOF451-1 und FeGOF454 verwendet. In beiden Fällen wurde das Reportertransgenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP (siehe Abbildung 4.12) wie in den Experimenten mit dem primären Zellklon BFFGOF12 aktiviert. Dieses Ergebnis wurde für die Zellen von FeGOF451-1 in zwei Wiederholungsexperimenten bestätigt. In Tabelle 4.5 sind die Effizienzen des somatischen Kerntransfers mit Zellen aus einem GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Fetus (FeGOF451-1) und dem Primärklon BFFGOF12 (erste Generation) zusammenfassend dargestellt. Der Zellklon BFFGOF12 wurde in vier Experimenten in der 9. - 11. Passage, die Zellen von FeGOF451-1 in drei Experimenten in der 4. - 5. Passage eingesetzt. Obwohl die Furchungsrate nach SCNT mit FeGOF451-1 niedriger war als mit BFFGOF12, brachte FeGOF451-1 nach sieben Tagen eine signifikant höhere Blastozystenrate ($P < 0,05$) hervor. Die Blastozystenrate errechnete sich aus dem Anteil der Blastozysten auf die Embryonen, die sich geteilt hatten.

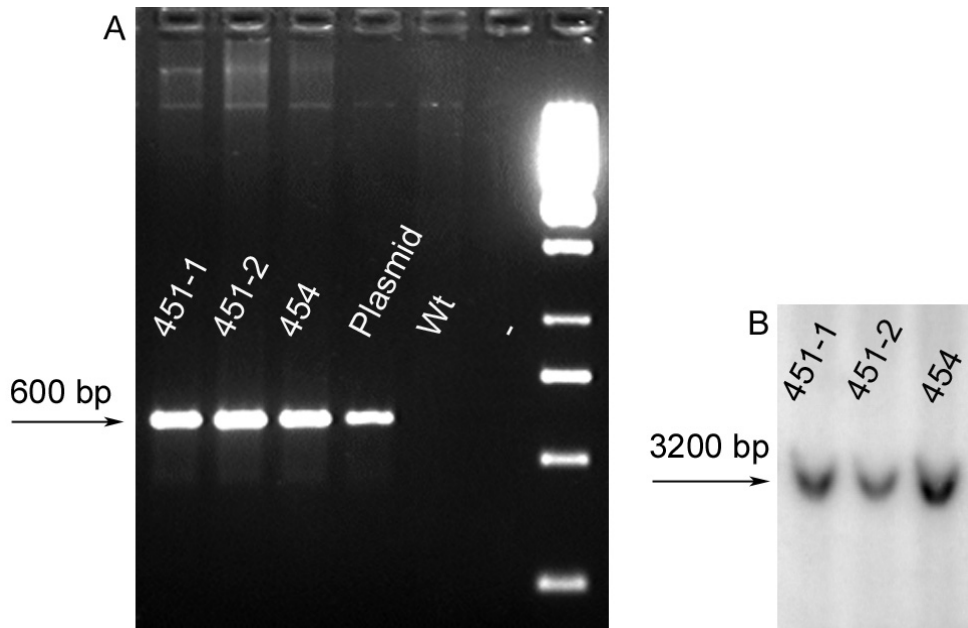


Abbildung 4.11: Nachweis des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP in Fibroblasten der zweiten Generation isoliert aus drei 34 Tage alten SCNT-Feten von BFFGOF12.

In allen isolierten Zelllinien konnte GOF18- Δ PE-EGFP mittels PCR (A) und Southern Blot Analyse (B) nachgewiesen werden. Die PCR (A) lieferte bei den isolierten fetalen Zellen im Agarose-Gel eine Bande bei 600 bp, wie bei der Positivkontrolle (Matrize: Plasmid), während beide Negativkontrollen (Wt und -) keine Bande zeigten. Molekulargewichtsstandard: 1-kb DNA Ladder. Wt: Wildtyp; -: NTC („non template control“). Die Southern Blot Analyse (B) ergab eine spezifische Band mit 3200 bp.

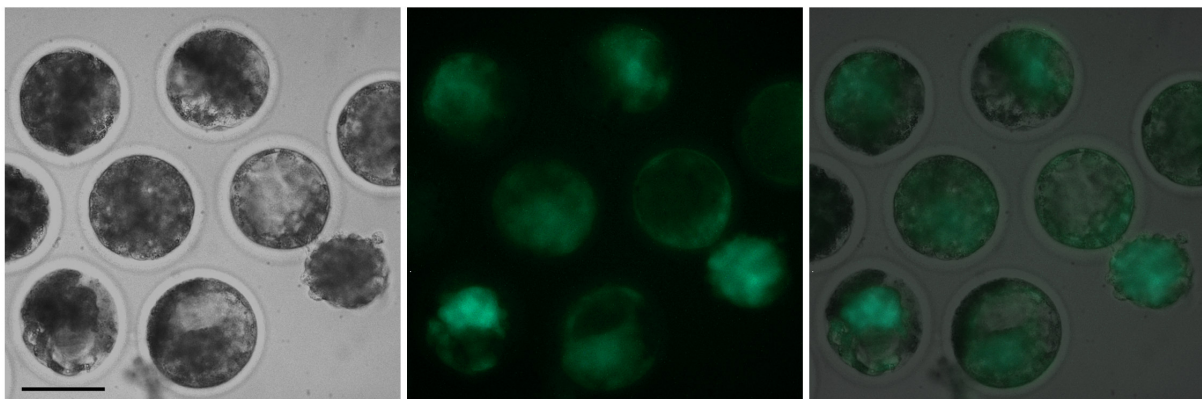


Abbildung 4.12: Aktivierung von GOF18- Δ PE-EGFP nach SCNT mit den Zellen FeGOF451-1 („second round“).

Die Aktivierung des Reportergenkonstruktes erfolgte wie bei den SCNT-Embryonen aus Zellklon BFFGOF12. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Tabelle 4.5: Vergleich der Effizienz nach Kerntransfer mit Zellen aus einem GOF18-ΔPE-EGFP-transgenen Fetus (FeGOF451-1) und dem primären Zellklon (BFFGOF12)

Zellen	Experimente (n)	Eizellen (n)	Fusionsrate (%)	Furchungsrate (%) ¹	Blastozystenrate Tag 7 (%) ²
BFFGOF12	4	161	93,7 ± 2,6	87,8 ± 4,8	24,7 ± 8,5
FeGOF451-1	3	113	95,5 ± 4,0	61,5 ± 10,0	39,8 ± 4,4*

Fusions-, Furchungs- und Blastozystenrate sind mit Mittelwert ± Standardabweichung (SA) angegeben. ¹Bezogen auf die fusionierten Karyoplast-Zytoplast Komplexen. ²Bezogen geteilten Embryonen. *Die Blastozystenrate unterscheidet sich signifikant (T-Test: $P < 0.05$) zwischen den beiden Spenderzelltypen.

4.5 Embryonaler Kerntransfer von Blastomeren (BNT) aus Tag 5 Morulae nach Kerntransfer mit BFFGOF12 und FeGOF451-1

Um die Aktivierung des Oct4-EGFP-Reportgenkonstruktes nach einer Reklonierung zu untersuchen wurden in einem parallelen Ansatz Tag 5 SCNT-Morulae aus dem Zellklon BFFGOF12 und Zellen der Linie FeGOF451-1 hergestellt und für BNT verwendet. Dabei wurde jeweils eine einzelne Blastomere mit einer entkernten Eizelle fusioniert wird. Da hier Blastomeren von SCNT-Embryonen als Kernspenderzellen verwendet wurden, spricht man von einer Reklonierung. Die resultierenden Embryonen wurden an Tag 7 mit dem Epifluoreszenzmikroskop beurteilt. Es wurde ein Experiment mit den in Tabelle 4.6 aufgelisteten Entwicklungsraten durchgeführt. BNT-Embryonen aus Tag 5 Morulae nach SCNT mit FeGOF451-1 zeigten eine doppelt so hohe Blastozystenrate wie BNT Embryonen aus BFFGOF12. Die Blastozystenrate errechnet sich aus dem Anteil der generierten Blastozysten an den fusionierten Kerntransferkomplexen.

Tabelle 4.6: Entwicklung von BNT-Embryonen nach der Reklonierung mit Tag 5 Morulae in einem parallelen Experiment

Zellen	Eizellen (n)	Fusionsrate (%)	Furchungsrate ¹ (%)	Blastozystenrate ¹ (%)
BFFGOF12	22	22 (100)	18 (82)	3 (14)
FeGOF451-1	25	25 (100)	16 (64)	7 (28)

¹Bezogen auf fusionierte Karyoplast-Zytoplast Komplexe.

In Abbildung 4.13 sind die Tag 7 BNT-Embryonen aus den Zellen von BFFGOF12 und FeGOF451-1 dargestellt. In beiden Fällen war EGFP nachweisbar und folglich der *Oct4*-Promotor von GOF18- Δ PE-EGFP aktiv.

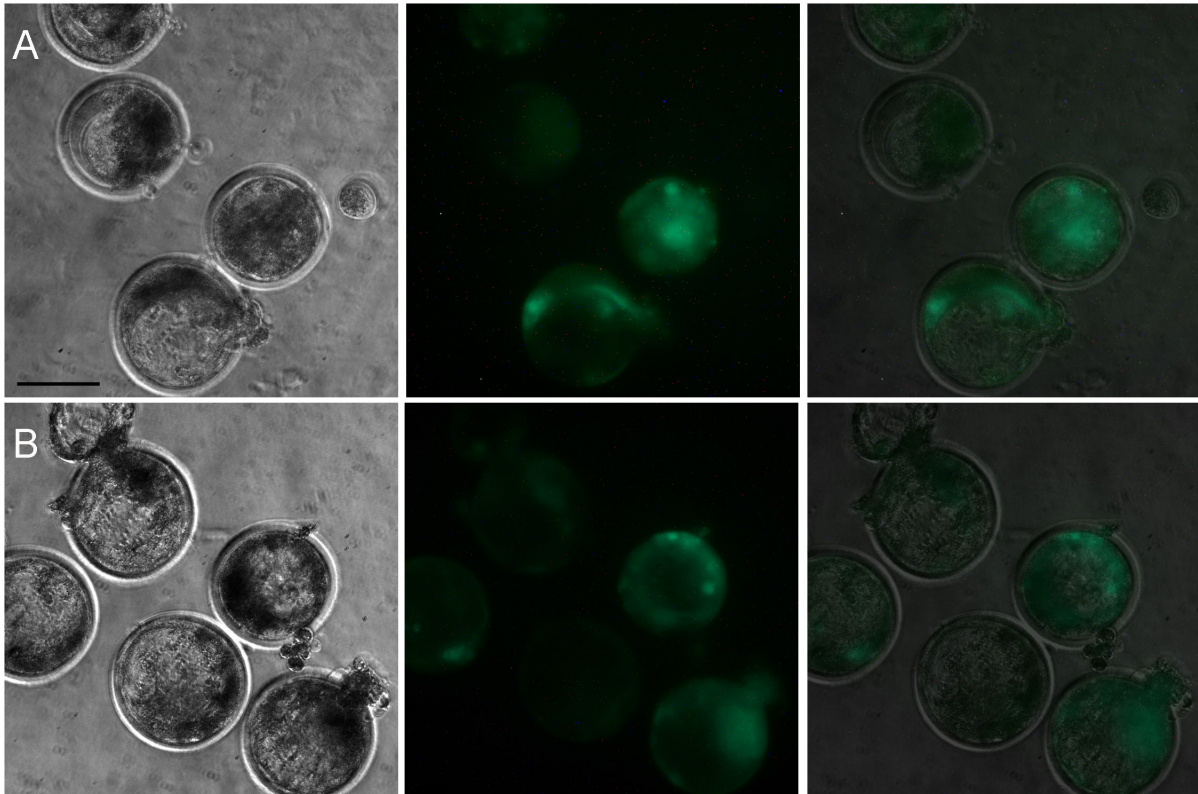


Abbildung 4.13: Reklonierung.

Tag 7 Embryonen nach BNT mit den Zellen von BFFGOF12 **(A)** und FeGOF451-1 **(B)**.
Maßstabsbalken: 100 μ m.

5 Diskussion

Die Geburt des ersten Klontieres aus SCNT mit adulten Zellen, des Schafes Dolly, weckte große Erwartungen in Bezug auf die Weiterentwicklung im Bereich der Biotechnologie der Nutztiere, der Herstellung transgener Tiere und der Entwicklung der Stammzelltherapie. Obwohl dieses Ereignis mittlerweile schon zehn Jahre zurück liegt, entwickelt sich der überwiegende Anteil der SCNT-Embryonen nicht über die Implantation hinaus. Eine Reihe von Ursachen wird im Zusammenhang mit den Fehlschlägen diskutiert, wie z. B. eine abnormale räumliche Verteilung und Höhe der *Oct4*-Expression bei der Maus. Beim Rind ist die Effizienz deutlich höher als bei der Maus und viele der Embryonen entwickeln sich zumindest über die Implantation hinaus, trotzdem kommt es auch in dieser Spezies zu Anomalien in der Entwicklung, wie z. B. dem „large offspring syndrome“ (LOS).

Für die Entwicklung eines Modellsystems zur Entschlüsselung der wesentlichen Mechanismen der Reprogrammierung nach Kerntransfer beim Rind, wurden stabil transfizierte *Oct4*-EGFP-Fibroblasten mit einer unilokulären („single locus“) Integration und normalem weiblichen Karyotyp hergestellt.

5.1 Herstellung und Charakterisierung stabil GOF18- Δ PE-EGFP-transfizierter boviner fetaler Fibroblasten (BFFGOF)

Das Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP wurde bereits bei der Maus erfolgreich eingesetzt (Szabo et al. 2002). Da die regulatorischen Sequenzen von *Oct4* bei der Maus und beim Rind sehr ähnlich sind (Nordhoff et al. 2001), wurde davon ausgegangen, dass beim Rind eine Abbildung der OCT4-Expression durch die vom murinen *Oct4*-Promotor gesteuerte Expression von EGFP möglich ist. Für die Herstellung von stabil mit dem Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP transfizierten bovinen fetalen Fibroblasten (BFF) wurde mit einem Neomycin-Resistenzgenkonstrukt kotransfiziert. Die Kotransfektion ist eine effektive Möglichkeit zwei Genkonstrukte gleichzeitig und meist am selben Locus in ein Genom zu integrieren. Bei der Selektion mit Geneticin (G418) wurden allerdings auch Zellklone selektiert, die nur das Neomycinresistenzgen enthielten. Daher wurden alle G418-resistenten

Zellklone mittels PCR und Southern Blot untersucht, um letztendlich 16 GOF18- Δ PE-EGFP-transgene Zellklone zu identifizieren.

Sowohl bei der Maus (Palmieri et al. 1994), als auch beim Rind (van Eijk et al. 1999) wurde gezeigt, dass das *Oct4*-Gen normalerweise nicht in differenzierten Zellen exprimiert wird. Daher wurde zunächst bei allen 16 Zellklonen eine Expression des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP im Epifluoreszenzmikroskop ausgeschlossen. Zellklone mit einer - beispielsweise durch Positionseffekte bedingten - abnormen Oct4-EGFP-Expression wären für die weiteren Untersuchungen nicht geeignet gewesen.

An sechs Zellklonen wurde die Aktivierung des Oct4-EGFP-Reportergens nach SCNT getestet. Drei der sechs Zellklone (BFFGOF3, -12 und -82) resultierten in SCNT-Embryonen, die an Tag 6 bzw. 7 EGFP-Fluoreszenz zeigten. Nur in der Entwicklung erheblich verzögerte Embryonen (< acht Zellen) zeigten keine EGFP-Fluoreszenz. Damit war geklärt, dass das Oct4-EGFP-Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP tatsächlich nach dem Kerntransfer in eine entkernte Eizelle aktiviert werden kann. In einer früheren Studie war dieses Oct4-EGFP-Reportergenkonstrukt verwendet worden, um die Aktivität des *Oct4*-Promotors in Präimplantationsembryonen von Rind und Schwein zu untersuchen (Kirchhof et al. 2000). Nach Mikroinjektion in Rinderzygoten wurden a) eine Expression des Reportergenkonstruktes vor der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms und b) mosaikartige Muster der EGFP-Expression beobachtet. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass aufgrund der Sequenzunterschiede die regulatorischen Sequenzen der Maus im Rind nicht adäquat funktionieren. Daneben könnten derartige abnorme Expressionsmuster vor allem auf die zufällige singuläre oder multiple Integration, auf eine instabile Integration oder auf Mosaizismus zurückzuführen sein. Solche Phänomene sind charakteristisch für die DNA-Mikroinjektion in Zygoten (Funahashi et al. 2001). In den SCNT-Embryonen der übrigen drei getesteten Zellklone ließ sich keine EGFP-Fluoreszenz nachweisen. Wenn es nicht möglich ist, EGFP-Fluoreszenz nachzuweisen, kann dies bedeuten, dass tatsächlich kein EGFP vorhanden ist, oder aber die Methode zum Nachweis von EGFP nicht sensitiv genug ist. So muss EGFP mit einer Mindestkonzentration (100 mM) in der Zelle vorhanden sein, damit es sicher detektiert und von Autofluoreszenz unterschieden werden kann (Clontech 2001).

Falls tatsächlich kein EGFP exprimiert wurde, gibt es wieder zwei mögliche Erklärungen:

1. Das Reportergenkonstrukt wurde nicht bzw. nicht vollständig integriert oder ist defekt.
2. Das Reportergenkonstrukt ist vollständig integriert und auf DNA-Ebene nicht mutiert, wird aber nicht exprimiert.

Zu 1.: Da zunächst alle 16 BFFGOF-Zellklone mittels PCR und teilweise zusätzlich durch Southern Blot Analyse als transgen identifiziert wurden, sollten alle SCNT-Embryonen aus diesen positiv getesteten BFFGOF-Zellklonen ebenfalls das Genkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP enthalten. Auf eine vollständige Sequenzierung des jeweils in den einzelnen Klonen integrierten Reportergenkonstruktes wurde aus Kostengründen verzichtet.

Zu 2.: Die Gründe für die Nicht-Expression trotz der sicheren Integration des auf DNA-Ebene intakten Reportergenkonstruktes sind vermutlich vielschichtig. Zum einen können Positionseffekte, die als Einflüsse der molekularen lokalen Umgebung auf die Transgenexpression definiert werden, eine Rolle spielen (Wilson et al. 1990; Twyman 2005). Sie sind die Hauptursache für unterschiedliche Transkription zwischen verschiedenen Zelllinien und transgenen Tieren. Lokale regulatorische Elemente sowie DNA-Methylierung und die Chromatinstruktur der lokalen Umgebung könnten die Stilllegung („silencing“) des Reportergenkonstruktes bewirken. Die Inaktivierung eines Transgens aufgrund solcher Effekte wird als „position-dependent silencing“ bezeichnet.

Vor weiterführenden Untersuchungen wurden bei den BFFGOF-Zellklonen, die EGFP-exprimierende SCNT-Embryonen lieferten, der Karyotyp sowie die Anzahl und Lage der Integrationsstellen untersucht. Eine normale Körperzelle beim Rind enthält 58 akrozentrische Autosomen und zwei X-Chromosomen beim weiblichen, sowie je ein X- und ein Y-Chromosom beim männlichen Tier ($2n = 60$, XX oder XY; Cribru et al. 2001). Grundsätzlich sollten Zellen mit einem veränderten Karyotyp nicht für SCNT verwendet werden, da unter anderem Bureau et al. (2003) beobachteten, dass SCNT-Embryonen beim Rind einen höheren Anteil an chromosomalen Anomalien aufwiesen, wenn sie von Spenderzellen mit einer großen Häufigkeit an Anomalien abstammten. Chromosomale Veränderungen bedingten Fehlbildungen und hohe Abortraten (Plachot 1989; King et al. 2006). Aktuelle Publikationen berichten, dass

ein hoher Prozentsatz von SCNT-Embryonen chromosomale Aberrationen aufweist, beim Rind je nach Studie 18 % bis 74 % (Mohamed Nour & Takahashi 2000; Booth et al. 2003) und beim Schaf 56 % (Alexander et al. 2006). Zwei der getesteten Zellklone, BFFGOF12 und -82, wiesen jeweils einen normalen weiblichen Karyotyp ($2n = 60, XX$) auf; ein Zellklon, BFFGOF3, zeigte einen instabilen Karyotyp ($2n = 58 - 62, XX, XXX, XXXX$). Die verwendete Transfektionsmethode erwies sich insgesamt somit als hervorragend geeignet für die Herstellung geeigneter stabil transfizierter Klone, da sie - im Gegensatz zu manchen viralen Vektoren - keine oder nur wenige chromosomale Aberrationen hervorrief. Eine lange *in vitro* Kultur der Zellen führt vermutlich zu einem größeren Anteil abnormer Zellen aufgrund von Seneszenz (King et al. 2006). Aneuploidie der Geschlechtschromosomen ist eine häufige Erscheinung in der Zellkultur (Fitzgerald et al. 1975; Honma et al. 1996; King et al. 2006), wobei Fehler bei der Chromosomentrennung häufig Ursache für eine abweichende Chromosomenzahl sind (Fukasawa 2005).

Die FISH-Analyse der drei Zellklone BFFGOF3, -12 und -82 ergab in allen drei Fällen eine unilokuläre Integration von GOF18- Δ PE-EGFP. Die Untersuchung der chromosomalen Integrationsorte von Transgenen mittels FISH wird häufiger bei Pflanzen (Abranches et al. 2000; Jackson et al. 2001) als bei Tieren (Nakanishi et al. 2002) angewendet, obwohl die Vorteile von FISH gegenüber der bloßen Analyse mittels PCR und Southern Blot, die keine Informationen über Lokalisation und Anzahl der Integrationsstellen liefern, offensichtlich sind.

Aufgrund des normalen Karyotyps, der unilokulären Integration von GOF18- Δ PE-EGFP und der Fähigkeit zur Aktivierung des Reportergenkonstruktes nach SCNT wurde der Zellklon BFFGOF12 für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt.

5.2 Analyse der Oct4-EGFP-Expression in SCNT-Embryonen von transfizierten fetalen Fibroblasten (Zellklon BFFGOF12)

5.2.1 Spezifität der EGFP-Fluoreszenz

Da in den meisten Organismen und Zellen eine natürliche Fluoreszenz von Metaboliten und strukturellen Komponenten, die so genannte Autofluoreszenz auftritt (Billinton & Knight 2001), wurde an jedem Embryo das Emissionsspektrum bei einer

Anregung mit 488 nm Wellenlänge analysiert. Zu den Molekülen, die Autofluoreszenz hervorrufen, gehören unter anderem Flavine, Lipofuzine, NAD(P)H, AGEs („advanced glycation end-products“) sowie aromatische Aminosäuren in Medienzusätzen. Das an den Embryonen beobachtete Emissionsspektrum deckte sich eng mit dem Emissionsspektrum von EGFP (Clontech 2001), womit eine relevante Verfälschung durch Autofluoreszenz ausgeschlossen wurde.

5.2.2 Tag 4 nach SCNT

Die Zählung der Zellkerne ergab bei den 73 untersuchten Tag 4 Embryonen eine große Bandbreite von 1 - 30 Zellkernen, wobei ca. ein Drittel der Embryonen 9 - 30 Zellkerne aufwies. Normale Embryonen befinden sich vier Tage nach der Befruchtung *in vivo* im 8-16-Zellstadium (Rüsse & Sinowatz 1991).

EGFP-Expression wurde bei Embryonen mit mindestens neun Kernen detektiert, wobei 69 % der Embryonen mit 9 - 16 Zellkernen EGFP-Expression in einer oder mehreren Blastomeren zeigten, wohingegen bei allen Embryonen mit 17 - 30 Zellkernen EGFP detektierbar war. Der *Oct4*-Promotor von GOF18- Δ PE-EGFP wurde somit regelmäßig von Blastomeren angeschaltet, die vier Zellteilungen durchlaufen hatten. In der embryonalen Entwicklung sind bis zum maternalen-embryonalen Übergang („maternal-to-embryonic transition“ - MET), der auch Haupt-Genomaktivierung genannt wird, die maternalen Transkripte und Proteine für die Entwicklung verantwortlich. Beim Rind findet in IVF-Embryonen dieser Übergang zwischen dem späten 4-Zellstadium und dem 8-16-Zellstadium statt (Kopecny et al. 1989; Barnes & First 1991), wobei neuere Studien zeigen konnten, dass in Rinderembryonen bereits im 2-Zellstadium Transkription stattfindet (Plante et al. 1994; Viuff et al. 1996; Memili et al. 1998). Die Beobachtung, dass das *Oct4*-EGFP-Reportergenkonstrukt in allen Embryonen mit mindestens 16 Zellkernen exprimiert wurde, entspricht Untersuchungen an bovinen IVF-Embryonen mittels RNA *in situ* Hybridisierung, in der *OCT4*-Transkripte ab dem 16-Zellstadium nachweisbar waren (Kurosaka et al. 2004). Die Initiation der Reprogrammierung des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP nach SCNT ereignete sich somit in dem Stadium in dem in IVF-Embryonen die Haupt-Genomaktivierung stattfindet.

Die unterschiedlich starke EGFP-Expression in Blastomeren innerhalb einzelner Embryonen, könnte durch einen unterschiedlichen Entwicklungsstand der Blasto-

meren hervorgerufen werden. Wenn sich Blastomeren unterschiedlich schnell teilen und somit nicht alle zu einem bestimmten Zeitpunkt gleich viele Zellzyklen durchlaufen haben, wird möglicherweise Oct4-EGFP zu unterschiedlichen Zeitpunkten angeschaltet.

Um den Zusammenhang zwischen dem Level der EGFP-Fluoreszenz und dem Entwicklungsstand der Embryonen zu untersuchen, wurde die EGFP-Fluoreszenz der einzelnen Embryonen gemessen. Die mediane Fluoreszenzintensität einzelner Embryonen lag im Bereich von sieben und 33 und schwankte damit um den Faktor 4,7. Es ergab sich eine mittlere positive Korrelation zwischen der medianen Intensität der EGFP-Fluoreszenz und Zellkernzahl ($r = 0,62$, $P < 0,05$), d.h. ein Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Zellkernzahl.

5.2.3 Tag 6 nach SCNT

Bei den 53 untersuchten Tag 6 Embryonen variierte die Zellkernzahl von 1 - 206 Zellkernen. In 22 der 53 Embryonen war EGFP-Expression nachweisbar, wobei der überwiegende Anteil dieser Embryonen eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität aufwies als die Tag 4 und Tag 8 Embryonen. Die stärkere EGFP-Expression spiegelt den Anstieg der *OCT4*-mRNA wider, wie es auch in IVF-Embryonen nach der Kompaktierung beobachtet wurde (Kurosaka et al. 2004). Allerdings variierte die mediane Fluoreszenzintensität der einzelnen Embryonen in einem weiten Bereich mit Werten von 22 bis 119 ($42,9 \pm 27,2$; Mittelwert \pm Standardabweichung) um den Faktor 5,4.

Bei einer Zellzahl, bei der in IVF-Embryonen die Haupt-Genomaktivierung erfolgt, wurde in Tag 4 SCNT-Embryonen der Oct4-Promotor nahezu uniform aktiviert. Im späteren Verlauf (Tag 6) war jedoch die Höhe der EGFP-Expression auch bei gleicher Zellzahl in den einzelnen Embryonen sehr unterschiedlich. Während die Initiation der epigenetischen Reprogrammierung und die Aktivierung des Oct4-Promotors wohl primär von ooplasmatischen Determinanten abhängig sind, wird die Höhe der Oct4-EGFP-Expression vermutlich einerseits von weiteren epigenetischen Modifikationen und andererseits von der Produktion spezifischer Transkriptionsfaktoren durch den Embryo bestimmt.

Von den 53 untersuchten Tag 6 Embryonen befanden sich 20 (37 %) Embryonen im Blastozystenstadium (im CLSM beginnende Blastocoelbildung oder später) mit einer

Zellkernzahl von 45 bis 206 ($107,3 \pm 50,4$; Mittelwert \pm Standardabweichung). Der Vergleich der Zellkernzahlen mit den Daten anderer Studien ist schwierig, da meistens Embryonen in einem bestimmten Entwicklungsstadium untersucht wurden und der genaue Zeitpunkt nach dem Kerntransfer nicht angegeben ist. Es wurde beobachtet, dass der Beginn der Blastocoelbildung sich bei *in vitro* und *in vivo* generierten Embryonen hinsichtlich der Zellzahl unterscheidet. Bei IVF-Embryonen bildete sich das Blastocoel bei einer Zellzahl von 32 bis 64 (Van Soom et al. 1993), wohingegen bei *in vivo* generierten Embryonen die Blastocoelbildung erst mit 64 - 128 Zellen begann (Van Soom et al. 1997).

Im Gegensatz zu den Tag 4 Embryonen war in Tag 6 Embryonen die Korrelation zwischen der Zellkernzahl und der medianen Fluoreszenzintensität nur gering positiv ($r = 0,31$; $P = 0,12$). Interessanterweise ergab sich aber bei genauerer Betrachtung der Zellkernmorphologie der Embryonen folgende Beobachtung. Embryonen mit vergleichbarer Zellkernzahl, aber unterschiedlicher medianer Fluoreszenzintensität wiesen deutliche Unterschiede in der Morphologie der Zellkerne auf. Embryonen mit einer stärkeren Fluoreszenzintensität wiesen a) in Form und Größe gleichmäßigere Zellkerne, und b) weniger kondensierte und fragmentierte Zellkerne auf, als Embryonen mit schwächerer EGFP-Fluoreszenz (1,9 % vs. 8,0 %).

Unterschiede in der Zellkerngröße können u. a. durch eine unterschiedliche Anzahl an Zellteilungen im Embryo hervorgerufen werden. Die Zellen im Embryo werden - im Gegensatz zu normalen Körperzellen - mit jeder Zellteilung kleiner. Wenn Zellkerne unterschiedlich groß sind, ist das möglicherweise ein Indiz dafür, dass eine unterschiedliche Anzahl an Teilungen stattgefunden hat, was auch eine Erklärung für eine unterschiedliche Anzahl an Zellkernen sein kann.

Kondensierte und fragmentierte Zellkerne sind nach der initialen Marginalisierung des Chromatins morphologische Kennzeichen des apoptotischen Zelltods (Wyllie et al. 1980). Apoptose wurde beim Rind ab dem 9-16-Zellstadium (Byrne et al. 1999) und im Morula- und Blastozystenstadium in 90 % bis 100 % der IVF-Embryonen beobachtet (Matwee et al. 2000; Van Soom et al. 2002). In bovinen IVF-Embryonen wurde ein höherer Anteil apoptotischer Zellkerne gefunden als in *ex vivo* gewonnenen Embryonen (Gjorret et al. 2003), während in NT-Embryonen wiederum häufiger Zellkerne mit fragmentierter DNA mittels TUNEL-Färbung gefunden wurde als in IVF-Embryonen (Fahrudin et al. 2002). Apoptose ist vermutlich Teil der

normalen embryonalen Entwicklung. Auftreten und Ausmaß von Apoptose in der Präimplantationsphase beeinflussen wahrscheinlich wesentlich die weitere Entwicklung des Embryos nach der Implantation (Gjorret et al. 2003). Bei der Maus wurde gezeigt, dass eine durch Exposition mit Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) bedingte Erhöhung der Apoptoserate (bestimmt durch TUNEL-Färbung) zwar nicht die Implantationsrate beeinflusste, jedoch anschließend die Anzahl der lebend geborenen Nachkommen und deren Geburtsgewicht verringerte (Wuu et al. 1999). Interessanterweise schlossen Yuan et al. (2003) aus ihren Ergebnissen, dass sich im Stereomikroskop morphologisch nicht unterscheidbare Embryonen hochgradig in der Anzahl der Zellkerne und dem Anteil apoptotischer Zellen unterscheiden können. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen an Tag 6 Embryonen suggerieren, dass die Höhe der Oct4-EGFP-Fluoreszenz ein Indikator für eine gute Entwicklungspotenz des lebenden Embryos sein könnte.

5.2.4 Tag 8 nach SCNT

In der Gruppe der Tag 8 Embryonen mit 45 Embryonen enthielten 23 (51 %) ca. 1 - 15 Zellen. Die restlichen 22 (49 %) Embryonen befanden sich im Blastozystenstadium, wobei der überwiegende Anteil am Schlüpfen war.

Von den Tag 8 Embryonen wurden nur zentrale optische Schnitte aufgenommen, auf eine quantitative Analyse der EGFP-Expression wurde aus technischen Gründen verzichtet: Aufgrund ihrer Größe konnten Tag 8 Embryonen nicht mit den gleichen mikroskopischen Einstellungen und den gleichen optischen Bedingungen untersucht werden wie zu den früheren Zeitpunkten. Vor allem jedoch kann die an Tag 8 besonders interessante Frage - das Abschalten des Promotors - in TE und ICM - aufgrund der langen Halbwertszeit von EGFP mit dem verwendeten Reporter-genkonstrukt nicht beantwortet werden. Eine Alternative für diesen Ansatz könnte ein Reporter-gen mit der kurzlebigen GFP-Variante dEGFP sein, die eine kurze Halbwertszeit von 2 h aufweist (Li et al. 1998b).

Eine mögliche Ursache für den starken Abfall der EGFP-Fluoreszenz zwischen Tag 6 und Tag 8 ist das Abschalten der Genexpression aufgrund von degenerativen Prozessen, eventuell hervorgerufen durch die *in vitro*-Kultur. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass in diesem Entwicklungsstadium (Tag 8) der murine *Oct4*-Promotor im Rind nicht adäquat reguliert bzw. exprimiert wird. Letzteres würde auch erklären, warum kein Unterschied in der EGFP-Intensität zwischen innerer Zellmasse

und Trophektoderm zu sehen war, da unter anderem aufgrund der Ergebnisse der RNA *in situ* Hybridisierung an IVF-Embryonen (Kurosaka et al. 2004) zu erwarten gewesen wäre, dass die Intensität im TE in diesem Stadium schwächer ist. Es ist somit noch zu prüfen, ob der Abfall der EGFP-Fluoreszenz einem Abfall des endogenen OCT4-Proteins und/oder der OCT4-mRNA entspricht.

5.3 Die fetale Entwicklung von SCNT-Embryonen *in utero*

Die stabil unilokulär mit Oct4-EGFP transfizierten fetalen Fibroblasten sind nicht immortal, sondern unterliegen der Seneszenz und können nicht unbegrenzt durch *in vitro* Kultur vermehrt werden. Aus den transfizierten Ausgangszellen erzeugte SCNT-Feten - oder gesunde Oct4-EGFP-transgene Tiere - könnten jedoch nahezu unbegrenzt Zellen mit der identischen Integration des Reporter-genkonstruktes als Basis für eine Reihe experimenteller Ansätze liefern.

Zwölf SCNT-Blastozysten des stabil mit dem Oct4-EGFP-Reporter-genkonstrukt transfizierten Zellklons BFFGOF12 wurden auf vier Empfängertiere übertragen, um ihre weitere intrauterine Entwicklung zu untersuchen. An Tag 34 wurden drei lebende und nach makroskopischer und stereomikroskopischer Analyse normal entwickelte Feten gewonnen. Die Scheitel-Steiß-Länge entsprach mit 1,8 cm der normalen Größe nach einer *in vivo* Befruchtung an Tag 34 (Rüsse & Sinowatz 1991). Um die Stabilität der Oct4-EGFP-Integration nach SCNT und embryonaler Entwicklung zu untersuchen, wurden aus jedem der drei SCNT-Feten Fibroblasten isoliert, kultiviert und mittels PCR, Southern Blot und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung untersucht. Wie beim Ausgangszellklon BFFGOF12, wurde in beiden untersuchten fetalen Primärkulturen FeGOF451-1 und FeGOF454 eine unilokuläre Integration des Reporter-genkonstruktes bei normalem Karyotyp ($2n = 60, XX$) nachgewiesen. Die Fibroblasten zeigten keine EGFP-Fluoreszenz und damit eine Inaktivierung des Oct4-EGFP-Reporter-genkonstruktes entsprechend der normalen Inaktivierung des endogenen *OCT4*-Promotors in differenzierten Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Vorhaben auf diese Weise gesunde Tiere mit einer stabilen unilokulären Integration des Oct4-EGFP-Reporter-genkonstruktes zu erzeugen, realistisch ist.

5.4 Die Expression von Oct4-EGFP in SCNT-Embryonen aus Fibroblasten der zweiten Generation („second round“ SCNT)

Mit zwei der drei aus den SCNT-Feten etablierten Fibroblasten-Kulturen der zweiten Generation (FeGOF451-1 und FeGOF454) wurden erneut Kerntransfers durchgeführt. Wie in den SCNT-Embryonen vom transfizierten Ausgangszellklon BFFGOF12 wurde auch in den SCNT-Embryonen aus Fibroblasten der zweiten Generation das Reportergenkonstrukt GOF18- Δ PE-EGFP aktiviert, was an der EGFP-Fluoreszenz zu erkennen war.

Im Vergleich zum transfizierten Ausgangszellklon BFFGOF12 lieferte der Kerntransfer mit der aus dem SCNT-Fetus gewonnenen Fibroblasten FeGOF451-1 zwar eine niedrigere Furchungsrate, aber eine signifikant höhere Blastozystenrate an Tag 7. Die aus dem SCNT-Fetus gewonnene Linie FeGOF451-1 wurde nach relativ kurzer Kultivierung *in vitro* - in der 4. und 5. Passage – für den Kerntransfer eingesetzt. Die Zellen des transfizierten Ausgangszellklons BFFGOF12 wurden dagegen nach erheblich längerer Kultur - in der 9. – 11. *in vitro*-Passage – für den Kerntransfer verwendet. Die Ursache für die unterschiedlichen Blastozystenraten an Tag 7 könnte in der unterschiedlichen Zellkulturdauer und Passagenzahl *in vitro* und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Grad der Seneszenz der Spenderzellen liegen. Allerdings führten Studien zum Einfluss der Passagenzahl boviner Spenderzellen auf die Blastozystenrate nach Kerntransfer zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Wells et al. 1999; Kubota et al. 2000; Roh et al. 2000; Cho et al. 2004). Kubota et al. (2000) beobachteten eine bessere Entwicklung von SCNT-Embryonen aus lang *in vitro* kultivierten Spenderzellen als aus kurz *in vitro* kultivierten Spenderzellen. Wells et al. (1999), Hill et al. (2001) und Cho et al. (2004) konnten dagegen keinen Effekt der Passagenzahl *in vitro* nachweisen. Roh et al. (2000) schließlich, die ebenfalls Kerntransfers von fetalen Fibroblasten durchführten, sahen - wie in der vorliegenden Arbeit - höhere Blastozystenraten bei Einsatz früher Passagen.

Somit stellen die Fibroblasten, die eine Inaktivierung des Reportergenkonstruktes - analog zur Inaktivierung des endogenen *OCT4*-Gens in differenzierten Zellen - und eine Aktivierung von Oct4-EGFP nach SCNT wie beim Ausgangszellklon zeigten, eine wichtige Basis für zahlreiche weiterführende Untersuchungen zu Mechanismen der Reprogrammierung nach Kerntransfer dar.

5.5 Embryonaler Kerntransfer von Blastomeren (BNT) aus Tag 5 Morulae nach Kerntransfer mit BFFGOF12 und FeGOF451-1

Bevor es gelang, Klontiere aus somatischen Zellen zu erzeugen, wurden embryonale Zellen für den Kerntransfer verwendet. Obwohl das „large offspring syndrome“ (LOS) sowohl bei IVF- (Behboodi et al. 1995; Schmidt et al. 1996), als auch bei NT-Embryonen aus embryonalen Zellen (ENT; Willadsen et al. 1991; Garry et al. 1996) auftritt, scheint die Rate schwerwiegender Störungen nach SCNT (Cibelli et al. 1998; Kato et al. 1998; Wells et al. 1999) besonders hoch zu sein. Allerdings wurde beim direkten Vergleich von BNT und SCNT beobachtet, dass die Reklonierung von Blastomeren keine verbesserte, sondern eine verschlechterte Entwicklungsfähigkeit der Embryonen zur Folge hatte (Wells et al. 1999). Daraus ergibt sich die wichtige Frage, wie sich eine Reklonierung, d. h. der Transfer einer Zelle, die bereits den reprogrammierenden Faktoren des Ooplasmas ausgesetzt war, auf die Aktivität des *Oct4*-Promotors und die embryonale Entwicklung auswirkt.

Der Blastomeren-Kerntransfer (BNT) lieferte sowohl nach SCNT des transfizierten Ausgangszellklons BFFGOF12, als auch nach SCNT der Zelllinie FeGOF451-1 aus dem transgenen Fetus EGFP-exprimierende Blastozysten. Der BNT aus SCNT-Morulae der aus dem transgenen Fetus gewonnenen Fibroblasten FeGOF451-1 lieferte wie die SCNT-Experimente (siehe Abschnitt 5.4) eine deutlich höhere Blastozystenrate als BNT aus SCNT-Morulae des transfizierten Ausgangszellklons BFFGOF12 (28 % vs. 14 %). Die Ursache könnte ebenfalls in der unterschiedlichen Zellkulturdauer und Passagenzahl *in vitro* und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Grad der Seneszenz der Ausgangsspenderzellen liegen (siehe Abschnitt 5.4).

5.6 Offene Fragen

Folgende Fragen konnten im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt werden:

- a) Bildet die EGFP-Expression tatsächlich die Aktivität des Promotors des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP ab?

Es muss beachtet werden, dass die EGFP-Fluoreszenz von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, wie z. B. von der Translationseffizienz und vom Proteinabbau.

- b) Inwieweit entspricht die Aktivität des Promotors von GOF18- Δ PE-EGFP der Aktivität des endogenen *OCT4*-Promotors?

Eine Parallelität der Transkription von Reportergenkonstrukt und endogenem *OCT4* kann durch die Untersuchung mittels RT-qPCR an einzelnen SCNT-Embryonen, sowie mittels zweifarben RNA *in situ* Hybridisierung (endogene *OCT4*-mRNA und Reporter-gen-mRNA) überprüft werden.

- c) Welchen Einfluss üben Integrationsort und damit die chromosomale Umgebung auf die Transkription des Reporter-Promotors aus?

Die Struktur der chromosomalen Umgebung kann sehr vielfältig sein und unterschiedliche Einflüsse ausüben. Beispielsweise spielen Gendichte, Repeats, Locus-Kontrollregionen und die lokale Chromatinstruktur - und Hetero- und Euchromatin - eine wichtige Rolle. In der Umgebung des Reporter-genkonstruktes könnten zufällige epigenetische Modifikationen auftreten, die nur die Steuerung des Promotors des Reportgenkonstruktes beeinflussen - vollkommen unabgänglich von der Reprogrammierung der beiden endogenen *OCT4*-Allele.

5.7 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit ist ein erster Schritt hin auf ein weiter gestecktes Ziel, nämlich die Entwicklung eines Modellsystems zur Entschlüsselung grundlegender Mechanismen der Genomreprogrammierung beim Rind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bovine fetale Fibroblasten mit unauffälligem weiblichem Karyotyp und einer stabilen unilokulären Integration eines Oct4-EGFP-Reporter-genkonstruktes (GOF18- Δ PE-EGFP) hergestellt. Dieses Genkonstrukt wurde 4 Tage nach SCNT in den bovinen Embryonen regelhaft aktiviert und EGFP war in praktisch allen Embryonen mit 17 - 32 Zellkernen nachweisbar. Die Höhe der EGFP-Fluoreszenz variierte stark von Embryo zu Embryo, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Reprogrammierung oder Regulation. Die deutlichen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Anteil abnormer Zellkerne und der Höhe der EGFP-Fluoreszenz in den SCNT-Embryonen suggeriert, dass die EGFP-Fluoreszenz des lebenden Embryos als Indikator für seine Entwicklungspotenz dienen könnte. Nach der Übertragung EGFP-exprimierender SCNT-Embryonen auf Empfängertiere wurden an Tag 34 nach Kerntransfer (makroskopisch und stereomikroskopisch) normal erscheinende Feten gewonnen. In daraus isolierten Fibroblasten wurde

wiederum die stabile unilokuläre Integration bei normalem weiblichen Karyotyp, sowie die Inaktivierung des Reporter-genkonstruktes analog zum endogenen *OCT4*-Gen nachgewiesen. Der SCNT mit der zweiten Generation Oct4-EGFP-transgener Fibroblasten ("second round" SCNT) führte, wie der SCNT mit dem Ausgangszellklon BFFGOF12, zu EGFP-exprimierenden Embryonen.

Abbildung 5.1 veranschaulicht das breite Spektrum vielversprechender experimenteller Ansätze aus der stabilen Transfektion boviner fetaler Fibroblasten, mit dem Oct4-EGFP-Reporter-genkonstrukt.

Das stabil unilokulär integrierte Oct4-EGFP-Reporter-genkonstrukt könnte in lebenden Zellen in der Zellkultur als Indikator für die Initiation der Reprogrammierung dienen und so entscheidend mithelfen, an unterschiedlichen somatischen fetalen und adulten Zelltypen die Schlüsselmoleküle und wesentliche Mechanismen der epigenetischen Reprogrammierung zu identifizieren.

Die Lokalisation des Oct4-EGFP-Reporter-genkonstruktes und der beiden endogenen *OCT4*-Loci im Zellkern vor und nach ihrer Aktivierung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie könnte wichtige Einblicke in wesentliche Prinzipien der dreidimensionalen funktionalen Genomorganisation im Zellkern bieten.

Aus Oct4-EGFP-transgenen Embryonen könnten über die EGFP-Fluoreszenz lebende embryonale Stammzellen isoliert werden als Basis für die Entwicklung der Stammzelltherapie am Modelltier Rind.

Die normale fetale Entwicklung bis Tag 34 lässt erwarten, dass es realistisch ist, auf diese Weise gesunde Tiere als Träger des Reporter-genkonstruktes zu erzeugen. Gesunde Trägartiere des Oct4-EGFP-Reporter-genkonstruktes bieten ein vielversprechendes Modellsystem, um IVF, SCNT, Embryotransfer und die Entwicklung transgener Tiere voranzutreiben. Oct4-EGFP-transgene Feten und Nachkommen könnten als Spender einer Vielzahl unterschiedlicher somatischer Zelltypen dienen z. B. für Untersuchungen zur Reprogrammierung unterschiedlicher Zelltypen nach SCNT, aber auch für gezielte zusätzliche Genmanipulationen für Zellkulturmodelle oder nachfolgenden SCNT. Darüber hinaus könnten von Oct4-EGFP-transgenen Tieren Spermien oder Eizellen für IVF gewonnen werden. Die Höhe der EGFP-Expression stellt möglicherweise einen wichtigen nicht-invasiven diagnostischen Parameter für die Entwicklungspotenz und die Selektion von SCNT- oder IVF-Embryonen für den Embryotransfer dar.

Es ist möglich, dass aus Oct4-EGFP-transgenen Feten über die EGFP-Fluoreszenz lebende primordiale Keimzellen identifiziert und isoliert werden können. Dies wäre ein wichtiger Ausgangspunkt für die Erforschung der Entwicklung von Gonaden und Keimzellen sowie der Reprogrammierung des Genoms in der Keimbahn beim Rind.

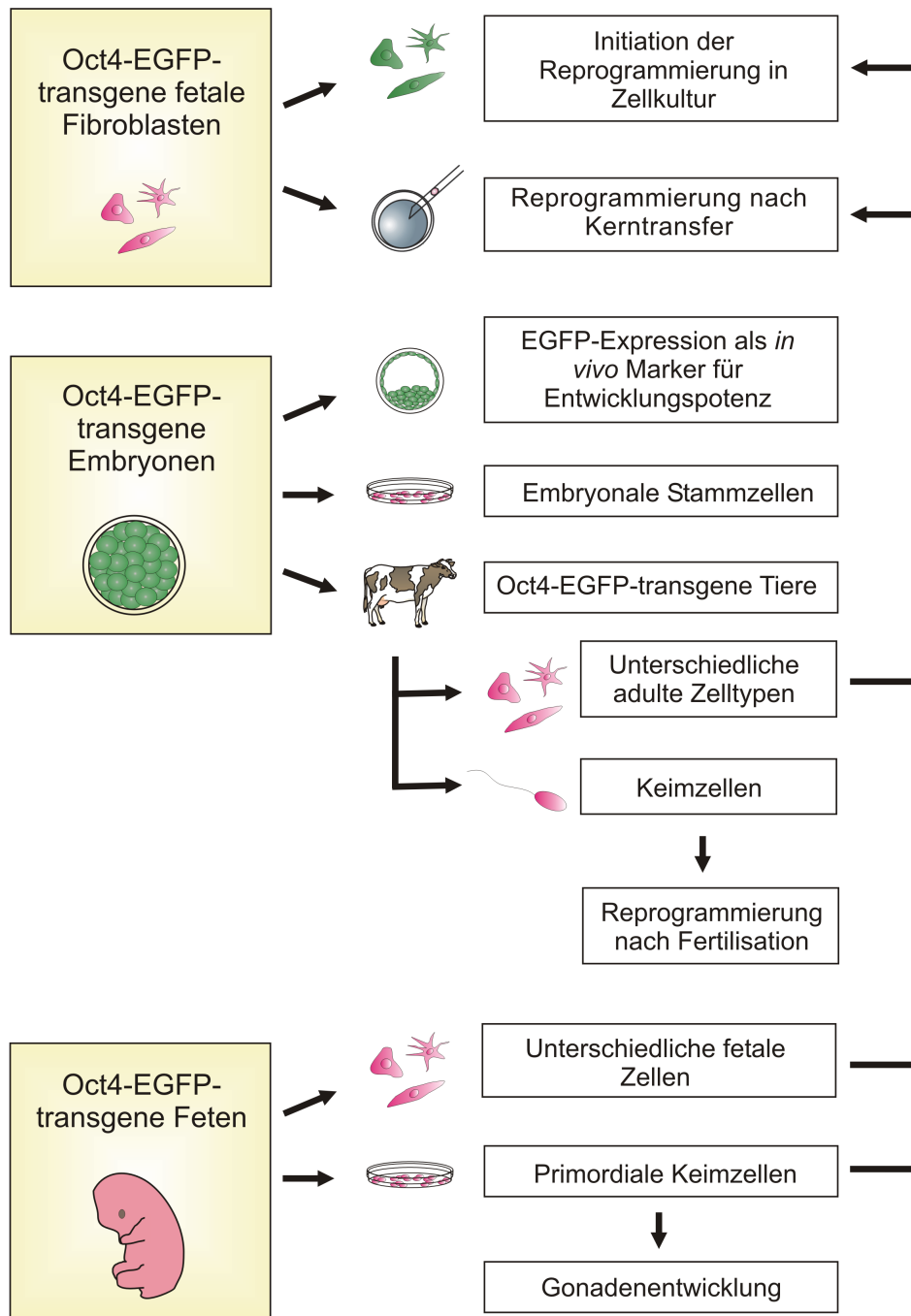


Abbildung 5.1: Perspektiven des in dieser Arbeit erzeugten Modellsystems.

Auf der linken Seite sind Oct4-EGFP-transgene Fibroblasten, Embryonen und Feten abgebildet, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden. Auf der rechten Seite sind weitere mögliche Untersuchungsansätze dargestellt. Rosa markierte Zellen: Enthalten das Reporter-genkonstrukt; grün markierte Zellen: exprimieren das Reporter-genkonstrukt.

6 Zusammenfassung

Die normale Entwicklung von Embryonen nach somatischem Zellkerntransfer („somatic cell nuclear transfer“, SCNT) hängt unter anderem von der erfolgreichen Reprogrammierung und Aktivierung von Schlüsselgenen ab. Ein Beispiel ist das Gen für den Transkriptionsfaktor Oct4, der im frühen Embryo nachweisbar und als Marker für pluripotente Zellen gilt. Die in klonierten Mausembryonen häufig beobachtete abnormale Expression von *Oct4* wird als eine mögliche Ursache für die hohen Verluste und schweren Fehlentwicklungen nach Kerntransfer diskutiert. Beim Rind liegt im Vergleich zur Maus und anderen Spezies die Erfolgsrate am höchsten. Daher ist die Untersuchung der Reprogrammierung von *OCT4* nach SCNT in der frühen Embryogenese beim Rind von besonderem Interesse. Um Fragen der epigenetischen Reprogrammierung des Rindergenoms und der Rolle von *OCT4* nach SCNT nachzugehen, wurden bovine fetale Fibroblasten stabil mit einem Oct4-EGFP-Reportergenkonstrukt transfiziert. In den unilokulär stabil transfizierten Zellen mit unauffälligem weiblichen Karyotyp war in Analogie zur Inaktivität des endogenen *OCT4*-Gens in differenzierten Zellklonen keine EGFP-Fluoreszenz nachweisbar. Das Anschalten der Oct4-EGFP-Expression nach SCNT entsprach weitgehend der nach *in vitro* Fertilisation beobachteten Aktivierung des endogenen *OCT4*-Gens. In SCNT-Embryonen mit weniger als neun Zellkernen wurde keine EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen. In allen Embryonen mit mindestens 17 Zellkernen war das Oct4-EGFP-Reportergenkonstrukt aktiv, was darauf hindeutet, dass Blastomeren nach der vierten Zellteilung den *Oct4*-Promotor aktivierten. Mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie wurde an zentralen optischen Schnitten die Intensität der EGFP-Fluoreszenz jedes Embryos gemessen. Im Vergleich mit Tag 4 SCNT-Embryonen war die EGFP-Fluoreszenz in Tag 6 Embryonen deutlich stärker mit erheblichen Unterschieden in der Expressionshöhe zwischen einzelnen Embryonen. Dabei zeigten Embryonen mit einer niedrigeren EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zu Embryonen mit stärkerer EGFP-Fluoreszenz einen erheblich höheren Anteil an Zellkernuntergängen (kondensierte und fragmentierte Zellkerne). 34 Tage nach dem Transfer von EGFP-exprimierenden Embryonen auf Empfängertiere wurden drei lebende und morphologisch unauffällige Feten gewonnen. In Fibroblasten, die aus diesen Feten isoliert wurden, war das Reportergenkonstrukt, analog zur normalen Inaktivierung des endogenen *OCT4*-Gens in differenzierten Zellen, inaktiviert. In

SCNT-Embryonen aus den Oct4-EGFP-transgenen Fibroblasten dieser zweiten Generation („second round“ SCNT) wurde das Reportergenkonstrukt erneut regelmäßig aktiviert wie in den SCNT-Embryonen vom Ausgangszellklon („first round“ SCNT). Die Herstellung stabil transfizierter boviner fetaler Fibroblasten mit einer unilokulären Integration des Oct4-EGFP-Reportergenkonstruktes stellt eine wichtige Basis für ein breites Spektrum experimenteller Ansätze zur Aufklärung grundlegender Mechanismen nach Kerntransfer beim Rind dar.

7 Summary

Analysis of epigenetic reprogramming after somatic cell nuclear transfer in cattle using an Oct4-EGFP reporter gene construct

Normal development of embryos after SCNT (somatic cell nuclear transfer) depends amongst other factors on the successful reprogramming and activation of key genes. An example is the gene encoding the transcription factor Oct4, which is present in the early embryo and considered to be a marker for pluripotency. The frequently observed abnormal Oct4 expression pattern in cloned mouse embryos is discussed to be one of the causes for the high losses and serious abnormal development after nuclear transfer. Compared to mouse and other species the highest success rate after SCNT is observed in cattle. Therefore the investigation of the reprogramming and activation of *OCT4* in early bovine embryogenesis after SCNT was of particular interest. To answer questions about the epigenetic reprogramming of the bovine genome and the role of OCT4 after SCNT, bovine fetal fibroblasts were stably transfected with an Oct4-EGFP reporter gene construct. In the stably transfected cell clones with a single locus integration and a normal female karyotype no EGFP fluorescence detectable, which is in line with the inactivity of the endogenous *OCT4* gene in differentiated cells. The activation of the Oct4-EGFP expression after SCNT widely mimicked the activation of the endogenous *OCT4* gene after *in vitro* fertilisation. SCNT embryos containing less than nine nuclei showed no EGFP expression. In all embryos with 17 or more nuclei the Oct4-EGFP reporter gene construct was active indicating that blastomeres activated the *Oct4* promoter after the fourth cell division. Using confocal laser scanning microscopy the intensity of the EGFP fluorescence of each single embryo was measured in central optical sections. In comparison with Day 4 embryos EGFP fluorescence was markedly stronger in Day 6 embryos with considerable variation in expression levels between individual embryos. Embryos with a lower EGFP fluorescence exhibited a remarkably higher proportion of nuclear abnormalities (condensed and fragmented nuclei) as compared to embryos with stronger EGFP fluorescence. 34 days after transfer of EGFP expressing embryos to recipients three living and morphologically normal fetuses were recovered. In fibroblasts isolated from these fetuses the reporter gene construct

was inactive, corresponding to the inactivation of the endogenous *OCT4* gene in differentiated cells. In SCNT embryos generated from this second generation of Oct4-EGFP transgenic fibroblasts (second round SCNT) the reporter gene construct was regularly activated as in SCNT embryos from the primary cell clone (first round SCNT). The production of stably transfected bovine fetal fibroblasts with one single locus integration of Oct4-EGFP is an important basis for a wide spectrum of experimental approaches for enlightenment of fundamental mechanisms after nuclear transfer in cattle.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Experimenteller Ansatz.....	3
Abbildung 2.1:	Genomische Struktur des Oct4-Gens.....	12
Abbildung 2.2:	Oct4-Expression im Mausembryo von der Morula bis zur Gastrula.....	14
Abbildung 2.3:	Oct4-Proteins im frühen Maus- und Rinderembryo.....	16
Abbildung 2.4:	Die so genannte „β-can“-Struktur von GFP.....	21
Abbildung 2.5:	Die Absorptions- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe.....	23
Abbildung 2.6:	Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops.....	25
Abbildung 2.7:	Bestandteile eines Laser Scanning Mikroskops von Zeiss.....	27
Abbildung 3.1:	Das 21,2 kb große Reporterengenkonstrukt GOF18-ΔPE-EGFP.....	39
Abbildung 3.2:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern Blots.....	48
Abbildung 3.3:	Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität mit ImageJ...	61
Abbildung 3.4:	Zellkernzählung.....	62
Abbildung 4.1:	Identifizierung GOF18-ΔPE-EGFP-transgener Zellklone.....	64
Abbildung 4.2:	Überprüfung von GOF18-ΔPE-EGFP-transgenen Zellklonen auf EGFP-Fluoreszenz.....	65
Abbildung 4.3:	Grün fluoreszierende Embryonen aus SCNT-Vorversuchen.....	66
Abbildung 4.4:	Karyotyp-Untersuchung GOF18-ΔPE-EGFP-transfizierter Zellen am Beispiel von Zellklon BFFGOF3.....	68
Abbildung 4.5:	Nachweis der unilokulären Integration des Oct4- Reporterengenkonstruktes mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	68
Abbildung 4.6:	Überprüfung des Emissionsspektrums an einem Tag 6 SCNT- Embryo.....	70
Abbildung 4.7:	Untersuchung der EGFP-Fluoreszenz in Tag 4, 6 und 8 Embryonen mittels CLSM.....	72
Abbildung 4.8:	Beziehung zwischen EGFP-Expression und Anzahl der Zellkerne in Tag 4 SCNT-Embryonen.....	74
Abbildung 4.9:	Quantitative Auswertung der EGFP-Fluoreszenz, Beurteilung der Zellkernzahl und -morphologie von Tag 6 SCNT-Embryonen.	76

Abbildung 4.10: 34 Tage alter Fetus (451-1) nach SCNT von Zellklon BFFGOF12.....	78
Abbildung 4.11: Nachweis des Reportergenkonstruktes GOF18- Δ PE-EGFP in Fibroblasten der zweiten Generation isoliert aus drei 34 Tage alten SCNT-Feten von BFFGOF12.	79
Abbildung 4.12: Aktivierung von GOF18- Δ PE-EGFP nach einer SCNT mit FeGOF451-1 („second round“).	79
Abbildung 4.13: Reklonierung.	81
Abbildung 5.1: Perspektiven des in dieser Arbeit erzeugten Modellsystems.....	95

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Erfolgreiche Kerntransfers mit somatischen Zellen bei verschiedenen Spezies.....	6
Tabelle 3.1:	Waschlösung: 2x SSC/0,1 % SDS	34
Tabelle 3.2:	Waschlösung: 1x SSC/0,1 % SDS	34
Tabelle 3.3:	Mastermix	44
Tabelle 3.4:	Reaktionsansatz	45
Tabelle 3.5:	Reaktionsbedingungen	46
Tabelle 3.6:	Reaktionsansatz	48
Tabelle 3.7:	DNA-Fragmente der transgenspezifischen Sonde	52
Tabelle 3.8:	Primerkombinationen Multiplex-PCRs	53
Tabelle 3.9:	Reaktionsansatz für die Herstellung der Matrize für die Kombination 2 für jedes einzelne Primerpaar (Matrizen-PCR)	53
Tabelle 3.10:	Reaktionsansatz für Markierungs-PCR.....	54
Tabelle 3.11:	Reaktionsbedingungen für die Matrizen- und Markierungs-PCR... ..	54
Tabelle 3.12:	Reaktionsansatz für Markierungs-PCR.....	55
Tabelle 3.13:	Reaktionsansatz für die Matrizen-PCR.....	56
Tabelle 3.14:	Reaktionsansatz für Markierungs-PCR.....	56
Tabelle 3.15:	Reaktionsbedingungen für Matrizen- und Markierungs-PCR.....	57
Tabelle 3.16:	Anregungs- und Emissionswellenlängen.....	58
Tabelle 4.1:	Ergebnisse der Karyotyp-Analyse von GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Zellklonen	67
Tabelle 4.2:	Auswertung der Tag 4 Embryonen: Anzahl von Zellkernen und Anteil der EGFP-exprimierenden Embryonen.....	71
Tabelle 4.3:	Anzahl der Zellkerne und EGFP-Fluoreszenz in Tag 6 SCNT-Embryonen von BFFGO12	73
Tabelle 4.4:	Anteil abnormer Zellkerne in Embryonen mit hoher (grau unterlegt) und geringerer EGFP-Fluoreszenz.....	75
Tabelle 4.5:	Vergleich der Effizienz nach Kerntransfer mit Zellen aus einem GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Fetus (FeGOF451-1) und dem primären Zellklon (BFFGOF12)	80

Tabelle 4.6: Entwicklung von BNT-Embryonen nach der Reklonierung mit
Tag 5 Morulae in einem parallelen Experiment 80

10 Abkürzungsverzeichnis

293T	humane embryonale Nierenzelllinie
³² P	Phosphor-32
°C	Grad Celcius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar (μmol/l)
Abtl.	Abteilung
AGE	„advanced glycation end-product“
Ala	Alanin
Arg	Arginin
as	„antisense“
bidest.	bidestillata
bp	Basenpaare (“base pairs”)
BP	Bandpass
BFF	bovine fetale Fibroblasten
BFFGOF	GOF18-ΔPE-EGFP-transgene BFF
BFP	blau fluoreszierendes Protein („blue fluorescent protein“)
BNT	Kerntransfer mit Blastomeren („blastomere nuclear transfer“)
Ca ²⁺	Calcium
CCD	„charge-coupled device“
Cdx2	„caudal-related homeobox 2“
CFP	cyan fluoreszierendes Protein („cyan fluorescent protein“)
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop („confocal laser scanning microscope“)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotide
cpm	Impulse pro Minute („counts per minute“)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CR	konservierte Region („conserved region“)
D6Z1	Locus auf Chromosom 6
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DE	distaler Enhancer
dEGFP	destabilisiertes EGFP
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	„down“
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonucleotide-Triphosphate
DsRed	Discosoma red
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridine-5'-Triphosphate
EB	Elutionspuffer („elution buffer“)
EBFP	„enhanced“ BFP
EC-Zellen	embryonale Karzinomzellen („embryonic carcinoma cells“)
ECFP	„enhanced“CFP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG-Zellen	embryonale Keimzellen („embryonic germ cells“)
EGFP	„enhanced“ GFP
EF	Emissionsfilter
ES-Zellen	embryonale Stammzellen („embryonic stem cells“)
ET	Embryotransfer
et al.	et alii
Ets2	„erythroblastosis retrovirus oncogene homologue 2“
EYFP	„enhanced“ YFP
Fbx15	F-box Protein 15
FeGOF	BFF aus GOF18- Δ PE-EGFP-transgenen Feten
Fgf4	„fibroblast growth factor 4“
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung

FKS	fetales Kälberserum
FLP	Rekombinase benannt nach „Flippase“-Aktivität von Hefen
FRT	FLP Erkennungsstelle („FLP recognition target“)
FT	Farbteiler
fw	„forward“ („sense“)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung: 1 <i>g</i> = 9,81 m/s ² ; RCF („relative centrifugal force“) (= 1,119 x 10 ⁻⁵ x rpm ² x r)
G418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (“green fluorescent protein”)
GOF	genomisches Oct4-Fragment (“genomic Oct4 fragment”)
h	Stunde
HBO	Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HFT	Hauptfarbteiler
HMG	„high mobility group“
H ₂ O	Wasser
HRE	hormone response element
HWZ	Halbwertszeit
ICM	innere Zellmasse („inner cell mass“)
IFNT	Interferon Tau
ISH	in situ Hybridisierung
IVF	in vitro fertilisiert
IVP	in vitro produziert
J	Joule
kb	kilo Basenpaare („kilo base pairs“)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kg	Kilogramm
lacZ	β-Galactosidase
l	Liter
Leu	Leucin
LP	Langpass

LSM	Laser Scanning Mikroskop
Lys	Lysin
M	Molar (mol/l)
MET	„maternal-to-embryonic transition“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
mm	Millimeter
MODC	Ornithin Decarboxylase der Maus („murine ornithin decarboxylase“)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Normal
NA	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid(-phosphat)
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NCCIT	undifferenzierte humane Teratokarzinomzelllinie
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NIH3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie
NFT	Nebenfarbteiler
nm	Nanometer
NT	Kerntransfer („nuclear transfer“)
NTC	PCR-Reaktionsansatz ohne DNA-Matrize („non template control“)
Oct	octamer
OD	optische Dichte
OPN	Osteopontin
OT	Objektträger

pBKS	Bluescript KS Vektor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc	post coitum
PCR	Polmerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor („platelet-derived growth factor“)
PE	proximaler Enhancer
PFA	Paraformaldehyd
PGC	primordiale Keimzellen („primordial germ cells“)
PGK	Phosphoglyceratkinase
<i>P</i>	P-Wert; Überschreitungswahrscheinlichkeit
pH	potentia hydrogenii
Phe	Phenylalanin
Pit-1	„pituitary-specific homeodomain factor 1“
PMT	Photomultiplier Tube
POU	Pit-Oct-Unc
PVP	Polyvinylpyrrolidon
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
rev	„reverse“ („antisense“)
Rex1	Synonym für Zfp42
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
SA	Standardabweichung
SCNT	somatischer Kerntransfer („somatic cell nuclear transfer“)
SDS	Natriumlaurylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
se	„sense“
sec	Sekunde
Ser	Serin
Skp1	„s-phase kinase-associated protein 1“
Sox2	SRY-related HMG-box protein-2
SRY	geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms; („sex determining region Y“)
SSC	„standard sodium citrate“
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
Ssp1	„sentrin specific protease 6“

TAMRA	6-Carboxyl-Tetramethyl-Rhodamin
T-DMRs	gewebeabhängig methylierte Regionen („tissue dependent methylated regions“)
T _m	Schmelztemperatur
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TS-Zellen	trophektodermale Stammzellen („trophectoderm stem cells“)
U	Einheit („unit“)
Utf1	„undifferentiated embryonic cell transcription factor 1“
Unc-86	„uncoordinated protein 86“
UV	ultraviolett
vs.	versus
Wt/wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“)
Zfp42	„zinc finger protein 42“

11 Literaturverzeichnis

Abranches, R., Santos, A. P., Wegel, E., Williams, S., Castilho, A., Christou, P., Shaw, P. & Stoger, E. 2000. Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. *Plant J.* 24: 713-723.

Akagi, S., Adachi, N., Matsukawa, K., Kubo, M. & Takahashi, S. 2003. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. *Mol.Reprod.Dev.* 66: 264-272.

Alexander, B., Coppola, G., Di Berardino, D., Rho, G. J., St John, E., Betts, D. H. & King, W. A. 2006. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 73: 20-30.

Amsterdam, A., Lin, S. & Hopkins, N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev.Biol.* 171: 123-129.

Anderson, R., Copeland, T. K., Schöler, H., Heasman, J. & Wylie, C. 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech.Dev.* 91: 61-68.

Angres, B. & Green, G. 1996. Dual Labeling Using ECFP & EYFP in Standard Fluorescence Microscopy. *CLONTECHniques* April.

Antequera, A., Boyes, J. & Bird, A. 1990. High Levels of the novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62: 503-514.

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17: 126-140.

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R.

- A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. & Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat.Biotechnol.* 17: 456-461.
- Barnes, F. L., Collas, P., Powell, R., King, W. A., Westhusin, M. & Shepherd, D. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 36: 33-41.
- Barnes, F. L. & First, N. L. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 29: 117-123.
- Behboodi, E., Anderson, G. B., BonDurant, R. H., Kreuzscher, B. R., Medrano, J. F. & Murray, J. D. 1995. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44: 227-232.
- Bell, A. C. & Felsenfeld, G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405: 482-485.
- Ben Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J. & Bergman, Y. 1998. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol.Cell Biol.* 18: 1866-1878.
- Bhuiyan, M. M., Cho, J., Jang, G., Park, E., Kang, S., Lee, B. & Hwang, W. 2004. Effect of transfection and passage number of ear fibroblasts on in vitro development of bovine transgenic nuclear transfer embryos. *J.Vet.Med.Sci.* 66: 257-261.
- Billinton, N. & Knight, A. W. 2001. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal.Biochem.* 291: 175-197.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.
- Bird, A. P. 1995. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* 11: 94-100.

Bodner, M., Castrillo, J. L., Theill, L. E., Deerinck, T., Ellisman, M. & Karin, M. 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55: 505-518.

Boiani, M., Eckardt, S., Leu, N. A., Schöler, H. R. & McLaughlin, K. J. 2003. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 22: 5304-5312.

Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H. R. & McLaughlin, K. J. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16: 1209-1219.

Boiani, M., Gentile, L., Gambles, V. V., Cavaleri, F., Redi, C. A. & Schöler, H. R. 2005. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* 23: 1089-1104.

Boiani, M. & Schöler, H. R. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6: 872-884.

Bokman, S. H. & Ward, W. W. 1981. Renaturation of Aequorea green-fluorescent protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 101: 1372-1380.

Booth, P. J., Viuff, D., Tan, S., Holm, P., Greve, T. & Callesen, H. 2003. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol.Reprod.* 68: 922-928.

Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D. L., Yanagimachi, R., Page, D. C. & Jaenisch, R. 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130: 1673-1680.

Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M. K., Vriend, G. & Schöler, H. R. 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12: 2073-2090.

- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J. P. & Viegas-Pequignot, E. 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr.Biol.* 11: 1542-1546.
- Brand, A. 1995. GFP in Drosophila. *Trends Genet.* 11: 324-325.
- Brem, G., Brenig, B., Goodman, H. M., Selden, R. C., Graf, F., Kruff, B., Springmann, K., Hondele, J., Meyer, J., Winnacker, E. L. & Kräußlich, H. 1985. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthyg.* 20: 251-252.
- Brockhaus 2006. Der Brockhaus in Text und Bild. Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG.
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P. & Laible, G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat.Biotechnol.* 21: 157-162.
- Bruggerhoff, K., Zakhartchenko, V., Wenigerkind, H., Reichenbach, H. D., Prella, K., Schernthaner, W., Alberio, R., Kuchenhoff, H., Stojkovic, M., Brem, G., Hiendleder, S. & Wolf, E. 2002. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol.Reprod.* 66: 367-373.
- Bureau, W. S., Bordignon, V., Leveillee, C., Smith, L. C. & King, W. A. 2003. Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells. *Cloning Stem Cells* 5: 123-132.
- Byrne, A. T., Southgate, J., Brison, D. R. & Leese, H. J. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J.Reprod.Fertil.* 117: 97-105.
- Campbell, K. H., Loi, P., Otaegui, P. J. & Wilmut, I. 1996a. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev.Reprod.* 1: 40-46.
- Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A. & Wilmut, I. 1996b. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Campbell, K. H., Ritchie, W. A. & Wilmut, I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos:

implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol.Reprod.* 49: 933-942.

Cauffman, G., Van, d., V, Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2005. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol.Hum.Reprod.* 11: 173-181.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

Chambers, I. & Smith, A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23: 7150-7160.

Chan, A. W., Kukulj, G., Skalka, A. M. & Bremel, R. D. 1999. Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol.Reprod.Dev.* 52: 406-413.

Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard, Y., Vignon, X. & Renard, J. P. 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol.Reprod.* 66: 1596-1603.

Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. & Renard, J. P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat.Biotechnol.* 20: 366-369.

Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., Li, P., Ang, Y. S., Lim, B., Robson, P. & Ng, H. H. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol.Cell Biol.* 25: 6031-6046.

Cho, J., Bhuiyan, M. M., Shin, S., Park, E., Jang, G., Kang, S., Lee, B. & Hwang, W. 2004. Development potential of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos according to various factors of donor cell. *J.Vet.Med.Sci.* 66: 1567-1573.

Cho, J. K., Lee, B. C., Park, J. I., Lim, J. M., Shin, S. J., Kim, K. Y., Lee, B. D. & Hwang, W. S. 2002. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. *Theriogenology* 57: 1819-1828.

Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. & Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.

Clerc, R. G., Corcoran, L. M., LeBowitz, J. H., Baltimore, D. & Sharp, P. A. 1988. The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains. *Genes Dev.* 2: 1570-1581.

Clontech . Living Colors® GFP. 2001.

Ref Type: Catalog

Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218.

Conchello, J. A. & Lichtman, J. W. 2005. Optical sectioning microscopy. *Nat.Methods* 2: 920-931.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.

Cribiu, E. P., Di Berardino, D., Di Meo, G. P., Eggen, A., Gallagher, D. S., Gustavsson, I., Hayes, H., Iannuzzi, L., Popescu, C. P., Rubes, J., Schmutz, S., Stranzinger, G., Vaiman, A. & Womack, J. 2001. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000). *Cytogenet.Cell Genet.* 92: 283-299.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem.Sci.* 20: 448-455.

Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I. A. & Ayares, D. L. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat.Biotechnol.* 20: 251-255.

Daniels, R., Hall, V. & Trounson, A. O. 2000. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol.Reprod.* 63: 1034-1040.

Daniels, R., Hall, V. J., French, A. J., Korfiatis, N. A. & Trounson, A. O. 2001. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol.Reprod.Dev.* 60: 281-288.

de Sousa, P. A., King, T., Harkness, L., Young, L. E., Walker, S. K. & Wilmut, I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol.Reprod.* 65: 23-30.

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

Degrelle, S. A., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., Renard, J. P. & Hue, I. 2005. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev.Biol.* 288: 448-460.

Delagrave, S., Hawtin, R. E., Silva, C. M., Yang, M. M. & Youvan, D. C. 1995. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology (N.Y.)* 13: 151-154.

Denhardt, D. T. & Guo, X. 1993. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 7: 1475-1482.

Do, J. T. & Schöler, H. R. 2004. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 22: 941-949.

Du, Z., Cong, H. & Yao, Z. 2001. Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 282: 701-706.

Eckardt, S., Leu, N. A., Kurosaka, S. & McLaughlin, K. J. 2005. Differential reprogramming of somatic cell nuclei after transfer into mouse cleavage stage blastomeres. *Reproduction* 129: 547-556.

Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W. M., III, Yanagimachi, R. & Jaenisch, R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98: 6209-6214.

Eggan, K., Baldwin, K., Tackett, M., Osborne, J., Gogos, J., Chess, A., Axel, R. & Jaenisch, R. 2004. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428: 44-49.

Ezashi, T., Ghosh, D. & Roberts, R. M. 2001. Repression of Ets-2-induced transactivation of the tau interferon promoter by Oct-4. *Mol.Cell Biol.* 21: 7883-7891.

Fahrudin, M., Otoi, T., Karja, N. W., Mori, M., Murakami, M. & Suzuki, T. 2002. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124: 813-819.

Farin, P. W. & Farin, C. E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol.Reprod.* 52: 676-682.

Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M. & Goldfarb, M. 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267: 246-249.

Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M. A., Rodriguez, D. F., Pintado, B. & Gutierrez-Adan, A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 5880-5885.

Finney, M. & Ruvkun, G. 1990. The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*. *Cell* 63: 895-905.

Fitzgerald, P. H., Pickering, A. F., Mercer, J. M. & Miethke, P. M. 1975. Premature centromere division: a mechanism of non-disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man. *Ann.Hum.Genet.* 38: 417-428.

Fukasawa, K. 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.* 230: 6-19.

Funahashi, H., Ideta, A., Konishi, M., Urakawa, M., Uruno, K., Aoyagi, Y., Okabe, M. & Niwa, K. 2001. Nuclear transfer of blastomeres expressing EGFP-reporter gene may improve the efficiency of transgenic cattle. *Cloning Stem Cells* 3: 183-190.

Galli, C., Duchi, R., Moor, R. M. & Lazzari, G. 1999. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1: 161-170.

Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. & Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424: 635.

Galli, C., Lagutina, I., Vassiliev, I., Duchi, R. & Lazzari, G. 2002. Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells* 4: 189-196.

Gao, S., McGarry, M., Ferrier, T., Pallante, B., Priddle, H., Gasparrini, B., Fletcher, J., Harkness, L., De Sousa, P., McWhir, J. & Wilmut, I. 2003. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. *Biol.Reprod.* 68: 595-603.

Garry, F. B., Adams, R. & McCann, J. P. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45: 141-152.

Gerrard, L., Zhao, D., Clark, A. J. & Cui, W. 2005. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells* 23: 124-133.

Gibbons, J., Arat, S., Rzucidlo, J., Miyoshi, K., Waltenburg, R., Respass, D., Venable, A. & Stice, S. 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol.Reprod.* 66: 895-900.

Gidekel, S. & Bergman, Y. 2002. A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *J.Biol.Chem.* 277: 34521-34530.

Gjorret, J. O., Knijn, H. M., Dieleman, S. J., Avery, B., Larsson, L. I. & Maddox-Hyttel, P. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol.Reprod.* 69: 1193-1200.

- Gruenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H. & Razin, A. 1981. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* 124: 67-71.
- Guillaudeau, T., Mattei, M. G., Depetris, D., Le Bouteiller, P. & Pontarotti, P. 1993. In situ hybridization localizes the human OTF3 to chromosome 6p21.3-->p22 and OTF3L to 12p13. *Cytogenet.Cell Genet.* 63: 212-214.
- Gurdon, J. B. & Colman, A. 1999. The future of cloning. *Nature* 402: 743-746.
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683.
- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M. & Robb, L. 2004. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev.Dyn.* 230: 187-198.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y. G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S. & Shiota, K. 2004. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J.Biol.Chem.* 279: 17063-17069.
- Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664.
- Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 12501-12504.
- Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., Ruvkun, G. & . 1988. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* 2: 1513-1516.
- Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X. & Renard, J. P. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol.Reprod.* 66: 6-13.
- Hill, J. R., Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., Spencer, T. E., Thompson, J. A., Winger, Q. A. & Westhusin, M. E. 2000a. Evidence for

placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol.Reprod.* 63: 1787-1794.

Hill, J. R., Roussel, A. J., Cibelli, J. B., Edwards, J. F., Hooper, N. L., Miller, M. W., Thompson, J. A., Looney, C. R., Westhusin, M. E., Robl, J. M. & Stice, S. L. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51: 1451-1465.

Hill, J. R., Winger, Q. A., Burghardt, R. C. & Westhusin, M. E. 2001. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim Reprod.Sci.* 67: 17-26.

Hill, J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson, J. A. & Westhusin, M. E. 2000b. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol.Reprod.* 62: 1135-1140.

Hochedlinger, K., Rideout, W. M., Kyba, M., Daley, G. Q., Blelloch, R. & Jaenisch, R. 2004. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *Hematol.J.* 5 Suppl 3: S114-S117.

Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhaue, M., Brem, G., Wolf, E. & Pfeifer, A. 2003. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 4: 1054-1060.

Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E. & Pfeifer, A. 2004. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol.Reprod.* 71: 405-409.

Holmgren, C., Kanduri, C., Dell, G., Ward, A., Mukhopadhyaya, R., Kanduri, M., Lobanenkova, V. & Ohlsson, R. 2001. CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr.Biol.* 11: 1128-1130.

Hong, Y., Winkler, C., Liu, T., Chai, G. & Scharf, M. 2004. Activation of the mouse Oct4 promoter in medaka embryonic stem cells and its use for ablation of spontaneous differentiation. *Mech.Dev.* 121: 933-943.

- Honma, M., Hayashi, M., Ohno, T., Mizusawa, H., Saijo, K. & Sofuni, T. 1996. Heterogeneity of the Y chromosome following long-term culture of the human lung cancer cell line A549. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 32: 262-264.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E. S., Golub, T. R. & Jaenisch, R. 2002. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 12889-12894.
- Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. & Okabe, M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett.* 375: 125-128.
- Imakawa, K., Kim, M. S., Matsuda-Minehata, F., Ishida, S., Iizuka, M., Suzuki, M., Chang, K. T., Echtenkamp, S. E. & Christenson, R. K. 2006. Regulation of the ovine interferon-tau gene by a blastocyst-specific transcription factor, Cdx2. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 559-567.
- Ingraham, H. A., Chen, R. P., Mangalam, H. J., Elsholtz, H. P., Flynn, S. E., Lin, C. R., Simmons, D. M., Swanson, L. & Rosenfeld, M. G. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55: 519-529.
- Inouye, S. & Tsuji, F. I. 1994a. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341: 277-280.
- Inouye, S. & Tsuji, F. I. 1994b. Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 351: 211-214.
- Itoh, N. & Ornitz, D. M. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* 20: 563-569.
- Jackson, S. A., Zhang, P., Chen, W. P., Phillips, R. L., Friebe, B., Muthukrishnan, S. & Gill, B. S. 2001. High-resolution structural analysis of biolistic transgene integration into the genome of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 56-62.

- Jaenisch, R. & Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat.Genet.* 33 Suppl: 245-254.
- Johnson, F., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L. C., Reynolds, G. & Waters, J. R. 1962. Quantum efficiency of Cybridina luminescences, with a note on that of *Aequorea*. *J.Cell.and Comp.Physiol.* 60: 85-103.
- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. & Kitts, P. 1995. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19: 650-655.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. & Kondoh, H. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16: 182-187.
- Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Chung, A. S., Lee, K. K. & Han, Y. M. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat.Genet.* 28: 173-177.
- Kasinathan, P., Knott, J. G., Wang, Z., Jerry, D. J. & Robl, J. M. 2001. Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat.Biotechnol.* 19: 1176-1178.
- Kato, M., Yamanouchi, K., Ikawa, M., Okabe, M., Naito, K. & Tojo, H. 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol.Reprod.Dev.* 54: 43-48.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. & Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098.
- Kato, Y., Tani, T. & Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J.Reprod.Fertil.* 120: 231-237.
- Keefer, C. L., Stice, S. L. & Matthews, D. L. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol.Reprod.* 50: 935-939.

Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Schöler, H. R. & Tomilin, A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5: 1078-1083.

Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J. & Cedar, H. 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44: 535-543.

King, W. A., Coppola, G., Alexander, B., Mastromonaco, G., Perrault, S., Nino-Soto, M. I., Pinton, A., Joudrey, E. M. & Betts, D. H. 2006. The impact of chromosomal alteration on embryo development. *Theriogenology* 65: 166-177.

Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H. & Niemann, H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol.Reprod.* 63: 1698-1705.

Kishigami, S., Hikichi, T., Van Thuan, N., Ohta, H., Wakayama, S., Bui, H. T., Mizutani, E. & Wakayama, T. 2006. Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett.*

Klemm, J. D., Rould, M. A., Aurora, R., Herr, W. & Pabo, C. O. 1994. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77: 21-32.

Ko, H. S., Fast, P., McBride, W. & Staudt, L. M. 1988. A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain. *Cell* 55: 135-144.

Kopecny, V., Flechon, J. E., Camous, S. & Fulka, J., Jr. 1989. Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol.Reprod.Dev.* 1: 79-90.

Kraft, H. J., Mosselman, S., Smits, H. A., Hohenstein, P., Piek, E., Chen, Q., Artzt, K. & van Zoelen, E. J. 1996. Oct-4 regulates alternative platelet-derived growth factor alpha receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 271: 12873-12878.

Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M. & Yang, X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 990-995.

Kues, W. A. & Niemann, H. 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* 22: 286-294.

Kues, W. A., Petersen, B., Mysegades, W., Carnwath, J. W. & Niemann, H. 2005. Isolation of murine and porcine fetal stem cells from somatic tissue. *Biol.Reprod.* 72: 1020-1028.

Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Choi, Y. J., Naeem, R., Tomizuka, K., Sullivan, E. J., Knott, J. G., Duteau, A., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Ishida, I. & Robl, J. M. 2002. Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. *Nat.Biotechnol.* 20: 889-894.

Kurosaka, S., Eckardt, S. & McLaughlin, K. J. 2004. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol.Reprod.* 71: 1578-1582.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. & Prather, R. S. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-1092.

Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Diaz, F., Moraes, C. T., Farin, P. W., Farin, C. E., Hammer, C. J., West, M. D. & Damiani, P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90.

Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Faber, D., Sweeney, R. W., Henderson, B., Nevala, W., West, M. D. & Wettstein, P. J. 2001. Cloned cattle can be healthy and normal. *Science* 294: 1893-1894.

Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruij, T., Niemann, H. & Galli, C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol.Reprod.* 67: 767-775.

- Lee, B. C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., Shamim, M. H., Kim, J. J., Kang, S. K., Schatten, G. & Hwang, W. S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436: 641.
- Lee, J. W., Wu, S. C., Tian, X. C., Barber, M., Hoagland, T., Riesen, J., Lee, K. H., Tu, C. F., Cheng, W. T. & Yang, X. 2003. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol.Reprod.* 69: 995-1001.
- Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V., Follet, J., Bailly, Y., Blanquet-Grossard, F., Decavel, J. P., Heinen, E. & Cesbron, J. Y. 2000. Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 5422-5427.
- Lenardo, M. J., Staudt, L., Robbins, P., Kuang, A., Mulligan, R. C. & Baltimore, D. 1989. Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. *Science* 243: 544-546.
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R. & Smith, A. 1998a. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr.Biol.* 8: 971-974.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. & Kain, S. R. 1998b. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J.Biol.Chem.* 273: 34970-34975.
- Li, Y., Dai, Y., Du, W., Zhao, C., Wang, H., Wang, L., Li, R., Liu, Y., Wan, R. & Li, N. 2006. Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine. *Mol.Reprod.Dev.* 73: 189-195.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J. A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat.Methods* 2: 910-919.
- Lim, C. R., Kimata, Y., Oka, M., Nomaguchi, K. & Kohno, K. 1995. Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *J.Biochem.(Tokyo)* 118: 13-17.

- Liu, L., Czerwec, E. & Keefe, D. L. 2004. Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr.Patterns*. 4: 433-441.
- Liu, L., Leaman, D., Villalta, M. & Roberts, R. M. 1997. Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *Mol.Endocrinol*. 11: 1651-1658.
- Liu, L. & Roberts, R. M. 1996. Silencing of the gene for the beta subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *J.Biol.Chem*. 271: 16683-16689.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Jr., Cappai, P. & Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat.Biotechnol*. 19: 962-964.
- Mainman, T. H. 1960. Optical and microwave-optical experiments in ruby. *Physical Review Letters* 4: 564-566.
- Marikawa, Y., Fujita, T. C. & Alarcon, V. B. 2005. Heterogeneous DNA methylation status of the regulatory element of the mouse Oct4 gene in adult somatic cell population. *Cloning Stem Cells* 7: 8-16.
- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W., Howe, J. R. & Hughes, T. E. 1995. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14: 211-215.
- Matwee, C., Betts, D. H. & King, W. A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 8: 57-68.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat.Biotechnol*. 17: 969-973.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H., Colman, A., Schnieke, A. E. & Kind, A. J. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1069.

- Meehan, R., Lewis, J., Cross, S., Nan, X., Jeppesen, P. & Bird, A. 1992. Transcriptional repression by methylation of CpG. *J.Cell Sci.Suppl* 16: 9-14.
- Memili, E., Dominko, T. & First, N. L. 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 51: 36-41.
- Minsky, M. Microscopy apparatus. [3.013.467]. 1961. US.
Ref Type: Patent
- Minucci, S., Botquin, V., Yeom, Y. I., Dey, A., Sylvester, I., Zand, D. J., Ohbo, K., Ozato, K. & Schöler, H. R. 1996. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. *EMBO J.* 15: 888-899.
- Mitalipov, S. M., Kuo, H. C., Hennebold, J. D. & Wolf, D. P. 2003. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol.Reprod.* 69: 1785-1792.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-642.
- Mohamed Nour, M. S. & Takahashi, Y. 2000. In vitro developmental potential of bovine nuclear transfer embryos derived from primary cultured cumulus cells. *J.Vet.Med.Sci.* 62: 339-342.
- Morin, J. G. & Hastings, J. W. 1971. Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J.Cell Physiol* 77: 305-312.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13: 2656-2662.
- Muller, M. M., Ruppert, S., Schaffner, W. & Matthias, P. 1988. A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells. *Nature* 336: 544-551.
- Murakami, M., Fahrudin, M., Varisanga, M. D. & Suzuki, T. 1999. Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. *J.Vet.Med.Sci.* 61: 843-847.

Murphy, D. B. 2001a. Confocal laser scanning microscopy. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging (pp. 205-231). Wiley.

Murphy, D. B. 2001b. Fluorescence microscopy. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging (pp. 177-203). Wiley.

Nakanishi, T., Kuroiwa, A., Yamada, S., Isotani, A., Yamashita, A., Tairaka, A., Hayashi, T., Takagi, T., Ikawa, M., Matsuda, Y. & Okabe, M. 2002. FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome. *Genomics* 80: 564-574.

Nan, X., Campoy, F. J. & Bird, A. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-481.

Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389.

Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. 1999. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat.Genet.* 23: 58-61.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. & Smith, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391.

Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A. & Muramatsu, M. 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol.Cell Biol.* 19: 5453-5465.

Niswender, K. D., Blackman, S. M., Rohde, L., Magnuson, M. A. & Piston, D. W. 1995. Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J.Microsc.* 180 (Pt 2): 109-116.

Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat.Genet.* 24: 372-376.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. & Rossant, J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123: 917-929.

Nordhoff, V., Hübner, K., Bauer, A., Orlova, I., Malapetsa, A. & Schöler, H. R. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm.Genome* 12: 309-317.

Oback, B., Wiersema, A. T., Gaynor, P., Laible, G., Tucker, F. C., Oliver, J. E., Miller, A. L., Troskie, H. E., Wilson, K. L., Forsyth, J. T., Berg, M. C., Cockrem, K., McMillan, V., Tervit, H. R. & Wells, D. N. 2003. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 5: 3-12.

Ogawa, H., Inouye, S., Tsuji, F. I., Yasuda, K. & Umesono, K. 1995. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 11899-11903.

Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F. & Matsuda, J. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol.Reprod.* 62: 1579-1584.

Ohbo, K., Yoshida, S., Ohmura, M., Ohneda, O., Ogawa, T., Tsuchiya, H., Kuwana, T., Kehler, J., Abe, K., Schöler, H. R. & Suda, T. 2003. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev.Biol.* 258: 209-225.

Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. & Shiota, K. 2001. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis.* 30: 45-50.

Ohmura, M., Yoshida, S., Ide, Y., Nagamatsu, G., Suda, T. & Ohbo, K. 2004. Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch.Histol.Cytol.* 67: 285-296.

- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. & Hamada, H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60: 461-472.
- Okazawa, H., Okamoto, K., Ishino, F., Ishino-Kaneko, T., Takeda, S., Toyoda, Y., Muramatsu, M. & Hamada, H. 1991. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J.* 10: 2997-3005.
- Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi, T., Nabeshima, Y., Kuro-o M, Nabeshima, Y., Boon, K., Keaveney, M., Stunnenberg, H. G. & Muramatsu, M. 1998. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17: 2019-2032.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. & Ishikawa, F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J.Biol.Chem.* 280: 5307-5317.
- Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395.
- Ovitt, C. E. & Schöler, H. R. 1998. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol.Hum.Reprod.* 4: 1021-1031.
- Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H. & Schöler, H. R. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev.Biol.* 166: 259-267.
- Panelli, S., Damiani, G., Galli, C. & Sgaramella, V. 2004. Rearranged genomes of bovine blood cells can allow the development of clones till late fetal stages; but rare unrearranged genomes have greater potential and lead to adulthood. *Gene* 334: 99-103.
- Park, K. W., Lai, L., Cheong, H. T., Cabot, R., Sun, Q. Y., Wu, G., Rucker, E. B., Durtschi, D., Bonk, A., Samuel, M., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B. & Prather, R. S. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol.Reprod.* 66: 1001-1005.

- Park, S. H., Park, S. B. & Kim, N. H. 2003. Expression of early development-related genes in bovine nuclear transferred and fertilized embryos. *Zygote*. 11: 355-360.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. & Piston, D. W. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys.J.* 73: 2782-2790.
- Pawley, J. B. 1995. Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, New York.
- Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J. & Schöler, H. 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech.Dev.* 71: 89-98.
- Piedrahita, J. A., Wells, D. N., Miller, A. L., Oliver, J. E., Berg, M. C., Peterson, A. J. & Tervit, H. R. 2002. Effects of follicular size of cytoplasm donor on the efficiency of cloning in cattle. *Mol.Reprod.Dev.* 61: 317-326.
- Pines, J. 1995. GFP in mammalian cells. *Trends Genet.* 11: 326-327.
- Plachot, M. 1989. Chromosome analysis of spontaneous abortions after IVF. A European survey. *Hum.Reprod.* 4: 425-429.
- Plante, L., Plante, C., Shepherd, D. L. & King, W. A. 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol.Reprod.Dev.* 39: 375-383.
- Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. & Campbell, K. H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90.
- Powell, A. M., Talbot, N. C., Wells, K. D., Kerr, D. E., Pursel, V. G. & Wall, R. J. 2004. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biol.Reprod.* 71: 210-216.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.

- Renard, J. P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P. & Vignon, X. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353: 1489-1491.
- Rideout, W. M., III, Eggan, K. & Jaenisch, R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093-1098.
- Roberts, R. M., Ezashi, T. & Das, P. 2004. Trophoblast gene expression: transcription factors in the specification of early trophoblast. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 2: 47.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H. & Robson, P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J.Biol.Chem.* 280: 24731-24737.
- Roh, S., Shim, H., Hwang, W. S. & Yoon, J. T. 2000. In vitro development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod.Fertil.Dev.* 12: 1-6.
- Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W. & Staudt, L. M. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345: 686-692.
- Rüsse, I. & Sinowatz, F. 1991. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Verlag Paul Parey.
- Ryan, A. K. & Rosenfeld, M. G. 1997. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* 11: 1207-1225.
- Saegusa, A. 1998. Mother bears could help save giant panda. *Nature* 394: 409.
- Saijoh, Y., Fujii, H., Meno, C., Sato, M., Hirota, Y., Nagamatsu, S., Ikeda, M. & Hamada, H. 1996. Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells* 1: 239-252.
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W. & Dean, W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr.Biol.* 13: 1116-1121.

Scheidereit, C., Cromlish, J. A., Gerster, T., Kawakami, K., Balmaceda, C. G., Currie, R. A. & Roeder, R. G. 1988. A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homoeobox protein. *Nature* 336: 551-557.

Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J. F., Sulon, J. & Hansen, H. B. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 46: 527-539.

Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. & Campbell, K. H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133.

Schöler, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H. & Gruss, P. 1990a. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9: 2185-2195.

Schöler, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. & Gruss, P. 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J* 8: 2543-2550.

Schöler, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K. & Gruss, P. 1990b. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344: 435-439.

Schoorlemmer, J., van Puijenbroek, A., van Den, E. M., Jonk, L., Pals, C. & Kruijer, W. 1994. Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Mol. Cell Biol.* 14: 1122-1136.

Shi, W., Zakhartchenko, V. & Wolf, E. 2003. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 71: 91-113.

Shimomura, O., Johnson, F. H. & SAIGA, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol* 59: 223-239.

Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. & Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.

- Shiota, K., Kogo, Y., Ohgane, J., Imamura, T., Urano, A., Nishino, K., Tanaka, S. & Hattori, N. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7: 961-969.
- Simonsson, S. & Gurdon, J. 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* 6: 984-990.
- Sinclair, K. D., Broadbent, P. J. & Dolman, D. F. 1995. In vitro produce embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. *Animal Science* 60: 55-64.
- Sturm, R. A., Das, G. & Herr, W. 1988. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 2: 1582-1599.
- Sturm, R. A. & Herr, W. 1988. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* 336: 601-604.
- Sylvester, I. & Schöler, H. R. 1994. Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* 22: 901-911.
- Szabo, P. E., Hübner, K., Schöler, H. & Mann, J. R. 2002. Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells. *Mech.Dev.* 115: 157-160.
- Takada, T., Iida, K., Awaji, T., Itoh, K., Takahashi, R., Shibui, A., Yoshida, K., Sugano, S. & Tsujimoto, G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat. Biotechnol.* 15: 458-461.
- Takeda, J., Seino, S. & Bell, G. I. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 4613-4620.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A. & Rossant, J. 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282: 2072-2075.
- Taranger, C. K., Noer, A., Sorensen, A. L., Hakelien, A. M., Boquest, A. C. & Collas, P. 2005. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16: 5719-5735.

Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H. & Yamanaka, S. 2003. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol.Cell Biol.* 23: 2699-2708.

Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M. & Okuda, A. 2002. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* 30: 3202-3213.

Trounson, A., Lacham-Kaplan, O., Diamente, M. & Gougoulidis, T. 1998. Reprogramming cattle somatic cells by isolated nuclear injection. *Reprod.Fertil.Dev.* 10: 645-650.

Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.* 67: 509-544.

Twyman, R. M. 2005. Gene transfer to animal cells. BIOS Scientific Publishers, Taylor & Francis Group.

Vajta, G., Lewis, I. M., Hyttel, P., Thouas, G. A. & Trounson, A. O. 2001. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* 3: 89-95.

van Eijk, M. J., van Rooijen, M. A., Modina, S., Scesi, L., Folkers, G., van Tol, H. T., Bevers, M. M., Fisher, S. R., Lewin, H. A., Rakacolli, D., Galli, C., de Vaureix, C., Trounson, A. O., Mummery, C. L. & Gandolfi, F. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol.Reprod.* 60: 1093-1103.

Van Soom, A., Boerjan, M. L., Bols, P. E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M. & de Kruif, A. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol.Reprod.* 57: 1041-1049.

Van Soom, A., Mahmoudzadeh, A. R. & de Kruif, A. 1993. Timing of blastocyst formation and cell number of early blastocysts derived from in vitro techniques. *Journal of Reproduction and Fertility* 12: 117.

Van Soom, A., Yuan, Y. Q., Peelman, L. J., de Matos, D. G., Dewulf, J., Laevens, H. & de Kruif, A. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine

- embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57: 1453-1465.
- Vejlsted, M., Avery, B., Schmidt, M., Greve, T., Alexopoulos, N. & Maddox-Hyttel, P. 2005. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. *Biol.Reprod.* 72: 678-686.
- Verrijzer, C. P., Alkema, M. J., van Weperen, W. W., Van Leeuwen, H. C., Strating, M. J. & van der Vliet, P. C. 1992. The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.* 11: 4993-5003.
- Verrijzer, C. P., Kal, A. J. & van der Vliet, P. C. 1990. The oct-1 homeo domain contacts only part of the octamer sequence and full oct-1 DNA-binding activity requires the POU-specific domain. *Genes Dev.* 4: 1964-1974.
- Verrijzer, C. P. & van der Vliet, P. C. 1993. POU domain transcription factors. *Biochim.Biophys.Acta* 1173: 1-21.
- Vigneault, C., McGraw, S., Massicotte, L. & Sirard, M. A. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol.Reprod.* 70: 1701-1709.
- Vignon, X., Chesne, P., Le Bourhis, D., Flechon, J. E., Heyman, Y. & Renard, J. P. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C.R.Acad.Sci.III* 321: 735-745.
- Viuff, D., Avery, B., Greve, T., King, W. A. & Hyttel, P. 1996. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 43: 171-179.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. & Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Wakayama, T. & Yanagimachi, R. 2001. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122: 49-60.
- Wall, R. J. 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45: 57-68.

- Wang, S. & Hazelrigg, T. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-403.
- Wang, S. H., Tsai, M. S., Chiang, M. F. & Li, H. 2003. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr. Patterns*. 3: 99-103.
- Ward, W. W. 1981. Properties of the coelenterate green-fluorescent protein. In *Bioluminescence and Chemiluminescence*. M.A.DeLuca, and W.D.McElroy, editors. Academic Press, New York 235-242.
- Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A. & Losick, R. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 177: 5906-5911.
- Wegner, M., Drolet, D. W. & Rosenfeld, M. G. 1993. POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5: 488-498.
- Wells, D. N., Laible, G., Tucker, F. C., Miller, A. L., Oliver, J. E., Xiang, T., Forsyth, J. T., Berg, M. C., Cockrem, K., L'Huillier, P. J., Tervit, H. R. & Oback, B. 2003. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 59: 45-59.
- Wells, D. N., Misica, P. M. & Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol.Reprod.* 60: 996-1005.
- Wells, D. N., Misica, P. M., Tervit, H. R. & Vivanco, W. H. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod.Fertil.Dev.* 10: 369-378.
- Wilke, V. 1985. Optical scanning microscopy - the laser scan microscope. *Scanning* 7: 88-96.
- Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63-65.

- Willadsen, S. M., Janzen, R. E., McAlister, R. J., Shea, B. F., Hamilton, G. & McDermid, D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35: 161-170.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wilson, C., Bellen, H. J. & Gehring, W. J. 1990. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu.Rev.Cell Biol.* 6: 679-714.
- Wilson, J. M., Williams, J. D., Bondioli, K. R., Looney, C. R., Westhusin, M. E. & McCalla, D. F. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* 38: 73-83.
- Winston, J. T., Koepf, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J. & Harper, J. W. 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Curr.Biol.* 9: 1180-1182.
- Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N. & Pate, B. J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301: 1063.
- Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R. & Niemann, H. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol.Reprod.* 65: 309-317.
- Wuu, Y. D., Pampfer, S., Becquet, P., Vanderheyden, I., Lee, K. H. & De Hertogh, R. 1999. Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol.Reprod.* 60: 479-483.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 68: 251-306.
- Xue, F., Tian, X. C., Du, F., Kubota, C., Taneja, M., Dinnyes, A., Dai, Y., Levine, H., Pereira, L. V. & Yang, X. 2002. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat.Genet.* 31: 216-220.

- Yamazaki, Y., Fujita, T. C., Low, E. W., Alarcon, V. B., Yanagimachi, R. & Marikawa, Y. 2006. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 73: 180-188.
- Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N. 1996a. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* 14: 1246-1251.
- Yang, T. T., Cheng, L. & Kain, S. R. 1996b. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24: 4592-4593.
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K. & Schöler, H. R. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122: 881-894.
- Yeom, Y. I., Ha, H. S., Balling, R., Schöler, H. R. & Artzt, K. 1991. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech.Dev.* 35: 171-179.
- Yoder, J. A., Soman, N. S., Verdine, G. L. & Bestor, T. H. 1997a. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J.Mol.Biol.* 270: 385-395.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H. 1997b. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13: 335-340.
- Yoshimizu, T., Sugiyama, N., De Felice, M., Yeom, Y. I., Ohbo, K., Masuko, K., Obinata, M., Abe, K., Schöler, H. R. & Matsui, Y. 1999. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev.Growth Differ.* 41: 675-684.
- Yu, X. & White, K. E. 2005. Fibroblast growth factor 23 and its receptors. *Ther.Apher.Dial.* 9: 308-312.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey, L. 1995. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9: 2635-2645.
- Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Coopman, F. O., Mintiens, K., Boerjan, M. L., Van Zeveren, A., de Kruif, A. & Peelman, L. J. 2003. Influence of oxygen tension on

apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 59: 1585-1596.

Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296: 913-916.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prella, K., Steinborn, R., Müller, M., Brem, G. & Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J.Reprod.Fertil.* 115: 325-331.

Zakhartchenko, V., Müller, S., Alberio, R., Schernthaner, W., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., Wanke, R., Lassnig, C., Müller, M., Wolf, E. & Brem, G. 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol.Reprod.Dev.* 60: 362-369.

Zappone, M. V., Galli, R., Catena, R., Meani, N., De Biasi, S., Mattei, E., Tiveron, C., Vescovi, A. L., Lovell-Badge, R., Ottolenghi, S. & Nicolis, S. K. 2000. Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* 127: 2367-2382.

Zeiss . Laser Scanning Mikroskope. 2003.

Ref Type: Catalog

Zhou, Q., Renard, J. P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A. & Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.

Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C. L., Fine, A., Chiu, S. Y. & Messing, A. 1997. Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev.Biol.* 187: 36-42.

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Bereitstellung des interessanten Themas, die jederzeit freundliche und hilfreiche Unterstützung und die Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz möchte ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit und Nutzung des konfokalen Mikroskops bedanken.

Bei Herrn Dr. Felix Habermann möchte ich mich ganz herzlich für die überaus interessante und tolle Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes bedanken.

Frau Dr. Regina Klose danke ich herzlich für die fachliche Betreuung dieser Arbeit und die stetige Unterstützung beim Durchleben der Höhen und Tiefen des wissenschaftlichen Arbeitens.

Ganz besonders möchte ich mich bei dem Team bedanken, das die Kerntransfers so gewissenhaft und zuverlässig durchgeführt hat, und zwar bei Herrn Dr. Valeri Zakhartchenko, Herrn Dr. Feikun Yang und Frau Ru Hao.

Herrn Dr. Hendrik Wenigerkind danke ich ausdrücklich für die Durchführung der Embryo Transfers.

Frau Dr. Sigrid Müller danke ich ganz herzlich für Rat, Tat und Beistand rund um die Zellkultur, sowie die unterhaltsamen und anregenden Gespräche.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Dr. Marc Boelhauve für die Hilfestellungen in diversen wissenschaftlichen Lebenslagen, sowie die spannenden Diskussionen rund um das Leben.

Einen lieben Dank an Herrn Tuna Güngor und Frau Myriam Weppert für die Unterstützung am Schlachthof und die netten Gespräche bei den oft sehr langen Wartezeiten.

Herrn Prof. Dr. Hans Schöler danke ich für das Oct4-EGFP-Reporterengenkonstrukt und Jessica Gorski und Kevin Jones für das Neomycin-Resistenzgenkonstrukt.

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich auch meinen lieben Kollegen und Mitdoktoranden, allen voran Frau Dr. Dagmar Kress und Frau Dr. Susanne Schmidt, die mir sehr ans Herz gewachsen sind und immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand hatten. Ebenso danke ich Frau Lika Savchuk, Frau Dr. Elisabeth Kemter und Frau Dr. Daniela Diehl für die Unterstützung im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Nicht unerwähnt bleiben sollen Herr Maik Dahlhoff, Frau Esther Braunreuther, Frau Heidi Alt, Herr Steffen Schiller, Frau Tamara Holy, Herr Dr. Marlon Schneider und Herr Dr. Andreas Höflich, die jederzeit hilfsbereit waren und zu einem netten Arbeitsklima beigetragen haben.

Einen lieben Dank auch an Dominik der mich vor allem in der Endphase dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Ich möchte auch meinen Eltern ganz herzlich danken, die mir mit ihrer Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

13 Lebenslauf

Name: Annegret Wünsch

Geburtsdatum: 14. Februar 1976

Geburtsort: Filderstadt-Plattenhardt

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Claudia Wünsch, geb. Böhmer
Wolfgang Wünsch

Geschwister: Matthias Wünsch
Marlies Wünsch

Schulbildung: 09.1982 – 07.1986 Grundschule Mörikeschule Köngen
09.1986 – 07.1988 Realschule Burgschule Köngen
09.1988 – 07.1995 Robert-Bosch-Gymnasium
Wendlingen

Schulabschluss: 07.1995 Abitur

Arbeit: 10.1995 – 04.1996 Aushilfskraft im Supermarkt
05.1996 – 07.1996 Praktikum bei Bauunternehmen Fa.
Züblin

Studium: 10.1996 – 08.1997 Studiengang Bauingenieurwesen,
Universität Stuttgart
10.1997 – 08.2003 Studiengang Tiermedizin, Ludwig-
Maximilians-Universität (LMU)
München

Abschluss des Studiums: 04.2003 3. Staatsexamen
04.2003 Approbation

Promotion: 07.2003 – 12.2003 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut
für Molekulare Tierzucht, LMU
München
Seit 01.2004 Wissenschaftliche Angestellte, Institut
für Molekulare Tierzucht, LMU
München