Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Proteomanalyse des bovinen Endometriums und zweier Oozytenstadien

Vorgelegt von:

Frank-Joachim Nathanael Berendt
aus
Neuburg an der Donau

München 2007

Erstgutachter:	Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Lutz Eichacker
Betreuer der Arbeit:	Dr. Georg Arnold

Dissertation eingereicht am:	29.03.2007
Tag der mündlichen Prüfung:	12.07.2007

Für Katrin, Irene und Jochen Berendt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Die Bedeutung assistierter Reproduktionstechniken ... 1
1.2 Molekulare Signale der embryo-maternalen Kommunikation ... 2
1.3 Holistische Analysen ... 4
1.4 Die Proteomanalyse ... 7
1.5 Proteomanalysen der embryo-maternalen Kommunikation ... 9
1.6 Neue fluoreszenzbasierte 2D-Analyseverfahren ... 12
1.7 2D-DIGE Analyse der embryo-maternalen Kommunikation ... 12
1.8 Zielsetzung ... 13
2 Material & Methoden ... 14
2.1 Chemikalien ... 14
2.2 Verbrauchsmaterialien ... 16
2.3 Puffer und Lösungen ... 16
2.4 Geräte ... 19
2.5 Software ... 21
2.6 Versuchstiere ... 21
2.7 Probennahme ... 21
2.8 Probenvorbereitung ... 23
2.9 Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen ... 23
2.10 2D-Polyacrylamid Gelelektrophorese ... 24
2.11 Scannen und Auswerten der 2D-Gele ... 25
2.12 Ausstechen der 2D-*Spots* und tryptische Hydrolyse ... 25
2.13 Identifizierung der Proteine ... 27
3 Ergebnisse ... 29
3.1 Analyse der Endometriumproben monozygoter Zwillinge ... 29
3.2 Analyse ungereifter versus in vitro gereifter boviner Oozyten ... 48
4 Diskussion ... 65
4.1 Allgemeine Aspekte ... 65
4.2 Analyse des Endometriums monozygoter Zwillinge ... 66
4.3 Analyse ungereifter versus in vitro gereifter Oozyten ... 76
5 Zusammenfassung ... 91
6 Literatur ... 93
7 Danksagung ... 110

8 Lebenslauf 112
9 Eidesstattliche Erklärung 116

Abkürzungen

Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System abgekürzt. Abkürzungen von Gennamen wurden „kursiv“, Abkürzungen von Proteinnamen „nicht kursiv“ geschrieben. Für Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet.

2D-DIGE	2D-Differenz-Gelelektrophorese
2D-PAGE	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
20 α-HSD	20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACBP	Acyl-CoA-Binding Protein
ART	Assistierte Reproduktionstechnik(en)
BVA	Biologische Varianz Analyse
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Cdc2	Cell Division Control Protein 2
CL	Corpus luteum
CHCA	α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIA	Differentielle In-Gel Analyse
DMF	Dimethylformamid
ESI	Elektrospray Ionisation
ET	Embryotransfer
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GH	Growth Hormone
GSTM5	Glutathion S-Transferase Mu5
HMB	2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure
hnRNP A2/B1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
iCAT	Isotope Coded Affinity Tags
ICD	Isocitrate Dehydrogenase 1 ($NADP^+$), soluble

IEF	Isoelektrische Fokusierung
IFNT	Interferon tau
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-IR	Type I IGF-Rezeptor
IGF-IIR	Type II IGF-Rezeptor
IGFBP	IGF-binding Protein
IPS	Internal Pooled Standard
iTRAQ	Isobaric Tags for Relativ and Absolute Quantitation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
LC	Flüssigkeitschromatographie
LH	Luteinisierendes Hormon
MALDI	Matrix-assistierte Laser Desorptions Ionisation
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MPF	Maturation Promoting Factor
MS	Massenspektrometrie
OR	Oxitocin-Rezeptoren
PBR	peripherer Benzodiazepin Rezeptor
PDI	Protein Disulfide Isomerase
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PMF	Peptidmassen Fingerabdruck
PTM	Posttranslationale Modifikation(en)
Rho GDI	Rho GDP Dissociation Inhibitor beta
RP	Reversed Phase
SB	Probenpuffer
SIL	Stable Isotope Labeling
SSE	Same-Same-Experiment
TCTP	Translationally-controlled Tumor Protein
TOF	Time-of-Flight
ZP	Zona pellucida

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung assistierter Reproduktionstechniken

Durch die Anwendung reproduktionsbiologischer Techniken in der Tierzucht ist es möglich, die Eigenschaften von Nutztieren gezielt zu verbessern. Eine der wichtigsten Methoden ist die in vitro Produktion (IVP) von Embryonen mit anschließendem Embryo Transfer (ET). Diese Technik wurde im Jahre 1981 beim Rind zum ersten Mal mit Erfolg angewendet [1]. Bei dieser Technik werden Oozyten in vitro maturiert, befruchtet und kultiviert. In Kultur entwickelt sich die befruchtete Eizelle zur Blastozyste und wird dann einer Leihmutter übertragen (ET) [2]. Neben der Erforschung der frühen Embryonalentwicklung haben diese Techniken, allgemein bezeichnet als assistierte Reproduktionstechniken (ART), heute einen wichtigen kommerziellen Nutzen. So wurden alleine im Jahr 2003 weltweit über 100.000 bovine Embryonen in vitro produziert und transferiert [3]. Diese Zahl verdeutlicht, welche wachsende wirtschaftliche Bedeutung diesen reproduktionsbiologischen Techniken heute in der Tierzucht zukommt.

Nur etwa 50% aller ETs beim Rind führen zu einer erfolgreichen Trächtigkeit. Häufig kommt es zu einem erhöhten Geburtsgewicht der Kälber (*Large Offspring Syndrome*), einer erhöhten Rate an Missbildungen und perinatalen Todesfällen [4, 5]. Diese Veränderungen werden nach einer künstlichen Befruchtung nicht beobachtet, wenn der Embryo zu Beginn der Entwicklung durch den Ovidukt wandert [6]. Beim ET könnte der fehlende Kontakt zum Oviduktepithel und somit die fehlende Interaktion zwischen Embryo und Muttertier zu der erhöhten Rate pathologischer Veränderungen während der Gravidität führen. Ein detaillierteres Verständnis der involvierten Signale bei der embryo-maternalen Kommunikation kann zur Optimierung der in vitro Kultursysteme für Embryonen und so zur Verringerung pathologischer Veränderungen während der Embryonalentwicklung beitragen. Des Weiteren könnten die Untersuchungen der embryo-maternalen Kommunikation wichtige Informationen über die Biologie der frühen Embryonalentwicklung liefern. Von den molekularen Signalen, die bei der Interaktion zwischen Embryo und Mutter eine Rolle spielen, sind bis heute nur einige wenige bekannt.

1.2 Molekulare Signale der embryo-maternalen Kommunikation

Interferon tau

Das bekannteste embryonale Trächtigkeitserkennungssignal bei Wiederkäuern ist das Ende der 80er Jahre erstmals beschriebene Interferon tau (IFNT) [7]. Dieses parakrine Hormon gehört zu fünf verwandten Typ I Interferonen (alpha, beta, delta, omega, tau). IFNT ist das Signal für die maternale Erkennung der Trächtigkeit in Wiederkäuern und wird von den Trophoblastenzellen der Blastozyste exprimiert [8]. Das vom Embryo sezernierte IFNT inhibiert die endometriale Expression von Oxytocin-Rezeptoren und die endometriale Freisetzung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) wird reprimiert. Diese IFNT-vermittelte Inhibition der $PGF_{2\alpha}$ Ausschüttung führt zur Erhaltung des Corpus luteum (CL) [9]. Das CL ist eine temporär inkretorische Drüse, die Progesteron produziert, ein essentielles Hormon für die Entstehung und Erhaltung der Trächtigkeit [10].

Bei der Kultur in vitro produzierter boviner Blastozysten können sich umweltbedingte Faktoren, wie beispielsweise oxidativer Stress auf die Menge des exprimierten IFNT auswirken [11]. Die Rate erfolgreicher Trächtigkeiten nach einem ET hängt wiederum von der Menge an sezerniertem IFNT ab [12, 13, 14]. Eine Fehlregulation der IFNT Expression durch innere oder äußere Einflüsse oder eine inadäquate Reaktion des Endometriums auf dieses Schlüsselhormon können die Ursache für einen verfrühten Verlust des Embryos sein. Neben diesem trächtigkeitsspezifischen Hormon von Wiederkäuerembryonen ist eine Reihe von multifunktionalen Signalen bekannt, die artübergreifend bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit eine Rolle spielen.

Das *Insulin-like Growth Factor*-System

Das *Insulin-like Growth Factor*-System (IGF-System) ist ein komplexes Hormonsystem, das wichtige Funktionen bei Apoptose, Zellwachstum und -differenzierung sowie der Entstehung der Trächtigkeit spielt [15]. Zum IGF-System gehören die Liganden IGF-I und –II, die Rezeptoren IGF-IR und IGF-IIR sowie die IGF-Bindungsproteine IGFBP-1 bis -6. Letztere binden IGF-I und –II und modulieren so deren Aktivität. Bereits in reifenden Oozyten wurde der Effekt einiger Komponenten des IGF-Systems gezeigt. Die Behandlung von *Xenopus laevis* Oozyten mit Insulin/IGF-I führte zur Aktivierung der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) sowie des *Maturation Promoting Factors* (MPF) und damit zur Initiierung der

Eizellreifung [16]. Die mRNA-Expression für die IGF, deren Rezeptoren sowie für die IGFBP-2 bis -5 wurde in präimplantativen Embryonen von Maus, Rind und Wasserbüffel nachgewiesen [17, 18, 19]. Die mRNA einiger Komponenten des IGF-Systems (IGF-I, -II, IGF-IR und IGFBP-3) werden im Ovidukt exprimiert, während der Embryo hindurch wandert [20]. Die maternale Umgebung reagiert so auf die Anwesenheit des Embryos. Durch das Fehlen dieser Interaktion könnte die Regulation des embryonalen Wachstums durch das IGF-System bei in vitro produzierten (IVP) Embryonen gestört sein und die Entstehung des *Large Offspring Syndrome* begünstigt werden [21].

Das *Fibroblast Growth Factor*-System

Wie das IGF-System gehört auch das *Fibroblast Growth Factor*-System (FGF-System) zu den Wachstumsfaktoren. Das FGF-System ist ein komplexes Netzwerk aus autokrinen und parakrinen Faktoren. Die bislang 22 Komponenten des FGF-Systems sind in Vertebraten hoch konserviert. Das FGF-System spielt eine Rolle bei der Kanzerogenese, der Regulation der Zellproliferation, –migration und –differenzierung [22]. FGF-4 und der Rezeptor FGFR-2 sind essentiell für die Embryonalentwicklung in verschiedenen Spezies. In der Maus konnte gezeigt werden, dass durch die Zerstörung der embryonal exprimierten Gene *Fgf4* und *Fgfr2* die Entwicklung des Embryos bis zur Implantation normal verläuft. Nach der Implantation kommt es jedoch zu letalen Fehlbildungen [23, 24]. FGF-4, das vom murinen Embryoblasten sezerniert wird, interagiert mit FGF-Rezeptoren (FGFR-2) des Trophektoderms. Diese Interaktion kontrolliert den Wechsel zwischen Proliferation und Differenzierung muraler Trophektodermzellen und plazentaler Zellen [25]. In Kultur-Experimenten mit bovinen Embryonen verbessert *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) in Kombination mit *Transforming Growth Factor* beta (TGF beta) deren Entwicklung bis zur Blastozyste [26, 27]. Michael et al. [28] postulieren, dass im Rind eine erhöhte Östrogen-Konzentration während des Östrus zu einer erhöhten Expression von bFGF im Endometrium führt. Uterines bFGF erhöht während der frühen Trächtigkeit die Abundanz der *IFNT*-mRNA sowie des IFNT-Proteins im bovinen Trophektoderm. Diese Daten zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der embryo-maternalen Interaktion, machen jedoch die Relevanz des FGF-Systems für einen koordinierten Ablauf der Trächtigkeit deutlich.

Die Homeobox Gene

Neben einer perfekten Kommunikation zwischen Embryo und Mutter ist auch der Verlauf der frühen Embryonalentwicklung an sich ausschlaggebend für den Erfolg einer Trächtigkeit. So ist die Bildung embryonaler Achsen von grundlegender Wichtigkeit. Die Homeobox (Hox)-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche die Hauptregulatoren bei der Ausbildung einer anterior-posterioren Achse des Embryos sind. Hox-Gene wurden erstmals bei *Drosophila melanogaster* beschrieben und sind in den meisten Metazoen hoch konserviert [29]. Expressionsstudien von Mitgliedern der Hox-Genfamilie verschiedener prä- und postimplantativer Entwicklungsstadien beim Rind (ungereifte Oozyte bis zur Blastozyste) haben gezeigt, dass diverse Hox-Gen-Transkripte zwischen den untersuchten Stadien unterschiedlich stark exprimiert werden [30]. *CDX2*-Transkripte zeigten die höchste Abundanz im Stadium der ungereiften Oozyte. Zum Stadium der gereiften Oozyte wurde eine Erniedrigung ihrer Abundanz gemessen. Suh et al. [31] haben in der Maus gezeigt, dass der Promotor des Clusterin-Gens durch den Transkriptionsfaktor CDX-2 aktiviert wird. Auf maternaler Seite spielen die Hox-Gene außerdem eine wichtige Rolle bei der Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation [32]. Dabei erfolgt die Regulation der Hox-Gene unter anderem über endokrine Faktoren, wie Östrogen und Progesteron [33].

1.3 Holistische Analysen

Ein Großteil der Befunde über bereits bekannte Signale der embryo-maternalen Kommunikation basiert auf der Durchführung hypothesengetriebener Ansätze. Dabei wird eine Hypothese, wie z.B. die Interaktion zweier Proteine betreffend, durch entsprechende Experimente überprüft. Dieser Fokus auf die Hypothese lässt jedoch andere, parallel zu dieser Interaktion ablaufende Prozesse, die gleichermaßen am untersuchten Phänomen beteiligt sein können, außer Acht. Doch gerade eine Analyse komplexer Netzwerke, wie der embryo-maternalen Kommunikation, erfordert ein paralleles Erfassen möglichst vieler Komponenten eines untersuchten Phänomens. Diesen Vorteil bieten holistische Analysen gegenüber den hypothesengetriebenen Strategien. Man unterscheidet zwei Arten holistischer Analysen. Die qualitative Analyse identifiziert möglichst viele Komponenten der jeweils untersuchten Substanzklasse (mRNA, Proteine) eines biologischen Systems.

Die differentielle Analyse, bei der zwei oder mehr biologische Zustände miteinander verglichen werden, liefert quantitative Unterschiede von Molekülen, die ein Indiz für deren indirekte oder direkte Beteiligung am untersuchten Phänomen sind. Die Stärke der differentiellen Analyse liegt in ihrem Potential zur Identifizierung von Kandidatenmolekülen, die mit dem untersuchten Phänomen bis dahin noch nicht in Verbindung gebracht wurden, so dass neue Hypothesen formuliert werden können. Interessante Gene oder Proteine können so als Grundlage für vertiefende, nunmehr hypothesengetriebene Analysen dienen.

RNA- und DNA-basierte Analyseverfahren werden seit Jahrzehnten entwickelt und haben mittlerweile hohe technische Reife erlangt. So ist man heute beispielsweise mit cDNA-*Arrays* in der Lage, die Expressionsprofile von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu analysieren [34]. Mittels dieser Techniken wurden in der Vergangenheit zahlreiche holistische Analysen im Zusammenhang mit der embryo-maternalen Kommunikation auf mRNA-Ebene durchgeführt. In der Ratte wurden Veränderungen der Genexpression im Ovar untersucht, um Gene zu identifizieren, die während der periovulatorischen Phase eine Rolle spielen [35]. Die in der Analyse ermittelten Gene waren in den Lipid- und Steroidmetabolismus sowie die Degradation der extrazellulären Matrix involviert. Es konnten drei Kandidatengene identifiziert werden, deren Expression im Ovar bis dahin unbekannt war: *Fabp5*, *Il4r* und *Pnoc*. In bovinen Oozyten wurde die Genexpression vor und nach der In-vitro-Maturation (IVM) mittels cDNA-*Arrays* gemessen [36]. Die Expression von etwa 300 verschiedenen Genen konnte gezeigt werden. 70 Gene waren differentiell reguliert, darunter Gene im Zusammenhang mit Apoptose (*DAD1*, *CASP4*, *FASTK*, *BCL2L1*), Zellzyklusregulation (*CDC2*, *CCNB1*) und oxidativem Stress (*PRDX1*, *PRDX2*, *GSTM1*, *GSTT1*).

Auf maternaler Seite wurden differentielle Analysen der Genexpression ipsi- und contralateraler Oviduktepithelzellen nach der Ovulation beim Rind mittels subtraktiver cDNA-Banken durchgeführt. Es konnten 35 verschiedene cDNAs detektiert werden, davon fünf mit unbekannter Funktion [37]. Die Genprodukte umfassten verschiedene funktionelle Klassen: Enzyme, Oberflächenproteine, Proteine für Zell-Zell-Interaktionen sowie Proteine, die an Signaltransduktions- und Immunprozessen beteiligt waren. Durch differentielle Untersuchungen der Periimplantationsphase am bovinen Endometrium konnten 87 differentiell exprimierte Gene ermittelt werden [38].

Annähernd die Hälfte dieser Gene wurde durch Typ I Interferone stimuliert, zu denen auch das embryo-spezifische IFNT gehört. Letzteres induziert im Endometrium die Produktion des so genannten *interferon-stimulated gene product 15* (ISG15) [39]. Die Bindung von ISG15 an Proteine wird als ISG15ylierung bezeichnet. Diese Modifikation spielt eine wichtige Rolle bei IFNT-vermittelten Signalkaskaden. Vier Komponenten dieses Systems (*IFITM1*, *IFITM3*, *HSXIAPAF1*, *DTX3L*) zeigten eine erhöhte Expression in trächtigen, im Vergleich zu nicht trächtigen Kontrolltieren. Des Weiteren konnten Gene identifiziert werden, die bei Zelladhäsion, Umstrukturierungen des Endometriums sowie an der Modulation des maternalen Immunsystems eine Rolle spielen könnten. Diese Prozesse sind vermutlich für die Anhaftung und Implantation des Embryos essentiell. Holistische Analysen auf mRNA-Ebene stellen eine schnelle und effektive Möglichkeit dar, um Rückschlüsse zwischen der Aktivität von Genen und komplexen biologischen Phänomenen wie der embryo-maternalen Kommunikation zu ziehen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Abundanz einer mRNA-Spezies und des korrespondierenden Proteins besteht jedoch nur begrenzt [40]. So ist die Menge eines individuellen Proteins in einer Zelle oder Körperflüssigkeit neben der mRNA-Menge von einer Vielzahl weiterer biochemischer Parameter abhängig, wie der korrekten mRNA-Prozessierung, der Rate ribosomaler Proteinsynthese und der folgenden Prozessierung des primären Translationsproduktes. Das Insulin z.B. kann sehr kurzfristig im Körper in Abhängigkeit des Blutzuckerspiegels und unabhängig von der Biosynthese freigesetzt werden. Es entsteht zunächst als inaktive Einzelkette (Prä-Proinsulin) in den β-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas [41]. In den sekretorischen Granula der β-Zellen wird das so genannte C-Peptid vom Proinsulin abgespalten. Es entstehen zwei aktive Ketten, die durch zwei Disulphid-brücken verbunden sind. Dieses funktionelle Insulin wird in den sekretorischen Granula gespeichert und bei Bedarf durch Exozytose sekretiert. Die Menge eines Proteins ist also auch von Sekretions- sowie Degradationsereignissen abhängig. Auf der Ebene der Proteine spielt die große Zahl posttranslationaler Modifikationen (PTM) eine wichtige Rolle, darunter insbesondere die kovalente Bindung von Phosphatgruppen an die Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin [42]. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen durch Kinasen bzw. Phosphatasen sind essentielle Steuerungsmechanismen von Signalkaskaden [43]. All diese

Informationen sind prinzipiell nicht aus mRNA-Abundanzänderungen ableitbar, sondern nur über die Analyse der Proteine selbst möglich.

1.4 Die Proteomanalyse

Versuche holistischer Analysen von Proteinen reichen zurück bis in die 70er Jahre, als die ersten Protein-Datenbanken etabliert wurden [44]. Eines der wichtigsten analytischen Werkzeuge dieser Zeit, aber auch der Gegenwart, war die von O'Farrell und Klose unabhängig voneinander entwickelte hochauflösende 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) [45, 46]. Mit der 2D-PAGE werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt, in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die einzige Möglichkeit zu dieser Zeit Proteine zu identifizieren war die N-terminale Sequenzierung nach Edman [47]. Bei dieser sehr aufwändigen Prozedur wird durch eine zyklische Reaktion eine Aminosäure nach der anderen vom N-Terminus der Peptidkette abgespalten und identifiziert. 1976 wurden noch etwa 500 pmol eines Peptids (heute genügen einige 100 fmol) für eine Aminosäuresequenzanalyse benötigt [48]. Aufgrund der geringen Sensitivität der Edman-Sequenzierung war eine Identifizierung der mittels 2D-PAGE analysierten Proteine sehr schwierig.

Große Fortschritte bezüglich der Identifizierung von Proteinen erbrachten zwei Ionisierungsverfahren in der Massenspektrometrie (MS), die von Koichi Tanaka 1985 entwickelte Matrix-assistierte Laser Desorptions Ionisation (MALDI) [49] und die von John B. Fenn 1988 entwickelte Elektrospray Ionisation (ESI) [50]. Beide Forscher haben dafür im Jahr 2002 den Nobelpreis für Chemie erhalten. Der routinemäßige Einsatz der beiden Verfahren ist etwa seit Ende der 90er Jahre möglich. Eine MS-basierte Methode zur Identifizierung von Proteinen ist der so genannte Peptidmassen Fingerabdruck (PMF). Dabei werden die Massen tryptisch gespaltener Peptide mittels MALDI-MS bestimmt. Die Identifizierung des korrespondierenden Proteins basiert auf dem Vergleich dieser Massen mit den Massen theoretischer Spaltungen aller in Frage kommenden Proteine einer Datenbank. Dieser Vergleich erfolgt mit speziell dafür entwickelten Programmen (Suchmaschinen). Aufgrund der sehr aufwändigen und teuren Sequenzierung von Proteinen nach Edman basieren diese Proteindatenbanken meist auf in silico Translationen aus cDNA-Sequenzen oder Sequenzen genomischer DNA. Aus diesem Grund war die Etablierung von DNA-

Sequenzen kompletter Genome verschiedener Organismen [51, 52] eine essentielle Voraussetzung für die großen Fortschritte in der Proteomforschung. Diese führten in den letzten Jahren zur Gründung verschiedener, groß angelegter Proteomprojekte, wie z.B. das Leber-Proteom-Projekt, das Plasma-Proteom-Projekt oder das Gehirn-Proteom-Projekt beim Menschen [53, 54, 55].

Verglichen mit einigen *Chip*-basierten Technologien, mit denen sich mehr als 20.000 Gene analysieren lassen [56], ist die Zahl der Proteine, die sich mit modernen gel- und MS-basierten Verfahren der Proteomanalyse erfassen lassen, verhältnismäßig klein. Eine der leistungsfähigsten Techniken zur Trennung von Proteinen ist noch heute die 2D-PAGE, mit der routinemäßig etwa 2.000 verschiedene Proteine aufgetrennt werden können [57]. Der Grund für diese experimentelle Einschränkung bei der Analyse von Proteinen ist deren außerordentliche Heterogenität in einem komplexen Proteingemisch. Je nach Analyseverfahren kann immer nur einem Teil der Eigenschaften der Proteine Rechnung getragen werden, wie z.B. Hydrophobizität, Löslichkeit, isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht. Dabei sind hydrophobe Proteine generell schwer zu analysieren. Membranproteinkomplexe lassen sich beispielsweise nur durch den Einsatz spezieller Analyseverfahren, wie der so genannten *Blue Native* Gelelektrophorese untersuchen [58].
Weitere experimentelle Einschränkungen der Proteomanalyse birgt der große dynamische Konzentrationsbereich in Zellen von bis zu 10^{10}, in Plasma sogar von bis zu 10^{12} [59]. Ausgehend von der seltensten Proteinspezies in einer Zelle oder im Plasma mit nur einem Molekül, so ist also das höchstabundante Protein in 10^{10} bzw. 10^{12} Kopien vorhanden. Die gängigen Detektionsverfahren umfassen hingegen nur einen dynamischen Bereich von maximal 10^4 [60]. Die Proteine mit niedriger Abundanz, die bis zu 80% des Gesamtproteoms ausmachen [61], können mit diesen Verfahren nicht erfasst werden. Eine Analyse dieser Proteine ist nur durch Anreicherung oder Vorfraktionierung einer entsprechend großen Ausgangsmenge biologischen Materials (z.B. Zellen aus Kultur) möglich. Sollen beispielsweise Proteine durch Vorfraktionierung mittels MS-basierter Techniken analysiert werden, die in zehn Kopien pro Zelle vorliegen, so würden 6×10^9 Zellen benötigt, um die Nachweisgrenze moderner Massenspektrometer von etwa 100 fmol in komplexen Proteingemischen zu erreichen (diese Beispielrechnung geht davon aus, dass durch die experimentellen Schritte keine Verluste auftreten) [62]. Die Kultivierung einer so

großen Zellzahl ist nicht praktikabel. Antikörper-basierte Techniken sind sensitiv genug, um Proteine niedriger Abundanz zu analysieren. Die Sensitivität reicht bis in den Attomol-Bereich [63]. Solche hochspezifischen Antikörper sind jedoch nur für wenige Proteine erhältlich.

1.5 Proteomanalysen der embryo-maternalen Kommunikation

Die Etablierung der 2D-PAGE in den 70er Jahren machte die holistische Analyse von Proteinen möglich. Obwohl zu dieser Zeit die Identifizierung der analysierten Proteine äußerst schwierig war und daher meist nicht durchgeführt werden konnte, wurden Proteinexpressionsprofile auch im Zusammenhang mit den Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation untersucht.

Analysen der maternalen Seite

Roberts et al. [64] haben beim Schaf Proteine und Glykosidasen in der Luminalflüssigkeit des Genitaltraktes zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus und der frühen Trächtigkeit untersucht. Mittels 2D-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Proteine in der uterinen Flüssigkeit in Abhängigkeit der untersuchten Zeitpunkte der Trächtigkeit variierte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cervicalmucus beim Schaf ein epitheliales Glykoprotein enthielt, das in seiner Zusammensetzung einem Glykoprotein entsprach, das auch bei Mensch und Rind isoliert werden konnte.

Mitte der 80er Jahre wurden beim Schaf Epithelzellen des Endometriums von nicht trächtigen und trächtigen Tieren (Tag 13) in Abwesenheit und Anwesenheit von Tag 15 Blastozystenmedium kultiviert [65]. Die von den Zellen sekretierten Proteine wurden durch die Inkorporation von ^{35}S-Methionin markiert, mittels 2D-PAGE getrennt und autoradiographisch nachgewiesen. Fünf der sekretierten Proteine (74 – 120 kDa) von den Zellen trächtiger Tiere waren in Anwesenheit des Blastozystenmediums in ihrer Abundanz erhöht. Man vermutete, dass die Endometriumzellen trächtiger Tiere metabolisch aktiver sind als die Zellen nicht trächtiger Tiere. Die hier beobachtete Blastozysten-vermittelte Sekretion ist Teil der Interaktion zwischen Embryo und Mutter.

Bei der Ziege wurden die zeitlichen Veränderungen der Sekretion radioaktiv markierter Proteine endometrialer Zellen in Zellkultur mittels 1D- und 2D-PAGE

untersucht [66]. An den Tagen 18 und 21 der Trächtigkeit konnte eine Erhöhung der Zahl und Intensität der Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 18 und 22 kDa (pI = 6,2 – 7,2) ermittelt werden, verglichen mit Zellen von Tieren am Tag 18 des Zyklus. Bei einem 14 kDa Protein konnten zwei oder mehr Varianten mit verschiedenen isoelektrischen Punkten detektiert werden. Ein weiteres 14 kDa Protein und ein 15 kDa Protein wurden als Antwort auf einen Embryo produziert. Die Autoren schließen aus ihren Beobachtungen, dass die detektierten Proteine an dem Prozess der maternalen Erkennung der Trächtigkeit beteiligt sind.

Im Rind wurde die IFNT-vermittelte Proteinsekretion endometrialer Zellen in Kultur mittels 2D-PAGE untersucht [67]. Die Proteine wurden radioaktiv markiert, indem die Zellen in Medium mit [^{3}H]-Leucin kultiviert wurden. In 1D- und 2D-basierten Experimenten wurden die von Endometriumzellen sekretierten Proteine analysiert. Verglichen wurden Proben aus der frühen Phase der Trächtigkeit (Tag 16 – 21) mit Proben aus östrischen Tieren (Tag 16 – 19). Es konnten IFNT-vermittelte Abundanzerhöhungen (bis Faktor 5) im Bereich 12 – 28 kDa der sekretierten Proteine ermittelt werden. In der 2D-PAGE wurden für ein Protein verschiedene Formen unterschiedlicher isoelektrischer Punkte nachgewiesen, was auf PTM hindeutete. Die Funktion dieser sekretorischen Proteine war nicht bekannt.

In den hier beschriebenen Arbeiten zur Analyse der Proteinexpressionsprofile im Zusammenhang mit der frühen Trächtigkeit verschiedener Spezies, die zwischen 1976 und 1993 durchgeführt wurden, konnten aufgrund der damaligen Möglichkeiten die detektierten Proteine nicht identifiziert werden.

Analysen der embryonalen Seite

Für ein detaillierteres Verständnis der Vorgänge, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit führen, ist neben der Analyse maternaler Vorgänge auch die Beleuchtung der embryonalen Seite nötig. Dabei ist die Eizellmaturation einer der ersten in vitro analysierbaren Prozesse vor der Fertilisation. Als Eizellreifung wird das Fortschreiten der Meiose von der Prophase I bis zur Metaphase II bezeichnet. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Analysen der Oozytenmaturation in verschiedenen Organismen durchgeführt.

Bei der Maus wurde im Jahr 2006 die in vivo Eizellreifung auf Proteomebene mittels 2D-PAGE analysiert [68]. Pro Gel wurde hier Gesamtproteinlysat von 500 Oozyten aufgetragen und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert. In der Analyse wurde

das Proteinmuster eines Gels ungereifter mit dem Proteinmuster eines Gels gereifter Oozyten verglichen. 12 Proteine differentieller Abundanz konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden. Neben anderen konnten das *Translationally-controlled Tumor Protein* (TCTP) und das ausschließlich in Oozyten vorkommende *Nucleoplasmin-2* identifiziert werden. Mittels eindimensionaler *Western Blot* Analyse konnten verschiedene Formen des *Nucleoplasmin-2* während der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Diese verschiedenen Formen unterschieden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität.

Beim Schwein wurden ungereifte mit in vitro gereiften Oozyten mittels 2D-PAGE anhand dreier biologischer Replikate verglichen [69]. Pro Gel wurde in dieser Studie Gesamtproteinlysat von 200 Oozyten aufgetragen und die Protein-*Spots* wurden mittels Silberfärbung visualisiert. Es konnten sechs Protein-*Spots* differentieller Abundanz (mind. Faktor 2) detektiert werden. In vier *Spots* wurden zwei oder mehr Proteinspezies identifiziert. Die zwei übrigen wurden eindeutig als Protein Disulfid Isomerase ER60 bzw. Antiquitin identifiziert.

Coenen et al. [70] analysierten bovine Oozyten während der In-vitro-Maturation (IVM). Dazu wurden die Oozyten in Anwesenheit von ^{35}S-Methionin kultiviert, um neu synthetisierte Proteine zu markieren. Acht Zeitpunkte wurden während der IVM mittels 2D-PAGE analysiert. Mit dieser äußerst empfindlichen Methode wurden nur 10 Oozyten pro Gel benötigt. Pro Zeitintervall wurden drei Gele angefertigt. Die Visualisierung erfolgte durch Autoradiographie. Es konnte gezeigt werden, dass die Neusyntheserate zu Beginn der Maturation am höchsten ist und ab der Metaphase I abfällt. Über die Kulturdauer von 28 Std. konnten drei verschiedene Muster der Proteinsynthese gezeigt werden. Eines der synthetisierten Proteine konnte als Tubulin identifiziert werden.

Die hier durchgeführten Techniken, die auf der Detektion radioaktiv-markierter Proteine basieren, sind sehr sensitiv und gut quantifizierbar. Daher sind sie besonders für die Analyse limitierter Proben wie Oozyten und Embryonen geeignet. Mit diesen Techniken werden Proteine detektiert und analysiert, die während des untersuchten Prozesses neu synthetisiert werden.

1.6 Neue fluoreszenzbasierte 2D-Analyseverfahren

Im Gegensatz zu neu synthetisierten Proteinen, die mittels radioaktiv markierter Aminosäuren erfasst werden können, sollten in der vorliegenden Arbeit bereits bestehende Komponenten des Gesamtproteoms untersucht werden. Mit der so genannten 2D-Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) können alle in einem komplexen Gemisch vorhandenen Proteine markiert werden, die mindestens einen Lysinrest (Minimalmarkierung) bzw. einen Cysteinrest (Sättigungsmarkierung) aufweisen. Der Fluoreszenzfarbstoff wird kovalent an die Lysine/Cysteine der Proteine gebunden [71, 72]. Durch die Verwendung verschiedener Farbstoffe können Proteingemische verschiedener Proben gleichzeitig in einem einzigen 2D-Gel getrennt werden. Das Laufverhalten der unterschiedlich markierten Proben ist dabei identisch. Durch eine Normalisierung über den so genannten *Internal Pooled Standard* (IPS) wird der qualitative und quantitative Vergleich innerhalb der Gele einer Analyse stark verbessert. Die 2D-DIGE Methode zeichnet sich im Vergleich zu klassischen Färbetechniken (Silber-, Coomassie-Färbung) durch einen großen dynamischen Bereich aus. Obwohl vom Hersteller hier ein theoretischer Wert von bis zu 10^5 angegeben wird, so liegt der tatsächlich nutzbare Bereich in der Praxis bei etwa 10^3 [73]. Bezüglich ihrer Sensitivität ist die Minimalmarkierung in etwa mit den klassischen Färbetechniken vergleichbar. Im Gegensatz dazu ist die Sättigungs-markierung jedoch um einen Faktor von 100 – 200 sensitiver [74]. Mit dieser Technik sind erstmals differentielle holistische Proteomanalysen extrem limitierter Proben durchführbar.

Die beiden 2D-DIGE Techniken, die Minimal- und die Sättigungsmarkierung, gehören zurzeit zu den modernsten 2D-basierten Methoden. Mit diesen Techniken ist es möglich, eine große Zahl bereits vorhandener Proteine eines biologischen Systems sehr reproduzierbar zu analysieren und zu quantifizieren. Die Techniken eignen sich daher sehr gut für die Analyse komplexer biologischer Netzwerke. In den hier durchgeführten Analysen der embryo-maternalen Kommunikation beim Rind waren die beiden 2D-DIGE Techniken die Methoden der Wahl.

1.7 2D-DIGE Analyse der embryo-maternalen Kommunikation

Für ein detaillierteres Verständnis der embryo-maternalen Kommunikation ist es nötig, sowohl die embryonale, wie auch die maternale Seite zu untersuchen. Für die

ultra-sensitive, differentielle Analyse der embryonalen Seite bei der Interaktion zwischen Embryo und Mutter wurde in der vorliegenden Arbeit als Machbarkeitsstudie die IVM boviner Oozyten auf Proteomebene analysiert. Eine Analyse in vivo gereifter Oozyten wäre beim Rind nicht möglich, da Oozyten nicht in exakt definiertem Zustand präparierbar wären und die für eine Analyse notwendige Zahl an Versuchstieren zu hoch wäre. Die IVM ist außerdem der erste und limitierende Schritt zur erfolgreichen Anwendung assistierter Reproduktionstechniken (ART) sowohl in der Tierzucht wie auch in der humanen Reproduktionsmedizin [75]. Von der Untersuchung der IVM erhofft man sich wesentliche Erkenntnisse zur Verbesserung von in vitro Kulturbedingungen sowie zum Verständnis der frühen Embryonalentwicklung.

1.8 Zielsetzung

Zur Analyse der maternalen Seite wurden in der hier vorgestellten Arbeit embryoinduzierte Veränderungen des Endometriums nicht trächtiger und trächtiger monozygoter Zwillinge am Tag 18 der Gravidität (Periimplantationsphase) auf 2D-Ebene untersucht. Zu diesem Zeitpunkt herrscht ein intensiver Austausch molekularer Signale zwischen Embryo und Mutter [76]. Durch die Verwendung von monozygoten Zwillingen war es durch einen genetisch identischen Hintergrund möglich, variable genetische Einflüsse zu eliminieren [77], die bei nicht verwandten Tieren aus Rekombinationsereignissen (*Crossing over*) sowie genetischen Polymorphismen resultieren.

Die differentiellen holistischen Proteomanalysen in dieser Arbeit waren bewusst darauf ausgerichtet, die majoren Proteine zu erfassen, die bei der Eizellreifung in vitro und der Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation eine Rolle spielen. Proteine niedriger Abundanz wurden durch die Analyse von Gesamtproteinlysaten ohne Vorfraktionierung (z.B. Organellen-, Membranfraktionen) nicht erfasst. Die hier durchgeführten Analysen waren als Pilotstudie ausgerichtet, als erster Schritt in der systematischen Analyse der Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation beim Rind.

2 Material & Methoden

2.1 Chemikalien

Substanz	**Firma**
Acetonitril (ACN)	Roth
Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)	Serva
Agarose	Serva
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	Riedel-de-Haën
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck
Bromphenolblau	Merck
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS)	Sigma
Coomassie Brilliant G-250	Sigma
Coomassie Brilliant R-250	Sigma
α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CHCA)	Applied Biosystems
CyDye DIGE Fluor, Cy2 minimal dye	GE Healthcare Bio Sciences
CyDye DIGE Fluor, Cy3 minimal dye	GE Healthcare Bio Sciences
CyDye DIGE Fluor, Cy5 minimal dye	GE Healthcare Bio Sciences
CyDye DIGE Fluor, Cy3 saturation dye	GE Healthcare Bio Sciences
CyDye DIGE Fluor, Cy5 saturation dye	GE Healthcare Bio Sciences
Cloprostenol	Essex Tierarznei
Dalton Mark VII-L	Sigma
DeStreak Reagent	GE Healthcare Bio Sciences
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma
Dithioerythritol (DTE)	Roth
Follikel-stimulierendes Hormon (FSH)	Sioux Biochemicals Inc.
Eisessig	Roth
Ethanol	Roth
Formaldehyd (37%)	Riedel-de-Haën
Glycerin	Roth
Glycin	Roth

2-Hydroxy-5-Methoxy- Benzoesäure (HMB)	Sigma
Iodacetamid	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Luteinisierendes Hormon (LH)	Sioux Biochemicals Inc.
L-Lysin-monohydrochlorid	Sigma
ß-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Methanol
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4*2H_2O$)	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva
Natriumthiosulfat Pentahydrat ($Na_2S_2O_3*5H_2O$)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($NaH_2PO_4*H_2O$)	Merck
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Pharmalyte 3-10	GE Healthcare Bio Sciences
Phosphorsäure (85%)	Merck
Roti®-Blue	Roth
Salzsäure HCl (25%)	Merck
Tissue Culture Medium (TCM)-199	Biochrom AG
Trypsin	Promega
Thiourea	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Riedel-de-Haën
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
Tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Roth
Urea	Roth

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	**Firma**
Gefrierröhrchen 2 ml	Simport
DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare Bio Sciences
Electrode Strips	GE Healthcare Bio Sciences
Falcon Röhrchen (15 ml und 50 ml)	TPP
Filterpapier (ø 240 mm)	Schleicher & Schuell
Gel-Blotting Papier (46 x 57 cm)	Schleicher & Schuell
Gel Drying Film (25,5 x 28 cm)	Promega
Immobiline DryStrips (pH 3 – 10, 18cm)	GE Healthcare Bio Sciences
Immobiline DryStrips (pH 4 – 7, 18cm)	GE Healthcare Bio Sciences
Immobiline DryStrips (pH 6 – 9, 18cm)	GE Healthcare Bio Sciences
ZipTip U-C18 Pipettenspitzen	Millipore
OMX-S	OMX-GmbH
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µl	Gilson
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Brand
Pipettenspitzen 50 – 1000 µl	Brand
QIAshredder	QIAGEN
Sample Cups	GE Healthcare Bio Sciences
Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Skalpelle Cutfix	Braun

2.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	**Zusammensetzung**
Äquilibrierungspuffer	6 M Urea 30% v/v Glycerin 2% w/v SDS 50 mM Tris-HCl pH 6,8
Bradford-Lösung	0,01% Coomassie G-250 5% Ethanol 10% H_3PO_4 (85%ig)

Coomassie Entfärbelösung	5% v/v Methanol 7% v/v Essigsäure
Coomassie Färbelösung	50% v/v Methanol 10% v/v Essigsäure 0,05% w/v Coomassie R-250
Heparin-Waschpuffer	0,4 M Na_2HPO_4 0,1 M NaH_2PO_4* H_2O 0,5 M NaCl 10 IU/ml Heparin
Konservierungslösung (für alle 2D Gele)	30% v/v Methanol 3% v/v Glycerin
Lysepuffer pH 8,0	30 mM Tris 7 M Urea 2 M Thiourea 4% (w/v) CHAPS pH 8,0 mit 25% HCl eingestellt.
Lysepuffer pH 8,5	8 M Urea 4 % w/v CHAPS 40 mM Tris pH 8,5 mit 25% HCl eingestellt.
Maturationsmedium Oozyten	TCM-199 mit Earle Salzen 22 µg/ml FSH 8 µg/ml LH 5% (v/v) OCS (Oestrous cow serum)
PBS	1 mM KH_2PO_4 2 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 0,9 mM $CaCl_2$ 0,49 mM $MgCl_2$ 0,8% (w/v) NaCl

Probenpuffer (2x, Minimalmarkierung)	8 M Urea 4 % w/v CHAPS 2% v/v Pharmalyte pH 3 – 10 130 mM DTE
Probenpuffer (2x, Sättigungsmarkierung)	7 M Urea 2 M Thiourea 4% w/v CHAPS 2% v/v Pharmalyte pH 3 – 10 130 mM DTE
Probenpuffer (10x, Sättigungsmarkierung)	7 M Urea 2 M Thiourea 4% w/v CHAPS 10% v/v Pharmalyte pH 3 – 10 650 mM DTE
Rehydratisierungspuffer 1 (Minimalmarkierung, pH 4 – 7)	8 M Urea 2% w/v CHAPS 10 mM DTE 2% Pharmalyte pH 3 – 10 0,8% gesättigte BPB-Lösung
Rehydratisierungspuffer 2 (Minimalmarkierung, pH 6 – 9)	8 M Urea 2% w/v CHAPS 2% Pharmalyte pH 3 – 10 1,2% v/v DeStreak 0,8% gesättigte BPB-Lösung
Rehydratisierungspuffer 3 (Sättigungsmarkierung, pH 4 – 7)	7 M Urea 2 M Thiourea 4% w/v CHAPS 1% v/v Pharmalyte pH 3 – 10 13 mM DTE 0,8% gesättigte BPB-Lösung

Rehydratisierungspuffer 4 (Sättigungsmarkierung, pH 6 – 9)	7 M Urea 2 M Thiourea 4% w/v CHAPS 1% v/v Pharmalyte pH 3 – 10 1,2% DeStreak 0,8% gesättigte BPB-Lösung
Sammelgel-Lösung (4%)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 4% T(*) Acrylamid/Bisacrylamid 0,1% w/v SDS 0,05 % w/v APS 0,1% v/v TEMED
SDS Laufpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% w/v SDS
Trenngel-Lösung (12%)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 12% T(*) Acrylamid/Bisacrylamid 0,1% w/v SDS 0,05 % w/v APS 0,05% v/v TEMED

(*) T = (a + b) x 100 / V [%]; a = Masse Acrylamid [g]; b = Masse Bisacrylamid [g]; V = Volumen [ml]

2.4 Geräte

Gerät	**Firma**
Acernote light	Acer
BP61	Sartorius
C18 PepMap100	LC Packings Dionex
Certomat U	Braun
DigestPro MS	Intavis
Direct Q 5	Millipore
Distal coated SilicaTips (FS-360-50-15-D-20)	New Objectiv
Ettan MDLC	GE Healthcare Bio Sciences
GS-15R	Beckman
HFU 686 Top (-80˚C)	Heraeus

IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel
Kühlschrank (+4˚C)	Liebherr
LNC 6000-10	Knürr-Heinzinger
Lyophylle Alpha 2-4	Christ
LTQ linear ion trap	Thermo Electron
MALDI-TOF/TOF 4700	Applied Biosystems
MALDI-TOF/TOF 4800	Applied Biosystems
MR 3000 K	Omnilab
Multiphor II	GE Healthcare Bio Sciences
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Powerlook 1000	UMAX
Powerpac 3000	BioRad
Protean II xi Cell	BioRad
Rehydratisierungskassette	GE Healthcare Bio Sciences
RS232-C	Knürr-Heinzinger
SK 25/90	Hettich
Sonorex RK 100	Bandelin
Spectrophotometer DU-65	Bedckman
SpeedVac	Bachhofer
*Spot*picker Proteineer spII	Bruker Daltonics
SX 25/90	Hettich
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermostat (f. Protean II xi Cell)	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20˚C)	Liebherr
Typhoon 9400	GE Healthcare Bio Sciences
Vacuum Concentrator	Bachhofer
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Voyager DE MALDI-TOF	Applied Biosystems
Waage 2357	Sartorius

2.5 Software

Software	Firma
DeCyder 5.0, 6.0 und 6.5	GE Healthcare Bio Sciences
ImageQuant 5.2	GE Healthcare Bio Sciences
Magic Scan	UMAX
MASCOT MS/MS search engine	Matrix Science
Profound	Proteometrix
ProteomWeaver 2.2	Definfiens

2.6 Versuchstiere

Monozygote Zwillinge (Simmental Fleckvieh, 4 – 6 Jahre) wurden wie beschrieben durch Embryo-Splitting generiert [77]. Untersuchung und Vorbereitung der Tiere wurde von der Arbeitsgruppe Wolf (Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Moorversuchsgut, Oberschleißheim) durchgeführt. Die Tiere stammten aus offener Laufstallhaltung. Das Futter bestand aus Heu und Grassilage. Die Synchronisation des Zyklus der Versuchstiere erfolgte durch die einmalige intramuskuläre Applikation von 500 µg Cloprostenol (Estrumate®) im Diöstrus. Die in vitro Produktion der Embryonen für den Embryo Transfer wurde mit geringen Modifikationen nach Stojkovic et al. [78] durchgeführt. Sieben Tage nach Beginn der Hochbrunst wurden auf je einen der korrespondierenden Zwillinge zwei in vitro produzierte Blastozysten (Tag 7 nach der Befruchtung) transferiert. Die Blastozysten wurden in Kulturmedium in das ipsilaterale Uterushorn (bezogen auf die Seite der Ovulation) übertragen. Der korrespondierende Zwilling bekam einen Schein-Transfer mit Kulturmedium. Ab einem Zeitpunkt vier Tage vor der Schlachtung wurden viermal täglich Blutproben genommen, die Ovarien mittels Ultraschall charakterisiert, der Uterustonus beurteilt und das Sexualverhalten der Tiere dokumentiert. Die Tiere wurden am Tag 18 der Trächtigkeit geschlachtet. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom örtlichen Veterinäramt genehmigt.

2.7 Probennahme

Die Schlachtung der Tiere wurde in gemeldeten Schlachthäusern oder Metzgereien durchgeführt. Der Uterus mit Ovarien der Tiere wurde direkt nach dem Bolzenschuss

und dem Ausbluten der Tiere zur Probengewinnung entnommen. Für die Entnahme der Endometriumproben wurden die Uterushörner sowie der Corpus uteri longitudinal mit einer Schere geöffnet. Endometrium wurde aus sieben verschiedenen Bereichen entnommen, in die der Uterus eingeteilt wurde (**Abb. 1**). Die Proben wurden zur Minimierung von Blut- bzw. Serumproteinen 10 min in 15 ml Heparin-Waschpuffer bei Raumtemperatur in einem Schüttler gewaschen. Die Endometriumproben wurden anschließend in Gefrierröhrchen auf Trockeneis gefroren, in flüssigem Stickstoff transportiert und bei -80˚C gelagert.

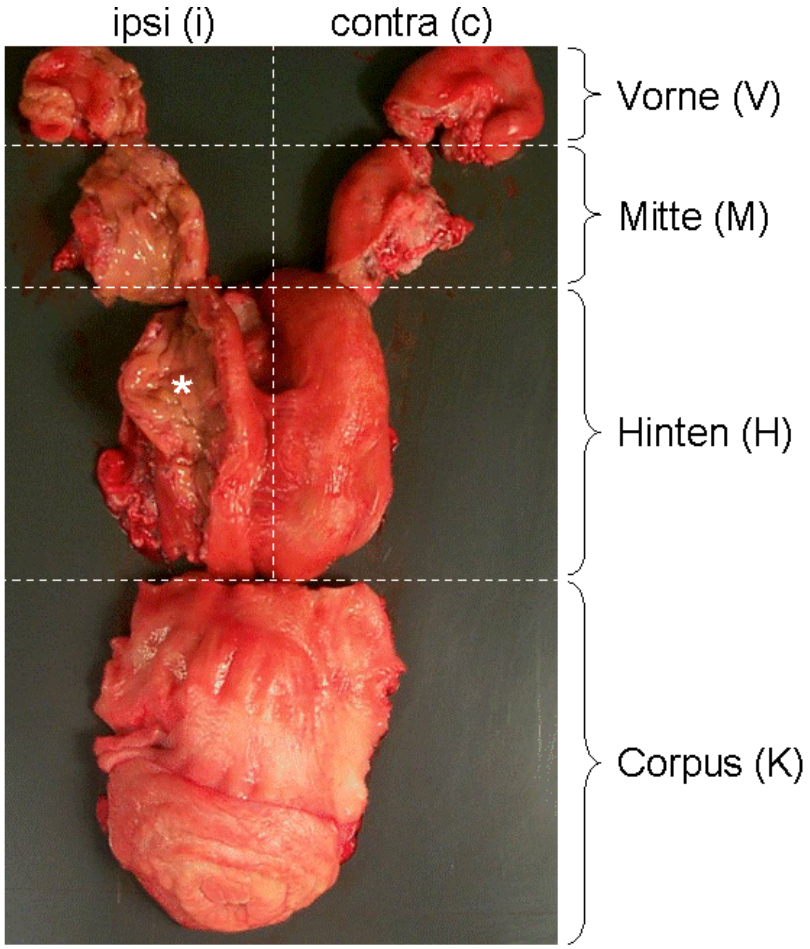


Abb. 1: Einteilung der Uteri für die Entnahme der Endometriumproben der monozygoten Zwillinge. Uteri wurden in sieben Abschnitte unterteilt. Den Corpus uteri (K); die beiden Uterushörner wurden jeweils in einen vorderen (V), mittleren (M) und hinteren (H) Abschnitt unterteilt. Die Seite, auf der die Ovulation stattgefunden hat, wurde als ipsilateral (i) bezeichnet. Der weiße Stern makiert die Region des Uterus, aus dem die Proben für die hier beschriebene Analyse entnommen wurden.

Präparation und In-vitro-Maturation (IVM) der Oozyten wurde von der Arbeitsgruppe Wolf (Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Moorversuchsgut, Oberschleißheim) durchgeführt. Ovarien wurden von Schlachthoftieren entnommen und bei 25 – 30˚C in PBS gewaschen. Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) wurden durch Aufsaugen mit einer Kanüle aus 2 – 8 mm Follikeln gewonnen. Dazu wurde ein Vakuum von etwa 100 mm Hg angelegt. KOK mit mindestens einer kompakten Schicht an Kumuluszellen wurden zweimal in Maturationsmedium gewaschen und in

zwei Gruppen geteilt. Die erste Gruppe der KOK wurde direkt nach der Entnahme aus den Ovarien von den Kumuluszellen getrennt. Denudierte, ungereifte Oozyten wurden lichtmikroskopisch charakterisiert (Zona pellucida frei von Rissen). Anschließend wurden die Oozyten in PBS gewaschen, auf Trockeneis gefroren und bei -80˚C gelagert. Die zweite Gruppe der präparierten KOK wurde in vitro maturiert. Die IVM wurde für 22 Std. bei 39˚C in 5% (v/v) CO_2 in 4-Well-Plates durchgeführt. Nach der IVM wurden die gereiften Oozyten von den Kumuluszellen getrennt, lichtmikroskopisch charakterisiert und dreimal in PBS mit 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon gewaschen. Nur gereifte Oozyten bester Qualität wurden verwendet, auf Trockeneis gefroren und bei -80˚C gelagert.

2.8 Probenvorbereitung

Alle verwendeten Werkzeuge wurden vor der Verwendung gewaschen und mit Ethanol gereinigt. Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mit Mörser und Pistill (mind. 1 min mit flüssigem Stickstoff gekühlt) pulverisiert und bis zur weiteren Verarbeitung in Gefrierröhrchen bei -80˚C gelagert. Das Gewebepulver wurde in gefrorenem Zustand in Lysepuffer pH 8,5 gegeben. Das Lysat wurde 5 min in einem Sonorex RK 100 sonifiziert und anschließend über eine QIAshredder-Säule zentrifugiert (1 min, 6000 rpm, Hettich SK 25/90). Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-*Assay* bestimmt [79]. Die Proben wurden bei -80˚C gelagert.
Die Lyse der Oozyten erfolgte durch die Zugabe von Lysepuffer pH 8,0. Die Oozyten wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren grob lysiert. Anschließend wurde jeder Ansatz 5 min in Eiswasser sonifiziert und dann auf Trockeneis gefroren. Dieser Vorgang von Sonifikation und Frieren auf Trockeneis wurde insgesamt dreimal pro Probe wiederholt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4˚C/10 min/12000 g) und jeweils der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Die Proben wurden bei -80˚C gelagert.

2.9 Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

Lyophillisierte Fluoreszenzfarbstoffe (CyDyes) wurden nach Herstellerprotokoll mit Dimethylformamid (DMF) rekonstituiert und bei -20˚C gelagert. Die CyDyes wurden unverdünnt aus der 1 mM Stammlösung verwendet. Die Markierungsreaktion wurde

für die Minimalmarkierung (*Minimal Labeling*) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Optimierung der Sättigungsmarkierung (*Saturation Labeling*) sowie die Sättigungsmarkierung selbst wurde nach Herstellerprotokoll bewerkstelligt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die markierten Proben bei -80˚C gelagert.

2.10 2D-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Gelstreifen (*Immobiline DryStrips* pH 4 – 7 und 6 – 9, 18 cm) wurden über Nacht in Rehydratisierungspuffer in der dafür vorgesehenen Kassette (*Reswelling Tray*) gequollen. Isoelektrische Fokusierungen (IEF) wurden mit der Multiphor II durchgeführt. Die Gelstreifen wurden wie vom Hersteller empfohlen in die Apparatur eingelegt und mit Mineralöl (*Dry Strip Cover Fluid*) überschichtet. Die Proben wurden mittels *Cup-Loading* auf der anodischen Seite der Gelstreifen aufgetragen und mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Proben wurden je nach Experiment mit 34,2 – 61,1 kVh fokusiert. Nach der IEF wurden die Gelstreifen mit der Gelseite nach innen in eine Kunststoff-Petrischale (Durchmesser 8,5 cm) gelegt und bei -80˚C gelagert.

Das Trenngel (Größe 18 cm x 16 cm x 1 mm) wurde mit Reinstwasser (Millipore) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Vor der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel (3 cm x 16 cm x 1 mm) auf das Trenngel gegossen und für 1 Std. polymerisiert. Gelstreifen mit Minimalfarbstoff-markierten Proben, sowie Gelstreifen für präparative Gele, die nach dem gleichen Protokoll angefertigt wurden, wurden 15 min in 15 ml Äquilibrierungspuffer mit 1% DTE und anschließend 15 min in 15 ml Äquilibrierungspuffer mit 2,5% Iodacetamid (+200 µl gesättigter Bromphenolblau-Lösung) in den Petrischalen auf einem Schüttler (100 rpm) äquilibriert. Gelstreifen mit Sättigungsfarbstoff-markierten Proben für analytische Gele wurden 10 min in 15 ml Äquilibrierungspuffer mit 1% DTE (+300 µl gesättigter Bromphenolblau-Lösung) in Petrischalen auf einem Schüttler (100 rpm) äquilibriert. Gelstreifen mit Sättigungsfarbstoff-markierten Proben für präparative Gele wurden 15 min in 15 ml Äquilibrierungspuffer mit 1% DTE (+200 µl gesättigter Bromphenolblau-Lösung) in Petrischalen auf einem Schüttler (100 rpm) äquilibriert. Nach dem Äquilibrieren wurden die Gelstreifen einmal in 1x Laufpuffer gewaschen und mit einer Schere auf 14,5 cm gekürzt, auf das Sammelgel aufgelegt und mit

0,5% Agarose in 1x Laufpuffer fixiert. Der Elektrophoreselauf wurde mit zwei 2D-Gelen in einer Protean II xi cell mit 1x Laufpuffer bei 9˚C mit 30 mA/Gel für 30 min und dann mit 40 mA/Gel für 3 Std. durchgeführt.

2.11 Scannen und Auswerten der 2D-Gele

2D-Gele mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben wurden mit einem Laser-Fluoreszenz-Scanner Typhoon 9400 gescannt. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Parameter verwendet. Die 2D-Gele mit den Minimalfarbstoff-markierten Proben wurden mit der DeCyder™ Version 5.0 ausgewertet. Bei der Detektion der Protein-*Spots* der 2D-Gele im DIA-Modul (Differentielle In-Gel Analyse) wurde der Parameter *Estimated number of Spots* im pH-Bereich von 4 – 7 auf 2000 und im pH-Bereich 6 – 9 auf 1500 eingestellt. 2D-Gele mit Sättigungsfarbstoff-markierten Proben wurden mit der DeCyder Version 6.5 ausgewertet. Für die *Spot*-Detektion wurde im DIA-Modul für den pH-Bereich 4 – 7 eine *Estimated number of Spots* von 2500, im pH-Bereich 6 – 9 von 1500 eingestellt. Nach der Detektion der *Spot*s wurden die korrespondierenden DIA-Dateien einer Analyse in das BVA-Modul (Biologische Varianz Analyse) importiert und ausgewertet. Die statistische Auswertung mit der Berechnung der p-Werte des *Student's* t-Test erfolgte automatisch durch das Programm DeCyder™.

2.12 Ausstechen der 2D-*Spots* und tryptische Hydrolyse

Präparative Gele wurden nach dem Lauf der 2. Dimension über Nacht mittels Coomassie gefärbt. Nach dem Entfärben wurden die Gele bis zur weiteren Verarbeitung in Konservierungslösung bei 4˚C gelagert. Präparative, Coomassie-gefärbte Gele wurden mit dem Programm *Magic Scan* mit einem *PowerLook* 1000 gescannt.

Kandidaten-*Spots* wurden aus präparativen 2D-Gelen manuell mit einer 200 µl Pipette mit abgeschnittener Spitze (Ø 1 – 2 mm) ausgestanzt oder mit einem Skalpell ausgeschnitten. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die *Spots* bei 4˚C in 500 µl Reinstwasser gelagert. Die *Spot*s wurden zweimal 15 min bei Raumtemperatur mit je 500 µl Reinstwasser geschüttelt, gefolgt von zwei Waschschritten mit je 500 µl 50 mM NH_4HCO_3-Lösung für jeweils 15 min. Das Gelstück wurde mit einer Pipettenspitze (200 µl) zerkleinert und knapp mit der NH_4HCO_3-Lösung

überschichtet. Nach Zugabe von 70 ng Trypsin wurde über Nacht bei 37˚C inkubiert. Die NH_4HCO_3-Lösung wurde ohne Gelstücke abpipettiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis weiter verarbeitet. Die Gelstücke wurden erneut mit 40 µl der 50 mM NH_4HCO_3-Lösung überschichtet, der Überstand wurde nochmals abpipettiert und mit der Lösung in dem frischen Reaktionsgefäß vereinigt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 40 µl 70% Acetonitril für 15 min geschüttelt. Die Lösung wurde frei von Gelstücken abpipettiert und wieder mit der Lösung in dem frischen Reaktionsgefäß vereinigt. Diese Peptidlösung wurde in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeengt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80˚C gelagert.

Die tryptische Hydrolyse wurde unter Verwendung der so genannten OMX-S®-Vorrichtung durchgeführt. OMX-S® besteht aus einem *Picker*, *Reactor* und *Sampler*. Protein-*Spots* wurden mit dem *Picker* ausgestochen. Durch Abzentrifugieren (2 min, 13000 xg) in den *Reactor* wurde das Gelstück zerkleinert. Nach Zugabe von 20 µl Trypsin-Lösung (10 ng/µl in 50 mM NH_4HCO_3) wurde erneut abzentrifugiert (1 min, 3800 xg). Für die Hydrolyse wurde bei 50°C für 60 min in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Peptidlösung wurde in den *Sampler* abzentrifugiert (1 min, 1000 xg) und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Peptidlösung (20 µl) wurde in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 10 µl eingeengt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80˚C gelagert.

Mittels MALDI-MS zu messende Peptide wurden nach der tryptischen Hydrolyse entsalzt. Die ZipTip U-C18 Pipettenspitzen wurden durch zweimaliges Einsaugen und wieder Ausstoßen von 10 µl 70% Acetonitril (ACN)/ 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen. Dann wurden die ZipTips auf die gleiche Weise zweimal mit je 10 µl 5% ACN/ 0,1% TFA äquilibriert. Anschließend wurde die Probe (in 10 µl 0,1% TFA gelöst) von oben auf die Säule pipettiert und die Flüssigkeit mit der Pipette durch die Säule gedrückt. Die an der Säule gebundenen Peptide wurden zweimal mit 10 µl 5% ACN/ 0,1% TFA gewaschen und mit 10 µl 70% ACN/ 0,1% TFA eluiert. Die Proben wurden vollständig in der Vakuumzentrifuge eingeengt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80˚C gelagert.

2.13 Identifizierung der Proteine

Peptidmassen Fingerabdruck

Peptidmassen Fingerabdruck (*Peptide mass fingerprint*; PMF) Analysen wurden mit einem Voyager DE MALDI-TOF-Gerät durchgeführt, welches von der Fa. Toplab (Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Die entsalzten und lyophilisierten Peptide wurden in 30% ACN/ 0,1% TFA gelöst. 0,5 µl dieser Lösung wurde mit 0,5 µl Matrix-Lösung (20 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)/ 2-Hydroxy-5-Methoxy-benzoesäure (HMB) (DHB/HMB 9:1) in 30% ACN/ 0,1% TFA) gemischt und auf eine MALDI-*Target*-Platte aufgetragen. Die Messung wurde mit mindestens 100 Laser-Schüssen (N_2-Laser: 337 nm) durchgeführt. Die Datenbank-Suche (Datenbank: Mammalian NCBInr Datenbank; 221796 Sequenzen, Datum 11.05.2004) erfolgte mit dem Programm *ProFound*.

Tandem-Massenspektrometrie Analysen

Für Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Tandem-Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) Analysen mit einem 4700 Proteomics Discovery Systems wurden die lyophilisierten Peptide in 10 µl 50% ACN/ 0,1% TFA gelöst. 0,5 µl dieser Peptid-Lösung wurden 1:1 mit α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CHCA; 5 mg/ml in 50% ACN/0,1% TFA, 5 mM $NH_4H_2PO_4$) auf der MALDI-*Target*-Platte gemischt. MS und MS/MS Spektren wurden mit 2500 Laser-Schüssen (Nd:YAG Laser, 355 nm, N_2 collision in MS/MS mode) durchgeführt. Zur Proteinidentifizierung wurden die MS/MS Spektren gegen die Swiss-Prot Datenbank (158337 Sequenzen, Datum 10.08.2004) mit dem Programm *MASCOT* gesucht.

Für MALDI-TOF/TOF Analysen mit einem 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer wurden die lyophilisierten Peptide nach dem Entsalzen von der ZipTip-Säule mit 2µl Matrix-Lösung (4 mg/ml CHCA in 50% ACN/ 0,1% TFA) direkt auf das MALDI-*Target*-Platte eluiert. Die PMF-Analyse wurde mit 1600 Laser-Schüssen (Nd:YAG Laser, 355 nm) durchgeführt. Die MS/MS Analyse erfolgte mit 500 Laser-Schüssen (Nd:YAG Laser, 355 nm, MS/MS Kollisionsgas: Luft). Die MS/MS Spektren wurden gegen die bovine IPI-Datenbank (33699 Sequenzen, Datum 25.04.2006) mit dem Programm *MASCOT* gesucht.

Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie Analysen

Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) Analysen wurden mit einer nano-LC-Anlage (Ettan MDLC) gekoppelt mit einem linearen Ionenfallen-Massenspektrometer (LTQ) durchgeführt. Nach der tryptischen Hydrolyse mit OMX-S wurden 40 µl 0,1% Ameisensäure zur Peptid-Lösung gegeben und für 15 min bei einer Flussrate von 10 µl/min mit 0,1% Ameisensäure auf eine C18-*Trapping*-Säule (C18 PepMap100, Partikelgröße: 5 µm, 100Å, Säulengröße: 300 µm x 5 mm) injiziert. Die Peptide wurden mittels *reversed-phase* (RP) Chromatographie auf einer nano-LC Säule (C18 PepMap100, Partikelgröße: 3 µm, 100Å, Säulengröße: 75 µm x 150 mm) bei einer Flussrate von 240 nl/min getrennt. Als mobile Phase A wurde H_2O, als mobile Phase B 84% ACN eingesetzt, mit jeweils 0,1% Ameisensäure. Der Chromatographielauf erfolgte mit einem Gradienten von 0% mobiler Phase A bis 30% mobiler Phase B in 70 min. Danach folgte eine Rampe bis 60% mobiler Phase B in 20 min und schließlich bis 100% mobiler Phase B in 10 min. Die Elektrospray Ionisation (ESI) wurde mit *distal coated SilicaTips* bei einer Nadelspannung von 1,4 kV durchgeführt. Die MS- und MS/MS-Analysen wurden mit einem MS-*Scan* (Massenbereich m/z 400-1600) und drei folgenden daten-abhängigen MS/MS-*Scans* (*dynamic exclusion*^{TM} aktiviert, Kollisionsenergie 35%) durchgeführt. Die MS/MS-Daten wurden mit *MASCOT* Version 2.1.03 gegen die IPI-Datenbank sowie gegen die SwissProt Datenbank gesucht. Folgende Such-Parameter wurden angewendet: (i) Enzyme: Trypsin; (ii) Variable Modifikation: Oxidation (M); (iii) Peptidtoleranz: 2 Da; (iv) MS/MS Tol.: 0.8 Da; (v) Peptidladung: 1+, 2+, 3+; (vi) Instrument: ESI-Trap; (vii) Zwei *miss cleavages* wurden zugelassen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Endometriumproben monozygoter Zwillinge

Die 2D-basierten Untersuchungen embryo-induzierter Unterschiede von Endometriumproben auf Proteinebene wurden mit monozygoten Zwillingen durchgeführt. Für den Embryotransfer (ET) standen insgesamt 13 monozygote Zwillingspaare zur Verfügung. Jeweils einer der beiden korrespondierenden Zwillinge erhielt zwei Embryonen (in vitro produzierte Blastozysten, ca. 150 Zellen). Das zugehörige Geschwistertier erhielt einen Scheintransfer mit Transfermedium und diente als nicht trächtige Kontrolle. Bei sechs der 13 Zwillingspaare wurde nach der Schlachtung und Öffnung des Uterus ein ca. 10 – 20 cm langer Embryo gefunden. Drei dieser sechs Paare wurden aufgrund makroskopischer Abnormalitäten wie Endometritis oder Präsenz von Urin im Uterus nicht für die Analyse verwendet. Für die Analyse der Periimplantationsphase standen somit drei Zwillingspaare zur Verfügung (Tiernummern der Zwillingspaare: 416/417, 418/419, 429/430). In der Analyse der Endometriumproben der monozygoten Zwillinge wurde der hintere Teil der ipsilateralen Uterushörner untersucht. Man nimmt an, dass der Embryo hier den intensivsten Kontakt mit dem Endometrium hat.

In 2D-basierten Vorversuchen mit zueinander nicht verwandten Färsen wurde gezeigt, dass Serumproteine in großen Mengen in den Endometriumproben vorhanden sind. Um den Einfluss von Serumproteinen auf die Analyse zu minimieren, wurden die Endometriumproben nach der Entnahme gründlich in Waschpuffer gewaschen. Die Optimierung des Waschvorgangs wurde mit Endometriumproben von Färsen am Tag 18 der Trächtigkeit durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Albumin-*Spot*s mit ungewaschenen und gewaschenen Proben erfolgte mit dem Programm *ProteomWeaver*. Durch das Waschen der Proben konnte eine Reduktion des Albumins um den Faktor 2,8 erreicht werden (**Abb. 2**, Seite 30). Eine signifikante Reduktion zellulärer Proteine durch den Waschvorgang wurde nicht beobachtet. Die Waschprozedur wurde auf alle in dieser Analyse untersuchten Endometriumproben der monozygoten Zwillinge angewendet.

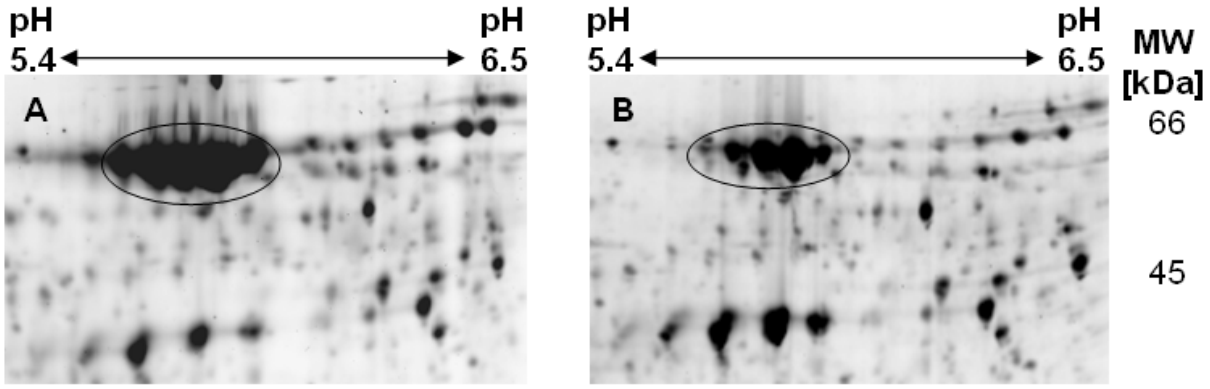


Abb. 2: Albumingehalt vor und nach dem Waschvorgang. Gezeigt sind die Ausschnitte zweier 2D-Gele im pH-Bereich von 5,4 bis 6,5 von Cy2-markierten Endometriumproben (je 50 µg). Durch Waschen der Endometriumsproben konnte der Gehalt an Albumin signifikant (Faktor 2,8) erniedrigt werden. Die Gelbilder zeigen eine ungewaschene Endometriumsprobe (A) und eine für 10 min in Heparin-Waschpuffer mittels eines Schüttlers gewaschene Probe (B). Die umkreiste Region markiert die Albumin-*Spots*, welche mittels Peptidmassen Fingerabdruck (*Peptide Mass Fingerprint*; PMF) eindeutig als bovines Serumalbumin (BSA) identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Reihen nebeneinander liegender *Spots* ein und desselben Proteins, wie hier beim BSA, resultieren aus unterschiedlichen Modifikationen.

Die Masse der entnommenen Gewebestücke lag zwischen 300 und 500 mg. Die Endometriumproben wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Pro Probe wurden zwei unabhängige Lysate mit jeweils 20 – 30 mg Gewebepulver angefertigt. Das Gewebepulver wurde direkt in 100 µl Lysepuffer pH 8,5 gegeben, um ein Antauen der Proben zu verhindern. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-*Assay* bestimmt. Zur Kontrolle wurde bei jeder Messung zusätzlich eine definierte BSA-Lösung (5 mg/ml) mittels Bradford-*Assay* quantifiziert. Die Proteinausbeute lag im Durchschnitt bei etwa 30 µg gelöstem Gesamtprotein pro 1 mg Gewebepulver.

Die Analyse der monozygoten Zwillinge wurde mit der 2D-Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE Minimalmarkierung) Technik durchgeführt. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden mit 400 pmol *CyDye* markiert. Pro Zwillingspaar resultierten vier Lysatkombinationen, jeweils bestehend aus einem Aliquot des nicht trächtigen Tieres und des trächtigen Tieres, markiert mit Cy3 und Cy5 bzw. umgekehrt (so genanntes *Cross Labeling*). Jede Lysatkombination beinhaltete zusätzlich den *Internal Pooled Standard* (IPS), ein Cy2-markiertes 1:1-Gemisch der Proben beider Tiere (**Abb. 3**, Seite 31). Pro Gel wurden insgesamt 150 µg Proteinlysat aufgetragen, was einem Probenvolumen von 55 – 74 µl entsprach. Insgesamt wurden 24 Gele in der Analyse der drei Zwillingspaare angefertigt (3 Zwillingspaare x 2 pH-Bereiche x 4 analytische Replikate).

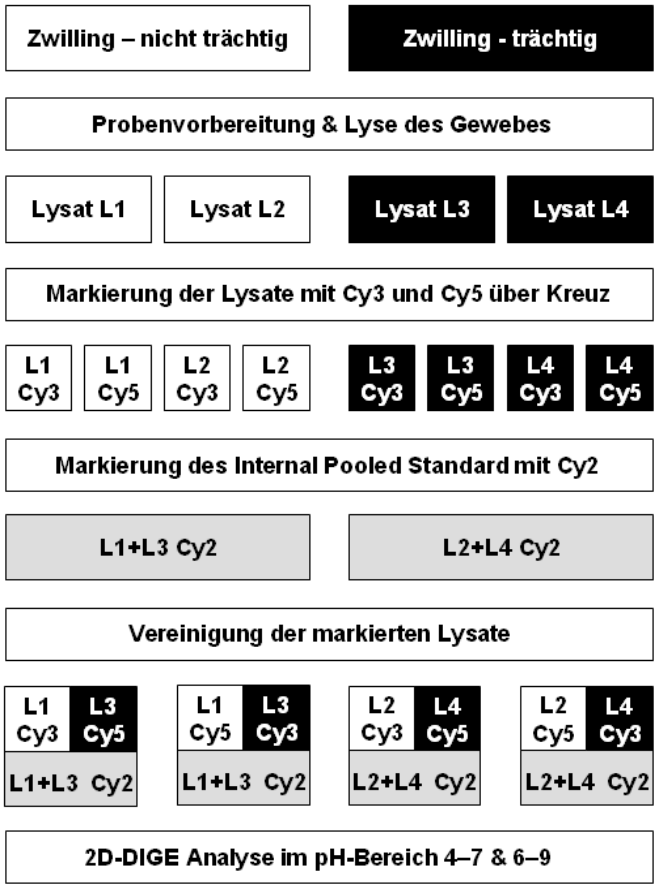


Abb. 3: Experimentelles Design anhand eines Zwillingspaares zum Nachweis von embryo-induzierten Abundanzänderungen von Endometrium-proteinen am Tag 18 der Trächtigkeit.

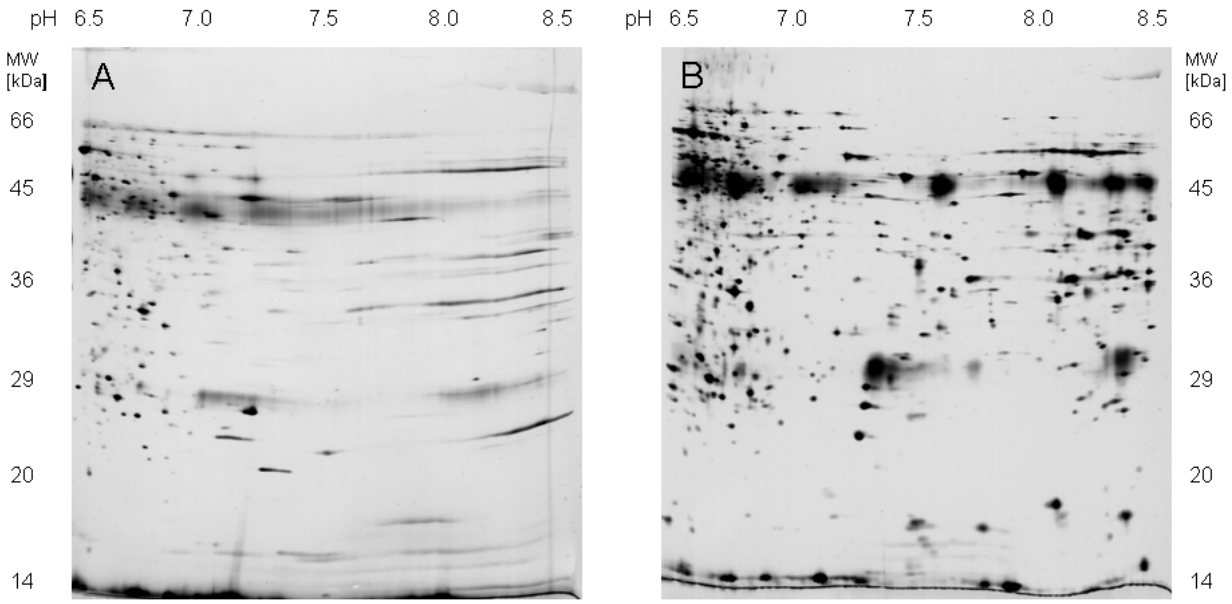


Abb. 4: Verbesserung der Auftrennung während der isoelektrischen Fokusierung durch *DeStreak*. 2D-Muster ohne (A) und mit (B) *DeStreak* im Rehydratisierungspuffer. Beide Gele sind silbergefärbt mit je 100 µg Gesamtprotein.

Im pH-Bereich 6 – 9 mussten die Bedingungen während der isoelektrischen Fokusierung (IEF) aufgrund der Bildung von Horizontalstreifen optimiert werden. Die Optimierung wurde mit weniger limitierten Endometriumproben von Färsen aus Vorversuchen durchgeführt. Die Optimierungsgele wurden nach Blum [80] silbergefärbt. Durch Substitution von DTE im Rehydratisierungspuffer durch *DeStreak*^{TM}, welches Hydroxyethyldisulphid enthält [81], konnte die Auflösung der Protein-*Spots* im pH-Bereich von 7,0 bis 8,5 so verbessert werden, dass die 2D-Gele über den gesamten Bereich gut auswertbar waren (**Abb. 4**, Seite 31). Für die Analyse der Endometriumproben der monozygoten Zwillinge wurden im pH-Bereich 6 – 9 12 2D-Gele angefertigt, vier Gele pro Zwillingspaar aus jeweils zwei unabhängigen Lysaten. Die 2D-DIGE Gele wurden für jeden der drei *CyDye*-Farbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) mit drei verschiedenen Wellenlängen (488 nm, 532 nm und 633 nm) angeregt und ausgelesen. Daraus resultierten für jedes analytische Gel drei Gelbilder. Die Gelbilder wurden mit dem Programm DeCyder^{TM} 5.0 ausgewertet. Mit Hilfe des DIA-Moduls (Differentielle In-Gel Analyse) dieses Programms wurde die Detektion der *Spots* in den drei Gelbildern eines physikalischen Gels durchgeführt. Im pH-Bereich 6 – 9 konnten im Mittel 947 *Spots* (± 159) detektiert werden. Außerdem erfolgten im DIA die automatische Quantifizierung der *Spots*, die Berechnung der Abundanzfaktoren (trächtig versus nicht trächtig) sowie die Normalisierung gegen den IPS. Im BVA-Modul (Biologische Varianz Analyse) erfolgte die automatische Zuordnung aller korrespondierender *Spots* (*Matching*) innerhalb der 12 2D-Gele eines pH-Gradienten. Etwa 10% der *Spot*s mussten manuell nachgearbeitet werden, d.h. dass falsch zugeordnete *Spots* korrigiert werden mussten. Es folgte die statistische Auswertung der Analyse des Endometriums der monozygoten Zwillinge, dabei wurden die p-Werte mit dem gepaarten *Student's* t-Test berechnet. Die statistischen Berechnungen wurden unter Einbeziehung des IPS vom DeCyder^{TM}-Programm automatisch durchgeführt. Die Unterschiede auf Proteinebene zwischen nicht trächtigen und trächtigen Tieren wurden als signifikant erachtet, wenn folgende Kriterien erfüllt wurden: (i) der jeweilige *Spot* in allen der 12 physikalischen Gele (36 Gelbilder) eines pH-Bereiches vorhanden ist; (ii) das Abundanzverhältnis eines Proteins von Kontrolle zu Probe bzw. von Probe zu Kontrolle einem Faktor von ≥ 2 entspricht; (iii) der p-Wert des *Student's* t-Test ≤ 0,01 ist.

Kein Protein-*Spot* erfüllte diese Parameter der Auswertung. Vier Proteine lagen knapp unter dem Faktor von 2 (**Abb. 5**). Drei dieser Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz in den Proben der nicht trächtigen Tiere. Die Abundanz des vierten Proteins war in den Proben der trächtigen Tiere erhöht (**Abb. 6** und **7**; Seite 34). Die *Spots* waren in 12 von 12 Gelen vorhanden. Die Abundanzfaktoren der differentiellen Analyse lagen zwischen 1,90 und 1,94 (**Tab. 1**, Seite 35). Die vom Programm DeCyder™ automatisch berechneten Werte des *Student's* t-Test lagen bei den vier Proteinen zwischen 2,0 x 10^{-6} und 2,2 x 10^{-10}. Die Abbildungen und die Tabelle der Seiten 34 und 35 enthalten zur besseren Übersichtlichkeit bereits die Namen der Proteine aus den unten beschriebenen massenspektrometrischen Analysen (ab Seite 38).

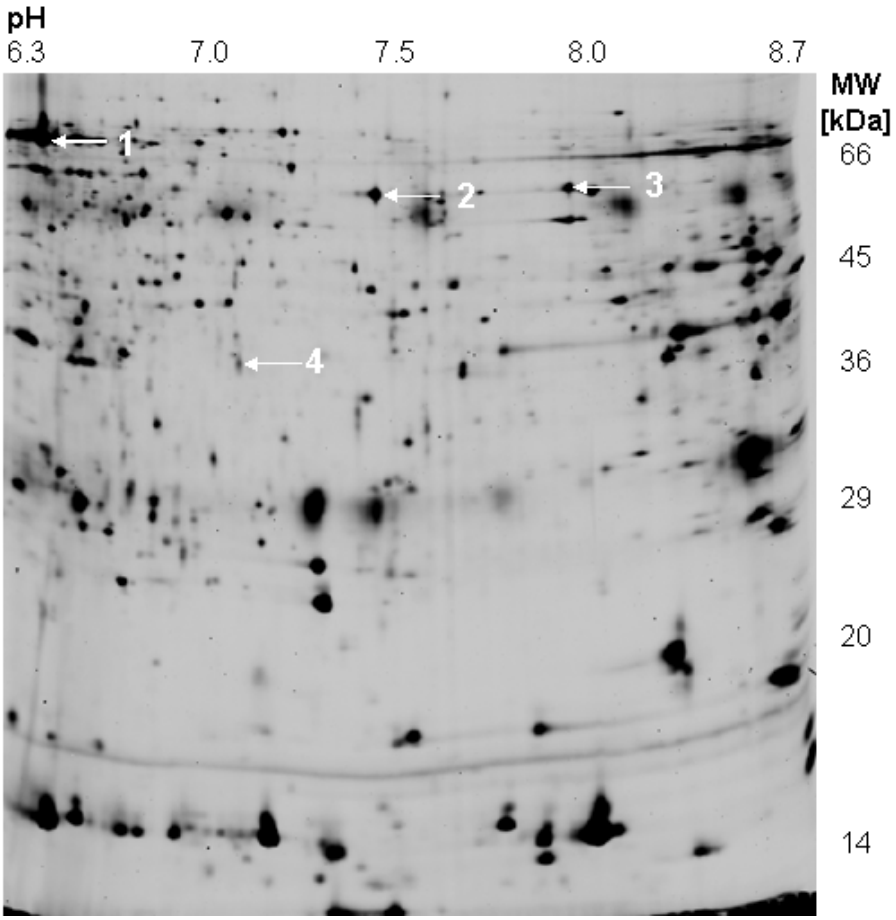


Abb. 5: 2D-DIGE Gel im pH-Bereich 6,3 – 8,7. Hier wurde ein Cy2-Gelbild gewählt, da dieses aus 50 µg eines 1:1-Gemischs der Lysate (IPS) zweier korrespondierender Zwillinge (Tiernummern 416/417) bestand und so beide Zustände repräsentiert. Die weißen Pfeile markieren die differentiellen Proteine. Die *Spots* konnten wie ab S. 38 beschrieben identifiziert werden als: Transferrin (1), Fibrinogen Beta Chain (2 und 3), heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A2 /B1 (4). Die Abundanzänderungen der Proteine sind in Abb. 6 und 7 graphisch dargestellt.

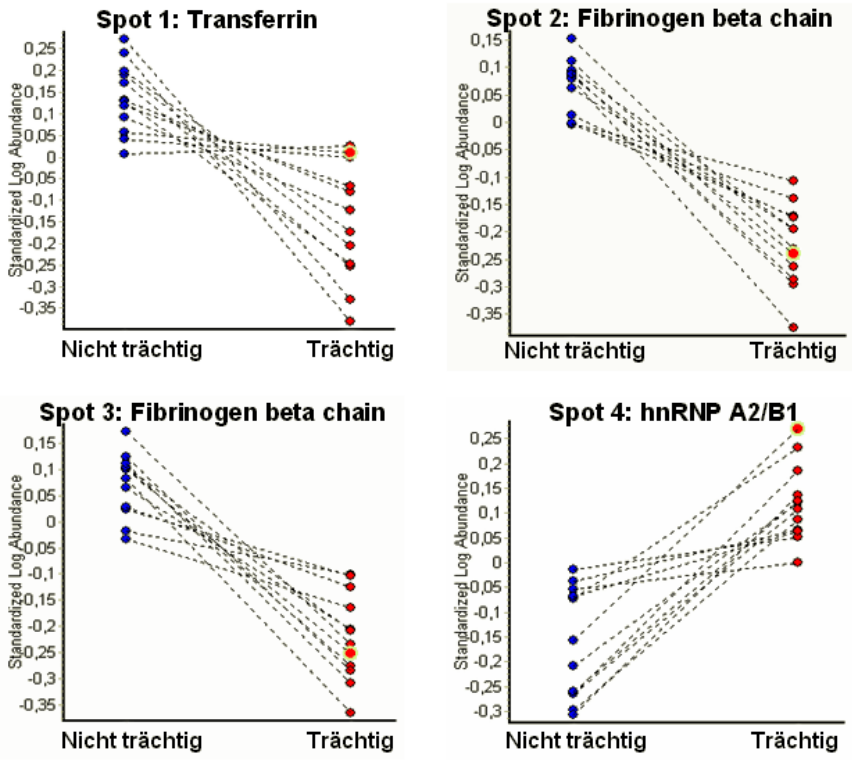


Abb. 6: Graphische Darstellung der differentiellen Proteine im pH-Bereich 6 – 9 (standardisiert, logarithmisch). Jeder blaue/rote Punkt bezeichnet einen Intensitätswert des jeweiligen Proteins für die Proben der nicht trächtigen/trächtigen Tiere. Die zusammengehörigen Werte eines bestimmten analytischen Replikats sind durch eine gestrichelte Linie miteinander verbunden. Drei Proteine (Transferrin, 2x Fibrinogen Beta Chain) haben eine erniedrigte Abundanz in den Proben der trächtigen Tiere, hnRNP A2/B1 eine erhöhte Abundanz.

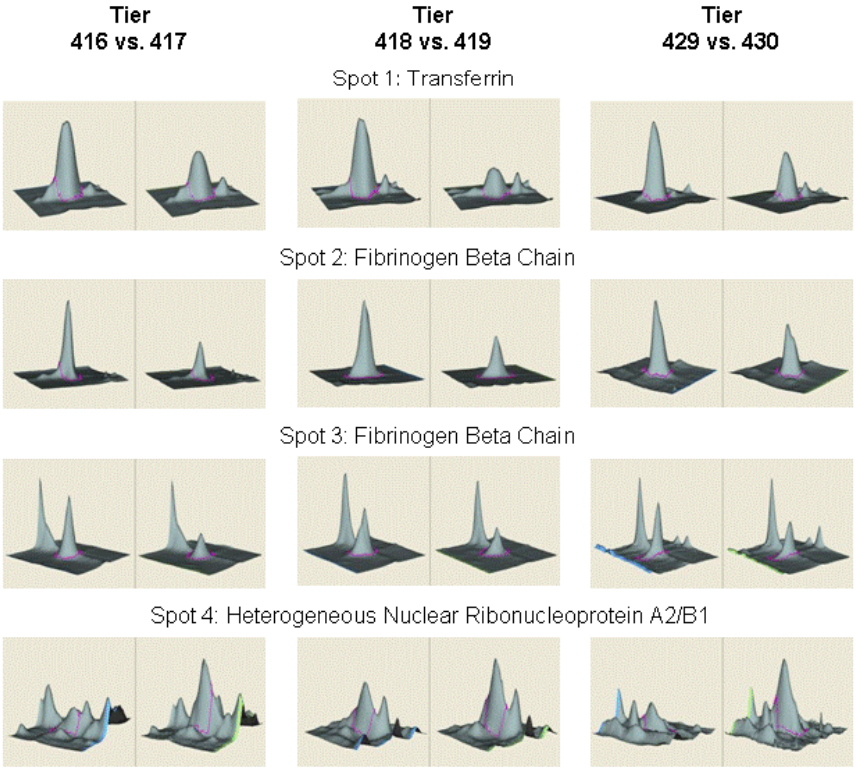


Abb. 7: 3D-Darstellung der Protein-*Spots* (pH 6 – 9). Für jedes Zwillingspaar sind zu jedem Protein die *Spot*-Volumina der nicht trächtigen (links) und der trächtigen (rechts) Tiere gezeigt. Die violetten Linien begrenzen die Fläche der *Spots* und werden vom Programm *DeCyder* errechnet. Eine Veränderung der *Spot*-Flächen durch den Anwender ist nicht möglich. Die z-Achse entspricht der Intensität.

Tab. 1: Daten der differentiellen und identifizierten Protein-*Spots* im pH-Bereich 6 – 9. Die Berechnung der normalisierten Abunddanzfaktoren sowie der p-Werte des *Student's* t-Test wurden vom Programm DeCyder™ automatisch berechnet.

Nr.	Proteinname	Vorkommen	Faktor	p-Wert
1	Transferrin	12 von 12	1,90 ▼	$2,0 \times 10^{-6}$
2	Fibrinogen Beta Chain	12 von 12	1,92 ▼	$2,2 \times 10^{-10}$
3	Fibrinogen Beta Chain	12 von 12	1,94 ▼	$2,0 \times 10^{-9}$
4	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP A2/B1)	12 von 12	1,91 ▲	$2,6 \times 10^{-7}$

▼: Abundanz in den Proben trächtiger Tiere erniedrigt. ▲: Abundanz in den Proben trächtiger Tiere erhöht.

Im pH-Bereich 4 – 7 sind insgesamt 12 Gele angefertigt worden, vier Gele pro Zwillingspaar aus jeweils zwei unabhängigen Lysaten. Die Gelbilder wurden entsprechend dem pH-Bereich 6 – 9 ausgelesen und prozessiert. Im DIA wurden im pH-Bereich 4 – 7 durchschnittlich 1180 *Spots* (± 120) detektiert. Die statistische Auswertung wurde gemäß dem pH-Bereich 6 – 9 im BVA mit den gleichen Parametern durchgeführt (*Spot* in 12 von 12 Gelen vorhanden; Faktor der Abundanzänderung eines Proteins ≥ 2; p-Wert des *Student's* t-Test ≤ 0,01). Im pH-Bereich 4 – 7 konnten drei Proteine ermittelt werden, die diese Kriterien erfüllten (**Abb. 8**, Seite 36). Protein Nr. 7 lag mit einem Faktor von 1,99 knapp unter dem Parameter von 2. Im Falle von *Spot* Nr. 7 war ein Doppel-*Spot* sichtbar. Dieser wurde in der Auswertung als ein *Spot* behandelt, da aufgrund des Algorithmus der Software hier die beiden *Spots* nicht als zwei getrennte aufgelöst werden konnten. Die Abundanzfaktoren der Proteine lagen zwischen 1,99 und 2,56. Die Abundanz jedes dieser Proteine war in den Endometriumproben der trächtigen Tiere erhöht verglichen mit den nicht trächtigen Tieren (**Abb. 9** und **10**, Seite 36 und 37). Die p-Werte des *Student's* t-Test lagen zwischen $1,9 \times 10^{-10}$ und $2,6 \times 10^{-13}$ (**Tab. 2**, Seite 37).

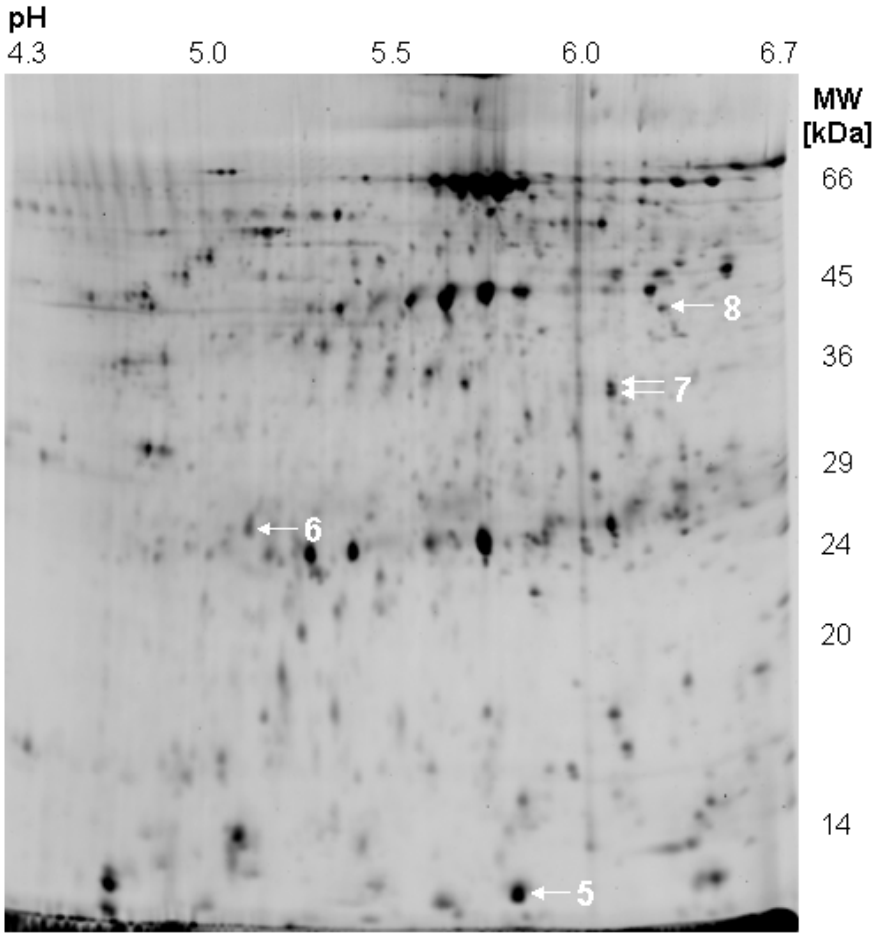


Abb. 8: Cy2-Gelbild des IPS im pH-Bereich 4,3 – 6,7. Es wurde ein Cy2-Gelbild gewählt, da dieses aus 50 µg eines 1:1-Gemischs (IPS) der Lysate zweier korrespondierender Zwillinge (Tiernummern 416/417) bestand und so beide Zustände repräsentiert. Die weißen Pfeile kennzeichnen die *Spots* der Proteine mit veränderter Abundanz. Wie unten beschrieben (ab S. 38) konnten die *Spots* identifiziert werden als: Acyl-CoA-Binding Protein (ACBP, 5), Rho GDP Dissociation Inhibitor (Rho GDI, 6), 20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (20 α-HSD, 7), Isocitrate Dehydrogenase (ICD, 8). Die Abundanzänderungen der Proteine sind in Abb. 9 und 10 graphisch dargestellt.

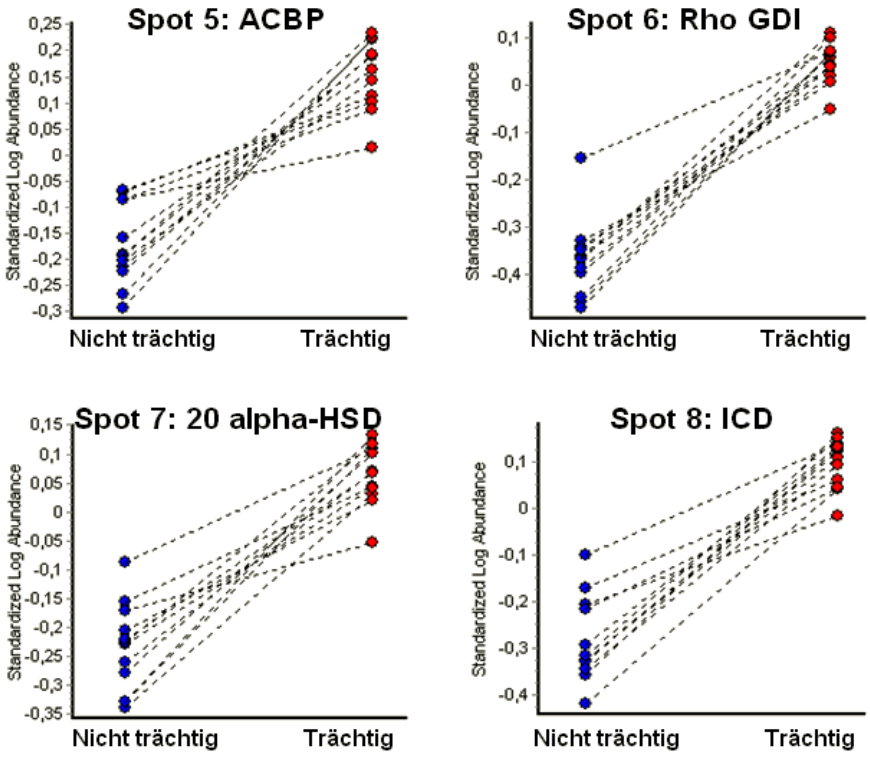


Abb. 9: Graphische Darstellung der vier abundanzveränderten Proteine im pH-Bereich 4 – 7. Die Identifizierungen der Proteine sind aus Gründen der Übersichtlichkeit vorweggenommen. Jeder blaue (nicht trächtig) und jeder rote (trächtig) Punkt repräsentieren einen Intensitätswert eines Gelbildes. Die jeweils roten und blauen Punkte, die durch eine gestrichelte Linie verbunden sind, stammen aus einem analytischen Replikat.

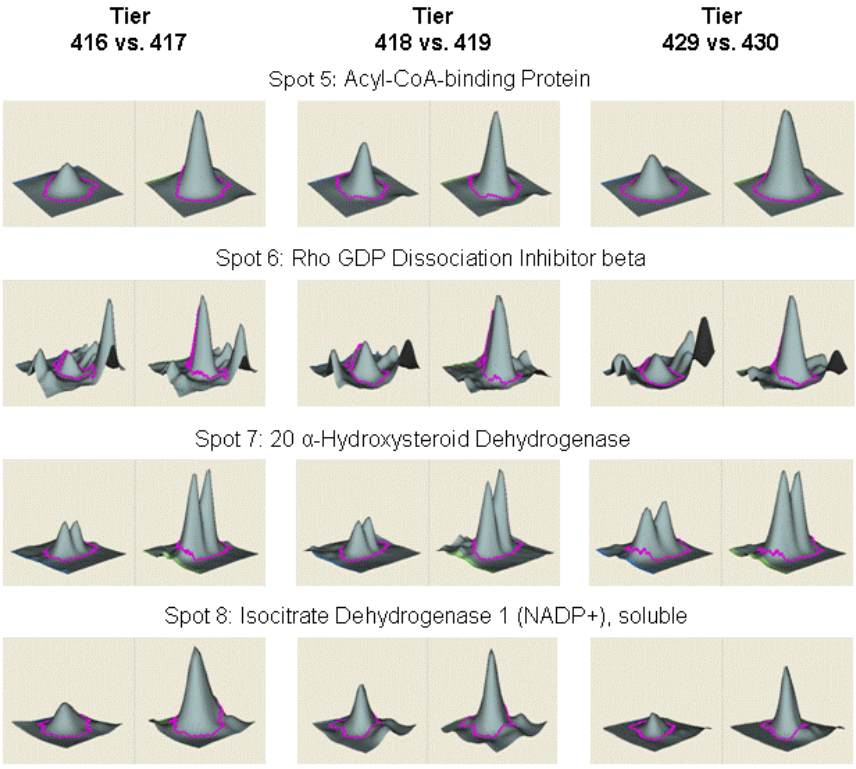


Abb. 10: 3D-Darstellung der Protein-*Spots* im pH-Bereich 4 – 7. Zu jedem Zwillingspaar und zu jedem Protein sind repräsentativ zwei korrespondierende *Spot*-Volumen der nicht trächtigen (links) und der trächtigen (rechts) Tiere abgebildet. Die violetten Linien makieren die Flächen der *Spots*. Diese werden vom Programm *DeCyder* errechnet. Eine Veränderung der *Spot*-Flächen durch den Anwender ist nicht möglich. Die z-Achse entspricht der Intensität.

Tab. 2: Daten der differentiellen und identifizierten Proteine im pH-Bereich 4 – 7. Die Berechnung der normalisierten Abunddanzfaktoren sowie der p-Werte des *Student's* t-Test wurden vom Programm DeCyder™ automatisch berechnet.

Nr.	Proteinname	Vorkommen	Faktor	p-Wert
5	Acyl-CoA-Binding Protein (ACBP)	12 von 12	2,12 ▲	$1,9 \times 10^{-10}$
6	Rho GDP Dissociation Inhibitor Beta (Rho GDI)	12 von 12	2,56 ▲	$2,6 \times 10^{-13}$
7	20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (20 α-HSD)	12 von 12	1,99 ▲	$1,4 \times 10^{-10}$
8	Isocitrate Dehydrogenase 1 ($NADP^+$), soluble (ICD)	12 von 12	2,38 ▲	$1,9 \times 10^{-11}$

▼: Abundanz in den Proben trächtiger Tiere erniedrigt. ▲: Abundanz in den Proben trächtiger Tiere erhöht.

Für die Identifizierung der vier Proteine aus der 2D-DIGE Analyse des Endometriums im pH-Bereich 6 – 9 wurden präparative Gele angefertigt, auf denen 250 µg Protein der Endometriumproben der monozygoten Zwillinge aufgetragen wurden. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt, die vier Proteine ausgestochen, tryptisch hydrolysiert und entsalzt. Die Identifizierung von *Spot* 1, 2 und 3 erfolgte mittels PMF Analyse. Die Datenbanksuche wurde mit *MASCOT* gegen den Mammalia-Teil der SwissProt-Datenbank durchgeführt. *Spot* 1 wurde eindeutig als Transferrin identifiziert (**Abb. 11**). *Spot* 2 und 3 wurden beide als F*ibrinogen Beta Chain* identifiziert (**Abb. 12** und **Abb. 13**, Seite 39). Die *Protein Scores* lagen für Transferrin und die beiden Fibrinogen *Spots* jeweils bei 205, 84 und 177 (> 58 entspricht $p < 0,05$). Die Sequenzabdeckungen lagen jeweils bei 47%, 53% und 58% (**Tab. 3**).

Tab. 3: Ergebnisse der PMF Analyse der Protein-Spots 1, 2 und 3 im pH-Bereich 6 – 9.

Nr.	Protein Name	*Accession* SwissProt	Prot. Score	Sequenz-Abdeckung	Gefundene Peptide
1	Transferrin	Q29443	205	47%	33
2	Fibrinogen Beta Chain	P02676	84	53%	29
3	Fibrinogen Beta Chain	P02676	177	58%	30

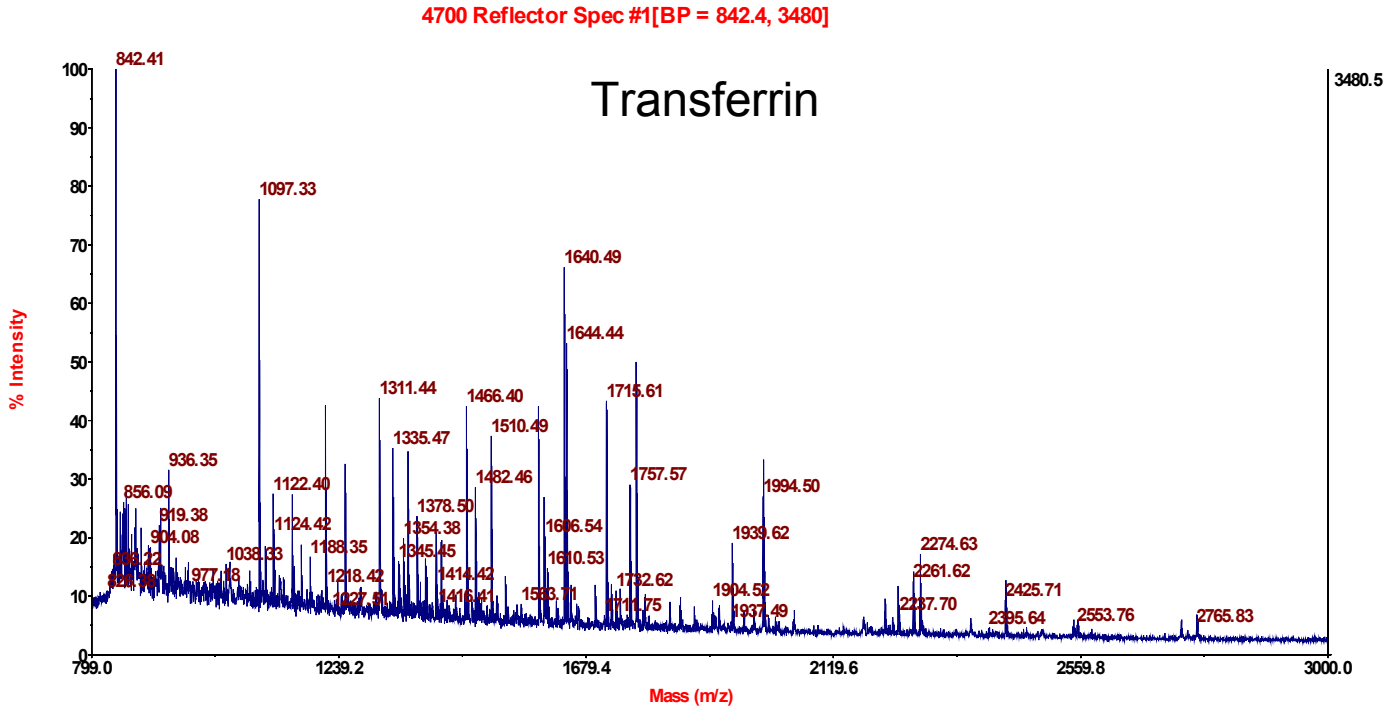


Abb. 11: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins Transferrin (*Spot* Nr. 1).

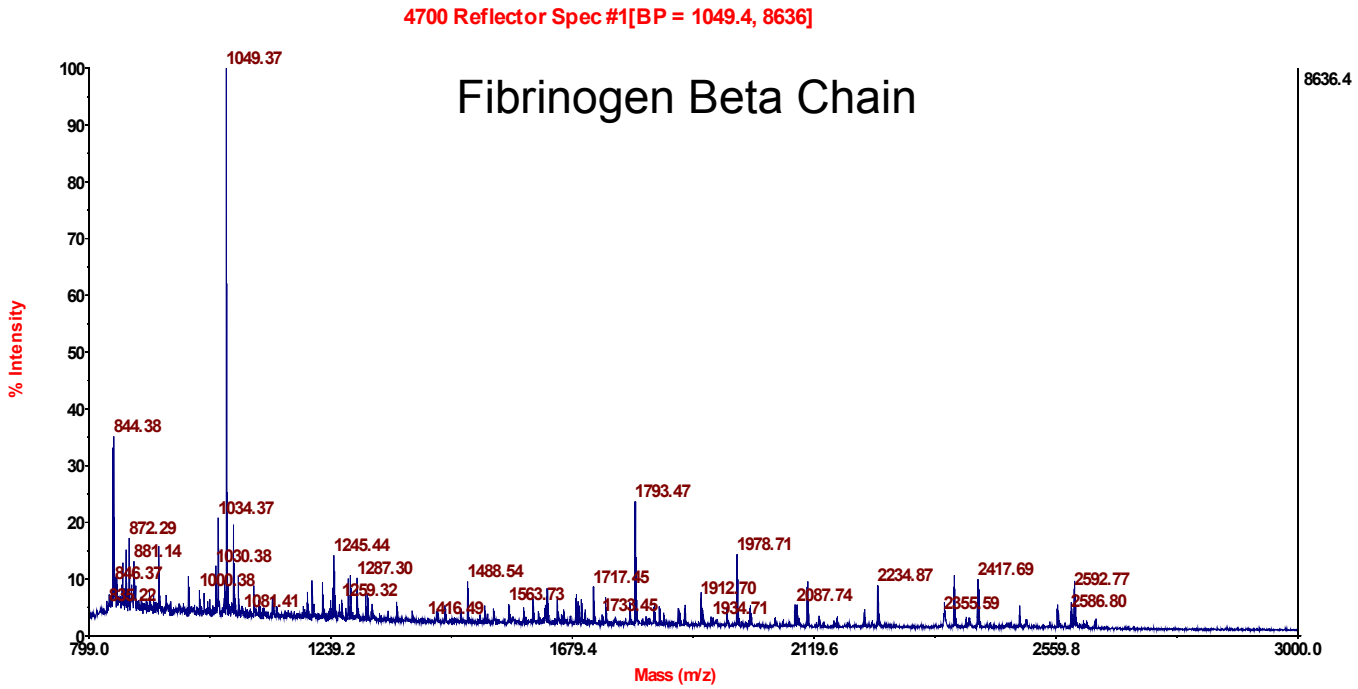


Abb. 12: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins Fibrinogen Beta Chain (*Spot* Nr. 2).

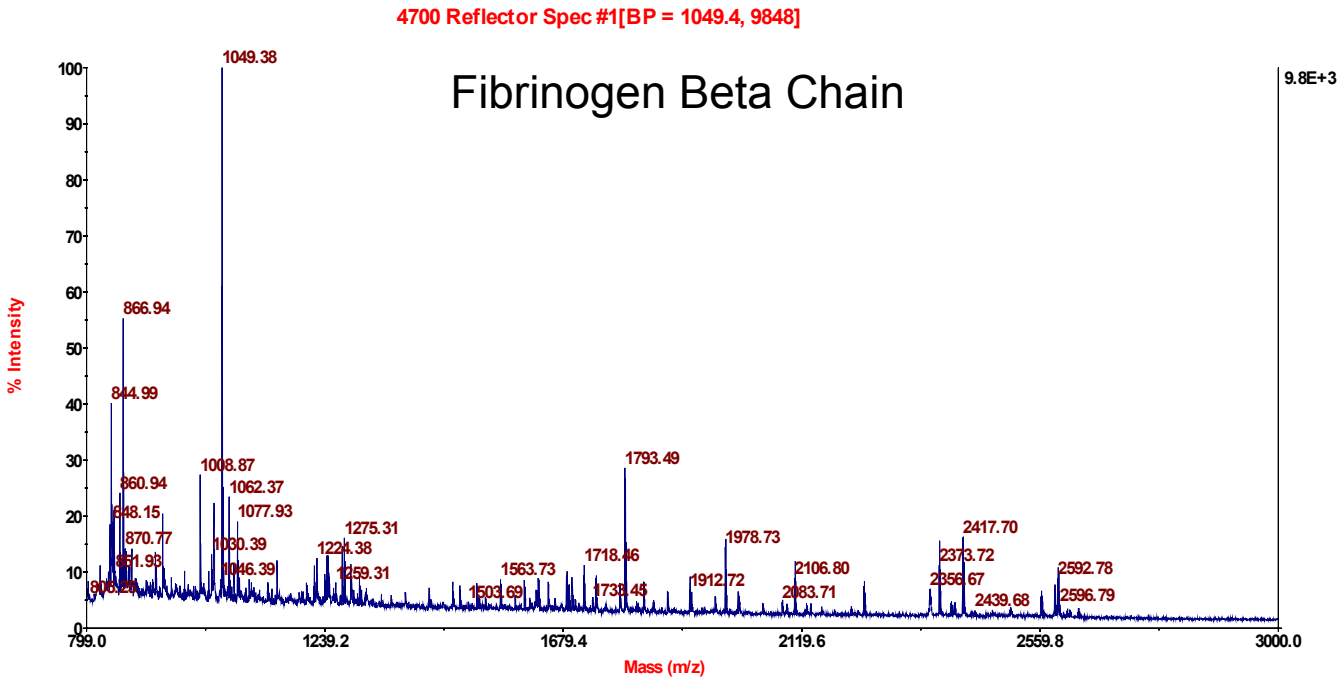


Abb. 13: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins Fibrinogen Beta Chain (*Spot* Nr. 3).

Eine Identifizierung von *Spot* 4 war durch eine PMF Analyse alleine nicht möglich (**Abb. 14**). Das Protein konnte jedoch durch eine MALDI-TOF/TOF Analyse eindeutig als *heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein* (hnRNP A2/B1) identifiziert werden. Der *Protein Score* betrug 100, die Sequenzabdeckung 11%. Drei Peptide des Proteins konnten mit einem *MASCOT Ion Score* zwischen 30 und 38 detektiert werden (**Tab. 4** und **Abb. 15 – 17**, Seiten 41 und 42). *Ion Score* Werte > 30 entsprechen einem p-Wert < 0,05. *Protein Score* und *Ion Score* Werte wurden von dem Programm *MASCOT* automatisch errechnet.

Tab. 4: Ergebnis der MALDI-MS/MS Analyse von hnRNP A2/B1 (*Spot* Nr. 4, pH 6 – 9).

Protein Nr. 4	***Accession* SwissProt**	***Prot. Score***	**Nominale Masse (M_r)**	**pI**	**Seq. Abd.**	***Ion Score***	**Peptid Sequenz**
hnRNP A2/B1	IPI00691167	100	37407	8,97	11%	31	GGNFGFGDSR
						30	GGGGNFGPGPGSNFR
						38	GFGFVTFDDHDPVDK

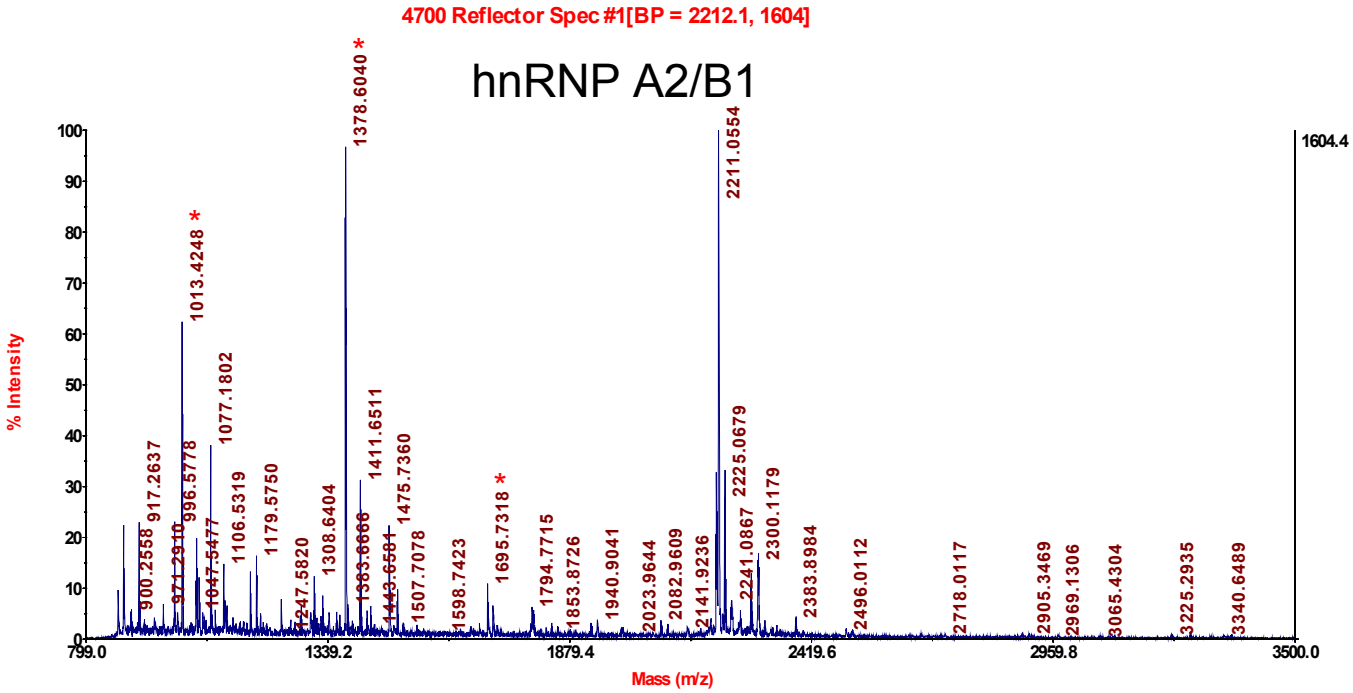


Abb. 14: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins hnRNP A2/B1 (*Spot* Nr. 4). Die roten Sterne markieren die drei Vorläufer-Ionen der Tandem Massenspektrometrie Analyse (Abb. 15 – 17).

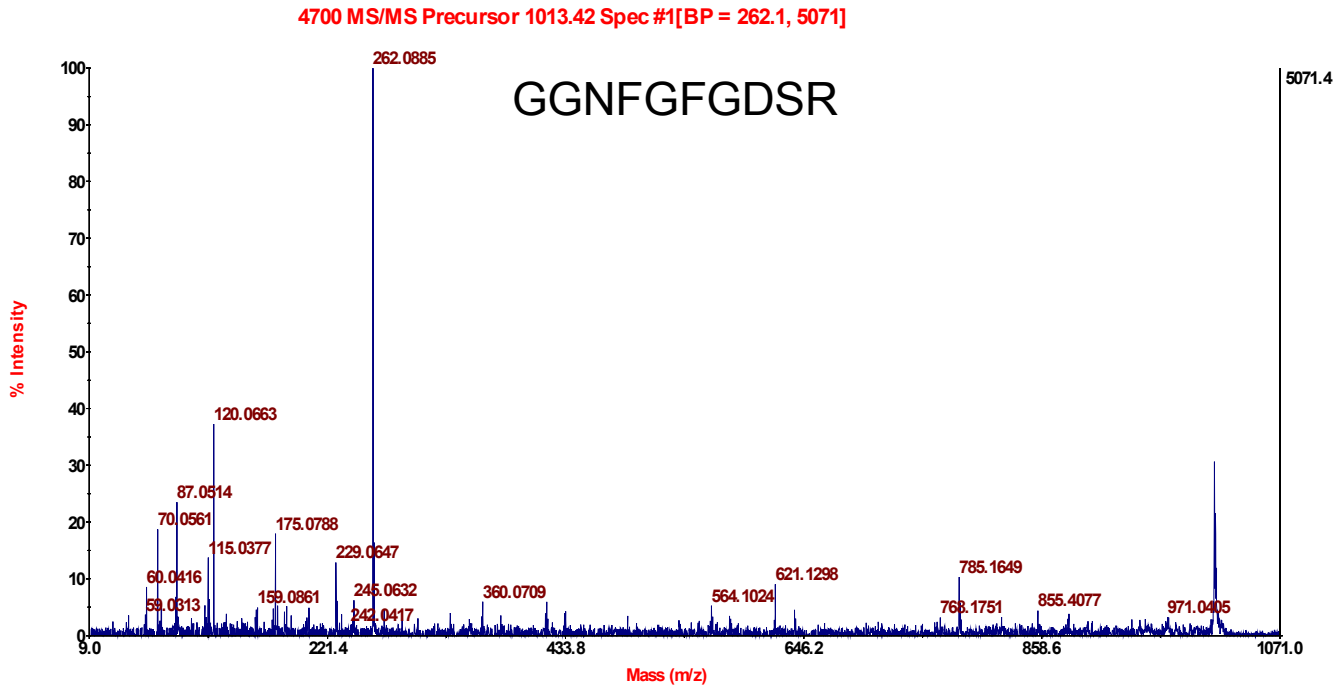


Abb. 15: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1013.42 Da des Proteins hnRNP A2/B1. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz GGNFGFGDSR.

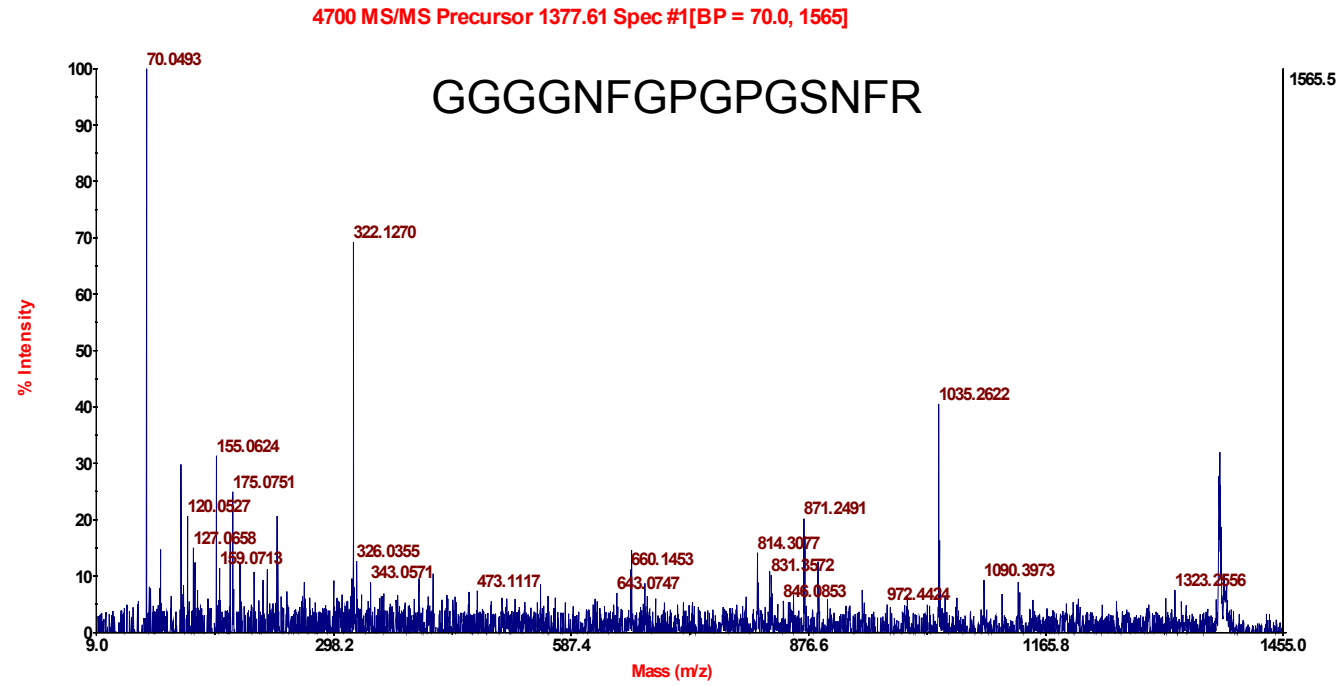


Abb 16: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1377.61 Da des Proteins hnRNP A2/B1. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz GGGGNFGPGPGSNFR.

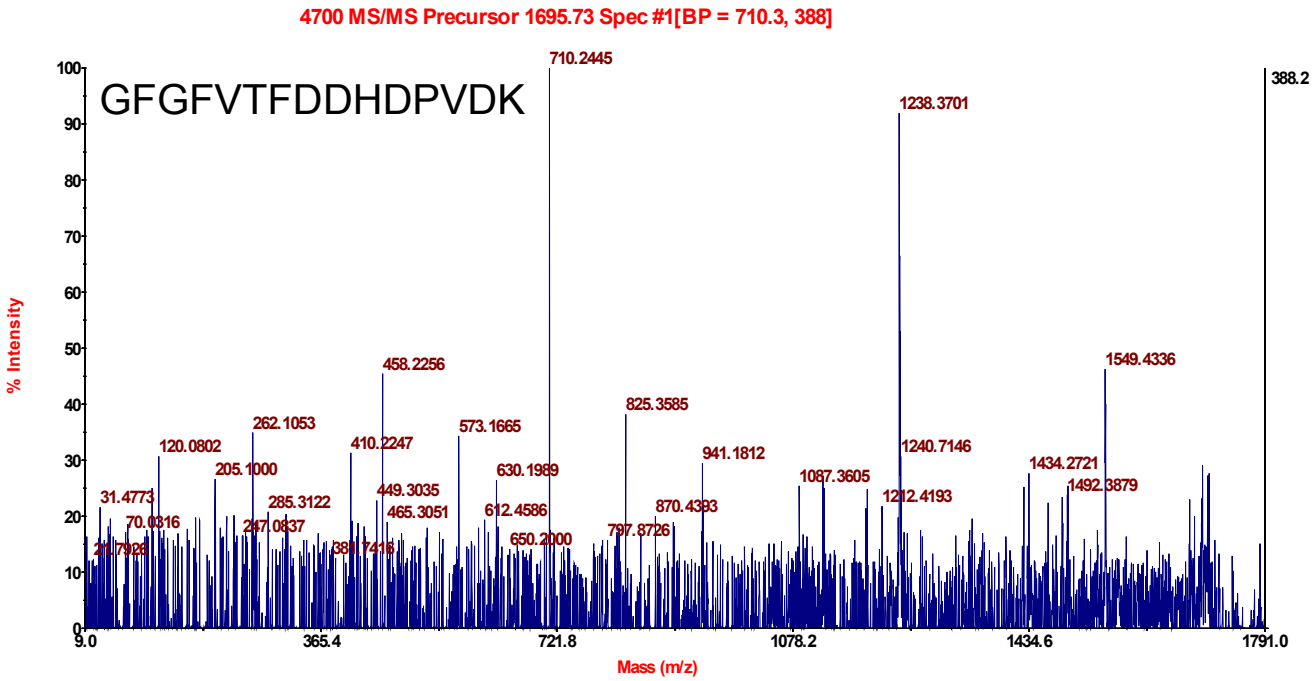


Abb. 17: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1695.73 Da des Proteins hnRNP A2/B1. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz GFGFVTFDDHDPVDK.

Im pH-Bereich 4 – 7 wurden für die massenspektrometrische Analyse der vier Protein-*Spots* aus den 2D-DIGE Experimenten des Endometriums präparative, Coomassie-gefärbte Gele angefertigt. Pro Gel wurden 500 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Protein-*Spots* wurden aus den präparativen Gelen ausgestochen, tryptisch hydrolysiert und entsalzt. Drei der Proteine *Spot* 6, 7 und 8 wurden mittels PMF Analyse identifiziert: *Spot* 6 wurde als *Rho GDP Dissociation Inhibitor Beta* (Rho GDI) identifiziert, *Spot* 7 als *20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase* (20 α-HSD) und *Spot* 8 als *Isocitrate Dehydrogenase 1 (NADP$^+$), soluble* (ICD) (**Abb. 18 – 20**, Seiten 43 und 44). Die Datenbanksuche wurde mit *ProFound* gegen den Mammalia-Teil der NCBInr Datenbank durchgeführt. Die z-Werte lagen jeweils zwischen 2,37 und 2,39. Ein z-Wert von ≥ 1,645 entspricht $p \leq 0,05$. Die z-Werte wurden von dem Programm *ProFound* automatisch errechnet. Die Sequenzabdeckungen lagen für Rho GDI bei 78%, für 20 α-HSD bei 71% und für ICD bei 55% (**Tab. 5**, Seite 43). Der Doppel-*Spot* der 20 α-HSD im Fluoreszenz-Gelbild erschien durch das geringe Auflösungsvermögen Coomassie-gefärbter, präparativer 2D-Gel nur als ein einzelner *Spot*. Bei der PMF Analyse dieses Proteins konnte ausschließlich die 20 α-HSD identifiziert werden, d.h. der Doppel-*Spot* könnte durch zwei verschiedene Isoformen der 20 α-HSD entstanden sein.

Tab. 5: Ergebnisse der PMF-Analyse der *Spots* 6, 7 und 8 im pH-Bereich 4 – 7.

Nr.	Protein Name	*Accession* NCBInr	z-Wert	Sequenz-Abdeckung	Gefundene Peptide
6	Rho GDI	gi/28461215	2,37	78%	15
7	20 α-HSD	gi/265404	2,37	71%	21
8	ICD	gi/30794318	2,39	55%	29

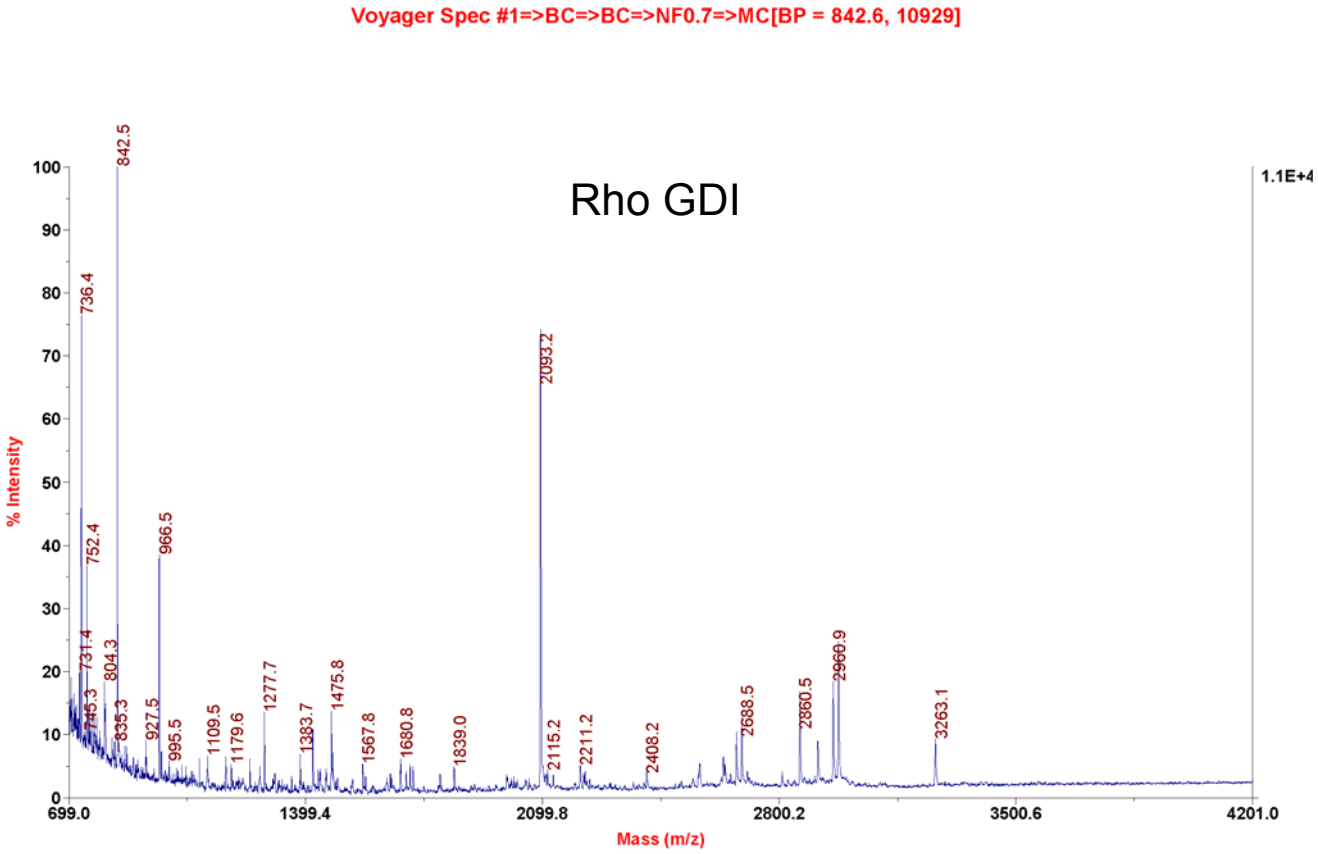


Abb. 18: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins Rho-GDI (*Spot* Nr. 6).

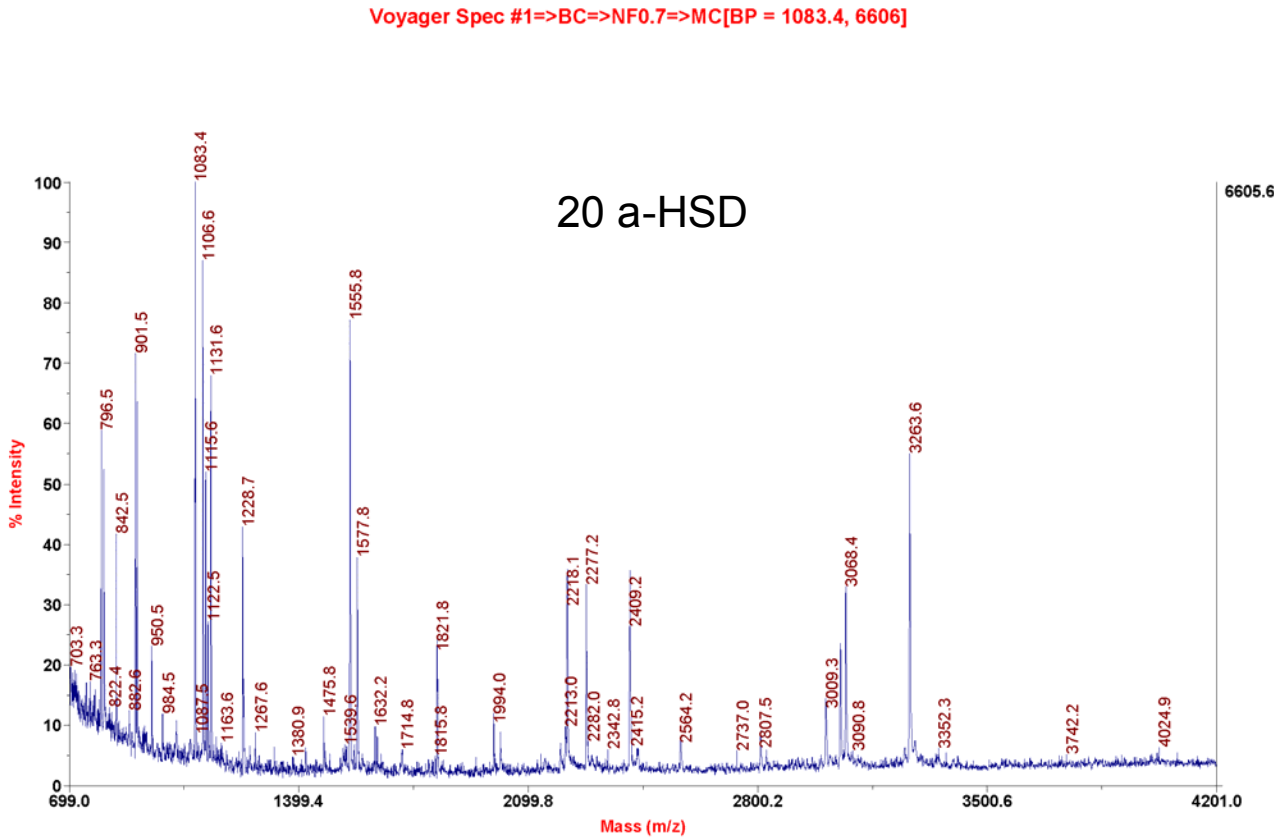


Abb. 19: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins 20 α-HSD (*Spot* Nr. 7).

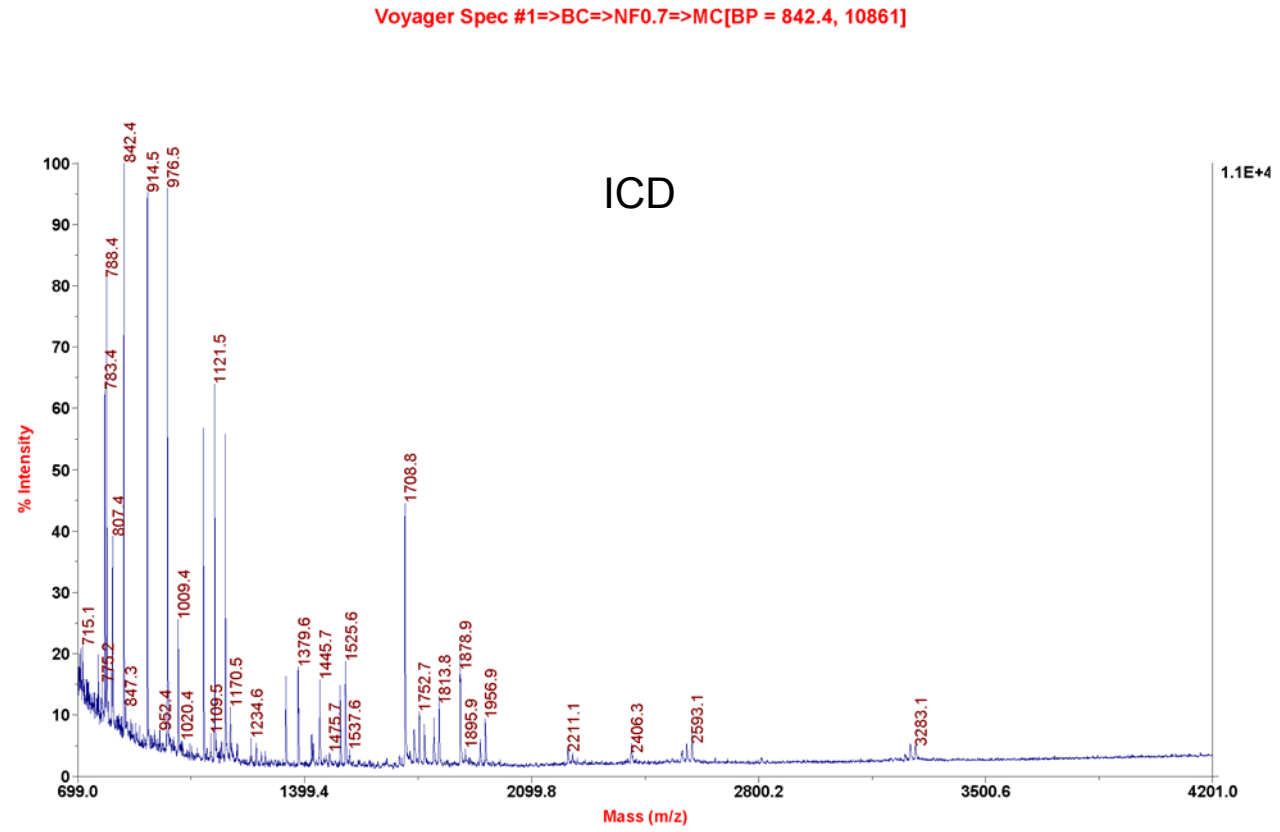


Abb. 20: Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) des Proteins ICD (*Spot* Nr. 8).

Spot 5 wurde durch eine MALDI-TOF/TOF Analyse eindeutig als *Acyl-CoA-Binding Protein* (ACBP) identifiziert (**Abb. 21 – 25**, Seiten 45 – 47). Die MS/MS-Spektren wurden mit *MASCOT* gegen die Swiss-Prot Datenbank gesucht. Der *Protein Score* betrug 219, die Sequenzabdeckung 38%. Vier Peptide des Proteins konnten mit einem *Ion Score* zwischen 51 und 87 detektiert werden (**Tab. 6**). *Ion Score* Werte > 30 entsprechen einem p-Wert < 0,05. *Protein Score* und *Ion Score* Werte wurden von dem Programm *MASCOT* automatisch errechnet.

Tab. 6: Ergebnis der MALDI-MS/MS Analyse vom *Acyl-CoA-binding Protein*.

Protein Nr. 5	***Accession* SwissProt**	***Prot. Score***	**Nominale Masse (M_r)**	**pI**	**Seq. Abd.**	***Ion Score***	**Peptid Sequenz**
ACBP	P07107	219	9913	6,11	38%	87	SQAEFDKAAEEVK
						86	AYIDKVEELK
						61	AKWDAWNELK
						51	WDAWNELK

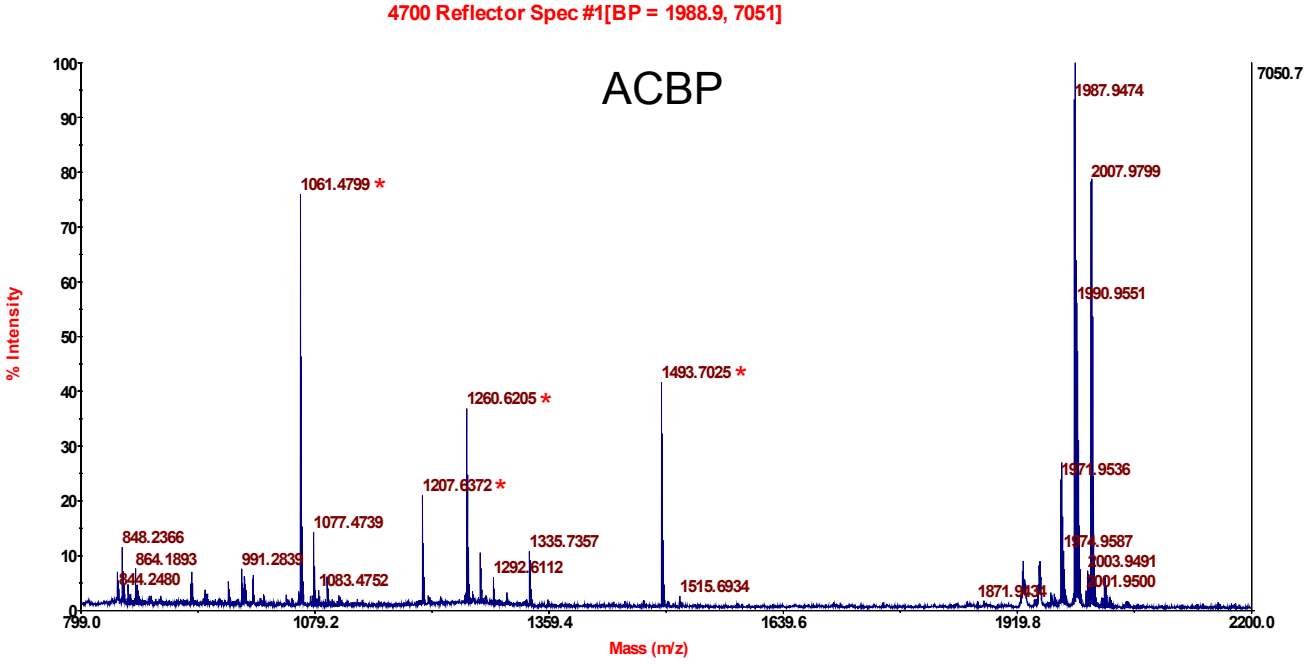


Abb. 21: Spektrum des Peptidmassen Fingerabdrucks (PMF) des Proteins ACBP (*Spot* Nr. 5). Im Spektrum sind die vier Vorläufer-Ionen der MS/MS-Analyse (Abb. 22 – 25) mit roten Sternen markiert.

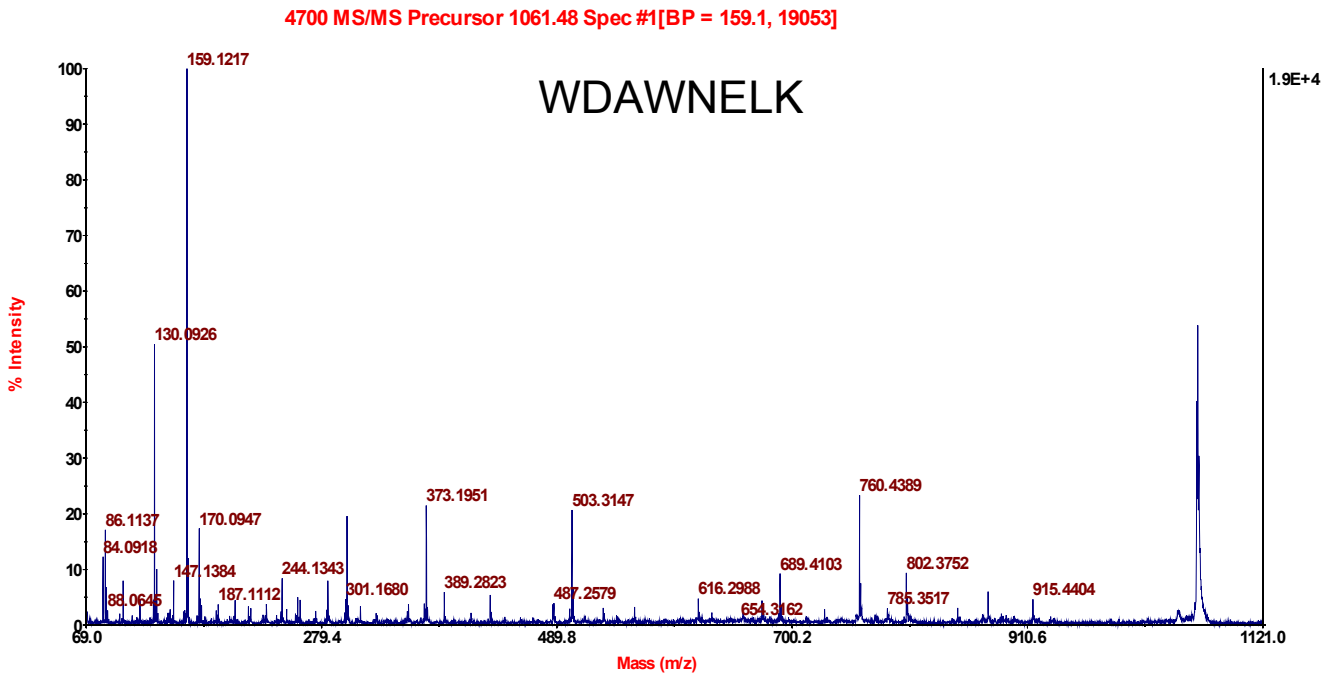


Abb. 22: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1061.48 Da des Proteins ACBP. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz WDAWNELK.

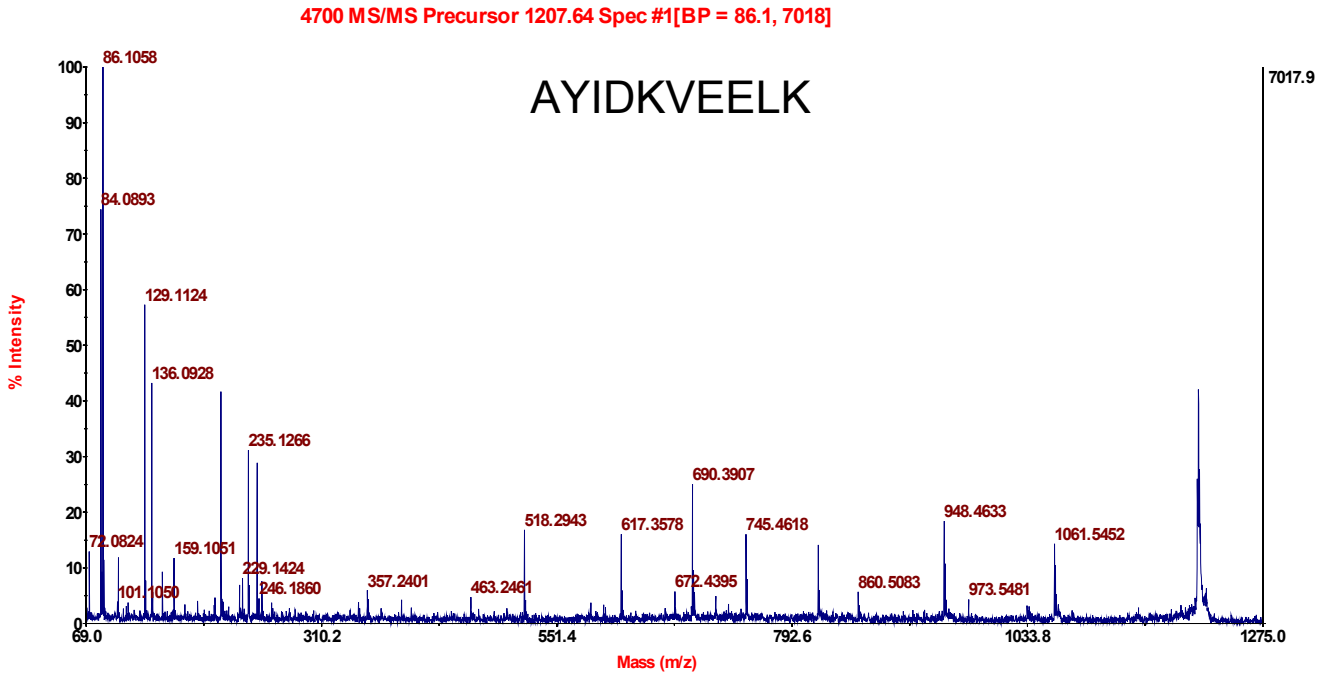


Abb. 23: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1207.64 Da des Proteins ACBP. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz AYIDKVEELK.

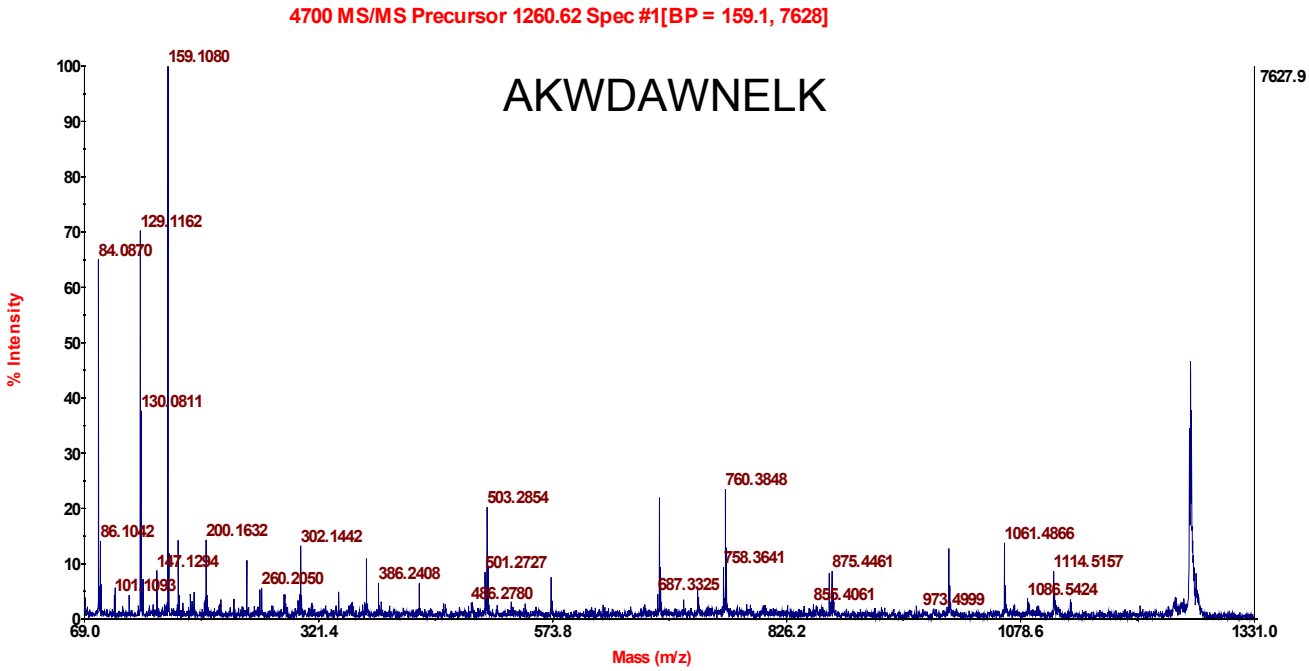


Abb. 24: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1260.62 Da des Proteins ACBP. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz AKWDAWNELK.

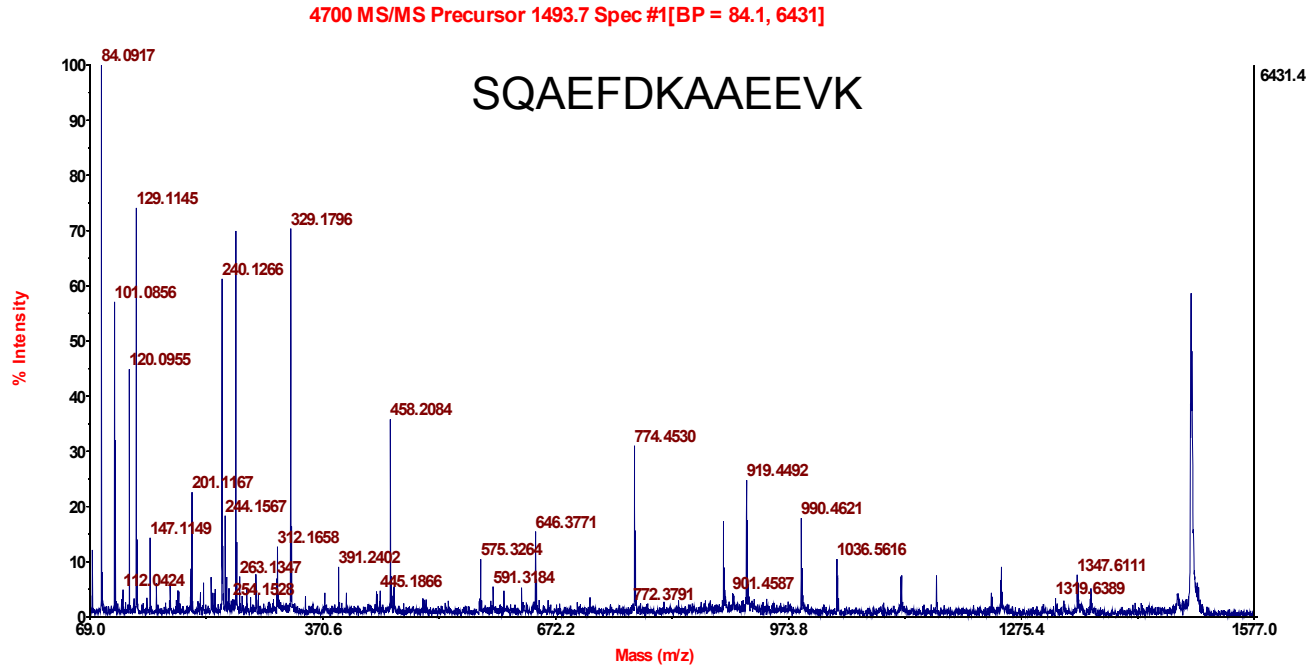


Abb. 25: MS/MS-Spektrum des Vorläufer-Ions mit der Masse 1493.70 Da des Proteins ACBP. Das detektierte Peptid hatte die Sequenz SQAEFDKAAEEVK.

3.2 Analyse ungereifter versus in vitro gereifter boviner Oozyten

Für den Vergleich ungereifter mit in vitro gereiften bovinen Oozyten mit der 2D-DIGE Technik (Sättigungsmarkierung) wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus Ovarien von Schlachthoftieren gewonnen. Von jedem Ovar konnten 10 – 15 KOK entnommen werden. Eine Hälfte der KOK wurde in vitro maturiert (IVM), die andere Hälfte diente als ungereifte Kontrolle. Die KOK wurden mittels Stereomikroskopie morphologisch charakterisiert. Die Oozyten wurden von den Kumuluszellen getrennt (Denudation). Insgesamt standen sechs biologische Replikate zur Verfügung, d.h. sechs Ansätze ungereifter Oozyten und sechs Ansätze in vitro gereifter Oozyten. Jeder Ansatz enthielt 150 Oozyten, für die differentielle Analyse wurden somit 1800 Oozyten präpariert. Jede der Proben wurde unabhängig voneinander lysiert. Die Proteinkonzentrationen, bestimmt mittels Bradford, lagen zwischen 0,74 mg/ml und 1,08 mg/ml. Pro Probe lag die Proteinausbeute zwischen 11,1 µg und 16,2 µg. Die Gesamtausbeute aller Ansätze betrug 163 µg (**Abb. 26**). Der Gesamtproteingehalt einer Oozyte lag nach der in dieser Arbeit durchgeführten Proteinbestimmung somit bei einem Durchschnittswert von etwa 90 ng.

Tag der Präparation	1		2		3		4		5		6	
Charakterisierung der KOK	↓		↓		↓		↓		↓		↓	
Anzahl KOK/Tag	300		300		300		300		300		300	
1:1-Aufteilung jedes Pools	↙	↘	↙	↘	↙	↘	↙	↘	↙	↘	↙	↘
Anzahl KOK	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
IVM für jeweils 150 KOK	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Reifungszustand/KOK	U	G	U	G	U	G	U	G	U	G	U	G
Denudation/Charakt./Lagerung	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Reifungszustand/Oozyten	U	G	U	G	U	G	U	G	U	G	U	G
Unabhängiges Lysieren jeder Probe	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
12 unabhängige Lysate (L)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12

Proteingehalt Ø 13,6 µg pro Probe (= 163 µg Gesamtprotein)

Abb. 26: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung für die Analyse ungereifter versus in vitro gereifter boviner Oozyten. Pro Präparationstag resultierten etwa 300 KOK. 150 KOK eines jeden Ansatzes blieben ungereift (U), die jeweils übrigen 150 KOK wurden in vitro gereift (G). Nach der Denudation wurde jeder der 12 Ansätze unabhängig voneinander lysiert. Im Durchschnitt resultierte pro Probe ein Proteingehalt von 13,6 µg, d.h. alle 12 Proben (= 1800 Oozyten) ergaben ein Gesamtproteingehalt von 163 µg.

Die Markierungsreaktion mittels der Sättigungsfarbstoffe Cy3 und Cy5 wurde vor der Analyse optimiert, um das exakte Verhältnis zwischen Protein- und Farbstoffmenge zu ermitteln. Diese Optimierung wurde aufgrund der stark limitierten Probenmenge der Oozyten mit bovinen Oviduktzellen durchgeführt. Für die Optimierung wurden sechs Gele angefertigt, auf denen jeweils 5 µg Oviduktzell-Lysat mit Cy3 und 5 µg mit Cy5 markiert wurden (**Tab. 7**). Das Verhältnis für die Markierung der Oozytenproteine konnte durch die Verwendung der Oviduktzellen im Voraus abgeschätzt werden. Für die Markierungsreaktion des Proteinlysats der Oozyten musste das Verhältnis um einen weiteren Schritt erhöht werden. Folgendes Verhältnis konnte als optimal für die Oozytenproteine ermittelt werden: Für die vollständige Markierung von 5 µg Protein mit *CyDye* wurden 2,5 µl einer 2 mM TCEP-Lösung und 5 µl einer 2 mM CyDye-Lösung benötigt. Das Gesamtvolumen der Markierungsreaktion betrug 16,5 µl und wurde vor der IEF mit dem entsprechenden Volumen 2x Probenpuffer (2x SB) versetzt. Durch das optimale Verhältnis von Protein- zu Farbstoffmenge konnte eine sehr gute Auflösung der Proteine erreicht werden (**Abb. 27**, Seite 50).

Tab. 7: Eingesetzte Volumina für die Optimierung der Markierungsreaktion mit Sättigungsfarbstoff. Aufgrund der limitierten Oozytenproben wurde die Optimierung mit Oviduktzellen (Gele 1 – 6) durchgeführt. Gel 7 zeigt die letztendlich eingesetzten Volumina für die Markierung der Oozytenproben. Nach der Markierungsreaktion wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen 2x Probenpuffer (2x SB) gemischt.

Gel	Material	Proteinmenge (µg)	Probenvol. (µl)	2 mM TCEP (µl)	2 mM CyDye (µl)	Vol. 2x SB (µl)
1	Ovidukt	5	9	0,5	1	10,5
2	Ovidukt	5	9	0,75	1,5	11,25
3	Ovidukt	5	9	1	2	12
4	Ovidukt	5	9	1,25	2,5	12,75
5	Ovidukt	5	9	1,5	3	13,5
6	Ovidukt	5	9	2	4	15
7	Oozyten	5	9	2,5	5	16,5

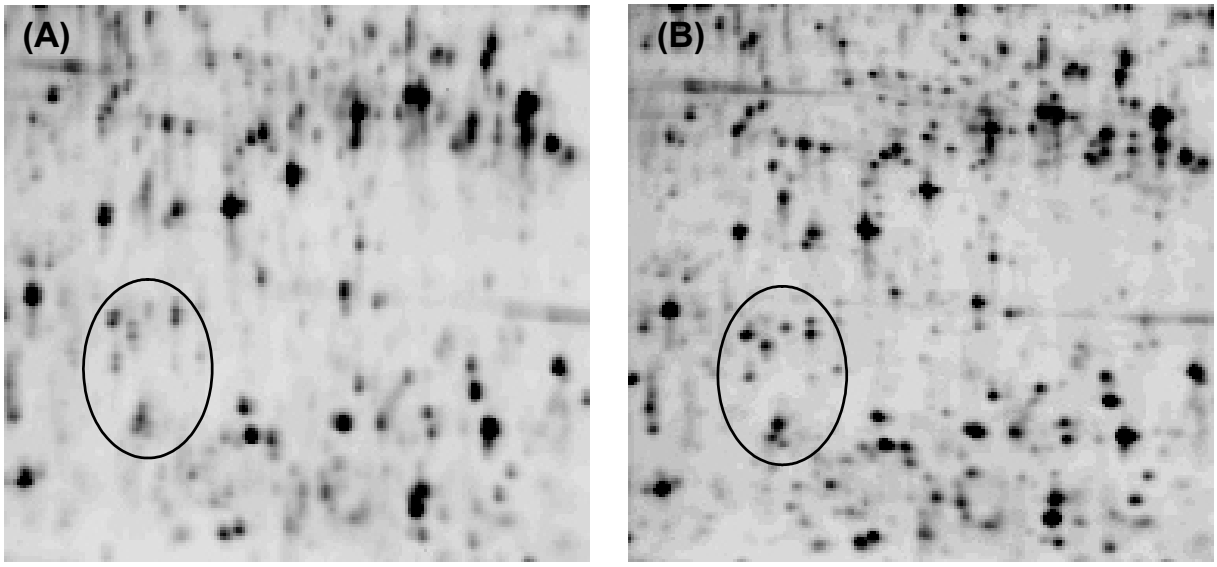


Abb. 27: Optimierung der Markierungsreaktion mit Sättigungsfarbstoff an Oviduktzellen. Gezeigt sind zwei einander entsprechende Gelausschnitte aus einem Optimierungsexperiment. (A) entspricht einem Ausschnitt des Gels Nr. 1, (B) entspricht einem Ausschnitt des Gels Nr. 6 in Tab. 7. In (A) ist das Verhältnis zwischen Farbstoff und Protein zu niedrig. In (B) ist das optimale Verhältnis von Protein zu Farbstoff gegeben. Die eingekreiste Region zeigt deutlich den Unterschied bezüglich der Bildung von Doppelspots. Die gesamte Auflösung ist durch die Optimierung verbessert (B).

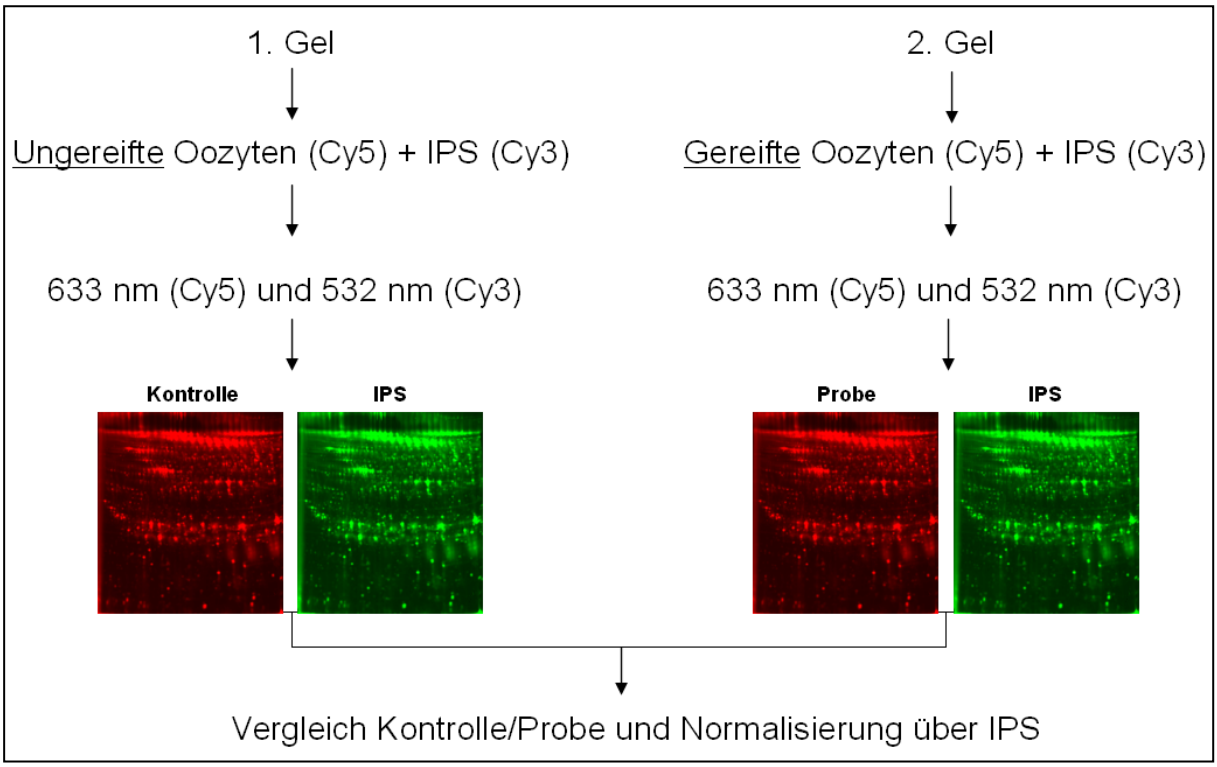


Abb. 28: Aufbau eines analytischen Replikats. Aufgrund der Verfügbarkeit von zwei verschiedenen Farbstoffen (Cy3 und Cy5) setzt sich ein analytisches Replikat aus zwei 2D-Gelen zusammen. Im ersten Gel wird die Kontrolle (Ungereifte Oozyten, Cy5) plus IPS (Cy3), im zweiten Gel die Probe (Gereifte Oozyten, Cy5) plus IPS (Cy3) aufgetragen. Beide Gele werden jeweils bei zwei verschiedenen Wellenlängen eingelesen. Pro 2D-Gel resultieren zwei digitale Gelbilder. Die Gelbilder von Kontrolle und Probe werden über das Programm *DeCyder* miteinander verglichen und über den IPS normalisiert.

Entsprechend der durchgeführten Optimierung wurden für die Analyse der Oozyten von jedem der 12 unabhängigen Lysate insgesamt 1,25 µg mit Cy5 markiert. Der IPS setzte sich in dieser Analyse zu gleichen Mengenanteilen aus allen 12 Einzelproben zusammen. Vom IPS wurden 10 µg mit Cy3 markiert. Da im Gegensatz zur Markierung mit Minimalfarbstoff bei der Sättigungsmarkierung nur zwei Farbstoffe erhältlich sind, war es nötig zwei Gele pro Experiment anzufertigen (**Abb. 28**, Seite 50). Auf dem ersten Gel wurden 0,25 µg Cy5-markierter Kontrolle (ungereifte Oozyten) zusammen mit 0,25 µg des Cy3-markierten IPS aufgetrennt (0,5 µg Protein pro 2D-Gel insgesamt). Durch die Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (633 und 532 nm) resultierten zwei Gelbilder. Auf dem zweiten Gel wurden 0,25 µg Cy5-markierte Probe (gereifte Oozyten) zusammen mit 0,25 µg Cy3-markiertem IPS aufgetrennt. Es resultierten ebenfalls zwei Gelbilder. Pro biologischem Replikat und pH-Bereich 4 – 7 und 6 – 9 wurden zwei Gele angefertigt. Die Analyse der Oozyten umfasste damit insgesamt 24 Gele (48 Gelbilder). Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels des Programms DeCyder™ 6.5. In der so genannten „Differentiellen In-Gel Analyse“ (DIA) wurden die *Spots* detektiert. In den Gelbildern des pH-Bereiches 4 – 7 wurden im Durchschnitt 2244 (± 100) *Spots* detektiert, im pH 6 – 9 konnten 1291 (± 65) *Spots* detektiert werden. Mit der Biologischen Varianz Analyse (BVA) erfolgte die automatische Zuordnung aller korrespondierender *Spots* (*Matching*) innerhalb der Gelbilder eines pH-Gradienten. Etwa 10% der *Spot*s wurden manuell nachgearbeitet. Es folgte die statistische Auswertung. In jedem der beiden pH-Bereiche der differentiellen Analyse mussten die Proteine folgende Kriterien erfüllen, um als signifikant verändert zu gelten: Abundanzverhältnis eines Proteins von Kontrolle zu Probe bzw. von Probe zu Kontrolle Faktor ≥ 2; *Spot* in 12 von 12 Gelen vorhanden; $p \leq 0{,}01$ (*Student's* t-Test). Es wurde der p-Wert des gepaarten *Student's* t-Test unter Anwendung der *False Discovery Rate* (FDR) berechnet. Zwei Protein-*Spots* erfüllten die Kriterien im pH-Bereich 6 – 9 (**Abb. 29**, Seite 53), 36 Proteine im pH-Bereich 4 – 7 (**Abb. 30**, Seite 53). Von den insgesamt 38 veränderten Protein-*Spots* waren 21 in ihrer Abundanz in gereiften Oozyten erniedrigt, 17 waren in gereiften Oozyten erhöht.

Die relativen Abundanzänderungen der beiden *Spots* (Nr. 1 und 2) im pH-Bereich 6 - 9 waren in den Proben der gereiften Oozyten erniedrigt und betrugen 2,81 und 3,28. Die beiden *Spots* waren in 12 von 12 Gelen vorhanden. Die p-Werte des *Student's* t-Test lagen bei $2{,}0 \times 10^{-9}$ bzw. $4{,}5 \times 10^{-8}$ (**Tab. 8**, Seite 52). *Spot* Nr. 26

lag im Überlappungsbereich der beiden verwendeten pH-Gradienten und war im pH-Bereich 6 – 9 in 9 von 12 Gelen vorhanden. Der Abundanzfaktor lag bei 2,15 (in gereiften Oozyten erniedrigt) im pH 6 – 9. Der p-Wert des *Student's* t-Test lag bei 0,19. Der *Spot* Nr. 26 erfüllte die angesetzten Kriterien im pH-Bereich 4 – 7. Die Abundanzänderungen der 36 Proteine im pH 4 - 7 lagen zwischen 2,02 und 10,34 (**Tab. 9**, Seite 54). Die p-Werte des *Student's* t-Test lagen zwischen 8,8 x 10^{-7} und 1,3 x 10^{-4}. Von den 13 Proteinen, die später identifiziert werden konnten (Siehe ab S. 57), waren vier in ihrer Abundanz in den gereiften Oozyten erhöht, neun waren erniedrigt (**Abb. 31**, Seiten 55 und 56).

Bei der Sättigungsmarkierung ist nicht auszuschließen, dass sich die beiden Farbstoffe durch Interferenz gegenseitig beeinflussen [82]. Dies könnte zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Um dies zu prüfen, wurde in jedem der zwei pH-Bereiche ein *Same-Same*-Experiment (SSE) durchgeführt. Dazu wurden 3,5 µg eines Pools aller 12 Oozytenproben mit Cy3 markiert. Ein weiteres Aliquot von 3,5 µg wurde mit Cy5 markiert. Im pH-Bereich 4 – 7 als auch 6 – 9 wurden je zwei technische Replikate angefertigt. Pro 2D-Gel wurden 0,25 µg Cy3-markiertes sowie 0,25 µg Cy5-markiertes Probengemisch aufgetragen. Erfolgt keine relevante Interferenz, so sollten die Verhältnisse der Intensitätswerte 1 betragen. Die Faktoren der beiden *Spots* aus dem SSE im pH-Bereich 6 – 9 betrugen 1,03 und 1,04 (**Tab. 8**). Die Faktoren der *Spots* aus dem SSE im pH-Bereich 4 – 7 lagen zwischen 1,00 und 1,35 (**Tab. 9**, Seite 54).

Tab. 8: Daten der Protein-Spots mit veränderter Abundanz der 2D-DIGE Analyse der Oozyten im pH-Bereich 6 – 9.

Nr.	Proteinname	Vorkommen	Faktor	p-Wert	Faktor (SSE)
1	--	12 von 12	3,28 ▼	4,5 x 10^{-8}	1,03 ▼
2	--	12 von 12	2,81 ▼	2,0 x 10^{-9}	1,04 ▼
26	--	9 von 12	2,15 ▼	0,19	1.08 ▲

▼: Abundanz in den gereiften Oozyten erniedrigt. ▲: Abundanz in den gereiften Oozyten erhöht.

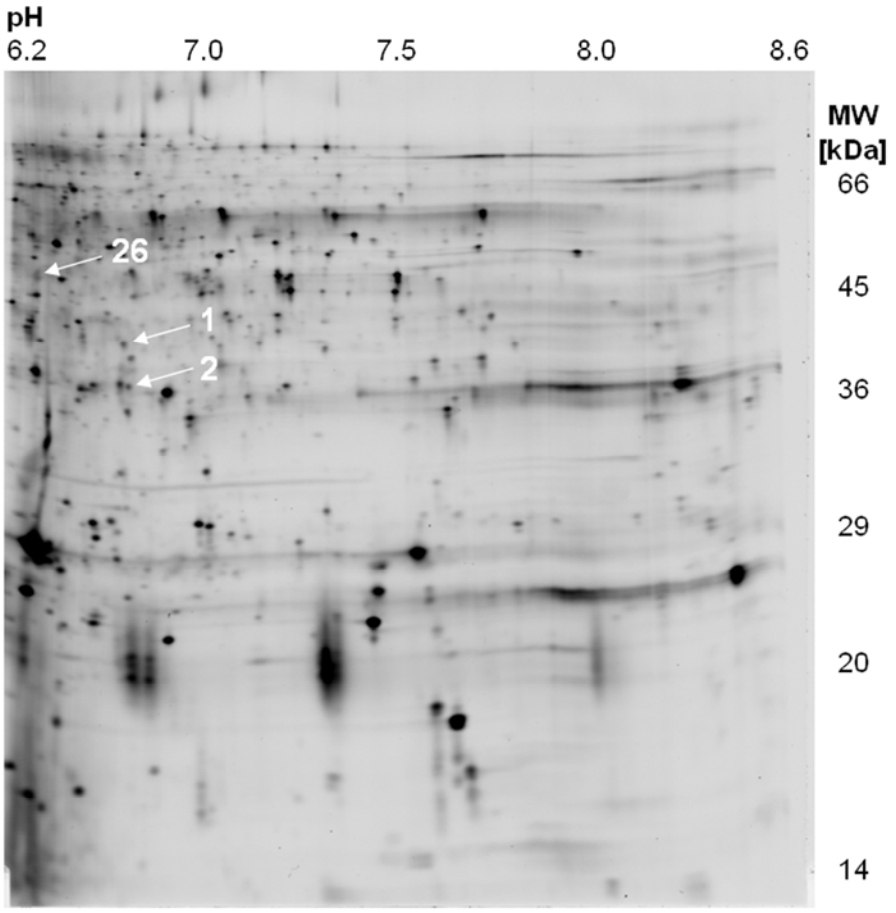


Abb. 29: Gelbild eines Cy3-markierten IPS (0,25 µg) im pH-Bereich 6,2 – 8,6. Die Pfeile kennzeichnen die abundanzveränderten Kanditdatenproteine. Proteine 1 und 2 erfüllen die angesetzten Kriterien und sind in ihrer Abundanz in den gereiften Oozyten erniedrigt (Siehe Tab. 8). Protein Nr. 26 erfüllt die Kriterien im pH 4 – 7, nicht jedoch im pH 6 – 9, was auf Proteinpräzipitationen in diesem Bereich zurück zu führen ist.

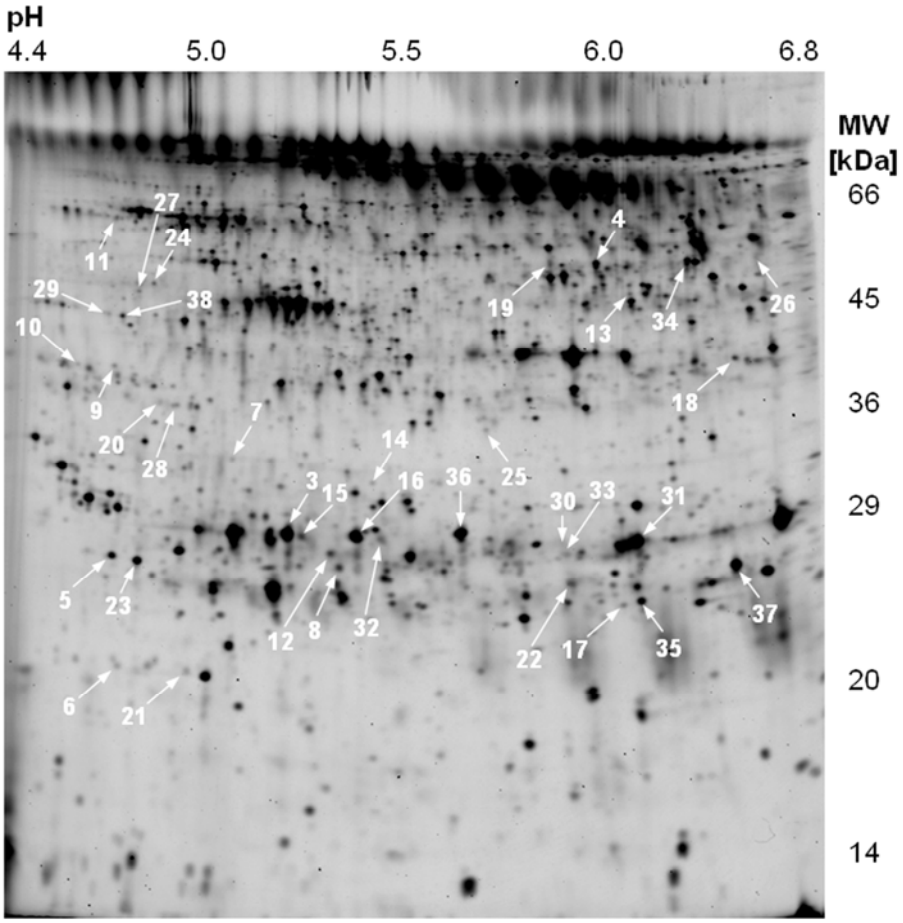
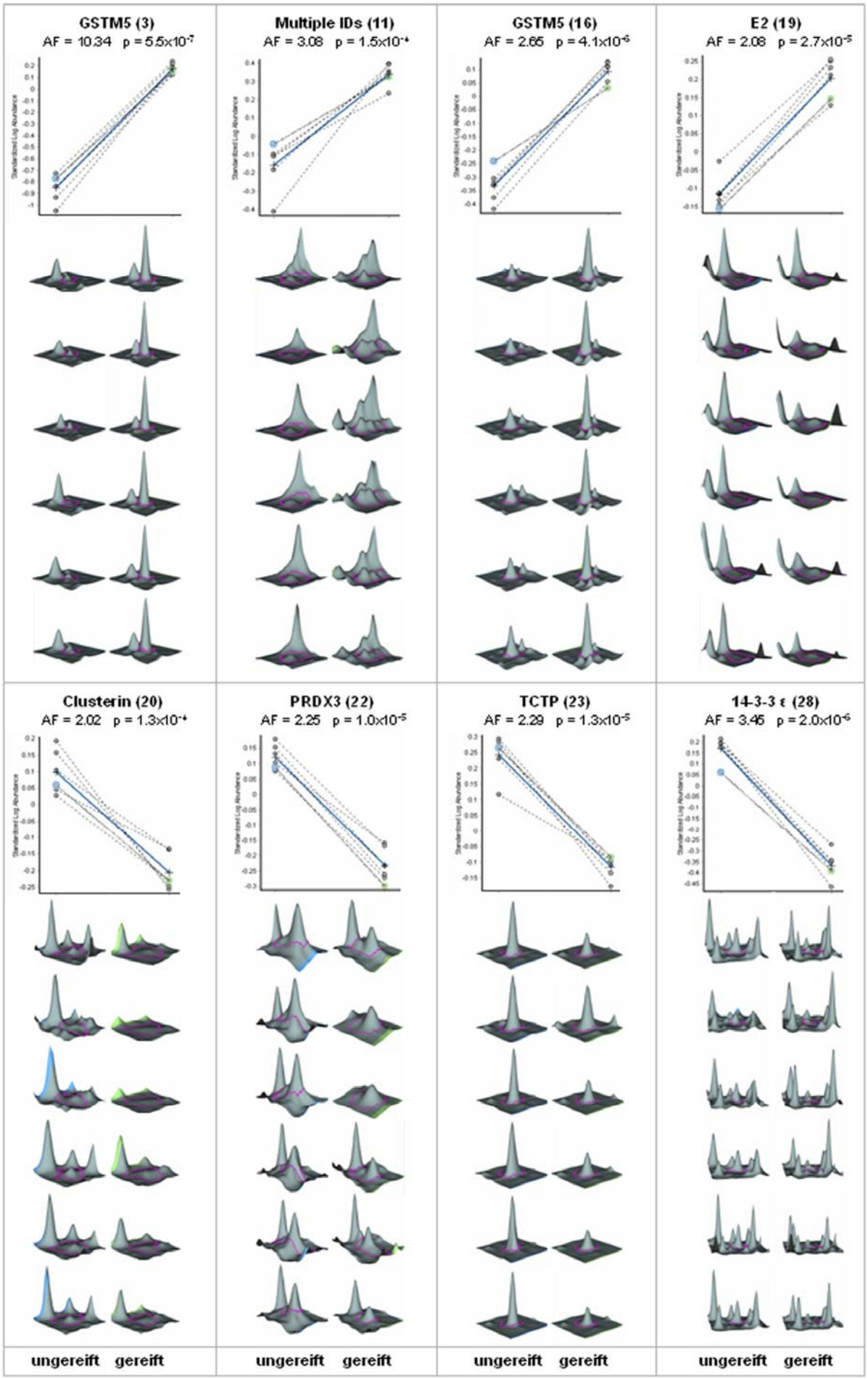


Abb. 30: Cy3-Gelbild des IPS (0,25 µg) im pH-Bereich 4,4 bis 6,8. Nummern und Pfeile markieren die 36 abundanzveränderten Protein-Spots. 17 Proteine sind in gereiften Oozyten erhöht. 19 Proteine sind in gereiften Oozyten erniedrigt. Alle Daten der 36 Protein-*Spots* sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9: Daten der 36 Protein-*Spots* im pH-Bereich 4 – 7 der 2D-DIGE Analyse ungereifter versus in vitro gereifter boviner Oozyten. Zur Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie siehe ab S. 57.

Nr.	Proteinname	Vorkommen	Faktor	p-Wert	Faktor (SSE*)
3	GSTM5	12 von 12	10,34 ▲	$5,5 \times 10^{-7}$	1,04 ▲
4	--	12 von 12	9,08 ▲	$3,4 \times 10^{-7}$	1,05 ▲
5	--	12 von 12	7,33 ▲	$3,4 \times 10^{-7}$	1,02 ▲
6	--	12 von 12	6,78 ▲	$4,4 \times 10^{-6}$	1,19 ▼
7	--	12 von 12	5,39 ▲	$5,3 \times 10^{-7}$	1,17 ▲
8	--	12 von 12	4,18 ▲	$8,8 \times 10^{-7}$	1,03 ▼
9	--	12 von 12	3,72 ▲	$5,7 \times 10^{-7}$	1,04 ▼
10	--	12 von 12	3,11 ▲	$5,7 \times 10^{-7}$	1,04 ▼
11	Mischpopulation	12 von 12	3,08 ▲	$1,5 \times 10^{-4}$	1,22 ▲
12	--	12 von 12	2,87 ▲	$2,0 \times 10^{-4}$	1,01 ▲
13	--	12 von 12	2,85 ▲	$5,5 \times 10^{-5}$	1,23 ▲
14	--	12 von 12	2,84 ▲	$8,3 \times 10^{-5}$	1,11 ▲
15	--	12 von 12	2,71 ▲	$1,4 \times 10^{-4}$	1,00 ▲
16	GSTM5	12 von 12	2,65 ▲	$4,1 \times 10^{-6}$	1,06 ▲
17	--	12 von 12	2,36 ▲	$2,0 \times 10^{-4}$	1,17 ▲
18	--	12 von 12	2,08 ▲	$2,3 \times 10^{-4}$	1,08 ▲
19	E2	12 von 12	2,08 ▲	$2,7 \times 10^{-5}$	1,02 ▲
20	Clusterin	12 von 12	2,02 ▼	$1,3 \times 10^{-4}$	1,14 ▼
21	--	12 von 12	2,06 ▼	$4,9 \times 10^{-4}$	1,05 ▼
22	Peroxiredoxin-3	12 von 12	2,25 ▼	$1,0 \times 10^{-5}$	1,09 ▲
23	TCTP	12 von 12	2,29 ▼	$1,3 \times 10^{-5}$	1,03 ▲
24	--	12 von 12	2,40 ▼	$9,1 \times 10^{-6}$	1,10 ▲
25	--	12 von 12	2,46 ▼	$2,6 \times 10^{-6}$	1,02 ▲
26	--	12 von 12	2,50 ▼	$9,8 \times 10^{-6}$	1,19 ▼
27	--	12 von 12	3,10 ▼	$3,8 \times 10^{-5}$	1,35 ▲
28	14-3-3 ε	12 von 12	3,45 ▼	$2,0 \times 10^{-6}$	1,02 ▲
29	--	12 von 12	3,65 ▼	$3,8 \times 10^{-5}$	1,01 ▼
30	--	12 von 12	4,00 ▼	$1,8 \times 10^{-6}$	1,02 ▼
31	GSTM5	12 von 12	4,10 ▼	$4,1 \times 10^{-5}$	1,04 ▼
32	6PGL	12 von 12	4,25 ▼	$4,4 \times 10^{-6}$	1,13 ▲
33	--	12 von 12	6,09 ▼	$1,4 \times 10^{-5}$	1,07 ▲
34	EF1γ	12 von 12	6,55 ▼	$4,2 \times 10^{-6}$	1,09 ▲
35	Mischpopulation	12 von 12	7,51 ▼	$5,3 \times 10^{-7}$	1,02 ▲
36	Mischpopulation	12 von 12	8,60 ▼	$5,5 \times 10^{-7}$	1,06 ▲
37	--	12 von 12	8,86 ▼	$5,7 \times 10^{-7}$	1,05 ▲
38	--	12 von 12	9,65 ▼	$5,7 \times 10^{-7}$	1,09 ▲

▼: Abundanz in den gereiften Oozyten erniedrigt. ▲: Abundanz in den gereiften Oozyten erhöht.
*) SSE: Same-Same-Experiment (Siehe S. 52)


GSTM5 (3)
AF = 10.34 p = 5.5x10-7
Multiple IDs (11)
AF = 3.08 p = 1.5x10-4
GSTM5 (16)
AF = 2.65 p = 4.1x10-6
E2 (19)
AF = 2.08 p = 2.7x10-5
Clusterin (20)
AF = 2.02 p = 1.3x10-4
PRDX3 (22)
AF = 2.25 p = 1.0x10-5
TCTP (23)
AF = 2.29 p = 1.3x10-5
14-3-3 ε (28)
AF = 3.45 p = 2.0x10-6
ungereift gereift
ungereift gereift
ungereift gereift
ungereift gereift

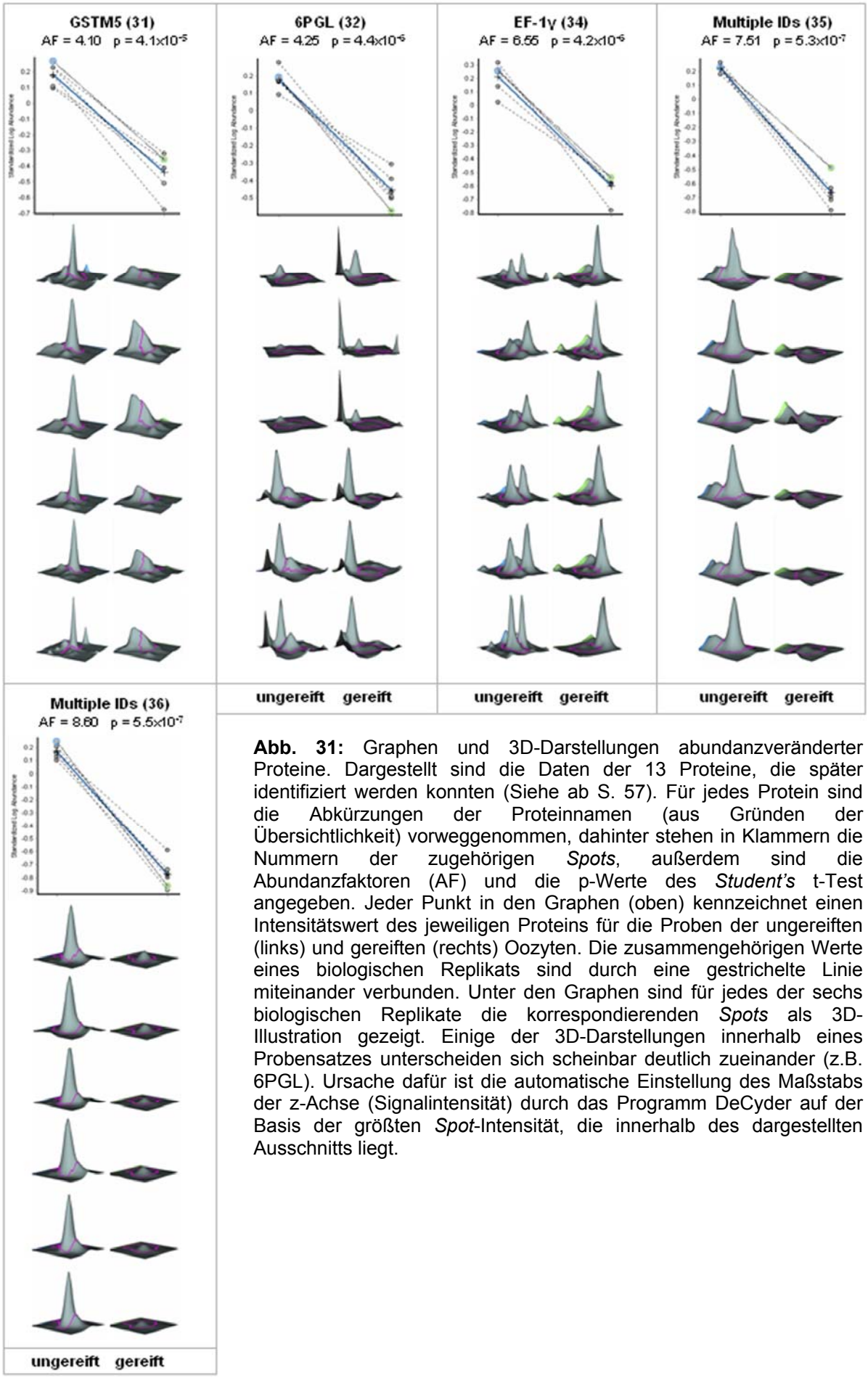


Abb. 31: Graphen und 3D-Darstellungen abundanzveränderter Proteine. Dargestellt sind die Daten der 13 Proteine, die später identifiziert werden konnten (Siehe ab S. 57). Für jedes Protein sind die Abkürzungen der Proteinnamen (aus Gründen der Übersichtlichkeit) vorweggenommen, dahinter stehen in Klammern die Nummern der zugehörigen *Spots*, außerdem sind die Abundanzfaktoren (AF) und die p-Werte des *Student's* t-Test angegeben. Jeder Punkt in den Graphen (oben) kennzeichnet einen Intensitätswert des jeweiligen Proteins für die Proben der ungereiften (links) und gereiften (rechts) Oozyten. Die zusammengehörigen Werte eines biologischen Replikats sind durch eine gestrichelte Linie miteinander verbunden. Unter den Graphen sind für jedes der sechs biologischen Replikate die korrespondierenden *Spots* als 3D-Illustration gezeigt. Einige der 3D-Darstellungen innerhalb eines Probensatzes unterscheiden sich scheinbar deutlich zueinander (z.B. 6PGL). Ursache dafür ist die automatische Einstellung des Maßstabs der z-Achse (Signalintensität) durch das Programm DeCyder auf der Basis der größten *Spot*-Intensität, die innerhalb des dargestellten Ausschnitts liegt.

Für die Identifizierung der Proteine wurden präparative 2D-Gele angefertigt. Für diesen Zweck wurden 5176 ungereifte Oozyten gesammelt, was einer Proteinmenge von 466 µg entsprach. Da die Sättigungsmarkierung das Laufverhalten der Proteine verändert, mussten die Proteinlysate für die präparativen Gele mit Cy3 markiert werden. Dadurch wurde das *Spot*-Muster der präparativen mit den analytischen Gelen vergleichbar. Für das Ausstechen und die Identifizierung der *Spots* mit veränderter Abundanz wurden präparative 2D-Gele im pH-Bereich 4 – 7 mit 100 bzw. 200 µg Gesamtprotein (entsprechend 1100 bzw. 2200 Oozyten) angefertigt. Aufgrund der Limitation der Oozyten konnten keine präparativen Gele im pH-Bereich 6 – 9 hergestellt werden. Die präparativen pH 4 – 7 Gele wurden zur Visualisierung der *Spots* Coomassie gefärbt (**Abb. 32**). Den 36 veränderten *Spots* der analytischen Gele im pH-Bereich 4 – 7 konnten 18 *Spots* auf den präparativen Gelen eindeutig zugeordnet werden. *Spot* Nr. 34 war in dem hier abgebildeten 200 µg Gel nicht vorhanden, konnte aber auf einem weiteren 100 µg Gel zugeordnet und ausgestochen werden. Eine Zuordnung der übrigen 18 *Spots* war aufgrund der geringeren Sensitivität der Coomassie-Färbung im Vergleich zur Sättigungsmarkierung nicht möglich.

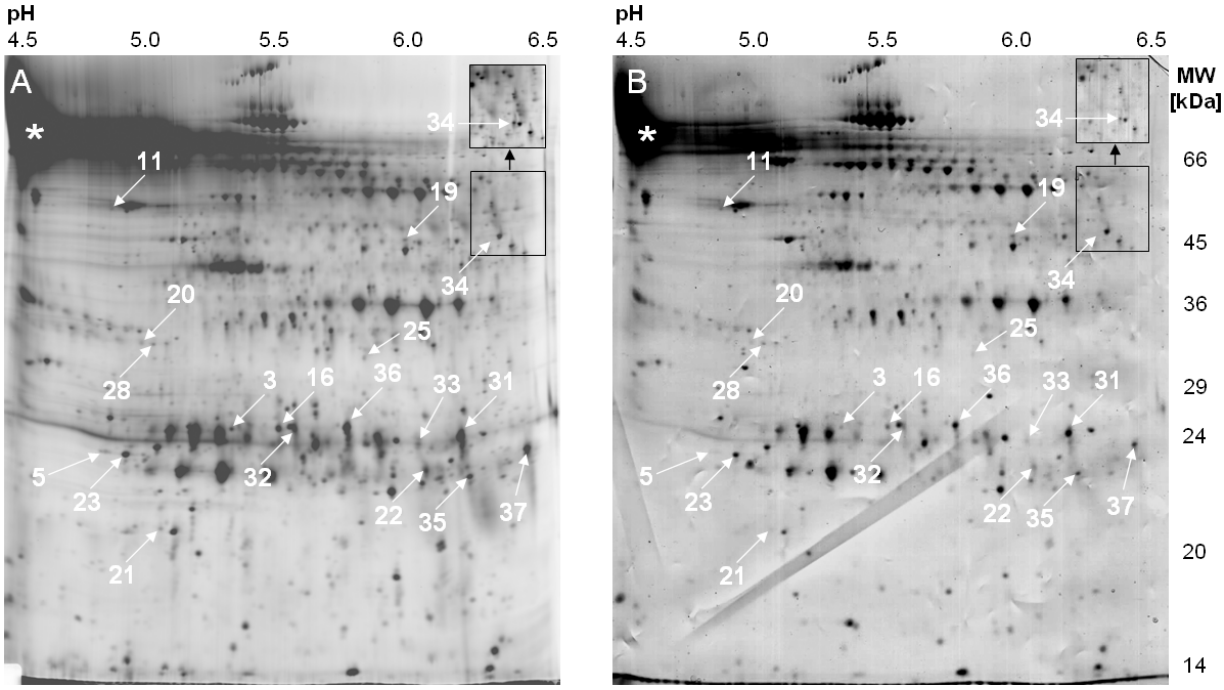


Abb. 32: Präparatives Gel aus Cy3-gelabeltem Oozyten-Lysat (200 µg). A) Cy3-Gelbild nach dem Einlesen mit 532 nm. B) Nachträgliche Färbung des Gels mit kolloidalem Coomassie. Der Stern markiert in beiden Gelbildern den Bereich mit Proteinpräzipitation im sauren pH-Bereich. Es fallen leichte Abweichungen der beiden *Spot*-Muster in Abhängigkeit der Visualisierungsmethode auf (Cy3 versus Coomassie), außerdem die geringere Sensitivität der Coomassie-Färbung. Die Pfeile markieren die 18 ausgestochenen *Spots*. *Spot* Nr. 34 war in dem hier dargestellten präparativen Gel nicht sichtbar (unterer Rahmen), jedoch in einem 100 µg präparativen Gel (oberer Rahmen).

Nach dem Ausstechen und der tryptischen Hydrolyse der *Spots* wurden die daraus resultierenden Peptide massenspektrometrisch analysiert. Zuerst sollten die Cy3-markierten Peptide mittels MALDI-TOF/TOF analysiert werden. Es hat sich gezeigt, dass diese Methode nicht für eine Identifizierung der markierten Proteine geeignet war – möglicherweise aufgrund hoher Energieabsorption durch die kovalent gebundenen Farbstoffmoleküle beim Laser-Beschuss. Die Proteine konnten schließlich erfolgreich mit Hilfe der wesentlich schonenderen ESI-MS/MS analysiert werden. Die Peptide wurden zuerst durch nano-Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend deren Masse-Ladungs-Verhältnis mittels ESI-MS/MS Analyse bestimmt. Die Daten der Analyse wurden gegen die Swiss-Prot R48 Datenbank (*Mammalia*) sowie gegen die IPI Datenbank (*cow* V3.07) mit dem *MASCOT* Algorithmus gesucht. Als Suchparameter wurde die *Cy3*-Sättigungsmarkierung als feste Modifikation angegeben. Die Suchergebnisse wurden mit einem p-Wert ≤ 0,05 und einem *MASCOT Ion Score* Ausschluss > 30 gefiltert. Identifizierungen wurden akzeptiert, wenn mindestens zwei Peptide diese Werte erfüllten. 12 der 18 ausgestochenen *Spots* konnten unter Anwendung dieser Kriterien identifiziert werden. Die *Protein Scores* lagen zwischen 58 und 422. Die Sequenzabdeckungen zwischen 4 und 33%, die *Ion Scores* zwischen 30 und 93 (**Tab. 10a, b, c**; Seite 60 – 62). Ein Protein (*Spot* Nr. 28, **Tab. 10b**) wurde über ein Peptid identifiziert und manuell ausgewertet. Der *MASCOT Ion Score* dieses Peptids lag bei 70. Das MS/MS-Spektrum dieses Peptids zeigte sieben b-Ionen und zehn y-Ionen (**Abb. 33**).

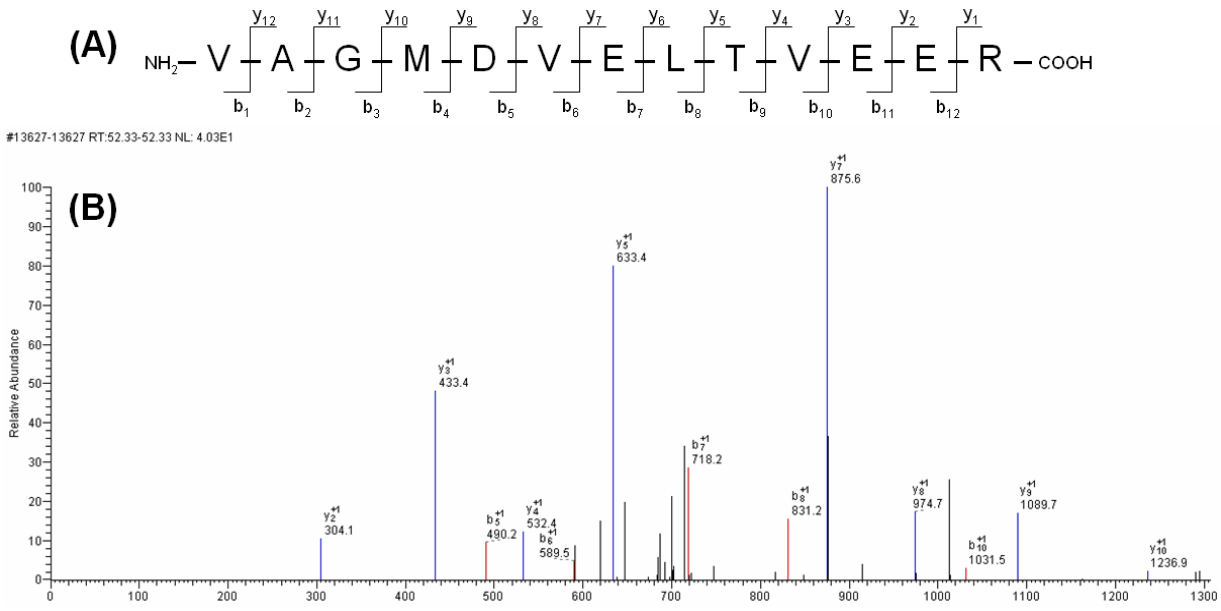


Abb. 33: MS/MS-Spektrum des Proteins 14-3-3 ε. A) Das Peptid ist 13 Aminosäuren lang, eine MS/MS-Analyse würde die gezeigten charakteristischen b- und y-Ionen erzeugen. B) Erhaltenes MS/MS-Spektrum des Peptids. Die *Peaks* der gemessenen b- und y-Ionen sind mit den zugehörigen m/z-Werten annotiert.

Bei drei der 13 identifizierten Proteine enthielt der *Spot* mehr als eine Proteinspezies. Im Falle von *Spot* 11 wurden vier verschiedene Spezies identifiziert. Im Falle von *Spot* 35 und 36 wurden jeweils zwei Spezies identifiziert. Um falsch positive Identifizierungen durch die Kontamination durch benachbarte *Spots* auszuschließen, wurden sieben der nächstgelegenen *Spots* zu den 18 differentiellen zusätzlich ausgestochen. Fünf dieser *Spots* konnten identifiziert werden (**Abb. 34**), *Spot* Nr. 11b mit mehr als einem Protein (**Tab. 11a, b,** Seite 63 und 64). Die benachbarten *Spots* Nr. 3 und 3a konnten als Glutathion S-Transferase Mu5 bzw. als *Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase Isoenzym L1* identifiziert werden. In *Spot* Nr. 11 konnten vier Spezies identifiziert werden: Tubulin beta, Tubulin alpha, *Protein Disulfide Isomerase Precursor* (PDI) und *UV Excision Repair Protein RAD23 homolog B*. In den benachbarten *Spots* Nr. 11a und 11b konnten die PDI und Tubulin beta identifiziert werden. *Spot* Nr. 32 wurde als *6-Phosphogluconolactonase* identifiziert. *Spot* Nr. 32a als *Endoplasmic Reticulum Protein 29V*. *Spot* Nr. 34 wurde als *Eucaryotic Elongation Factor 1 gamma* identifiziert. *Spot* Nr. 34a als Alpha Enolase.

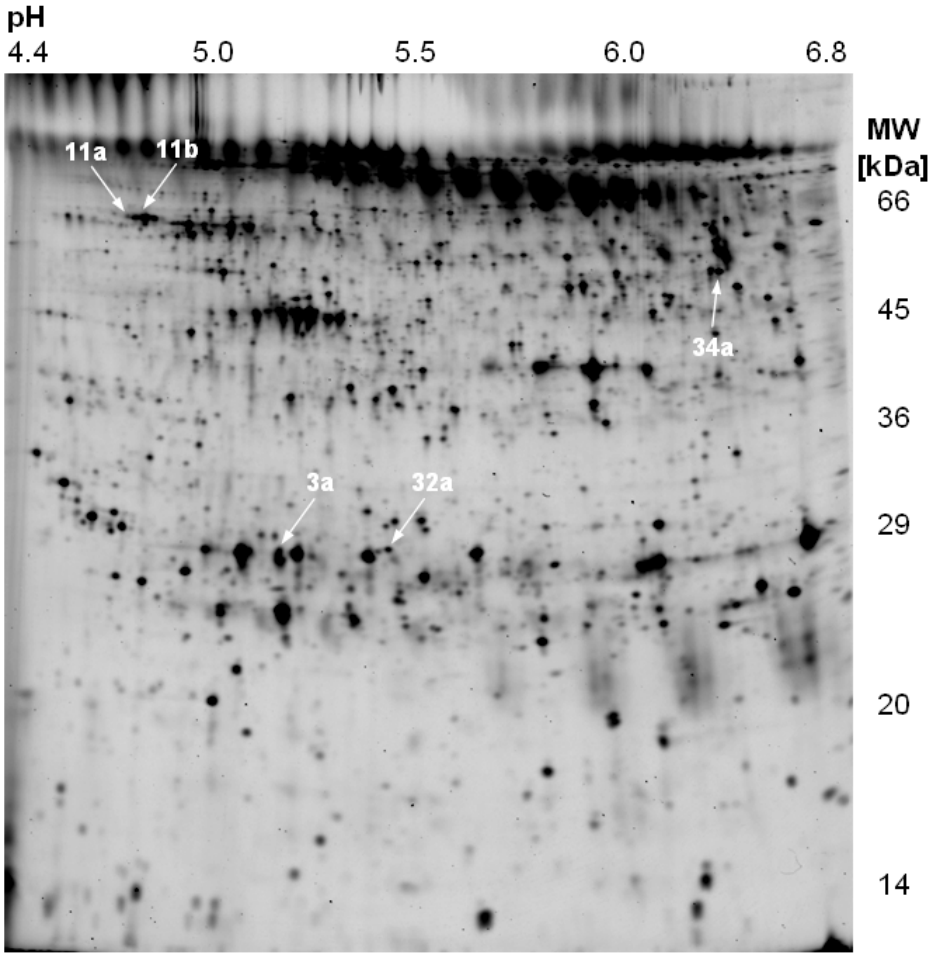


Abb 34: Cy3-Gelbild des IPS im pH-Bereich 4 – 7 mit zusätzlich identifizierten *Spots*. Die fünf markierten *Spots* konnten identifiziert werden (Tab. 11a, b). Die Identifizierungen dieser *Spots* sollten Aufschluss darüber geben, ob Identifizierungen der differentiellen Proteine durch Diffusion von Proteinen nahe liegender *Spots* beeinflusst worden sind.

Tab. 10a: Daten der mittels LC-MS/MS identifizierten abundanzveränderten Proteine (I).

Nr.	Proteinname	IPI Accession	Prot. Score	Nominale Masse (M_r)	pI	Seq. Abd.	Ion Score	Peptid Sequenz
3	Similar to glutathione-S-Transferase, Mu 5 (GSTM5)	IPI00702950	208	30860	6,83	24%	31	K.YSWFAGEK.L
							53	R.VDIMENQIMDFR.M
							69	R.MLLEFTDTSYEEK.R
							39	R.MLLEFTDTSYEEKR.Y
							37	R.IRVDIMENQIMDFR.M
11	Tubulin Beta	IPI00697107	147	54604	4,78	7%	36	R.FPGQLNADLR.K
							61	R.ISEQFTAMFR.R
							53	R.AILVDLEPGTMDSVR.S
	Similar to Tubulin Alpha 1	IPI00700865	87	57754	5,01	5%	43	K.EIIDLVLDR.I
							51	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T
	Protein Disulfide Isomerase Precursor (PDI)	IPI00709465	74	61929	4,80	7%	30	R.EADDIVNWLK.K
							43	K.NFEEVAFDEK.K
							56	K.VDATEESDLAQQYGVR.G
	UV Excision Repair Protein RAD23 homolog B	IPI00690790	54	42709	4,81	13%	42	K.IDIDPDETVR.A
							35	K.ILNDDTALKEYKIDEK.N
							37	K.QEKPAERPVETPVATTPTSTDSTSGDSSR.S
16	Similar to Glutathione-S-Transferase Mu 5 (GSTM5)	IPI00702950	254	30860	6,83	21%	32	R.YLEQLPGQLK.Q
							62	K.SMVLGYWDIR.G
							44	R.VDIMENQIMDFR.M
							64	R.MLLEFTDTSYEEK.R
							55	R.MLLEFTDTSYEEKR.Y
							41	R.IRVDIMENQIMDFR.M

Tab. 10b: Daten der mittels LC-MS/MS identifizierten abundanzveränderten Proteine (II).

Nr.	Proteinname	IPI Accession	Prot. Score	Nominale Masse (M_r)	pI	Seq. Abd.	Ion Score	Peptid Sequenz
19	PREDICTED: similar to Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (E2)	IPI00686747	422	52899	8,73	11%	42	R.VLLLDL.-
							37	K.VEGGTPLFTLR.K
							70	R.NVETMNYADIER.T
							93	K.TPAFAESVTEGDVR.W
							65	K.TPAFAESVTEGDVRWEK.A
20	Clusterin Precursor	IPI00694304	63	57794	5,73	4%	41	R.GSLFFNPK.S
							51	K.LLLSSLEEAK.K
							44	R.KLLLSSLEEAK.K
22	Thioredoxin-dependent Peroxide Reductase (Peroxiredoxin-3)	IPI00696824	268	30863	7,15	12%	34	K.EISLDDFK.G
							56	K.HLSVNDLPVGR.S
							98	R.DYGVLLEGPGLALR.G
23	Translationally-controlled Tumor Protein (TCTP)	IPI00705660	404	20911	4,84	33%	57	R.EDGVTPYMIFFK.D
							71	R.DLISHDEMFSDIYK.I
							33	-.MIIYRDLISHDEMFSDIYK.I
28	14-3-3 ε	IPI00696435	133	31169	4,63	5%	70	K.VAGMDVELTVEER.N
31	Similar to Glutathione-S-Transferase, Mu 5 (GSTM5)	IPI00702950	58	30866	6,83	9%	49	K.SMVLGYWDIR.G
							34	R.VDIMENQIMDFR.M
32	Similar to 6-Phosphogluconolactonase (6PGL)	IPI00706234	80	27514	5,57	10%	63	R.TVIFVATGEGK.A
							41	R.ELPAAAAPAGPASLAR.W
34	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Gamma (EF1γ)	IPI00706632	111	50346	6,15	8%	31	K.STFVLDEFK.R
							55	K.STFVLDEFKR.K
							73	R.KLDPGSEETQTLVR.E

Tab. 10c: Daten der mittels LC-MS/MS identifizierten abundanzveränderten Proteine (III).

Nr.	Proteinname	IPI Accession	Prot. Score	Nominale Masse (M_r)	pI	Seq. Abd.	Ion Score	Peptid Sequenz
35	Thioredoxin-dependent Peroxide	IPI00696824	67	30867	7,15	8%	52	K.HLSVNDLPVGR.S
	Reductase (Peroxiredoxin-3)						48	R.GLFIIDPNGVIK.H
	Cofilin-1	IPI00699700	65	21737	8,21	15%	38	R.YALYDATYETK.E
							48	K.LGGSAVISLEGKPL.-
36	Similar to Glutathione-S-Transferase,	IPI00702950	119	30866	6,83	12%	56	R.VDIMENQIMDFR.M
	Mu 5 (GSTM5)						53	R.MLLEFTDTSYEEK.R
							33	R.IRVDIMENQIMDFR.M
	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 30 kDa Subunit, mitochondrial precursor	IPI00686077	78	32283	6,54	11%	64	R.VVAEPVELAQEFR.K
							42	K.TYTDELTPIESSVPVYK.A

Tab. 11a: Daten der mittels LC-MS/MS zusätzlich identifizierten Proteine (I).

Nr.	Proteinname	IPI Accession	Prot. Score	Nominale Masse (M_r)	pI	Seq. Abd.	Ion Score	Peptid Sequenz
3a	Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase Isoenzyme L1 (UCH-L1)	IPI00701112	38	28905	5.07	15%	34	K.QFLSETEKLSPEDR.A
							37	R.MPFPVNHGTSSEDSLLQDAAK.V
11a	Protein Disulfide Isomerase Precursor (PDI)	IPI00709465	655	61929	4.80	14%	48	R.EADDIVNWLK.K
							61	R.LITLEEEMTK.Y
							42	K.NFEEVAFDEK.K
							86	K.VDATEESDLAQQYGVR.G
							99	R.LAKVDATEESDLAQQYGVR.G
							45	K.MDSTANEVEAVKVHSFPTLK.F
							103	K.VDATEESDLAQQYGVRGYPTIK.F
11b	Protein Disulfide Isomerase Precursor (PDI)	IPI00709465	1004	61929	4.80	25%	48	R.EADDIVNWLK.K
							48	K.NFEEVAFDEK.K
							45	K.SVSDYEGKLSNFK.K
							59	K.VLVGKNFEEVAFDEK.K
							84	K.VDATEESDLAQQYGVR.G
							46	K.EYTAGREADDIVNWLK.K
							95	R.LAKVDATEESDLAQQYGVR.G
							43	K.MDSTANEVEAVKVHSFPTLK.F
							100	K.VDATEESDLAQQYGVRGYPTIK.F
							35	R.LITLEEEMTKYKPESDELTAEK.I
	Tubulin Beta	IPI00697107	114	54604	4.78	7%	51	K.LAVNMVPFPR.L
							56	R.ISEQFTAMFR.R
							60	R.AILVDLEPGTMDSVR.S

Tab. 11b: Daten der mittels LC-MS/MS zusätzlich identifizierten Proteine (II).

Nr.	Proteinname	IPI Accession	Prot. Score	Nominale Masse (M_r)	pI	Seq. Abd.	Ion Score	Peptid Sequenz
32a	Similar to: Endoplasmic Reticulum Protein 29 V	IPI00709407	260	29558	5.64	18%	77	K.ILDQGEDFPASEMTR.I
							63	R.LAENSASSDDLLVAEVGISDYGDKLNMELSEK.Y
34a	Alpha-Enolase	IPI00707095	523	51144	6.43	22%	102	K.VVIGMDVAASEFYR.S
							50	K.YNQILRIEEELGSK.A
							86	R.AAVPSGASTGIYEALELR.D
							61	R.EIFDSRGNPTVEVDLFTAK.G
							47	K.AGYSDKVVIGMDVAASEFYR.S
							67	K.DATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK.N

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Aspekte

Die embryo-maternale Kommunikation ist ein komplexes Regelwerk molekularer Signale, deren perfekte räumliche und zeitliche Koordination für die Entstehung und Erhaltung der Trächtigkeit essentiell ist. Untersuchungen dieser Interaktionen auf mRNA-Ebene haben zur Aufklärung der Mechanismen in verschiedenen Spezies beigetragen. Beim Rind wurde beispielsweise gezeigt, dass durch das embryonale Interferon tau (IFNT) trächtigkeitsrelevante Gene stimuliert werden, deren Produkte das Endometrium auf die Implantation vorbereiten [83]. Transkriptomstudien des bovinen Endometriums am Tag 18 der Trächtigkeit mit monozygoten Zwillingen lieferten zahlreiche Gene, von denen fast die Hälfte von Typ I Interferonen stimuliert wird [38]. *Microarray*-Analysen der Implantationsstellen bei der Maus deuteten auf die Relevanz zahlreicher Gene bei der Regulation der uterinen Umgebung für die Implantation der Blastozyste hin [84]. Eine Vielzahl solcher Arbeiten auf diesem Gebiet wurde auch beim Menschen durchgeführt. So wurde die Genexpression während des Zeitpunktes der Implantation an gut charakterisierten Biopsieproben humanen Endometriums untersucht [85]. Die regulierten Gene kodierten für implantationsrelevante Produkte, wie *Insulin Like Growth Factor binding Proteins* (IGFBPs), für Proteine die an der Prostaglandinsynthese beteiligt sind, sowie für Prostaglandinrezeptoren.

Nachteil der Transkriptomanalysen ist, dass sie keine direkte Information über die Abundanzen der aus den erfassten Genen translatierten Proteine liefern [40]. Der Rückschluss, dass eine bestimmte Änderung auf der Ebene der mRNA die gleiche Änderung auf Proteinebene hervorruft, ist nicht möglich. Degradationsprozesse der mRNA, die Stabilität der synthetisierten Proteine und deren Abbau können nicht erfasst werden. Direkte Untersuchungen von Körperflüssigkeiten oder den kernlosen Thrombozyten bleiben der Transkriptomanalyse generell verschlossen [86]. Eine Analyse von Proteinen ist nur mittels einer Proteomanalyse möglich.

4.2 Analyse des Endometriums monozygoter Zwillinge

Das Proteom einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus ist ein sich schnell änderndes und empfindliches System. Werden in einer Proteomanalyse zwei Zustände miteinander verglichen, so ist es ausgesprochen wichtig, möglichst identische Ausgangsbedingungen für den Versuchsaufbau zu wählen. Des Weiteren muss die Zahl veränderter Parameter zwischen den beiden Zuständen so gering wie möglich gehalten werden. Bei der Bewertung differentieller Proteinmuster spielt auch die genetische Heterogenität untersuchter Individuen eine große Rolle. Optimale Untersuchungsobjekte für eine Proteomanalyse stellen daher genetisch identische Organismen dar. Aus diesem Grund wurden in der hier vorgestellten Arbeit zur Analyse der embryo-maternalen Kommunikation embryo-induzierte Veränderungen des Endometriums auf Proteomebene bei monozygoten Rinderzwillingen untersucht. Die Zwillinge wurden durch Embryo *Splitting* generiert und sind durch identische nukleäre und mitochondrielle DNA charakterisiert [77]. Neben der Verfügbarkeit genetisch identischer Individuen stellt das Rind ein sehr gutes Modell für Untersuchungen der Interaktionen zwischen Embryo und Mutter dar. Gewebeproben können in ausreichenden Mengen von gut definierten Versuchstieren entnommen werden. Um möglichst vergleichbares Probenmaterial zu erhalten, wurden alle Zwillingstiere in der gleichen Umgebung gehalten und die Tiere wurden zyklussynchronisiert. Eines der Zwillingstiere erhielt einen Embryo Transfer (ET) mit zwei Blastozysten aus einem gut etablierten und definierten in vitro System [78]. Der korrespondierende Zwilling erhielt einen Scheintransfer mit Transfermedium ohne Embryonen.

Aus logistischen Gründen wurden in dieser Arbeit in vitro produzierte Embryonen auf die Empfängertiere übertragen. Diese Strategie hat den Vorteil, dass zum Zeitpunkt des Experiments eine genügend große Zahl an Embryonen einer definierten Entwicklungsstufe zur Verfügung steht. Die Embryonen können morphologisch selektiert werden, um die Wahrscheinlichkeit einer Trächtigkeit zu erhöhen. Im Vergleich zur künstlichen Befruchtung ist die Rate embryonaler Verluste bei in vitro produzierten und transferierten Embryonen jedoch erhöht [87]. Um dieses Defizit auszugleichen, wurden in den hier beschriebenen Experimenten pro Empfängertier zwei Embryonen transferiert.

Weiterhin wurden alle geschlachteten Tiere nach strengen Kriterien selektiert, um eine gute Charakterisierung des Probenmaterials zu gewährleisten. So gingen ausschließlich Proben solcher Zwillingspaare in die Proteomanalyse ein, bei denen beim entsprechenden Tier eindeutig eine Trächtigkeit festgestellt werden konnte. Außerdem wurden Tierpaare, bei denen eines der Tiere pathologische Veränderungen des Uterus, wie Endometritis und Urometra aufwies, nicht für die Analyse verwendet [88]. Unter Anwendung dieser Kriterien erwiesen sich drei Zwillingspaare als geeignet für die Analyse.

Minimierung von Serumproteinen und das experimentelle Design

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass Serumproteine in veränderlichen Mengen in den Endometriumproben vorhanden sind (**Abb 2**, Seite 30). Eine Abreicherung dieser Serumproteine musste daher vor der Analyse durchgeführt werden. Dafür stehen für humane Proben verschiedene Systeme zur Verfügung. So wurden beispielsweise Systeme entwickelt, die auf Immunoaffinität basieren [89, 90]. Spezifische Antikörper können dabei an das Säulenmaterial eines Chromatographie-Systems gebunden werden. Läuft eine Probe über diese Säule, so werden die hochabundanten Proteine über die Bindung an ihre korrespodierenden Antikörper aus der Probe entfernt. Da es keine Erfahrungen bezüglich der Abreicherungs-Effektivität beim Rind gibt, wurde in dieser Arbeit nicht auf solche Systeme zurückgegriffen. Aufgrund der hohen Bindungskapazität des bovinen Serumalbumins (BSA) für zelluläre Proteine könnten diese nach der Lyse zusammen mit dem BSA abgereichert werden. Zur Reduzierung der Serumproteine wurden die Endometrium-proben der monozygoten Zwillinge für die hier durchgeführten Experimente unmittelbar nach der Entnahme gewaschen. Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Serumproteinen dadurch signifikant reduziert werden kann. Der Vergleich der Intensitäten der Albumin-*Spots* ungewaschener versus gewaschener Proben ergab eine Reduktion um den Faktor 2,8. Eine Abreicherung zellulärer Proteine wurde nicht beobachtet.

Die verschiedenen Schritte der Lyse komplexer Gewebe wie Endometrium können die Ursache für experimentelle Variationen im Proteingehalt des Lysats sein. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurden in dieser Analyse zwei unabhängige Lysate jeder Probe angefertigt (**Abb. 3**, Seite 31). Aufgrund der hohen Komplexität der lysierten Endometriumproben wurden so genannte überlappende pH-Gradienten

4 – 7 und 6 – 9 verwendet. Diese liefern eine verbesserte Auflösung gegenüber den häufig verwendeten Gradienten pH 3 – 10 [91], vorausgesetzt der pH-Bereich 6 – 9 ist so optimiert, dass Proteine mit einem isoelektrischen Punkt ab etwa 7 gut aufgelöst sind (**Abb. 4**, Seite 31). Durch die Verwendung überlappender pH-Gradienten werden die *Spots* deutlicher voneinander separiert. Dadurch werden die Quantifizierung der *Spots* sowie die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung der Proteine verbessert, da die Zahl der *Spots*, die mehr als eine Proteinspezies enthalten, abnimmt. Nachteil dieser Strategie ist die Verdoppelung des experimentellen Aufwands bezüglich Probenmenge, Verbrauchsmaterialien und Arbeit. Die Auflösung und die Anzahl der detektierten *Spots* könnten mit ultra-engen pH-Gradienten (z.B. pH 4,0 – 5,0 und pH 4,5 – 5,5 usw.) noch weiter erhöht werden. Hier würde aber der hohe materielle und experimentelle Aufwand bei weitem die Vorteile überwiegen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf ultra-enge pH-Gradienten verzichtet.

Die 2D-DIGE Technik – Minimalmarkierung

Nachteil der 2D-PAGE ist die Variation innerhalb verschiedener Gele einer Analyse. In klassischen Ansätzen wie z.B. mit SYPRO-Ruby®-gefärbten Gelen muss diese Variation über eine genügend große Zahl technischer Replikate (n ≥ 5) kompensiert werden [92]. Sowohl die Quantifizierbarkeit wie auch die Reproduzierbarkeit der 2D-PAGE wurden durch die Entwicklung einer Technik, der 2D-Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE), signifikant verbessert [93]. Bei der Minimalmarkierung werden die Fluoreszenzfarbstoffe vor der 2D-PAGE über einen NHS-Ester kovalent an Lysinreste der Proteine gebunden. Es wird ein Lysinrest pro Protein sowie 1 – 2% aller Moleküle markiert. Die Markierungschemie dieser Technik ist ausgesprochen robust. Es können insgesamt drei verschiedene Proteingemische mit unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3, Cy5 und Cy2) markiert und innerhalb eines Gels separiert werden. In der Regel werden in einem 2D-Gel die Probe, die Kontrolle und ein Cy2-markierter *Internal Pooled Standard* (IPS) aufgetrennt – ein Proteingemisch, welches beide biologischen Zustände repräsentiert. Aufgrund identischer Massen (0,5 kDa) der drei Fluorophore (*CyDyes*) komigrieren die korrespondierenden Proteine der drei Gemische. Außerdem erfolgt durch eine Ladungskompensation der Farbstoffe am Lysin keine Veränderung der Position der *Spots* im Vergleich zu unmarkierten Proteinen. Durch die Möglichkeit, zwei biologische Zustände innerhalb

eines Gels aufzutrennen, kann die Anzahl nötiger Replikate für eine Analyse gegenüber klassischen Ansätzen halbiert werden.

Bei der (Computer-basierten) Auswertung der Gele erfolgt eine automatische Normalisierung jedes einzelnen *Spots* auf dessen korrespondierenden *Spot* des IPS. Dadurch ist es möglich, Variationen zwischen den Gelen exakt zu ermitteln und in die Quantifizierung korrigierend einzubeziehen [94]. Der IPS bestand in dieser Analyse aus einem Gemisch zu gleichen Proteinmengen beider Tiere eines Zwillingspaares, um dem identischen genetischen Hintergrund der korrespondierenden Tiere Rechnung zu tragen. Um bei der Quantifizierung mit der 2D-DIGE Technik systematische Fehler auszuschließen, die auf der Markierung mit Cy5 bzw. Cy3 beruhen, wurde jedes Lysat unabhängig voneinander mit Cy5 und Cy3 markiert (**Abb. 3**, Seite 31).

Für den Vergleich der Endometriumproben nicht trächtiger und trächtiger monozygoter Zwillinge wurden pro pH-Bereich 4 – 7 und 6 – 9 mit der DIGE Technik 12 2D-Gele angefertigt und mit dem Programm DeCyder™ Version 5.0 ausgewertet, 24 in dieser Analyse insgesamt. Da die automatische Zuordnung der *Spots* mittels DeCyder™ zwischen den einzelnen Gelen (das so genannte *Matching*) häufig unzuverlässig war, mussten alle Gele in der Analyse manuell kontrolliert und nachgearbeitet werden. Aufgrund technisch bedingter Schwankungen, die bei der Quantifizierung 2D-basierter Analysen bis zu 35% ausmachen können [95], ist es wichtig, strenge Selektionskriterien für die Proteine anzulegen. Die Zahl der Proteine, die diese Kriterien erfüllen, ist nach der Auswertung mit dem Programm DeCyder™ maßgeblich von den festgelegten Selektionsparametern des Anwenders abhängig [96]. Je strikter die Kriterien, desto geringer ist die Zahl der Proteine mit veränderter Abundanz, aber umso valider sind die Ergebnisse. Initiativen zur Entwicklung allgemein gültiger Richtlinien in der Proteomik gibt es erst seit wenigen Jahren wie beispielsweise die *Human Proteome Organisation's Proteomics Standards Initiative* (HUPO PSI) [97]. In den hier beschriebenen Analysen musste die Abundanz eines Proteins zwischen Proben nicht trächtiger und trächtiger Tiere mindestens um den Faktor 2 verändert sein. Protein-*Spots* wurden des Weiteren nur akzeptiert, wenn sie in jedem der 12 Gele eines pH-Bereiches vorhanden waren, mit einem *Student's* t-Test $p \leq 0{,}01$. In diesen Analysen wurde der gepaarte *Student's* t-Test angewendet, da Kontrolle und Probe durch den identischen genetischen Hintergrund eine Einheit bildeten.

Die identifizierten Proteine im pH- Bereich 6 – 9

Im pH-Bereich 6 – 9 konnten keine Proteine detektiert werden, die diese strengen Kriterien erfüllten. Vier Protein-*Spots* lagen jedoch sehr knapp unter dem Abundanzfaktor von 2 (**Abb. 5**, Seite 33 und **Tab. 1**, Seite 35) und wurden daher identifiziert. Drei dieser Proteine waren in den Proben der trächtigen Tiere erniedrigt, eines war in den trächtigen erhöht (**Abb. 6** und **7**, Seite 34). Eines der vier Proteine konnte durch eine *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) Analyse als Transferrin, zwei als Fibrinogen Beta *Chain* identifiziert werden. Die *Protein Scores* lagen bei jeweils 205, 84 und 177. Der *Protein Score* ist ein Wahrscheinlichkeitswert, der vom Programm *MASCOT* für einen PMF errechnet wird [98]. In diesem Fall entspricht ein Wert > 58 einem p-Wert < 0,05. Die Sequenzabdeckungen lagen zwischen 47 und 58%, es wurden 33, 29 bzw. 30 Peptide gefunden (**Tab. 3**, Seite 38).

Fibrinogen beta *Chain* konnte in zwei *Spots* identifiziert werden. Die beiden Fibrinogen beta *Chain Spots* lagen in etwa bei pH 7,5 und 8,0 (**Abb. 5**, Seite 33). Diese Differenz könnte aus unterschiedlichen Modifikationen resultieren. Humble et al. [99] haben beispielsweise die Phosphorylierung von Fibrinogen in vitro bei Hase, Hund und Mensch gezeigt.

Transferrin und Fibrinogen beta *Chain* sind Serumproteine. Beide waren in den Proben trächtiger Tiere erniedrigt. Man nimmt an, dass Transferrin im Schwein maternales und fetales Gewebe vor Lipid-Peroxidation schützt [100]. Dieser Prozess ist eine mögliche Folge des Eisentransports über die endometriale Sekretion des Uteroferrins. Fibrinogen ist essentiell für die Erhaltung der frühen Schwangerschaft beim Menschen, es spielt eine Rolle bei der Implantation [101]. Die veränderte Abundanz dieser beiden Serumproteine kann jedoch trotz intensiven Waschens die Folge von unterschiedlichem Serumgehalt in den Endometriumproben sein.

Das vierte abundanzveränderte Protein im pH-Bereich 6 – 9 wurde mittels PMF und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) Analyse eindeutig als *heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A2/B1* (hnRNP A2/B1) identifiziert. Der Protein *Score* des PMF lag bei 100, es wurden drei Peptide mit *Ion Scores* von 30 bis 38 detektiert (**Tab. 4**, Seite 40). Der *Ion Score* ist ein von *MASCOT* errechneter Wahrscheinlichkeitswert jedes Peptids der MS/MS-Analyse. Ein *Ion Score* > 30 entspricht einem p-Wert < 0,05. Für eine eindeutige Identifizierung werden von vielen Proteom-Arbeitsgruppen mindestens zwei Peptide mit einem *Ion Score* > 30 gefordert. Diese Kriterien wurden auch hier zugrunde gelegt.

Das RNA-assoziierte Protein hnRNP A2/B1 war in Proben trächtiger Tiere um den Faktor 1,91 erhöht. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, den so genannten *heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins* (hnRNP). Diese Proteine sind in die mRNA-Prozessierung involviert [102]. Pollard et al. [103] haben die räumliche und zeitliche Expression von hnRNP A1/$A1^B$ in Myometrium, der uterinen Gewebsschicht unter dem Endometrium, schwangerer Frauen untersucht. Sie haben gezeigt, dass hnRNPA1/$A1^B$ die Expression myometrialer Proteinspezies reguliert, die bei der Kontrolle der uterinen Aktivität während der Schwangerschaft eine Rolle spielen.

Die identifizierten Proteine im pH- Bereich 4 – 7

Im pH-Bereich 4 – 7 wurden vier Proteine detektiert, welche die festgelegten Kriterien erfüllten. Alle vier waren in ihrer Abundanz in den Proben trächtiger Tiere erhöht (**Abb. 9** und **10** Seite 36 und 37, **Tab. 2**, Seite 37). Eines dieser Proteine lag zwar mit einem Faktor von 1,99 knapp unter 2, konnte jedoch in unabhängigen MS-basierten Experimenten bestätigt werden [104]. Drei der Proteine aus dem pH-Bereich 4 – 7 wurden eindeutig über eine PMF Analyse identifiziert. Die z-Werte lagen zwischen 2,37 und 2,39. Der z-Wert ist ein spezifisch vom Programm *ProFound* errechneter Wahrscheinlichkeitswert. Ein z-Wert von 1,645 entspricht einem p-Wert von 0,05, ein z-Wert von 2,326 entspricht einem p-Wert von 0,01 [105]. Die Sequenzabdeckungen lagen zwischen 55 und 78% (**Tab. 5**, Seite 43). Diese drei Proteine wurden identifiziert als *Rho GDP Dissociation Inhibitor* (Rho GDI), *20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase* (20 α-HSD) und *soluble $NADP^+$-dependent Isocitrate Dehydrogenase 1* (ICD). Das vierte Protein, *Acyl-CoA-binding Protein* (ACBP), konnte aufgrund seiner geringen Größe von etwa 10 kDa und der daraus resultierenden geringen Zahl tryptischer Peptide nur über eine MS/MS Analyse identifiziert werden. Der Protein *Score* lag beim ACBP bei 219, es wurden vier Peptide mit *Ion Scores* von 51 bis 87 detektiert (**Tab. 6**, Seite 45). Das Protein 20 α-HSD (Spot Nr. 7) war in den analytischen 2D-DIGE Gelen als Doppelspot detektierbar (**Abb. 8**, Seite 36). Die Intensitäten der beiden *Spots* waren in den Proben trächtiger Tiere gleichermaßen erhöht (**Abb. 10**, Seite 37). In der PMF Analyse konnte keine weitere Proteinspezies außer 20 α-HSD nachgewiesen werden. Das legt den Schluss nahe, dass das Protein in zwei Isoformen mit leicht unterschiedlichem Molekulargewicht vorlag. Die Abundanzen dieser Isoformen

wurden durch den Kontakt des Endometriums zum Embryo in gleicher Richtung beeinflusst.

Die Validität der Abundanzänderung der 20 α-HSD konnte in einem gel-unabhängigen Verfahren, der so genannten LC-MS Analyse bestätigt werden [104]. LC-MS basierte Methoden arbeiten auf Peptidebene, wodurch die Komplexität eines untersuchten Proteoms stark erhöht wird. Für die Reduktion dieser Komplexität wird das Peptidgemisch vor der Massenspektrometrie über Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt. Die Signalintensitäten in der Massenspektrometrie korrelieren nicht hinreichend mit den Konzentrationen der entsprechenden Peptide. Dafür ist unter anderem die so genannte Ionensuppression verantwortlich. Dabei werden die Signale von Ionen niedriger Abundanz von denen hochabundanter Ionen unterdrückt [106]. Eine Quantifizierung auf MS-Ebene wird aber durch den Einsatz spezieller Markierungstechniken möglich. Dabei werden die beiden biologischen Zustände mit zwei funktionellen Gruppen markiert, die sich durch ihre Isotopenzusammensetzung in der Masse unterscheiden (z.B. ^{12}C-haltige versus ^{13}C-haltige Markierungsgruppe). Die korrespondierenden Peptide werden als charakteristisches Massenpaar detektiert, dessen Signalintensitätsverhältnis dem Konzentrationsunterschied des jeweiligen Proteins in den beiden biologischen Zuständen entspricht. Gel- und MS-basierte Methoden erfassen jeweils unterschiedliche Sätze an Proteinen und sind daher als komplementäre Methoden zu betrachten. Häufig kommt es zwischen beiden Techniken zu Schnittmengen bei der Detektion abundanzveränderter Proteine.

Die Abundanzänderung der 20 α-HSD konnte mit der so genannten *isotope Coded Affinity Tag* (iCAT) Technik [107] in den drei Zwillingspaaren auf der Basis von je zwei Peptiden identifiziert und quantifiziert werden. Das Protein war entsprechend dieser Messung in den Proben der trächtigen Tiere um den Faktor 1,8 (± 0,3) in ihrer Abundanz erhöht (Faktor 2D-DIGE Analyse = 1,99). Die Quantifizierungen der beiden unabhängigen Techniken 2D-DIGE und iCAT stimmen sehr genau überein und zeigen die hohe Validität der Quantifizierung.

Die Analyse von Endometriumproben nicht trächtiger versus trächtiger monozygoter Zwillinge (Tag 18) auf Proteomebene lieferte somit insgesamt vier differentiell abundante Proteine. In die Prozesse der embryo-maternalen Kommunikation sind mit Sicherheit deutlich mehr Proteine involviert [76]. Aufgrund der Limitationen, die

holistischen Proteomanalysen im Allgemeinen anhaften, kann in derartigen Experimenten nur ein Teil aller endometrialen Proteine analysiert werden. Eine wesentliche Limitation ist der große dynamische Bereich verschiedener Molekülspezies, die in einer Zelle, einem Gewebe oder einer Körperflüssigkeit vorhanden sind. In Zellen liegen beispielsweise hoch abundante Proteine (z.B. Aktin) mit 10^8 Kopien pro Zelle vor. Einige Transkriptionsfaktoren sind nur mit 100 – 1000 Molekülen pro Zelle vertreten. Der dynamische Bereich liegt hier bei 10^5 – 10^6. Keine der modernen Methoden für Proteomanalysen kann diesen dynamischen Bereich abdecken.

Mit der 2D-PAGE, wie sie für die Analysen der Endometriumproben monozygoter Zwillinge in dieser Arbeit verwendet wurde (zwei pH-Gradienten), können etwa 2000 Protein-*Spots* gleichzeitig quantifiziert werden. Diese Eigenschaft der 2D-PAGE übertrifft die Leistung anderer Quantifizierungsmethoden holistischer Ansätze um ein Vielfaches. Mit der hier verwendeten 2D-DIGE Technik ist außerdem eine sehr genaue Quantifizierung in einem dynamischen Bereich von bis zu 10^3 möglich. Dieser Bereich umfasst zwar nur einen Bruchteil des dynamischen Bereiches biologischer Systeme, stellt jedoch das derzeit erreichte Optimum dar. So haben die Eigenschaften der 2D-DIGE Technik die Quantifizierung der hier beschriebenen vier trächtigkeitsrelevanten Proteine erst ermöglicht.

Bekannte Funktionen der Proteine im Kontext der Gravidität

Die ICD war in ihrer Abundanz in trächtigen Tieren erhöht (Faktor 2,38). Byrjalsen et al. [108] haben mittels 2D-PAGE [^{35}S]-Methionin-markierte Proteine von gesunden Frauen während der Menstruation untersucht. Es wurde gezeigt, dass die ICD in der sekretorischen Phase am stärksten exprimiert wird. Die sekretorische Phase beginnt nach der Ovulation. In dieser Phase erfolgt durch Progesteron die Differenzierung des Endometriums zum so genannten sekretorischen Endometrium. Diese Phase erreicht ihr Maximum zwischen dem 19. und 22. Tag des Zyklus. In dieser Zeit wird das Endometrium für die Implantation der Blastozyste vorbereitet. Studien aus den 70er und 80er Jahren stellen einen Zusammenhang zwischen der Progesteron-Synthese in Mitochondrien humaner Plazenta und ICD her [109, 110]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die erhöhte Adundanz von ICD in den Proben der trächtigen Tiere auf einen durch die Trächtigkeit erhöhten Metabolismus der endometrialen Zellen zurück zu führen ist.

ACBP (Faktor 2,12) wird auch *Endozepine* oder *Diazepam Binding Inhibitor* genannt [111]. Dieses 10 kDa Protein ist der natürliche Ligand für den peripheren Benzodiazepin Rezeptor (PBR). Die Interaktion zwischen ACBP und PBR konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden [112]. PBR ist hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und wird in großen Mengen in steroidogenen Zellen exprimiert [113]. ACBP und PBR sind wichtige Elemente des Steroidmetabolismus. Sie sind am Transport von Cholesterin aus dem Zytoplasma zur inneren Membran der Mitochondrien beteiligt [112, 114]. Hier wird Cholesterin durch das Enzym *Cytochrome P450 Side Chain Cleavage* (P450scc) in Pregnenolon umgewandelt. Letzteres ist der Vorläufer vieler Steroidhormone, unter anderem des Progesterons, welches das Endometrium auf die Implantation vorbereitet. Bei der Implantation bilden sich im Trophoblasten zwei- oder mehrkernige Riesenzellen. Diese so genannten binukleären Zellen fusionieren mit den einkernigen endometrialen Zellen. Es wurde gezeigt, dass Progesteron von den binukleären Zellen dieses so genannten feto-maternalen Hybridepithels synthetisiert wird [115, 116].

Rho GDI (Faktor 2,56) inhibiert den Austausch von GDP/GTP bei Proteinen der Rho Familie. Rho Proteine sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt wie z.B. Wachstum, Differenzierung, Genexpression und Regulation des Zytoskeletts [117, 118]. Es wurde gezeigt, dass nahezu alle Proteine der Rho Familie mit Rho GDI interagieren [119]. Rho A ist ein wichtiger Faktor während der Implantation beim Mensch, speziell im Zusammenhang mit der Anheftung und Penetration des Trophoblasten [120]. In Rho GDI *Knock-out* Mäusen wurde gezeigt, dass es beim Phänotyp u.a. zur fehlerhaften Embryonalentwicklung nach der Implantation kommt [121].

20 α-HSD (Faktor 1,99) katalysiert die Umwandlung von Progesteron in dessen inaktive Form 20 α-Dihydroprogesteron. Progesteron spielt bei der Entstehung einer Trächtigkeit eine wichtige Rolle. Es bereitet das Endometrium auf die Implantation vor und inhibiert uterine Kontraktionen bis zur Geburt. 20 α-HSD wird in der Plazenta von Ratte, Maus, Ziege und Mensch exprimiert, wobei dessen genaue Funktion dort noch nicht geklärt ist [122]. Obwohl Progesteron ein Schlüsselenzym vieler Prozesse vor und während der Trächtigkeit ist, kann eine zu hohe Konzentration toxisch auf den Embryo wirken [123]. Möglicherweise trägt 20 α-HSD zur Reduktion des embryotoxischen Effektes während der Periimplantationsphase bei.

Die Abundanzänderungen dieser vier identifizierten Proteine deuten auf deren indirekte oder direkte Beteiligung an den Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation hin. Das Bild dieser Proteine wird im Kontext der Entstehung der Trächtigkeit beim Rind in zukünftigen Experimenten weiter vervollständigt. So wurden bereits Antikörper gegen 20 α-HSD, Rho GDI und ACBP generiert, welche in immunhistochemischen Lokalisationsstudien Anwendung finden werden. Diese Studien sollen die Verteilung der Proteine innerhalb des Endometriums insbesondere in Bezug auf die Implantationsstelle des Embryos wiedergeben. Aus der Gesamtheit dieser Ergebnisse soll ein Bild entstehen, das maßgeblich zur weiteren Aufklärung der Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation beitragen kann.

4.3 Analyse ungereifter versus in vitro gereifter Oozyten

Vom Embryo sezernierte Signale wie z.B. das Interferon tau (IFNT) sind ein wichtiger Bestandteil der embryo-maternalen Kommunikation. Die Sekretion dieser Signale ist eine Reaktion des Embryos auf die uterine Umgebung während der Entstehung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit. Der erste Schritt zu einer adäquaten embryonalen Antwort und damit zu einer erfolgreichen Gravidität ist die präzise Entwicklung männlicher und weiblicher Gameten.

Während der ersten Reifeteilung treten Säugeroozyten in der ersten Prophase in eine Ruhephase ein, die bis zur Pubertät andauert (beim Rind im Alter von 15 – 18 Monaten) [124]. Die folgende postpuberale Phase, in der der Zellzyklus fortgesetzt wird, wird als Reifung bezeichnet. Diese Phase beginnt mit der Auflösung der Kernmembran (Germinalvesikel-*Break Down*) und endet beim zweiten Arrest der Oozyte in der Metaphase II. Schlüsselfaktoren während der Oozytenreifung sind der *Maturation Promoting Factor* (MPF) und der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) [125, 126].

Bei der In-vitro-Maturation (IVM) nehmen die noch ungereiften und von den Kumuluszellen umgebenen Oozyten (Kumulus-Oozyten-Komplex) in einem geeigneten Medium die Meiose spontan wieder auf [127]. Die IVM ist der erste wichtige Schritt zur erfolgreichen Anwendung moderner assistierter Reproduktionstechniken (ART). Die Reifung der Oozyte, sowohl in vivo als auch in vitro, hängt von der akkuraten Transkription und Translation reifungsrelevanter Gene in die korrespondierenden Proteine ab [128]. Die IVM bietet die Möglichkeit, die ersten analysierbaren Prozesse während der Entwicklung der Eizelle beim Rind zu untersuchen.

Die Präparation ungereifter und in vitro gereifter boviner Oozyten

Für ein besseres Verständnis dieser molekularen Mechanismen bei der Oozytenmaturation wurden im zweiten Teil dieser Arbeit ungereifte mit in vitro gereiften bovinen Oozyten auf Proteomebene verglichen. Für diese Analyse wurden insgesamt fast 7000 Oozyten gesammelt. Der personelle wie auch finanzielle Aufwand mit gut charakterisierten Tieren wäre nicht durchführbar gewesen. Ausgehend von etwa 10 – 15 Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) pro Ovar wären etwa 250 – 350 Rinder für diese Analyse benötigt worden. Aus diesem Grund

wurden Ovarien von Schlachthoftieren für die Präparation der KOK entnommen. Aus dieser Strategie ergab sich der Nachteil, dass Alter, Zykluszeitpunkt, pathologische Veränderungen sowie die genetische Variation zwischen den Tieren nicht in Betracht gezogen werden konnten. Um die biologische Variation durch dieses heterogene Probenmaterial zu minimieren, wurden alle für die Analyse verwendeten KOK morphologisch charakterisiert und selektiert. So wurden nur KOK verwendet, die von mindestens einer Schicht kompakter Kumuluszellen umgeben waren. Nach Entfernung der Kumuluszellen (der so genannten Denudation) wurden die Oozyten lichtmikroskopisch auf Risse der Zona pellucida geprüft. Es gingen ausschließlich intakte Oozyten in die Analyse ein. Insgesamt standen sechs biologische Replikate zu jeweils 150 ungereiften und 150 gereiften Oozyten zur Verfügung (**Abb. 26**, Seite 48). Jedem Ansatz von 150 Oozyten lagen also mindesten fünf bis acht Tiere zugrunde. Durch die Vereinigung (*Pooling*) von Oozyten unterschiedlicher Tiere konnte eine Kompensation potentiell inhomogener Proben bewirkt werden. Angesichts des geringen Proteingehalts einer Oozyte von 90 ng lieferte jeder der 12 Ansätze Gesamtprotein von durchschnittlich 13,5 µg. Diese Limitation bezüglich der Probenmenge erforderte ein besonders sensitives Analyseverfahren.

Die 2D-DIGE Technik – Sättigungsmarkierung

Der Vergleich ungereifter versus in vitro gereifter Oozyten auf Proteomebene wurde mit der ultra-sensitiven Sättigungsmarkierung durchgeführt [129]. Bei dieser Fluoreszenzmarkierung wird die reaktive Gruppe des Farbstoffs (Maleimid) über eine Thioetherbindung kovalent an die Thiolgruppe der Cysteinreste gebunden. Dabei wird eine möglichst vollständige Markierung aller Cysteinreste angestrebt. Diese Sättigung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff führt zu der hohen Sensitivität dieser Technik. Eine Sättigung der Cysteinreste ohne gleichzeitiges Markieren von Lysingruppen durch einen Farbstoffüberschuss ist jedoch nur mit einem für jedes Probenmaterial spezifischen Verhältnis zwischen Farbstoff- und Proteinmenge zu erreichen, d.h. die Markierungsreaktion muss optimiert werden. Sind nicht alle Cysteine mit Farbstoff markiert, so kann daraus eine Massendifferenz innerhalb einer Proteinspezies resultieren. In der zweiten Dimension der 2D-PAGE führt dies zur Bildung von Doppel-*Spots* (**Abb. 27**, Seite 50). Ein zu hohes Verhältnis von Farbstoff- zu Proteinmenge führt wiederum zur unspezifischen Markierung der Lysinreste und zur Bildung von Horizontalstreifen. Eine exakt durchgeführte

Optimierungsreaktion entscheidet daher maßgeblich über die Qualität der Gele und damit über die Quantifizierbarkeit der Protein-*Spots*. Der geringe durchschnittliche Cysteingehalt der Proteine von 1,5% (http://expasy.org/sprot/relnotes/) hat zur Folge, dass Proteine, die kein Cystein enthalten, nicht detektierbar sind.
Durch Anwendung der Sättigungsmarkierung waren nur 0,5 µg Gesamtprotein für ein analytisches 2D-Gel nötig, was dem Proteingehalt von etwa fünf Oozyten entsprach. Da bei der Sättigungsmarkierung (im Gegensatz zur Minimalmarkierung) nur zwei verschiedene Fluorophore zur Verfügung stehen (Cy3 und Cy5), bestand jedes Einzelexperiment in der Analyse der Oozyten aus zwei Gelen (**Abb. 28**, Seite 50). Auf dem ersten Gel wurde die Kontrolle (ungereifte Oozyten) und der IPS aufgetragen, auf dem zweiten Gel die Probe (gereifte Oozyten) und der IPS. Der IPS bestand hier aus einem Gemisch aller 12 Proben zu gleichen Proteinanteilen. Die Repräsentation aller Proben im IPS ermöglichte eine Normalisierung jedes *Spots* in einem Gel mit seinen Pendants auf allen anderen Gelen.

Wie für die Analyse der Endometriumproben wurden auch für die Oozyten zwei überlappende pH-Bereiche 4 – 7 und 6 – 9 verwendet. Des Weiteren wurden in dieser Analyse die gleichen stringenten Kriterien angelegt (Abundanzfaktor ≥ 2; *Spot* in 12 von 12 Gelen vorhanden; *Student's* t-Test $p \leq 0{,}01$). Da die jeweils ungereiften und gereiften Oozyten eines Probensatzes aus derselben Präparation stammten, wurde der gepaarte *Student's* t-Test angewendet. In der hier verwendeten DeCyder™ Version 6.5 war eine Korrektur mit der so genannten *False Discovery Rate* (FDR) möglich. Dabei handelt es sich um eine Korrekturmethode für multiple Tests [130], die die Werte des *Student's* t-Tests für jeden Protein-*Spot* anpasst, um die allgemeine Fehlerrate so niedrig wie möglich zu halten.
Im pH-Bereich 6 – 9 wurden zwei *Spots* detektiert, die in ihrer Abundanz in gereiften Oozyten erniedrigt waren (**Tab. 8**, Seite 52 und **Abb. 29**, Seite 53). Im pH-Bereich 4 - 7 konnten 36 Proteine mit veränderter Abundanz detektiert werden, 19 waren in den gereiften Oozyten erniedrigt und 17 erhöht (**Abb. 30**, Seite 53 und **Tab. 9**, Seite 54). Ein *Spot* (Nr. 26) lag im Überlappungsbereich der beiden pH-Gradienten. Der *Spot* erfüllte die Kriterien im pH 4 – 7 (Abundanzfaktor 2,50, *Spot* in 12 von 12 Gelen vorhanden, $p = 9{,}8 \times 10^{-6}$), nicht jedoch im pH 6 – 9 (Abundanzfaktor 2,15, *Spot* in 9 von 12 Gelen vorhanden, $p = 0{,}19$). Aufgrund von Präzipitationserscheinungen im

sauren Bereich dreier pH 6 - 9 Gele sowie Verzerrungen der Gele im Randbereich konnte dieser *Spot* nur innerhalb von neun Gelen zugeordnet werden.

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe der Sättigungsmarkierung können sich beim Einlesen der 2D-Gele durch die Anregung mittels Laser gegenseitig beeinflussen. Dieser Effekt wird Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) genannt. Dabei wird die Energie von einem angeregten Fluorophor strahlungslos durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein zweites Fluorophor übertragen. Der Effekt führt zur Verstärkung oder Abschwächung des Signals eines Farbstoffes durch den anderen [82]. Um sicher zu stellen, dass die detektierten Unterschiede nicht auf diesem Phänomen beruhen, sondern biologischen Ursprungs sind, wurden in der Analyse der Oozyten zusätzlich *Same-Same*-Experimente (SSE) durchgeführt. Dazu wurden zwei Aliquots ein und derselben Probe (hier ein Gemisch aller 12 Ansätze) mit Cy3 bzw. Cy5 markiert. Es wurden je zwei Gele im pH-Bereich 4 – 7 und 6 – 9 angefertigt und mit DeCyder 6.5 ausgewertet. Die „Abundanzfaktoren“ der SSEs (max. Faktor = 1,35, **Tab. 9**, Seite 54) lagen innerhalb der technischen Variation [95]. Die ermittelten Unterschiede der differentiellen Analyse konnten daher nicht auf interferierenden Farbstoffen basieren.

Die präparativen Gele

Für die Identifizierung der abundanzveränderten Proteine der Analyse der Oozyten wurden präparative Gele angefertigt. Da alle relevanten Spots in analytischen Gelen ungereifter und gereifter Oozyten vorhanden waren, wurden für die Anfertigung der präparativen Gele ausschließlich ungereifte Oozyten (5176 Stück) gesammelt. Aufgrund der starken Limitierung der Proben konnten nur im pH-Bereich 4 – 7 präparative Gele angefertigt werden. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoffen bei der Minimalmarkierung verändern die Farbstoffe bei der Sättigungsmarkierung das Laufverhalten der Proteine [131]. Es war daher notwendig, die Proteine für präparative Gele mit Farbstoff (Cy3) zu markieren, um ein mit den analytischen Gelen vergleichbares Muster zu erhalten. Nur so war eine eindeutige Zuordnung einander entsprechender *Spots* zwischen den analytischen und den präparativen Gelen möglich. Bei der Auftrennung des Cy3-markierten Proteinlysats der Oozyten kam es zu Proteinpräzipitation im sauren, hochmolekularen Bereich der präparativen Gele (**Abb. 32**, Seite 57). Durch die kovalente Bindung der Farbstoffmoleküle wurden

die Proteine hydrophober, was zur verstärkten Präzipitation der Proteine während der IEF geführt hat. Shaw et al. [72] haben gezeigt, dass der Verlust durch markierungsbedingte Präzipitation im Durchschnitt 25% beträgt, bei großen Proteinen sogar bis zu 40%. Diese Präzipitationen wurden in den analytischen Gelen aufgrund der sehr geringen Proteinmengen (0,5 µg) nicht beobachtet.

18 der 36 als differentiell abundant detektierten Protein-*Spots* konnten in den pH 4 - 7 Coomassie-gefärbten (CBB) Gelen zugeordnet und ausgestochen werden (**Abb. 32**, Seite 57). Die übrigen 18 Proteinspots blieben aufgrund der geringen Sensitivität der CBB-Färbung verglichen mit der hohen Sensitivität der Sättigungsmarkierung verborgen. Von diesen 18 Proteinen waren 13 in den ungereiften Oozyten erhöht, fünf waren in den gereiften Oozyten erhöht. Dieses Verhältnis spiegelt die Tatsachen wider, dass für die Herstellung der präparativen Gele ausschließlich ungereifte Oozyten verwendet werden konnten. Die In-Vitro-Maturation einer derart hohen Zahl an Oozyten (ca. 2500) für die Herstellung präparativer Gele wäre aufgrund des experimentellen Aufwands nicht durchführbar gewesen.

Die Identifizierung der Proteine

Zunächst sollten die ausgestochenen und hydrolysierten Proteine mittels MALDI-TOF/TOF Analyse identifiziert werden. Diese Technik ist üblicherweise sehr gut für die Identifizierung von 2D-*Spots* geeignet. Bei dieser Methode werden die Peptide zusammen mit einer Matrix auf einem festen Träger (MALDI *Target*) kristallisiert. Die Matrix bewirkt bei Beschuss durch einen Laser die Verdampfung und Ionisation der Peptide [49]. Über die Bestimmung der Flugzeit in einem elektrischen Feld kann die Masse der Peptide errechnet werden. Der Computer-basierte Vergleich der beobachteten Massen mit den theoretischen Peptidmassen, die aus einer Datenbank errechnet werden, setzt definierte Peptidgrößen voraus. Diese werden beim PMF durch die enzymatische Spaltung von Proteinen an Peptidbindungen bestimmt, so spaltet z.B. Trypsin regioselektiv nach den Aminosäuren Lysin und Arginin. Vermutlich führte die Cy3-Markierung der Peptide zu einer so hohen Absorption von Laser-Energie, dass dadurch die Peptide auch an anderen Stellen des Kohlenstoffgerüsts brachen. Eine Zuordnung der beobachteten und theoretischen Fragmentmassen und damit die Identifizierung des ursprünglichen Proteins waren somit nicht mehr möglich.

Bei der nano-LC-MS/MS Analyse erfolgt die Ionisation der Peptide durch das wesentlich schonendere so genannte Elektrospray (ESI) Verfahren [132]. Dabei werden die Peptide nach der Trennung durch eine nano-Chromatographie durch eine dünne Hohlnadel, deren Oberfläche unter Hochspannung steht, geleitet und über eine Strecke mit hoher Potentialdifferenz gesprüht. Die elektrostatisch geladenen Tröpfchen verdampfen im Gasstrom und die anwachsende Ladungsdichte führt zur Explosion des Tröpfchens (Coulomb Explosion). Dadurch resultieren vorrangig mehrfach positiv geladene Peptidionen. Mit diesem erheblich aufwendigeren Verfahren konnten schließlich 13 der ausgestochenen Proteine identifiziert werden (**Tab 10a**, **b**, und **c**, Seiten 60 – 62). Die Cy3-Markierung wurde den Suchparametern des *MASCOT*-Programms als „Feste Modifikation“ hinzugefügt. Trotzdem konnten keine Cystein-haltigen Peptide detektiert werden. Möglicherweise verhindert die Cy3-Markierung die Ionisierung der Peptide, oder das Farbstoffmolekül zerbricht während der Ionisation oder der MS/MS-Analyse in undefinierte Fragmente [133].

Die Identifizierungen der Proteine waren aufgrund der Eigenschaften der Fluorophore (*CyDyes*) bei der Ionisierung sowie der Limitierung der Oozytenproben ausgesprochen schwierig. Es stellt sich die Frage, ob ein gelfreier, rein auf LC-MS/MS basierender Ansatz für die Analyse der Oozyten besser geeignet gewesen wäre. Eine der jüngsten MS-basierten Entwicklungen ist die *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ) Technik [134]. Hier können vier verschiedene Proteingemische gleichzeitig analysiert werden. Die Markierungs-reaktion erfolgt auf Peptidebene. Die vier erhältlichen iTRAQ-Reagenzien unterscheiden sich während der PMF Analyse in ihrer Masse nicht. Bei der MS/MS-Analyse fragmentiert jedes der Reagenzien auf eine spezifische Art und Weise, sodass die Proteine anhand ihrer MS/MS-Signale identifiziert und quantifiziert werden können. Diese allgemein als *Stable Isotope Labeling* (SIL) bezeichneten Techniken sind jedoch durchweg nicht sensitiv genug, um so geringe Mengen, wie in dieser Analyse beschrieben, zu analysieren. In dieser Analyse wurden 0,5 µg pro 2D-Gel aufgetragen. Ausgehend von etwa 2×10^6 verschiedenen tryptischen Peptiden, die aus einem eukaryontischen Zelllysat resultieren [60], liegen im Durchschnitt nur 260 amol einer Peptidspezies vor (bei durchschnittlich 962 Da pro Peptid). Die Nachweisgrenze einer linearen Ionenfalle, wie sie hier verwendet wurde, liegt im unteren Femtomol-Bereich [62]. Des Weiteren ist eine Quantifizierung auf

Peptidebene schwieriger als auf Proteinebene, da zwei Peptide des gleichen Proteins für eine eindeutige Quantifizierung und Identifizierung nötig sind. Die Abundanzänderung des Proteins wird aus dem Mittelwert der Abundanzen aller gefundenen Peptide errechnet. Eine differentielle Analyse der Oozyten in dieser Sensitivität und Quantifizierungsgenauigkeit war ausschließlich mit der 2D-PAGE in Kombination mit der Sättigungsmarkierung und der Identifizierung der *Spots* mittels nano-LC-MS/MS möglich.

12 der Proteine wurden mit mindestens zwei Peptiden mit *MASCOT Ion Scores* > 30 identifiziert (**Tab 10a**, **b**, und **c**, Seiten 60 – 62), was einem p-Wert < 0,05 entspricht. Eines der Proteine (14-3-3 ε) konnte mittels der nano-LC-MS/MS Analyse nur mit einem Peptid detektiert werden. In solchen Fällen ist es möglich, eine manuelle Auswertung des MS/MS-Spektrums vorzunehmen, um die Validität dieser Identifizierung zu prüfen. Maßgeblich für die Validität einer Identifizierung über ein Peptid ist die Qualität des MS/MS Spektrums. Das MS/MS Spektrum des Peptids mit der Sequenz VAGMDVELTVEER in dieser Analyse zeigte eine Reihe von zehn Aminosäuren (**Abb 33**, Seite 58), die Suche dieser Sequenz gegen bovine Datenbanken (IPI und SwissProt) zeigte die eindeutige Diskriminierung für 14-3-3 ε. Zusammen mit dem hohen *MASCOT Ion Score* des Peptids von 70 kann das Protein als eindeutig identifiziert angesehen werden.
Um zu klären, ob die Identifizierungen der Proteine durch Diffusion aus benachbarten *Spots* beeinflusst worden sein könnten, wurden zusätzlich *Spots* ausgestochen, die sehr nah an den abundanzveränderten *Spots* lagen. Fünf dieser Nachbar-*Spots* konnten identifiziert werden (**Tab 11a** und **b**, Seite 63 und 64). Die Identifizierungen der beiden benachbarten *Spots* Nr. 3 und 3a ergaben unterschiedliche Proteinspezies. Ebenso die Protein-*Spots* 32 und 32a bzw. 34 und 34a. Damit konnte für die drei *Spots* Nr. 3, 32 und 34 gezeigt werden, dass kein Einfluss benachbarter *Spots* bei der Identifizierung bestand.
Im Falle der *Spots* Nr. 11, 35 und 36 wurden zwei oder mehr Proteinspezies identifiziert. In *Spot* 11 wurden identifiziert: Tubulin beta, Tubulin alpha 1, *Protein Disulfide Isomerase Precursor* (PDI), *UV excision repair protein RAD23 homolog B*. In den benachbarten *Spots* Nr. 11a und 11b konnten PDI bzw. PDI und Tubulin beta identifiziert werden. Diese beiden Proteine sind möglicherweise in *Spot* 11 eindiffundiert. Das in *Spot* 11 identifizierte *UV excision repair protein RAD23*

homolog B hatte eine theoretische Masse von 43 kDa und einen pI von 4,79. Der pI hat mit dem im 2D-Gel beobachteten übereingestimmt, es wurde jedoch eine Masse von 65 kDa beobachtet. Im Falle von Mehrfachidentifizierungen ist keine eindeutige Aussage möglich, da nicht eindeutig geklärt werden kann, welches der Proteine in seiner Abundanz verändert ist. Hierzu wäre es nötig, einen sehr engen pH-Bereich zu verwenden wie beispielsweise 4,5 – 5,5 für *Spot* Nr. 11. Die Protein-*Spots* könnten so klarer voneinander getrennt werden. Dazu wären zusätzliche Analysen in den jeweiligen pH-Bereichen nötig gewesen, was aufgrund der Limitation der Proben jedoch nicht möglich gewesen wäre.

Bekannte Funktionen der Proteine im Kontext der Eizellreifung

In der Analyse ungereifter versus in vitro gereifter Oozyten konnten zehn der abundanzveränderten Protein-*Spots* eindeutig identifiziert werden. *Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase* (E2) wurde in gereiften bovinen Oozyten mit 2-fach erhöhter Abundanz detektiert (Faktor 2,08). *6-Phosphogluconolactonase* (6PGL) wurde mit 4-fach erniedrigter Abundanz detektiert (Faktor 4,25). E2 und 6PGL sind beides Enzyme des Energiemetabolismus. E2 bildet eine Untereinheit des 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes, welcher ein regulatorisches Enzym des Krebszyklus ist [135]. Der Krebszyklus ist essentiell während der Eizellreifung [136]. 6PGL ist in den Pentose-Phosphat-Weg involviert [137]. Tsutsumi et al. [138] haben bei der in vivo und in vitro Reifung von Oozyten der Ratte gezeigt, dass die Aktivität des Krebszyklus während der Reifung erhöht ist, während die Aktivität der Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges erniedrigt ist. Die Ergebnisse von Tsutsumi et al. decken sich mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Abundanzmessungen von E2 und 6PGL. Diese Übereinstimmungen zeigen die hohe Validität der Daten der vorliegenden Arbeit.

Das *Translationally-controlled Tumor Protein* (TCTP) wurde mit erniedrigter Abundanz (Faktor 2,29) in gereiften Oozyten gemessen. TCTP ist als Mikrotubulus- und Ca^{2+}-bindendes Protein bekannt. Schwankungen der Ca^{2+}-Konzentration spielen eine Rolle bei der Reifung boviner Oozyten [139]. Niedrige Ca^{2+}-Konzentrationen in der Oozyte begünstigen das Fortschreiten der Meiose. TCTP könnte durch seine erhöhte Konzentration in ungereiften Oozyten einen Teil der Ca^{2+}-Ionen abpuffern und so die Meiose begünstigen. Taft et al. [140] haben u.a. das Gen *Tpt1* beschrieben, welches für TCTP kodiert und im Ovar der Maus ausschließlich in der

Oozyte exprimiert wird. TCTP wurde außerdem als Interaktionspartner für *Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein* (MCL1) beschrieben, welches in die Keimzellreifung sowie in die Interaktion zwischen Keimzellen und somatischen Zellen während der Bildung der Primordialfollikel beim Menschen involviert ist [141, 142]. In einem kürzlich erschienenen Artikel der Eizellreifung bei der Maus wurde beobachtet, dass die Abundanz von TCTP in gereiften Oozyten erhöht war [68]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine erniedrigte Abundanz des Proteins in gereiften Oozyten beschrieben werden. Dieser Unterschied zwischen den beiden Arbeiten könnte auf die Detektion zweier verschiedener Isoformen zurückzuführen sein.

Clusterin wurde in ungereiften Oozyten mit 2-fach erhöhter Abundanz im Vergleich zu gereiften detektiert (Faktor 2,02). Clusterin ist ein hoch konserviertes Protein und in der Literatur mit 18 Synonymen beschrieben [143]. Ostermeier et al. [144] haben mittels eines *zona-free hamster egg/human sperm penetration assays* gezeigt, dass die Spermien zusätzlich zum haploiden väterlichen Genom auch paternale mRNA an die Eizelle übertragen. Sie konnten die Transkripte von Clusterin in den Spermien nachweisen, nicht aber in unbefruchteten Oozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte das Protein Clusterin jedoch in ungereiften und gereiften bovinen Oozyten nachgewiesen werden. Da die hier verwendeten Oozyten mit Zona Pellucida (ZP) untersucht wurden, könnte Clusterin von den Kumuluszellen synthetisiert und bei der Eizellentwicklung in die ZP eingelagert werden. Der Promotor des Clusterin-Gens ist Ziel des Transkiptionsfaktors CDX-2 [31], welcher ein Hox-Gen-Transkript ist und die höchste Abundanz im Stadium der ungereiften Oozyte zeigt [30]. Der Transkriptionsfaktor CDX-2 könnte von der Oozyte an die Kumuluszellen abgegeben werden und dort die Translation des Clusterins initiieren. *Microarray*-Analysen haben gezeigt, dass das Clusterin-Gen in humanen Kumuluszellen stark überexprimiert ist [145]. Clusterin interagiert mit Komponenten des Komplementsystems [146]. Das von den Kumuluszellen in die ZP eingelagerte Clusterin könnte die Oozyte durch sukzessive Freisetzung bei ihrer Wanderung durch den Eileiter vor Komplement-vermittelter Lyse schützen [147]. Diese Hypothese wird durch die in dieser Arbeit gemessene Abundanzerniedrigung untermauert.

Peroxiredoxin-3 (PRDX) oder *Thioredoxin-dependent Peroxid Reductase* ist in das Redox-System involviert [148]. In der vorliegenden Arbeit wurde Peroxiredoxin-3 mit erniedrigter Abundanz in gereiften verglichen mit ungereiften Oozyten detektiert (Faktor 2.25). Bhojwani et al. [149] konnten während der IVM boviner Oozyten eine

Erniedrigung des Proteins Peroxiredoxin-2 zeigen. Möglicherweise erfüllen die beiden Proteine Peroxiredoxin-2 und Peroxiredoxin-3 ähnliche Funktionen während der IVM. Leyens et al. [150] konnten auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Oozyten und Embryonen verschiedene Expressionsmuster der sechs *PRDX*-Isoformen detektieren. *PRDX2*-, *PRDX3*- und *PRDX6*-Transkripte wurden in Oozyten vor und nach der IVM detektiert. Im 9- bis 16-Zellstadium der Embryonen waren diese Transkripte nicht messbar. Diese mRNA-Daten zusammen mit der unabhängigen Identifizierung zweier verschiedener Proteine dieser Familie – Peroxiredoxin-2 von Bhojwani et al. und Peroxiredoxin-3 in der vorliegenden Arbeit – zeigen eindeutig deren Beteiligung an der Oozyten-Reifung.

Glutathion S-Transferasen (GST) schützen die Zelle vor oxidativem Stress oder so genannten *Reactive Oxygen Species* (ROS) wie O_2^-, H_2O_2 und HO•. Vom Bakterium bis zum Säuger wurde gezeigt, dass GST durch oxidativen Stress hoch reguliert werden [151]. Oxidativer Stress spielt eine Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie der Reproduktion sowie bei der Eizellreifung. In Oozyten der Ratte wurde gezeigt, dass Antioxidantien die spontane Wiederaufnahme der Meiose blockieren. ROS hingegen induzieren die Reifung der Eizellen in den Follikeln [152]. In den hier durchgeführten Experimenten konnten drei verschiedene Protein-*Spots* (*Spot* Nr. 3, 16 und 31) mit veränderter Abundanz eindeutig als Glutathion S-Transferase Mu5 (GSTM5) identifiziert werden, eine von 7 Mu-Klassen bei Säugern [153]. Die drei GSTM5 *Spots* sind im 2D-Gel bei einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa auf gleicher Höhe lokalisiert. Die GSTM5 *Spot*s wiesen jedoch unterschiedliche isoelektrische Punkte zwischen pH 5,4 und 6,3 auf. Der Abundanzfaktor der drei *Spot*s lag zwischen 4,10 und 10,34. Der Sequenzvergleich (*Sequence Alignment*) aller Mu-Varianten der GST aus der bovinen IPI Datenbank zeigte, dass alle hier gemessenen Peptide ausschließlich mit GSTM5 übereinstimmen (**Abb 35**, Seite 86). Diese Ergebnisse lassen folgende Rückschlüsse zu: (i) Die drei verschiedenen Protein-*Spot*s resultieren aus verschiedenen Modifikationen ein und derselben GSTM5-Form. Die Abundanzen der unterschiedlich modifizierten GSTM5-Varianten werden in Abhängigkeit des Reifungszustandes der Oozyten in der IVM reguliert. Obwohl diese Ergebnisse keine Aussagen über die Art und Position der Modifikationen zulassen, liefern sie dennoch wichtige Informationen für weitere Untersuchungen. So wäre eine genauere Analyse der Art der Modifikationen möglich

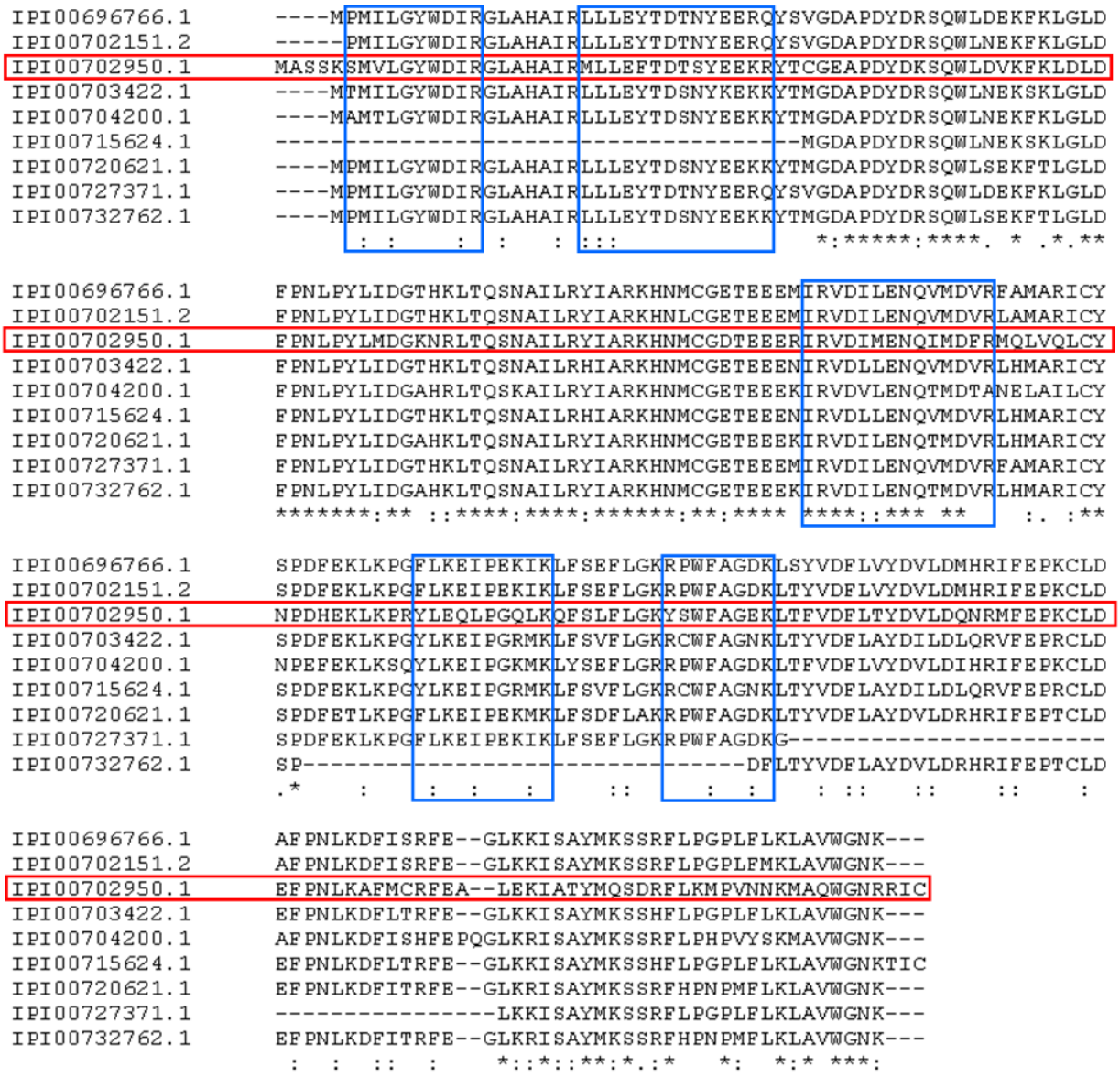


Abb. 35: Sequenzvergleich (Alignment) der neun in der bovinen IPI-Datenbank vorhandenen GST-Mu-Formen. Innerhalb der Mu-Varianten wird zwischen verschiedenen Isoformen unterschieden (Siehe unten). Der rote Rahmen markiert die in unseren Experimenten identifizierte Mu5-Form. Die blauen Rahmen markieren die Peptide, die zur Identifizierung der GST Mu5 geführt haben. Im Vergleich mit den anderen acht Mu-Formen in diesem Alignment fällt auf, dass alle detektierten Peptide eindeutig für die Mu5-Form (IPI00702950.1) sind. In der folgenden Tabelle sind die Namen zu den Accession-Nummern aufgelistet, wie sie in der Datenbank vorliegen:

Accession-Nr.	Proteinname IPI-Datenbank
IPI00696766.1	Predicted: Similar to Glutathione S-Transferase Mu 1 Isoform 1
IPI00702151.2	Glutathione S-Transferase Mu 1
IPI00702950.1	Similar to Glutathione S-Transferase Mu 5
IPI00703422.1	26 kDa Protein
IPI00704200.1	Predicted: Similar to Glutathione S-Transferase Mu1 Isoform 2 Isoform 3
IPI00715624.1	22 kDa Protein
IPI00720621.1	Predicted: Similar to Glutathione S-Transferase Mu 1 Isoform 1
IPI00727371.1	Predicted: Similar to Glutathione S-Transferase Mu 1 Isoform 2 Isoform 2
IPI00732762.1	Predicted: Similar to Glutathione S-Transferase Mu 4 Isoform 2

beispielsweise durch Antikörper-basierte Techniken (z.B. Antikörper gegen Phospho-Tyrosin) [154]. (ii) Die gemessenen Peptide stimmen mit den Sequenzen polymorpher GST-Varianten überein, die noch nicht in der Literatur bzw. den Datenbanken beschrieben sind. Es wäre möglich die drei detektierten GST-Formen zu sequenzieren. Die Kombination von 2D-PAGE, Western-Blotting und Edman-Sequenzierung stellt eine geeignete Methode für die Determination der Sequenz eines Proteins dar [155]. Diese Erkenntnisse über Modifikationen der GSTM5 bzw. polymorpher GST-Formen im Kontext der IVM wären mit einer gelfreien LC-MS/MS Analyse verborgen geblieben. Nur durch den 2D-basierten Ansatz in Kombination mit der genauen Quantifizierungsmöglichkeit über die 2D-DIGE Technik konnten diese Informationen erlangt werden.

Peroxiredoxin-3 und GSTM5 sind mit oxidativem Stress assoziiert. Die IVM der Oozyten findet unter normalen, atmosphärischen Bedingungen statt. Dabei liegt eine Sauerstoffkonzentration von ca. 20% vor, verglichen mit etwa 7% der in vivo Situation im Ovidukt [150]. Hohe Sauerstoffkonzentrationen während der IVM führen zu erhöhten Mengen an ROS, die möglicherweise Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress aktivieren. Diese Mechanismen könnten die Ursache für die hier gemessenen Änderungen sein. Andererseits sind ROS wichtige Mediatoren bei vielen reproduktionsbiologischen Prozessen wie Eizellreifung, Steroidogenese, Ovulation, Implantation, Entstehung der Blastozyste, Luteolyse, sowie bei der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit [156]. In zukünftigen Experimenten soll die Eizellreifung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (z.B. bei 7% und 20% O_2) untersucht werden, um deren möglichen Einfluss auf die IVM zu klären. Diese Experimente könnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Optimierung der Kultursysteme für die IVM liefern. Kann beispielsweise die hohe O_2-Konzentration während der IVM als Ursache für die Abundanzänderung der Redox-assoziierten Proteine bestätigt werden, könnten im nächsten Schritt die Bedingungen während der Kultur so angepasst werden, dass der Redox-Status der Oozyten während der Kultur den in vivo Bedingungen entspricht. Außerdem kann die Funktion Redox-assoziierter Proteine während des Prozesses der Eizellreifung genauer untersucht werden.

Die drei Proteine E2, Peroxiredoxin-3 und GSTM5, die in der vorliegenden Arbeit mit veränderter Abundanz detektiert werden konnten, zeigten in einer differentiellen Proteomstudie der IVM mit Oozyten vom Schwein keine Veränderung [69]. Dies

könnte auf artspezifischen Unterschieden beruhen. Wahrscheinlicher sind jedoch die Unterschiede aufgrund verschiedener Detektionsmethoden für Proteine. Die differentielle Analyse der porcinen Oozyten wurde mit Silber-gefärbten 2D-Gelen durchgeführt. Die Silberfärbung hat einen sehr geringen dynamischen Bereich von nur einer Größenordnung und ist zudem sehr schwierig zu reproduzieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *CyDyes* haben in der Praxis einen dynamischen Bereich von 10^3 und einen sehr hohen Grad an Reproduzierbarkeit und exakter Quantifizierbarkeit. Es wäre denkbar, dass sich die Abundanzänderungen der drei Proteine außerhalb des messbaren Bereichs der Silberfärbung befanden, mit der DIGE-Technik jedoch erfasst werden konnten.

In der 2D-DIGE Analyse der ungereiften versus der in vitro gereiften bovinen Oozyten konnte eine mehr als 6-fache Abundanzabnahme des *Elongation Factor 1 gamma* (EF-1γ, Faktor 6,55) und eine mehr als 3-fache Abundanzabnahme des Proteins 14-3-3 ε (Faktor 3,45) ermittelt werden. Beide Proteine sind in den Regulationsmechanismus des *Maturation Promoting Factors* (MPF) involviert (**Abb. 36**, Seite 89), welcher ein Schlüsselenzym der Zellzykluskontrolle sowohl bei der Mitose als auch der Meiose ist [125]. MPF besteht aus zwei Untereinheiten, *Cell Division Control Protein 2* (Cdc2) und Cyclin B. Die Aktivität des MPF wird während des Zellzyklus durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die Phosphorylierung der Cdc2-Untereinheit durch Myt1/Wee1 führt zur Inaktivierung von MPF. Myt1/Wee1 wird durch eine cAMP-abhängige Kaskade gesteuert [157]. MPF-Aktivierung erfolgt durch Cdc25, welches die Cdc2-Untereinheit dephosphoryliert. Cdc25 ist durch die Bindung an 14-3-3 ε inaktiviert [158]. Cdk2 bewirkt die Dissoziation von 14-3-3 ε und somit die Aktivierung von Cdc25. Cdc25 dephosphoryliert Cdc2, und MPF wird aktiviert. In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine Abnahme von 14-3-3 ε in gereiften Oozyten gemessen werden. Das Protein könnte nach der Maturation degradiert werden, da keine Inaktivierung des Cdc25 mehr nötig ist.

In Oozyten von *Xenopus laevis* und Goldfisch wurde gezeigt, dass EF-1γ durch MPF phosphoryliert wird [159, 160]. Tokumoto et al. haben postuliert [161, 162], dass durch die Phosphorylierung von EF-1γ dessen Bindung an 26S-Proteasomen verstärkt wird, und dass sich während der Reifung von *Xenopus* Oozyten die Abundanz von EF-1γ signifikant erniedrigt. Außerdem zeigten sie, dass Cyclin B durch das 26S-Proteasom degradiert und MPF inaktiviert wird. Möglicherweise liegt hier ein zusätzlicher Autoregulationsmechanismus von MPF vor, der von der Bindung

von EF-1γ an das 26S-Proteasom abhängt. Vor der Reifung wird EF-1γ vom aktivierten MPF phosphoryliert. EF-1γ bindet verstärkt an 26S-Proteasomen, wodurch der Abbau des Cyclin B verhindert wird. Diese Hypothese wird durch die erhöhte Abundanz des EF-1γ in den ungereiften Oozyten gestützt. Nach der Reifung wird die Aktivität des MPF gehemmt, indem EF-1γ von den 26S-Proteasomen dissoziiert und Cyclin B in erhöhtem Maße degradiert wird. Da EF-1γ in diesem Zusammenhang nicht mehr benötigt wird, kann es ebenfalls degradiert werden. Die Abundanz von EF-1γ wäre demzufolge in gereiften Oozyten erniedrigt, was sich mit den hier ermittelten Daten deckt.

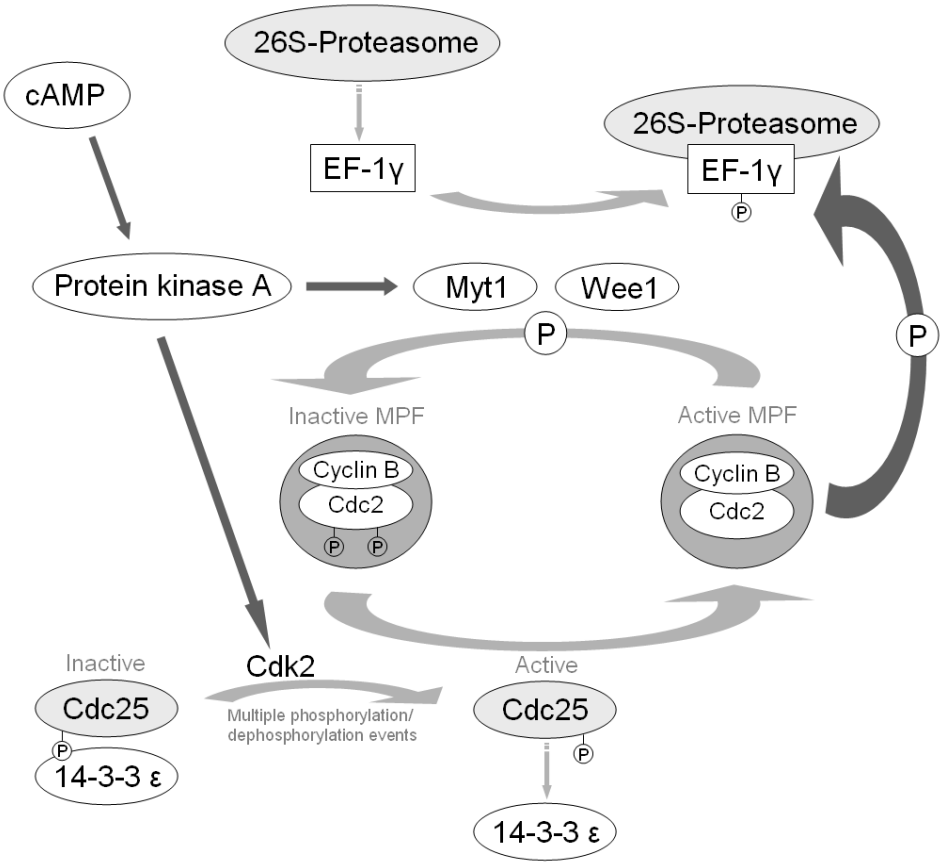


Abb. 36: Regulation des Maturation Promoting Factor (MPF). Die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) ist von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig. Hohe cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung von PKA. PKA wiederum aktiviert Myt1/Wee1, welches die Phosphorylierung von Cdc2 katalysiert und MPF inaktiviert. Gleichzeitig blockiert PKA die Kinase Cdk2. Dadurch bleibt Cdc25 inaktiv. MPF liegt in seiner inaktiven Form vor. EF-1γ wird nicht phosphoryliert. 26S-Proteasomen bauen vermehrt Cyclin B ab. Niedrige cAMP-Konzentrationen führen zur Inaktivierung von PKA und damit von Myt1/Wee1. Die Blockierung von Cdk2 wird aufgehoben. Durch Phosphorylierung- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen dissoziiert 14-3-3 ε von Cdc25. Das aktivierte Cdc25 katalysiert die Dephosphorylierung von Cdc2, was zur Aktivierung von MPF führt. MPF phosphoryliert EF-1γ, wodurch dessen Bindung zu 26S-Proteasomen verstärkt und so der Abbau von Cyclin B inhibiert wird.

2D-DIGE weist eine bis heute unter den 2D-basierten Techniken unerreichte Quantifizierbarkeit und Reproduzierbarkeit auf. In Kombination mit der ultra-sensitiven Sättigungsmarkierung hat man die Möglichkeit, diese Eigenschaften auf stark limitierte Proben anzuwenden, mit denen bis vor kurzem noch keine differentielle Proteomanalyse möglich gewesen wäre wie die hier untersuchte In-vitro-Maturation boviner Oozyten.

Einige der identifizierten Proteine wie z.B. E2 und 6PGL sind bekannt für ihre Aktivitätsänderung während der Eizellreifung. Die in dieser Arbeit ermittelten Abundanzfaktoren decken sich mit den Erkenntnissen früherer Arbeiten, was die Zuverlässigkeit des experimentellen Ansatzes verdeutlicht. Das Protein Clusterin wurde im Zusammenhang mit den Prozessen während der Eizellreifung noch nicht beschrieben. Tiefer gehende Untersuchungen des Clusterins werden weitere wichtige Informationen über dessen mögliche Funktion während der Oozyten-maturation liefern. Des Weiteren konnten drei verschiedene GSTM5-*Spots* detektiert werden. Genauere Untersuchungen dieses Phänomens könnten neue, noch nicht beschriebene Formen der GST hervorbringen, die unterschiedliche Funktionen während der Reifungsprozesse erfüllen. EF-1γ und 14-3-3 ε sind Interaktionspartner des MPF, ein essentielles Enzym der Zellzyklusregulation. Die Abundanz-erniedrigung des 14-3-3 ε konnte erstmals im Zusammenhang mit der Oozytenmaturation gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stellen eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen dar. Ein detaillierteres Verständnis der Funktion einiger der hier ermittelten Oozytenproteine kann zur Aufklärung noch unbekannter, an der Reifung beteiligter Mechanismen beitragen. Des Weiteren könnten Folgeuntersuchungen, die auf dieser Arbeit basieren, zur Entwicklung besserer Bedingungen während der In-vitro-Maturation führen und so die Rate erfolgreich angewendeter, moderner assistierter Reproduktionstechniken beim Rind und anderen Säugern erhöhen.

5 Zusammenfassung

Der Erfolg einer Gravidität hängt von einem komplexen Zusammenspiel molekularer Faktoren von Gameten, Embryonen und Feten mit ihrer maternalen Umgebung ab. Eine intakte embryo-maternale Kommunikation ist die Voraussetzung für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit. Von den molekularen Signalen, die an dieser Interaktion beteiligt sind, sind bis heute nur wenige bekannt.

Für ein besseres Verständnis dieser molekularen Faktoren beim Rind wurden auf maternaler Seite embryo-induzierte Veränderungen des Endometriums am 18. Tag der Trächtigkeit auf Proteomebene untersucht. Diese so genannte Periimplantationsphase wurde anhand monozygoter Zwillinge analysiert. Jeweils einer der beiden Zwillinge erhielt einen Transfer zweier in vitro produzierter Blastozysten, der korrespondierende Zwilling bekam einen Scheintransfer und diente als nicht trächtige Kontrolle. Endometriumproben dreier Zwillingspaare wurden mit der zweidimensionalen Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) in Kombination mit der Minimalmarkierung untersucht. Um als biologisch relevant angesehen zu werden, mussten die Protein-*Spots* die folgenden strengen Kriterien erfüllen: Abundanzfaktor ≥ 2; *Spots* in allen Gelen vorhanden; *Student's* t-Test $p \leq 0{,}01$. Vier abundanzveränderte Protein-*Spots* konnten detektiert und mittels PMF und MALDI-TOF/TOF Analyse identifiziert werden: Die *Isocitrate Dehydrogenase 1 ($NADP^+$, soluble)* spielt eine Rolle bei der Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation. *Acyl-CoA-binding Protein* ist ein wichtiges Element des Steroidmetabolismus. *Rho GDP Dissociation Inhibitor beta* interagiert mit Proteinen der Rho-Familie, wobei Rho A an der Implantation beteiligt ist. *20 α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase* ist am Progesteron-Metabolismus beteiligt. Die vier trächtigkeitsrelevanten Proteine lieferten interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen. Die erfolgreiche Entstehung der Trächtigkeit basiert jedoch nicht nur auf der Vorbereitung der maternalen Umgebung, ebenso essentiell ist die präzise Entwicklung männlicher und weiblicher Gameten.

Eine korrekte Eizellreifung stellt die Grundlage für eine erfolgreiche Befruchtung und die darauf folgende Embryonalentwicklung dar. Da in vivo eine Analyse der Oozytenmaturation nicht durchführbar ist, wurde auf der embryonalen Seite die In-vitro-Maturation (IVM) boviner Oozyten auf Proteomebene untersucht. Die IVM ist beim Rind eine routinemäßig durchgeführte Prozedur und der erste und limitierende

Schritt für assistierte Reproduktionstechniken (ART) wie die In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen. Die Eizellreifung ist definiert als die Phase von der Vollendung der ersten Reifeteilung bis zur Metaphase der Meiose II. Oozyten wurden aus Ovarien präpariert und in vitro maturiert. Auf Proteomebene wurden ungereifte mit in vitro gereiften bovinen Oozyten verglichen. Aufgrund der Limitierung der Probenmenge (10 – 20 Oozyten pro Ovar = 0,9 – 1,8 µg Protein) wurde eine 2D-DIGE-basierte Analyse mit der ultra-sensitiven Sättigungsmarkierung durchgeführt. So konnten die quantitativen Analysen mit nur 0,5 µg Gesamtprotein pro 2D-Gel durchgeführt werden. Sechs unabhängige biologische Replikate von ungereiften bzw. gereiften Oozyten wurden analysiert. Die Auswertung der Analyse nach den oben genannten Kriterien ergab die Detektion von 38 abundanzveränderten Proteinen, von denen zehn mittels nano-LC-MS/MS Analyse eindeutig identifiziert werden konnten: *Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase* und *6-Phosphogluconolactonase* sind Enzyme des Energiemetabolismus. *Translationally-controlled Tumor Protein* könnte bei der Wiederaufnahme der Meiose eine Rolle spielen. Clusterin interagiert mit Komponenten des Komplementsystems und könnte eine Schutzfunktion vor Komplement-vermittelten Abbauprozessen haben. Peroxiredoxin-3 und Glutathion S-Transferase Mu5 sind in das Redox-System involviert. Durch den 2D-Gel-basierten Ansatz war es möglich, drei Formen der Glutathion S-Transferase zu detektieren. *Elongation Factor 1 gamma* und das Protein 14-3-3 ε sind in den Regulations-mechanismus des *Maturation Promoting Factor* (MPF) involviert. MPF ist ein Schlüsselenzym der Zellzykluskontrolle. Einige dieser abundanzveränderten Proteine, die während der IVM boviner Oozyten detektiert wurden, könnten wichtige Hinweise zur Optimierung bestehender in vitro Kultursysteme geben.

Die abundanzveränderten Proteine, die in den hier durchgeführten 2D-basierten Analysen detektierten werden konnten, sind interessante Kandidaten für weitere, tiefer gehende Analysen im Zusammenhang mit der embryo-maternalen Kommunikation.

6 Literatur

1. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., et al., Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 1982, *27*, 147-158.

2. Taverne, M. A., Breukelman, S. P., Perenyi, Z., Dieleman, S. J., et al., The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002, *42*, 613-624.

3. Thibier, M., Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. *Data Retrieval Commitee Annual Report. IETS Newslett* 2004, *22*, 12-19.

4. Young, L. E., Sinclair, K. D., Wilmut, I., Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 1998, *3*, 155-163.

5. Farin, P. W., Piedrahita, J. A., Farin, C. E., Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2006, *65*, 178-191.

6. Hansen, P. J., Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. *Theriogenology.* 2006, *65*, 119-125.

7. Stewart, H. J., McCann, S. H., Barker, P. J., Lee, K. E., et al., Interferon sequence homology and receptor binding activity of ovine trophoblast antiluteolytic protein. *J. Endocrinol.* 1987, *115*, 13-15.

8. Bazer, F. W., Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992, *199*, 373-384.

9. Demmers, K. J., Derecka, K., Flint, A., Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction.* 2001, *121*, 41-49.

10. Spencer, T. E., Bazer, F. W., Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci.* 2002, *7*, 1879-1898.

11. Kimura, K., Spate, L. D., Green, M. P., Roberts, R. M., Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-tau by bovine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, *68*, 88-95.

12. Kubisch, H. M., Larson, M. A., Roberts, R. M., Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, *49*, 254-260.

13. Kubisch, H. M., Larson, M. A., Ealy, A. D., Murphy, C. N., Roberts, R. M., Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim Reprod. Sci.* 2001, *66*, 1-13.

14. Kubisch, H. M., Sirisathien, S., Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H. J., et al., Effects of developmental stage, embryonic interferon-tau secretion and recipient synchrony on pregnancy rate after transfer of in vitro produced bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 2004, *39*, 120-124.

15. Jones, J. I., Clemmons, D. R., Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995, *16*, 3-34.

16. Chesnel, F., Bonnec, G., Tardivel, A., Boujard, D., Comparative effects of insulin on the activation of the Raf/Mos-dependent MAP kinase cascade in vitellogenic versus postvitellogenic Xenopus oocytes. *Dev. Biol.* 1997, *188*, 122-133.

17. Hahnel, A., Schultz, G. A., Insulin-like growth factor binding proteins are transcribed by preimplantation mouse embryos. *Endocrinology.* 1994, *134*, 1956-1959.

18. Winger, Q. A., de los, R. P., Han, V. K., Armstrong, D. T., et al., Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of "embryotrophic" insulin-like growth factor circuits. *Biol. Reprod.* 1997, *56*, 1415-1423.

19. Daliri, M., Rao, K. B., Kaur, G., Garg, S., et al., Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo (Bubalus

bubalis) embryos and oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 1999, *117*, 61-70.

20. Watson, A. J., Westhusin, M. E., Winger, Q. A., IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1999, *54*, 303-315.

21. Blondin, P., Farin, P. W., Crosier, A. E., Alexander, J. E., Farin, C. E., In vitro production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biol. Reprod.* 2000, *62*, 384-389.

22. Ornitz, D. M., Itoh, N., Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001, *2*, Reviews3005.

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

24. Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J. K., Lonai, P., Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, *95*, 5082-5087.

25. Rassoulzadegan, M., Rosen, B. S., Gillot, I., Cuzin, F., Phagocytosis reveals a reversible differentiated state early in the development of the mouse embryo. *EMBO J.* 2000, *19*, 3295-3303.

26. Larson, R. C., Ignotz, G. G., Currie, W. B., Transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, *33*, 432-435.

27. Lim, J. M., Hansel, W., Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, *8*, 1199-1205.

28. Michael, D. D., Alvarez, I. M., Ocon, O. M., Powell, A. M., et al., Fibroblast Growth Factor-2 Is Expressed by the Bovine Uterus and Stimulates Interferon-{tau} Production in Bovine Trophectoderm. *Endocrinology.* 2006, *147*, 3571-3579.

29. Akam, M., Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell.* 1989, *57*, 347-349.

30. Ponce-Barajas, P., Expression analysis of homeobox gene family in bovine pre- and post-implantative developmental stages. *Dissertation* 2006.

31. Suh, E., Wang, Z., Swain, G. P., Tenniswood, M., Traber, P. G., Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, *280*, 149-156.

32. Taylor, H. S., Transcriptional regulation of implantation by HOX genes. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 2002, *3*, 127-132.

33. Daftary, G. S., Taylor, H. S., Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr. Rev.* 2006, *27*, 331-355.

34. Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S. E., Mallok, S., et al., Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 2004, *32*, 449-466.

35. Leo, C. P., Pisarska, M. D., Hsueh, A. J., DNA array analysis of changes in preovulatory gene expression in the rat ovary. *Biol. Reprod.* 2001, *65*, 269-276.

36. Dalbies-Tran, R., Mermillod, P., Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 2003, *68*, 252-261.

37. Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., et al., Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol. Reprod.* 2003, *68*, 1170-1177.

38. Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Einspanier, R., et al., Monozygotic Twin Model Reveals Novel Embryo-Induced Transcriptome Changes of Bovine Endometrium in the Pre-Attachment Period. *Biol. Reprod.* 2005, *74*, 253-264.

39. Rempel, L. A., Francis, B. R., Austin, K. J., Hansen, T. R., Isolation and sequence of an interferon-tau-inducible, pregnancy- and bovine interferon-stimulated gene product 15 (ISG15)-specific, bovine ubiquitin-activating E1-like (UBE1L) enzyme. *Biol. Reprod.* 2005, *72*, 365-372.

40. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* 1999, *19*, 1720-1730.

41. Kaufmann, J. E., Irminger, J. C., Halban, P. A., Sequence requirements for proinsulin processing at the B-chain/C-peptide junction. *Biochem. J.* 1995, *310*, 869-874.

42. Trinidad, J. C., Specht, C. G., Thalhammer, A., Schoepfer, R., Burlingame, A. L., Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Mol. Cell Proteomics.* 2006, *5*, 914-922.

43. Walsh, C. T., *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory*, Englewood, Colorado 2006.

44. Needleman, S. B., Wunsch, C. D., A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 1970, *48*, 443-453.

45. O'Farrell, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, *250*, 4007-4021.

46. Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975, *26*, 231-243.

47. Edman, P., Sequence determination. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 1970, *8*, 211-255.

48. Lottspeich, F., Zorbas, H., *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin 1998, pp. 297-322.

49. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., et al., Protein and polymer analyses up to *m/z* 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988, *2*, 151-153.

50. Mora, J. F., Van Berkel, G. J., Enke, C. G., Cole, R. B., et al., Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000, *35*, 939-952.

51. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., et al., The sequence of the human genome. *Science.* 2001, *291*, 1304-1351.

52. Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., McGraw, R. A., et al., A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 1997, *7*, 235-249.

53. Zheng, J., Gao, X., Beretta, L., He, F., The Human Liver Proteome Project (HLPP) workshop during the 4th HUPO World Congress. *Proteomics.* 2006, *6*, 1716-1718.

54. Omenn, G. S., Paik, Y. K., Speicher, D., The HUPO Plasma Proteome Project: a report from the Munich congress. *Proteomics.* 2006, *6*, 9-11.

55. Frohlich, T., Helmstetter, D., Zobawa, M., Crecelius, A. C., et al., Analysis of the HUPO Brain Proteome reference samples using 2-D DIGE and 2-D LC-MS/MS. *Proteomics.* 2006, *6*, 4950-4966.

56. Schaeffer, L. R., Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim Breed. Genet.* 2006, *123*, 218-223.

57. Gorg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004, *4*, 3665-3685.

58. Reisinger, V., Eichacker, L. A., Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Proteomics.* 2006, *6*, 6-15.

59. Anderson, N. L., Anderson, N. G., The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics.* 2002, *1*, 845-867.

60. Rabilloud, T., Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2002, *2*, 3-10.

61. Pedersen, S. K., Harry, J. L., Sebastian, L., Baker, J., et al., Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J. Proteome. Res.* 2003, *2*, 303-311.

62. Frohlich, T., Arnold, G. J., Proteome research based on modern liquid chromatography - tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J. Neural Transm.* 2006, *113*, 973-994.

63. Kreutzberger, J., Protein microarrays: a chance to study microorganisms? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, *70*, 383-390.

64. Roberts, G. P., Parker, J. M., Symonds, H. W., Macromolecular components of genital tract fluids from the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1976, *48*, 99-107.

65. Salamonsen, L. A., Doughton, B. W., Findlay, J. K., The effects of the preimplantation blastocyst in vivo and in vitro on protein synthesis and secretion by cultured epithelial cells from sheep endometrium. *Endocrinology* 1986, *119*, 622-628.

66. Weise, D. W., Newton, G. R., Emesih, G. C., Effects of day of the estrous cycle or pregnancy on protein secretion by caprine endometrial tissues. *Biol. Reprod.* 1993, *49*, 522-527.

67. Rueda, B. R., Naivar, K. A., George, E. M., Austin, K. J., et al., Recombinant interferon-tau regulates secretion of two bovine endometrial proteins. *J. Interferon Res.* 1993, *13*, 303-309.

68. Vitale, A. M., Calvert, M. E., Mallavarapu, M., Yurttas, P., et al., Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2006, *Epub ahead of print*.

69. Ellederova, Z., Halada, P., Man, P., Kubelka, M., et al., Protein patterns of pig oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 2004, *71*, 1533-1539.

70. Coenen, K., Massicotte, L., Sirard, M. A., Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, *67*, 313-322.

71. Unlu, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997, *18*, 2071-2077.

72. Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J., Stone, T., et al., Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics.* 2003, *3*, 1181-1195.

73. Sitek, B., Apostolov, O., Stuhler, K., Pfeiffer, K., et al., Identification of dynamic proteome changes upon ligand activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* 2005, *4*, 291-299.

74. Fujii, K., Kondo, T., Yokoo, H., Okano, T., et al., Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye. *Proteomics.* 2006, *6*, 1640-1653.

75. Paoloni-Giacobino, A., Implications of reproductive technologies for birth and developmental outcomes: imprinting defects and beyond. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2006, *8*, 1-14.

76. Wolf, E., Arnold, G. J., Bauersachs, S., Beier, H. M., et al., Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod. Domest. Anim* 2003, *38*, 276-289.

77. Wolf, E., Zakhartchenko, V., Brem, G., Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J. Biotechnol.* 1998, *65*, 99-110.

78. Stojkovic, M., Westesen, K., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., et al., Coenzyme Q(10) in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 1999, *61*, 541-547.

79. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, *72:248-54.*, 248-254.

80. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 1987, *8*, 93-99.

81. Pennington, K., McGregor, E., Beasley, C. L., Everall, I., et al., Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics.* 2004, *4*, 27-30.

82. Gruber, H. J., Hahn, C. D., Kada, G., Riener, C. K., et al., Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconjug. Chem.* 2000, *11*, 696-704.

83. Pru, J. K., Austin, K. J., Haas, A. L., Hansen, T. R., Pregnancy and interferon-tau upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. *Biol. Reprod.* 2001, *65*, 1471-1480.

84. Reese, J., Das, S. K., Paria, B. C., Lim, H., et al., Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 44137-44145.

85. Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., et al., Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002, *143*, 2119-2138.

86. Moebius, J., Zahedi, R. P., Lewandrowski, U., Berger, C., et al., The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 2005, *4*, 1754-1761.

87. Peterson, A. J., Lee, R. S., Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003, *59*, 687-697.

88. LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2006, *89*, 1267-1279.

89. Greenough, C., Jenkins, R. E., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M., et al., A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. *Proteomics.* 2004, *4*, 3107-3111.

90. Hinerfeld, D., Innamorati, D., Pirro, J., Tam, S. W., Serum/Plasma depletion with chicken immunoglobulin Y antibodies for proteomic analysis from multiple Mammalian species. *J. Biomol. Tech.* 2004, *15*, 184-190.

91. Westbrook, J. A., Yan, J. X., Wait, R., Welson, S. Y., Dunn, M. J., Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms. *Electrophoresis* 2001, *22*, 2865-2871.

92. Ngai, H. H., Sit, W. H., Jiang, P. P., Xu, R. J., et al., Serial changes in urinary proteome profile of membranous nephropathy: implications for pathophysiology and biomarker discovery. *J. Proteome. Res.* 2006, *5*, 3038-3047.

93. Seike, M., Kondo, T., Fujii, K., Yamada, T., et al., Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics.* 2004, *4*, 2776-2788.

94. Lilley, K. S., Friedman, D. B., All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert. Rev. Proteomics.* 2004, *1*, 401-409.

95. Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., et al., A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 2003, *3*, 36-44.

96. Gade, D., Thiermann, J., Markowsky, D., Rabus, R., Evaluation of two-dimensional difference gel electrophoresis for protein profiling. Soluble proteins of the marine bacterium Pirellula sp. strain 1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2003, *5*, 240-251.

97. Taylor, C. F., Hermjakob, H., Julian, R. K., Jr., Garavelli, J. S., et al., The work of the Human Proteome Organisation's Proteomics Standards Initiative (HUPO PSI). *OMICS.* 2006, *10*, 145-151.

98. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999, *20*, 3551-3567.

99. Humble, E., Heldin, P., Forsberg, P. O., Engstrom, L., Phosphorylation in vitro of fibrinogen from three mammalian species with four different protein kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985, *241*, 225-231.

100. Vallet, J. L., Christenson, R. K., McGuire, W. J., Association between uteroferrin, retinol-binding protein, and transferrin within the uterine and conceptus compartments during pregnancy in swine. *Biol. Reprod.* 1996, *55*, 1172-1178.

101. Asahina, T., Kobayashi, T., Okada, Y., Itoh, M., et al., Studies on the role of adhesive proteins in maintaining pregnancy. *Horm. Res.* 1998, *50*, 37-45.

102. Caceres, J. F., Kornblihtt, A. R., Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 2002, *18*, 186-193.

103. Pollard, A. J., Sparey, C., Robson, S. C., Krainer, A. R., Europe-Finner, G. N., Spatio-temporal expression of the trans-acting splicing factors SF2/ASF and heterogeneous ribonuclear proteins A1/A1B in the myometrium of the pregnant human uterus: a molecular mechanism for regulating regional protein isoform expression in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, *85*, 1928-1936.

104. Berendt, F. J., Frohlich, T., Schmidt, S. E., Reichenbach, H. D., et al., Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. *Proteomics.* 2005, *5*, 2551-2560.

105. Chamrad, D. C., Korting, G., Stuhler, K., Meyer, H. E., et al., Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics.* 2004, *4*, 619-628.

106. Annesley, T. M., Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2003, *49*, 1041-1044.

107. Hansen, K. C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R. J., Hirsch, J., et al., Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable 13C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol. Cell Proteomics.* 2003, *2*, 299-314.

108. Byrjalsen, I., Larsen, P. M., Fey, S. J., Christiansen, C., Human endometrial proteins with cyclic changes in the expression during the normal menstrual cycle: characterization by protein sequence analysis. *Hum. Reprod.* 1995, *10*, 2760-2766.

109. Klimek, J., Boguslawski, W., Tialowska, B., Zelewski, L., Regulation of progesterone biosynthesis in human placental mitochondria by Krebs cycle metabolites. *Acta Biochim. Pol.* 1976, *23*, 185-192.

110. Simpson, E. R., MacDonald, P. C., Endocrine physiology of the placenta. *Annu. Rev. Physiol.* 1981, *43*, 163-188.

111. Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkel, D., et al., Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983, *80*, 3531-3535.

112. Papadopoulos, V., Brown, A. S., Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995, *53*, 103-110.

113. Papadopoulos, V., Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.* 1993, *14*, 222-240.

114. Lacapere, J. J., Papadopoulos, V., Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 2003, *68*, 569-585.

115. Wooding, F. B., Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 1992, *13*, 101-113.

116. Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.* 2004, *128*, 657-668.

117. Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C., Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997, *11*, 2295-2322.

118. Hall, A., Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998, *279*, 509-514.

119. Faure, J., Dagher, M. C., Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie* 2001, *83*, 409-414.

120. Shiokawa, S., Sakai, K., Akimoto, Y., Suzuki, N., et al., Function of the small guanosine triphosphate-binding protein RhoA in the process of implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000, *85*, 4742-4749.

121. Dovas, A., Couchman, J. R., RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* 2005, *390*, 1-9.

122. Jayasekara, W. S., Yonezawa, T., Ishida, M., Yamanouchi, K., Nishihara, M., Expression and possible role of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the placenta of the goat. *J. Reprod. Dev.* 2005, *51*, 265-272.

123. PETRELLI, E. A., Forbes, T. R., Toxicity of progesterone to mouse fetuses. *Endocrinology* 1964, *75*, 145-146.

124. Russe, I., Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.* 1983, *24*, 77-92.

125. Nurse, P., Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 1990, *344*, 503-508.

126. Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., et al., Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. *Science.* 1993, *262*, 1262-1265.

127. Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F. F., Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* 2005, *73*, 737-744.

128. Massicotte, L., Coenen, K., Mourot, M., Sirard, M. A., Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics.* 2006, *6*, 3811-3820.

129. Wilson, K. E., Marouga, R., Prime, J. E., Pashby, D. P., et al., Comparative proteomic analysis using samples obtained with laser microdissection and saturation dye labelling. *Proteomics.* 2005, *5*, 3851-3858.

130. Benjamini, Y., Hochberg, Y., On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *J. Educ. Behav. Stat.* 2000, *25*, 60-83.

131. Greengauz-Roberts, O., Stoppler, H., Nomura, S., Yamaguchi, H., et al., Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens. *Proteomics.* 2005, *5*, 1746-1757.

132. Smith, R. D., Future directions for electrospray ionization for biological analysis using mass spectrometry. *Biotechniques.* 2006, *41*, 147-148.

133. Sitek, B., Luttges, J., Marcus, K., Kloppel, G., et al., Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics.* 2005, *5*, 2665-2679.

134. Chong, P. K., Gan, C. S., Pham, T. K., Wright, P. C., Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections. *J. Proteome. Res.* 2006, *5*, 1232-1240.

135. Yeaman, S. J., The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J.* 1989, *257*, 625-632.

136. Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., Beconi, M., Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction.* 2003, *126*, 753-763.

137. Collard, F., Collet, J. F., Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Identification of the cDNA encoding human 6-phosphogluconolactonase, the

enzyme catalyzing the second step of the pentose phosphate pathway(1). *FEBS Lett.* 1999, *459*, 223-226.

138. Tsutsumi, O., Satoh, K., Taketani, Y., Kato, T., Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, *33*, 333-337.

139. He, C. L., Damiani, P., Parys, J. B., Fissore, R. A., Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1997, *57*, 1245-1255.

140. Taft, R. A., Denegre, J. M., Pendola, F. L., Eppig, J. J., Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. *Biol. Reprod.* 2002, *67*, 953-960.

141. Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z. H., Fujise, K., Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J. Biol. Chem.* 2002, *277*, 37430-37438.

142. Hartley, P. S., Bayne, R. A., Robinson, L. L., Fulton, N., Anderson, R. A., Developmental changes in expression of myeloid cell leukemia-1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, *87*, 3417-3427.

143. Rosenberg, M. E., Silkensen, J., Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995, *27*, 633-645.

144. Ostermeier, G. C., Miller, D., Huntriss, J. D., Diamond, M. P., Krawetz, S. A., Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature.* 2004, *429*, 154.

145. Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrour, T., et al., The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum. Reprod.* 2006, *21*, 1705-1719.

146. Jenne, D. E., Tschopp, J., Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem. Sci.* 1992, *17*, 154-159.

147. Fenichel, P., Donzeau, M., Cervoni, F., Menezo, Y., Hsi, B. L., Expression of complement regulatory proteins on human eggs and preimplantation embryos. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1995, *33*, 155-164.

148. Watabe, S., Hiroi, T., Yamamoto, Y., Fujioka, Y., et al., SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1997, *249*, 52-60.

149. Bhojwani, M., Rudolph, E., Kanitz, W., Zuehlke, H., et al., Molecular Analysis of Maturation Processes by Protein and Phosphoprotein Profiling during In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: A Proteomic Approach. *Cloning Stem Cells.* 2006, *8*, 259-274.

150. Leyens, G., Knoops, B., Donnay, I., Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, *69*, 243-251.

151. Rinaldi, R., Eliasson, E., Swedmark, S., Morgenstern, R., Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab Dispos.* 2002, *30*, 1053-1058.

152. Behrman, H. R., Kodaman, P. H., Preston, S. L., Gao, S., Oxidative stress and the ovary. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2001, *8*, 40-42.

153. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, *45*, 51-88.

154. Ivanov, S. S., Chung, A. S., Yuan, Z. L., Guan, Y. J., et al., Antibodies immobilized as arrays to profile protein post-translational modifications in mammalian cells. *Mol. Cell Proteomics.* 2004, *3*, 788-795.

155. Komatsu, S., Edman Sequencing of Proteins from 2D Gels. *Methods Mol. Biol.* 2006, *355:211-8.*, 211-218.

156. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K., Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005, *3*, 28-48.

157. Schmitt, A., Nebreda, A. R., Inhibition of Xenopus oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, *99*, 4361-4366.

158. Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., Kornbluth, S., Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.* 1999, *18*, 2174-2183.

159. Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Cormier, P., Labbe, J. C., et al., Purification of a p47 phosphoprotein from Xenopus laevis oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *FEBS Lett.* 1989, *251*, 219-224.

160. Tokumoto, M., Nagahama, Y., Tokumoto, T., A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1 gamma from goldfish (Carassius auratus). *DNA Seq.* 2002, *13*, 27-31.

161. Tokumoto, T., Kondo, A., Miwa, J., Horiguchi, R., et al., Regulated interaction between polypeptide chain elongation factor-1 complex with the 26S proteasome during Xenopus oocyte maturation. *BMC. Biochem.* 2003, *4*.

162. Tokumoto, T., Yamashita, M., Tokumoto, M., Katsu, Y., et al., Initiation of cyclin B degradation by the 26S proteasome upon egg activation. *J. Cell Biol.* 1997, *138*, 1313-1322.

7 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Dr. Georg Arnold für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe am Genzentrum die Doktorarbeit anfertigen zu können. Während der Zeit in seiner Arbeitsgruppe habe ich neben einer Menge an fachlichem Wissen gelernt, wie gute wissenschaftliche Arbeit funktioniert. Wichtig für mich war auch, dass ich immer das Gefühl hatte, dass mein Chef hinter mir steht.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß und Herrn Prof. Dr. Lutz Eichacker danke ich für die Begutachtung meiner Doktorarbeit innerhalb der Fakultät für Biologie und für die freundliche Unterstützung.

Den weiteren Mitgliedern der Promotionskommission Herrn Prof. Dr. Dario Leister, Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer, Herrn Prof. Dr. John Parsch und Herrn PD Dr. Jörg Meurer danke ich für ihre Bereitschaft, diese Aufgabe zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Eckhardt Wolf danke ich für die Möglichkeit im Rahmen meiner Dissertation an einem sehr interessanten reproduktionsbiologischen Thema arbeiten zu können. Außerdem möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Thomas Fröhlich danke ich für seine große Hilfsbereitschaft während meiner Zeit in diesem Labor, vor allem für die intensive Betreuung während der ersten Phase meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an das Graduiertenkolleg (GRK 1029). In den interessanten Vorlesungs- und Kursangeboten hatte ich einen Einblick in interessante Gebiete anderer Arbeitsgruppen und Institute. Den Kollegiaten danke ich für die netten und lustigen, aber wie ich finde zu seltenen Zeiten, die wir zusammen verbracht haben.

Dr. Hendrik Wenigerkind, Dr. Horst Reichenbach, Dr. Susanne Rehfeld und Dr. Susanne Schmidt danke ich für ihre Arbeit bezüglich Vorbereitung und Untersuchung der Versuchstiere sowie der Entnahme der Endometriumproben.

Dr. Marc Boelhauve und Tuna Güngör möchte ich für die Vorbereitung und In-vitro-Maturation der Oozytenproben danken.

Meiner Schwester Katrin Berendt danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Roman Kashirin, Michael Forgber, Patrick Gruber, Carolin Block, Miwako Tamura, Sabine Frank, Corinna Mörth und Irene Friedle danke ich für die netten Gespräche und gemeinsamen Unternehmungen, auch außerhalb des Labors.

Herrn Ulrich Stuck möchte ich für seine außergewöhnliche und für mich ausgesprochen wichtige Hilfe danken, ohne die ich sowohl privat als auch beruflich niemals so weit gekommen wäre.

Meinen Freunden und den Fliegerkameraden der Fluggruppe Neuburg danke ich für die Ablenkung in meiner Freizeit. Vor allem die Zeit „über den Wolken“ hat mich vieles vergessen lassen und so den nötigen Abstand zu meiner Arbeit hergestellt.

Meiner liebsten Miriam danke ich für ihre Geduld während der manchmal doch sehr schwierigen Zeiten mit mir. Vielen Dank, mein Schatz, für die tolle gemeinsame Zeit, die wir zusammen haben.

8 Lebenslauf

Frank Berendt
Zielstattstr. 58
81379 München

Persönliche Daten:

Geburtstag:	30.08.1974
Geburtsort:	Neuburg an der Donau
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch

Schule:

1986 – 1995	Descartes-Gymnasium, Neuburg a. d. Donau Leistungskurse: Biologie, Physik
1995	Allgemeine Hochschulreife

Hochschule:

1995 – 1996:	Fachhochschule, Regensburg Studiengang: Maschinenbau
1996 – 1998:	Universität Regensburg Studiengang Biologie
1998 – 2001:	Ludwig-Maximilians-Universität, München Studiengang Biologie Hauptfach: Neurobiologie Nebenfächer: Anthropologie & Humangenetik, Pharmakologie & Toxikologie, Zoologie
2001 – 2002:	Diplomarbeit, Psychiatrische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München Arbeitsgruppe: Dr. med. D. Rujescu „Expression von *CLK2* und *htra2ß* in post mortem Hirngewebe von Patienten mit Alzheimer, Schizophrenie und Kontrollen.“

2002 – 2007: Doktorarbeit, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Arbeitsgruppe: Dr. G. Arnold
„Proteomanalyse des bovinen Endometriums und zweier Oozytenstadien."

2005 – 2007: Graduiertenkolleg GRK1029: „Functional genome research in veterinary medicine."

Veröffentlichungen:

Artikel:

Berendt, F.J., Fröhlich, T., Schmidt, S.E., Reichenbach, H.D., Wolf, E., Arnold, G.J. (2005). Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. Proteomics, *5*, 2551-2560.

Glatz, D.C., Rujescu, D., Tang, Y., **Berendt, F.J.**, Hartmann, A.M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Hulette, C., Jellinger, K., Hampel, H., Riederer, P., Moller, H.J., Andreadis, A., Henkel, K., Stamm, S. (2006). The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. J. Neurochem. *96*, 635-644.

Eingereichte Artikel:

Berendt F.J., Fröhlich T., Boelhauve M., Güngör T., Wolf E., Arnold G.J. (2007). Highly sensitive saturation labeling reveals changes in abundance of cell cycle associated proteins and redox enzyme variants during oocyte maturation *in vitro*.

Abstracts:

Fröhlich, T., **Berendt, F.J.**, Wolf, E., Arnold, G.J. (2004). Deciphering embryo-maternal cross-talk by holistic proteome approaches. Mol. Cell. Proteomics *3*, 203.

Berendt, F.J., Fröhlich, T., Wolf, E., Arnold, G.J. (2005). Embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium. Mol. Cell. Proteomics *4*, 383.

Präsentationen:

Vorträge:

Trächtigkeitsabhängige Veränderungen des bovinen Endometrium-Proteoms. (2004) Vortragstagung DGfZ / GFT, Rostock, Germany.

Proteomanalyse des bovinen Endometriums und korrespondierender Embryonalstadien. (2005) Retreat Graduiertenkolleg (GRK1029), Hohenkammer, Germany.

Vergleich ungereifter vs. gereifter Oozyten. (2006) Retreat Graduiertenkolleg (GRK1029), Hohenkammer, Germany.

Poster:

Berendt, F.J., Fröhlich, T., Wolf, E., Arnold, G.J. (2004). Deciphering embryo-maternal cross-talk by holistic proteome approaches. 6thSiena Meeting from Genome to Proteome, Siena, Italy.

Fröhlich, T., **Berendt, F.J.**, Wolf, E., Arnold, G.J. (2004). Deciphering embryo-maternal cross-talk by holistic proteome approaches. HUPO 3rd Annual World Congress, Beijing, China.

Berendt, F.J., Fröhlich, T., Schmidt, S.E., Wolf, E., Arnold, G.J. (2005). Deciphering embryo-maternal cross-talk by holistic proteome approaches. Gene Center Retreat, Wildbad Kreuth, Germany.

Berendt, F.J., Fröhlich, T., Wolf, E., Arnold, G.J. (2005). Embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium. HUPO 4th Annual World Congress, Munich, Germany.

Berendt, F.J., Boelhauve, M., Fröhlich, T., Richter, S., Wolf, E., Arnold, G.J. (2006). Ultra-sensitive differential analysis of bovine oocyte proteomes. Genecenter Retreat, Wildbad Kreuth, Germany.

Berendt, F.J., Boelhauve, M., Fröhlich, T., Richter, S., Wolf, E., Arnold, G.J. (2006). Ultra-sensitive differential analysis of bovine oocyte proteomes. 7thSiena Meeting from Genome to Proteome, Siena, Italy.

Stipendien:

Stipendiat im Graduiertenkolleg GRK1029: “Functional genome research in veterinary medicine.” (2005 – 2007)

9 Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, den 16.07.2007 ……

(Unterschrift des Antragstellers)