

Entwicklung und Evaluierung eines Verfahrens zur
Genexpressionsanalyse bei individuellen praimplantatorischen
Saugerembryonen über die cDNA-Array-Technologie

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universitat Würzburg

vorgelegt von

Tobias Brambrink

aus Gütersloh

Würzburg, 2002

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter : Prof. Dr. H. Niemann, Tierärztliche Hochschule Hannover

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne, Fakultät für Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biotechnologie des Institutes für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Mariensee angefertigt und im Rahmen des SFB 265 durch die DFG gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
<hr/>		
1.1	Genexpression und Differenzierung	2
1.2	Präimplantatorische Embryonalentwicklung bei Säugern	4
1.3	In vitro-Produktion (IVP) von Embryonen	8
1.3.1	In vitro-Maturation (IVM)	8
1.3.2	In vitro-Fertilisation (IVF)	9
1.3.3	In vitro-Kultur (IVC)	9
1.3.4	Kerntransfer (NT)	10
1.3.5	Leistungsfähigkeit von IVP-Systemen	11
1.3.6	Probleme der In vitro-Produktion von Embryonen	12
1.4	Die Erstellung von Genexpressionsprofilen bei Embryonen	13
1.4.1	Konventionelle Methoden zur Erstellung von Genexpressionsprofilen	13
1.4.2	Beurteilung von Embryonen durch Genexpressionsanalyse	16
1.4.3	Nachweis apoptotischer Vorgänge in Embryonen	17
1.4.3.1	Allgemeines zur Apoptose	17
1.4.3.2	Molekulare Grundlagen der Apoptose	18
1.4.3.3	Apoptose in der frühen Embryonalentwicklung	20
1.4.4	Grenzen konventioneller Methoden zum Nachweis der Genexpression	21
1.5	Die cDNA-Array-Technologie	22
1.5.1	Grundlagen der cDNA-Array-Technologie	22
1.5.2	Technische Aspekte der cDNA-Array-Technologie	23
1.5.3	Grenzen der cDNA-Array Technologie	25
1.5.4	Strategien zur cDNA-Array-Analyse sehr kleiner mRNA-Mengen	25
1.5.4.1	T7-Polymerase Amplifikation	26
1.5.4.2	Globale PCR	27
1.6	Ziele der Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
<hr/>		
2.1	cDNA Arrays	31
2.1.1	RT-PCR	32
2.1.2	Klonieren der PCR-Produkte in pGemTeasy	33
2.1.3	Transfektion kompetenter Bakterien	34
2.1.4	Bakterienkultur	34
2.1.5	Miniprep	34

2.1.6	Restriktionsverdau	35
2.1.7	Sequenzierung	35
2.1.8	Amplifikation der Inserts mit universellen Primern	41
2.1.9	Gelelektrophorese	42
2.1.10	Gelextraktion	42
2.1.11	Vakuumzentrifugation	42
2.1.12	Denaturierung	42
2.1.13	Drucken der Arrays	43
2.2	Tiermaterial und Tierhaltung	45
2.2.1	Mäuse	45
2.2.2	Rinder	45
2.3	Superovulationsbehandlungen	45
2.3.1	Mäuse	45
2.3.2	Rinder	46
2.4	Embryongewinnung, -kultur und -lagerung	46
2.4.1	Murine Oozyten	46
2.4.2	Murine Zweizeller	46
2.4.3	Murine Blastozysten	47
2.4.4	In vivo produzierte bovine Blastozysten	47
2.4.5	In vitro produzierte bovine Blastozysten	47
2.4.5.1	Ovariengewinnung	48
2.4.5.2	KOK-Gewinnung	48
2.4.5.3	In vitro-Maturation (IVM)	48
2.4.5.4	In vitro-Fertilisation (IVF)	49
2.4.5.5	In vitro-Kultur von Embryonen (IVK)	49
2.4.5.6	Kerntransfer (NT)	49
2.4.5.7	Erstellung parthenogenetischer Embryonen	50
2.5	mRNA Extraktion aus Embryonen	51
2.6	Murines Gewebe	51
2.7	RNA Extraktion aus murinem Gewebe	51
2.8	aRNA-Präparation für die cDNA-Array Analyse	52
2.8.1	cDNA Synthese	53
2.8.1.1	Erststrangsynthese	53
2.8.1.2	Zweitstrangsynthese	54
2.8.2	Globale PCR	55
2.8.3	Aufreinigung der voramplifizierten cDNAs	55
2.8.4	In vitro-Transkription (IVT)	55
2.8.5	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen	56
2.8.6	Nukleinsäure-Markierung	56
2.9	cDNA-Array Analyse von mRNA- bzw. aRNA-Präparationen	57

2.9.1	Nukleinsäure-Hybridisierung	58
2.9.2	Detektion hybridisierter Nukleinsäuren	58
2.9.3	Digitalisierung	59
2.9.4	Densitometrie	59
2.9.5	Normalisierung	59
2.9.6	Berechnung des Cutoff-Value	59
2.10	Verwendete Geräte und Lösungen	60
2.10.1	Geräte	60
2.10.2	Lösungen	61
2.10.2.1	Medien für die Zell- und Embryonenkultur	61
2.10.2.2	Medium für die Bakterienkultur	63
2.10.2.3	Lösungen für die cDNA-Array Analyse	63
2.11	Ablauf der Experimente	64
3	Ergebnisse	65
<hr/>		
3.1	Vorversuche	65
3.1.1	Vergleich verschiedener Strategien der globalen RT-PCR	66
3.1.2	Vergleich von DOP-RT-PCR und SMART-Technologie	68
3.1.3	Optimierung des PCR-Schrittes der globalen RT-PCR	71
3.1.4	Optimierung der Zweitstrangsynthese	74
3.1.5	Reproduzierbarkeit der globalen RT-PCR aus Einzelembryonen	77
3.1.6	In vitro-Transkription von cDNA-Fragmenten aus der globalen RT-PCR	80
3.2	Erstellung eines Protokolls zur cDNA-Array-Analyse von mRNA-Präparationen aus einzelnen Säugerembryonen nach RT-PCR-IVT	81
3.2.1	mRNA-Extraktion	81
3.2.2	Erststrangsynthese	82
3.2.3	Zweitstrangsynthese	82
3.2.4	Globale PCR	83
3.2.5	In vitro-Transkription	83
3.2.6	Markierung der aRNA	83
3.2.7	cDNA-Array-Hybridisierung	84
3.3	Evaluierung des erstellten Protokolls	86
3.3.1	Analyse von mRNA-Präparationen verschiedener Maus-Gewebe	86
3.3.2	Analyse separat präparierter mRNA-Extrakte	90
3.3.3	Analyse einer aRNA-Präparation in separaten Markierungs- und Hybridisierungsreaktionen	91
3.3.4	Analyse aus einer mRNA-Quelle separat amplifizierter aRNA-Präparationen	92

3.3.5	Analyse amplifizierter und nicht amplifizierter RNA-Präparationen aus derselben mRNA-Quelle	93
3.3.6	Sequenzanalyse falsch negativer cDNA-Sonden	95
3.4	cDNA-Array-Analyse einzelner muriner Tag 3,5-Blastozysten	97
3.5	cDNA-Array-Analyse muriner Embryonalstadien	101
3.6	Evaluierung des erstellten Amplifikationsprotokolls zur Analyse boviner aRNA-Präparationen über heterologe cDNA-Array-Hybridisierung	105
3.7	cDNA-Array-Analyse individueller boviner Tag 8-Blastozysten	107
4	Diskussion	115
<hr/>		
4.1	Methodische Aspekte der cDNA-Array-Technologie beim Nachweis der mRNA-Expression in präimplantatorischen Säugerembryonen	115
4.2	Genexpressionsanalyse bei murinen Blastozysten	122
4.3	Genexpressionsanalyse embryonaler Entwicklungsstadien der Maus	123
4.4	Genexpressionsanalyse bei bovinen Blastozysten	126
4.5	Grenzen und Perspektiven der cDNA-Array-Analyse präimplantatorischer Embryonen	130
4.6	Schlußfolgerungen	132
5	Zusammenfassung	133
<hr/>		
6	Summary	137
<hr/>		
7	Literaturverzeichnis	140
<hr/>		
8	Anhang	164
<hr/>		
8.1	Nukleotidsequenzen der als Standard verwendeten Proben	164
8.1.1	PGCS-lo	164
8.1.2	PGCS-up	164
8.1.3	pBR322	164

8.1.4	pGEMT easy	165
8.1.5	Globin	166
8.1.6	pBKS	166
8.1.7	18S rRNA	167
8.2	Erklärung der Abkürzungen und Gen-Nomenklatur	168
8.3	Publikationsliste	171
8.4	Lebenslauf	172