

# **1 Einführung**

Untersuchungen der Transkriptionsebene präimplantatorischer Säugerembryonen können wertvolle Hinweise auf den physiologischen Status und damit die Überlebensfähigkeit und Entwicklungskompetenz der analysierten Embryonen liefern. Weiterhin ist es auf diese Weise möglich, einen Einblick in die Regulation der Expression zahlreicher Gene während der frühen Embryonalentwicklung zu erhalten, in deren Verlauf sich als Ergebnis einer sehr fein regulierten, zeitlich und räumlich kontrollierten Expression maternaler Transkripte und embryonaler Gene aus einer Zygote eine implantationsfähige Blastozyste entwickelt.

Die Funktionsweise der regulatorischen Netzwerke, die die frühembryonale Entwicklung kontrollieren, ist eines der zentralen Forschungsobjekte der Entwicklungsbiologie. Ein genaues Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen, die essentiell zur frühen Entwicklung eines Embryos beitragen, ist die Voraussetzung für die Beantwortung grundlegender entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Weiterhin ist es der Schlüssel zur Verbesserung von Systemen zur In vitro-Produktion von Embryonen bei Mensch und Tier.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Genexpression bei präimplantatorischen Säugerembryonen über cDNA-Array-Analyse. Es soll daher eine kurze Einführung in die Mechanismen der Genexpression eukaryotischer Zellen sowie die Abläufe der frühen Embryonalentwicklung bei Maus und Rind gegeben werden. Da eines der Ziele der Erstellung von Genexpressionsprofilen früher Embryonalstadien die Verbesserung von Systemen zur In vitro-Produktion von Embryonen ist, widmet sich ein Abschnitt dieses Kapitels den grundlegenden Aspekten der assistierten Reproduktionstechnologie. Weiterhin sollen die Grundzüge der cDNA-Array-Technologie vorgestellt und die Probleme ihrer Anwendung zur Analyse individueller präimplantatorischer Säugerembryonen skizziert werden.

## **1.1 Genexpression und Differenzierung**

Die Umsetzung der in der DNA gespeicherten Information in ein entsprechendes Genprodukt und damit verbunden die Ausbildung eines von diesem Genprodukt abhängigen Merkmals wird als Genexpression bezeichnet (CRICK, 1970; LEWIN, 2000). Die Differenzierung von Zellen, die während der frühen Embryonalentwicklung einsetzt und zur Bildung eines komplexen Organismus mit einer Vielzahl hochspezialisierter Zelltypen führt, ist das Ergebnis einer selektiven Realisierung bestimmter Teile der genetischen Information in den verschiedenen Zelltypen dieses Organismus (JACOB und MONOD, 1963). Das Säuger genom besteht nach heutigem Kenntnisstand aus etwa 30 000-50 000 Genen, von denen in den meisten Zellen jedoch nur etwa 8000–10000 exprimiert werden (MCPHERSON et al., 2001; CLAVERIE, 2001; EWING und GREEN, 2000; LIANG et al., 2000). Zwei unterschiedlich differenzierte Zellen desselben Individuums unterscheiden sich daher darin, dass sie bei identischer Erbinformation ein unterschiedliches Arsenal an Genfunktionen und damit in erster Linie an Proteinen exprimieren (NOVER et al., 1978; LEWIN, 2000).

Der erste Schritt der Genexpression ist die Transkription, die durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen vermittelt wird (KARLSON, 1984; LEWIN, 2000). In eukaryotischen Zellen treten drei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen auf, die jeweils spezifisch bestimmte Klassen von Ribonukleinsäuren synthetisieren. Die RNA-Polymerase I transkribiert die Gene, die für die ribosomalen RNAs (rRNAs) codieren, die RNA-Polymerase II synthetisiert die proteincodierenden messenger-RNA-Vorläufer (prä-mRNAs oder hnRNAs), während die Produkte der RNA-Polymerase III tRNAs und andere RNAs sind (VOET und VOET, 1992).

RNA-Polymerasen sind große Proteinkomplexe, die in der Lage sind, Promotorsequenzen in der DNA spezifisch zu erkennen und zu binden (EICK et al., 1994; PTASHNE, 1988; PUGH, 2000). Nach der Erkennung einer Transkriptionsinitiationsstelle wird die DNA-Doppelhelix durch das Enzym lokal entwunden. Der nun freiliegende kodogene Strang dient als Matrize zur Polymerisation eines komplementären RNA-Stranges aus freien Ribonukleosidtriphosphaten, die zunächst durch Basenpaarung an die Matrize angelagert werden und bei Erkennung des korrekten (d.h. zum entsprechenden Desoxyribonukleotid der Matrize komplementären) Ribonucleotids unter Bildung einer Phosphodiesterbindung mit dem vorangegangenen Nukleotidrest verbunden werden (RICE et al., 1991).

Nachdem ein Nukleotidrest an das Kettenende angefügt wurde, wandert die RNA-Polymerase am kodogenen Strang eine Position weiter und fügt das nächste Nukleotid in die Kette ein. Erreicht das Enzym dabei eine spezifische Sequenz, die das Ende der Transkription initiiert, so löst es sich von der DNA-Matrize ab und gibt das synthetisierte Transkript frei (ADHYA und GOTTESMAN, 1978; PLATT; 1986; LEWIN, 2000).

Die für Proteine kodierenden prä-mRNAs werden nach ihrer Synthese im Zellkern weiter prozessiert, bevor sie als reife mRNAs durch die Kernporen ins Zytoplasma verbracht werden. Dort werden sie von Ribosomen gebunden, die entsprechend der Basensequenz des jeweils gebundenen mRNA-Stranges ein spezifisches Protein synthetisieren. Dieser Vorgang der Übersetzung der in der Nukleinsäuresequenz gespeicherten Information in die Aminosäuresequenz eines Proteins wird als Translation bezeichnet (MERRICK, 1992, 1994; WILSON und NOLLER, 1998).

Die Expression eines Gens ist ein auf verschiedenen Ebenen präzise kontrollierter Prozess. So ist beispielsweise die Chromatinstruktur des jeweiligen Gens entscheidend dafür, ob dieses Gen transkribiert werden kann oder nicht (HERSCHBACH und JOHNSON, 1993; NIKOLOV und BURLEY, 1997). Die Initiation der Transkription, also die Bindung der RNA-Polymerase an ihre Zielsequenz ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist, welche die Transkription erleichtern oder hemmen können und somit eine sehr feine Kontrolle der Transkriptionsraten zahlreicher Gene erlauben (FRANKLIN, 1999; HUANG et al., 1999; NIKOLOV und BURLEY, 1997). Auch die Prozessierung des Primärtranskriptes, das Spleissen (MODREK und LEE, 2002), die Translationsrate sowie der Stabilität der mRNA und des von ihr codierten Proteins (BEN-NERIAH, 2002) können regulatorisch beeinflusst werden (KORNBERG, 1999). Schließlich werden viele Proteine noch nach ihrer Synthese z.B. durch Phosphorylierung bestimmter Domänen in ihrer Funktion reguliert (HUNTER, 1995).

Obwohl es eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression gibt, bildet die Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene die wesentliche Kontrollinstanz vieler Gene (HOLSTEGE und YOUNG, 1999; DARNELL, 1982; O'NEILL und O'SHEA, 1995). Daher erlaubt die Analyse der Transkriptionsebene einer biologischen Probe wichtige Rückschlüsse auf den physiologischen Status der untersuchten Zellen (DEVAUX et al., 2001).

## **1.2 Präimplantatorische Embryonalentwicklung bei Säugern**

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Befruchtung der reifen Eizelle durch ein Spermium und damit der Verschmelzung des väterlichen und mütterlichen Erbmaterials sowie der Aktivierung der befruchteten Eizelle (AGOSTONI, 1993). Die Befruchtung findet kurz nach der Ovulation der Oozyte in der Ampulle des Ovidukts statt. Ihr Ergebnis ist die diploide Zygote (KIDDER, 1992; SCHNORR, 1985). Die präimplantatorische Embryonalentwicklung gliedert sich in die ersten Teilungen bis hin zur Morula, die Kompaktierung der Morula, die Differenzierung der Blastomeren in Trophektoderm und innere Zellmasse, die Blastulation mit Kavitation und Blastozoelexpansion und schließlich das Schlüpfen der expandierten Blastozyste aus der Zona pellucida.

Bei der Maus wird das Morulastadium am 3. Tag nach der Befruchtung erreicht, beim Rind dagegen erst am 5.-6. Tag (HOGAN et al., 1986; RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Durch eine Reihe von Veränderungen in der Genexpression der zunächst frei in der Zona pellucida beweglichen Blastomeren erfolgt die Kompaktierung der Morula. Die Blastomeren bilden dabei Gap junctions zu benachbarten Zellen aus (FLEMING und GOODALL, 1993; KIDDER und WINTERHAGER, 2001). Die außen liegenden Blastomeren verstärken ihren Zellkontakt untereinander und bilden apikal Tight junctions aus, wodurch der Embryo sich abrundet und eine außenliegende, impermeable, epitheliale Zellschicht entsteht (HOGAN et al., 1986; ZIOMEK und JOHNSON, 1980). Diese Differenzierungsereignisse laufen in den einzelnen Blastomeren ebenso wie deren Zellzyklus asynchron ab (CHISHOLM et al., 1985).

Ein weiteres einschneidendes Ereignis, das während der Kompaktierung erfolgt, ist die kontaktinduzierte Polarisierung der Blastomeren der äußeren Zellschicht (EDWARDS, 2000). Diese betrifft sowohl die Zellmembranen, deren apikale und basolaterale Domänen starke Unterschiede in ihren Oberflächeneigenschaften zeigen, als auch die Organisation des Zytoskeletts und damit die Verteilung der Zellorganellen (FLEMING und GOODALL, 1986; FLEMING et al., 1989, JOHNSON et al., 1986). Mit dem Erreichen des Morulastadiums beginnt auch die Differenzierung der Blastomeren in zwei unterschiedliche Linien (GUETH-HALLONET und MARO, 1992). Die äußeren Blastomeren der Morula bilden das spätere Trophektoderm, während aus den innen liegenden Zellen die innere Zellmasse (ICM) hervorgeht (COLLINS und FLEMING, 1995; GARDNER, 1989; ETKIN, 1985; RÜSSE und SINOWATZ, 1991).

Durch Flüssigkeitseintritt entlang von Ionengradienten ins Innere des späten Morulastadiums und das Zusammenfließen von Interzellularräumen entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum im Inneren des Embryos, das Blastozoe (BENOS et al., 1985; WATSON, 1992; WATSON und BARCROFT, 2001).

Die Blastomeren haben sich zu diesem Zeitpunkt in zwei verschiedene Zelltypen differenziert: die das Blastozoe umspannenden Zellen des Trophectoderms, aus dem später Chorion und Amnion hervorgehen, und die Zellen der inneren Zellmasse, aus denen sich der eigentliche Embryo entwickelt (FLEMING et al. 2001, ROBSON et al., 2001; RÜSSE und SINOWATZ, 1991).

Mäuseembryonen erreichen das Stadium der Blastozyste am 4. Tag nach der Befruchtung (HOGAN et al., 1986), bei Rinderembryonen wird dieses Stadium am Tag 7-8 der Gravidität erreicht (NIEMANN und MEINECKE, 1993).

Die Blastozyste expandiert nun in der Zona pellucida. Eine voll expandierte Maus-Blastozyste besteht aus etwa 60-80 Zellen, von denen etwa 20 die Innere Zellmasse bilden (HOGAN et al., 1986). Während des 4.-5. (Maus) bzw. 8.-9. (Rind) Tages schlüpft die Blastozyste aus der Zona pellucida. Murine Blastozysten können nach dem Schlüpfen in den Uterus implantieren während bovine Blastozysten erst nach einer dem Schlupf folgenden Phase des Längenwachstums zur Implantation in den Uterus bereit sind (WILEY et al., 1990; FIRST und BARNES, 1989; LONERGAN, 1994; AGOSTONI, 1993; RÜSSE und SINOWATZ, 1991).

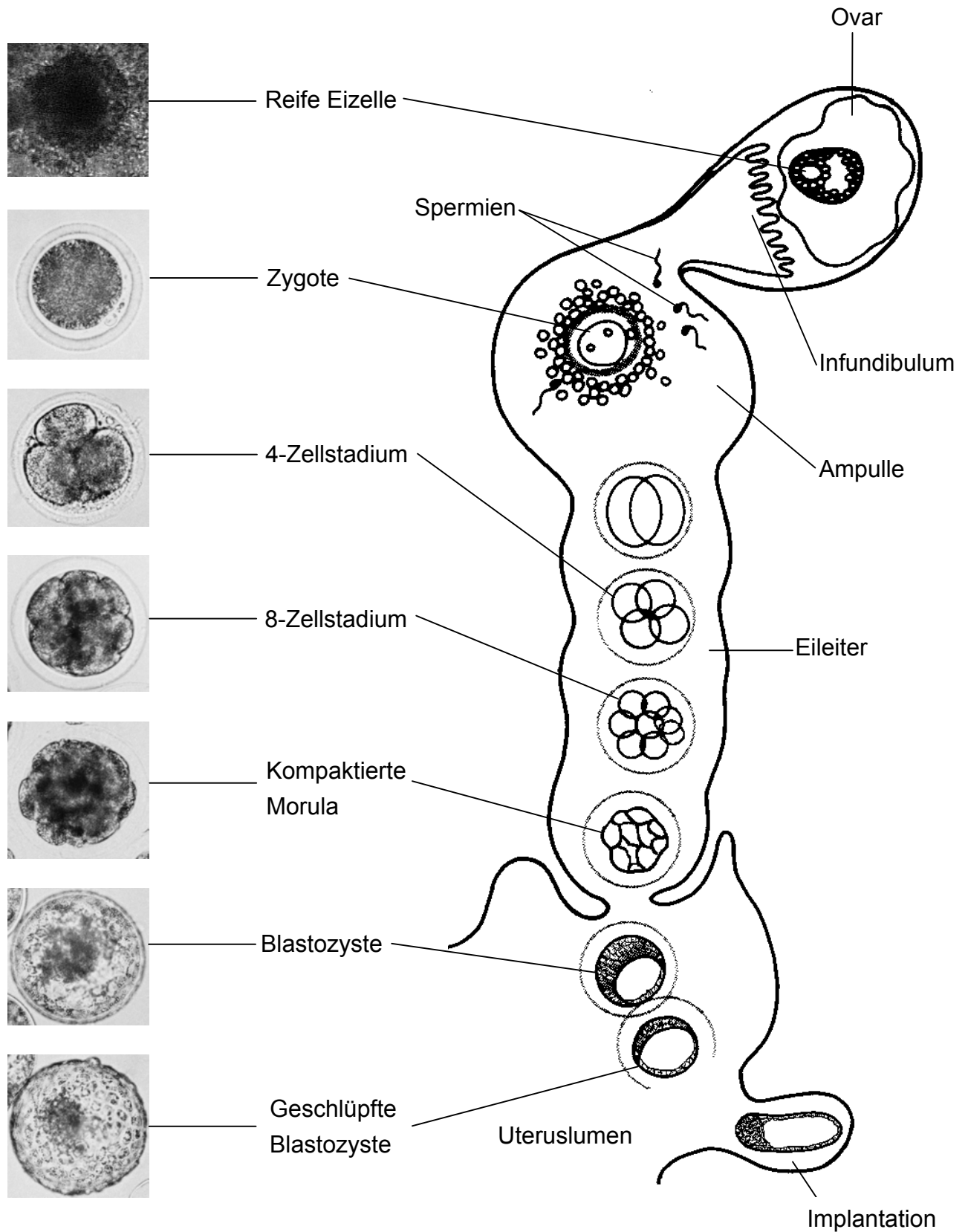
Die präimplantatorische Entwicklung eines Säugerembryos ist gekennzeichnet durch einschneidende Veränderungen in der Expressionsstärke zahlreicher Gene. Dieser Prozess, der in vivo von komplexen Interaktionen des genetischen Programms der Zygote mit dem mütterlichen Genitaltrakt kontrolliert wird (BAVISTER, 2000; SNOW 1981), folgt einem festen zeitlichen Schema und ist das Ergebnis von Wechselwirkungen des Embryos mit seiner Umgebung (DE SOUSA et al., 1998; JURISICOVA et al., 1998; KRISHER und BAVISTER, 1998; NISSON et al., 1989; PAL et al., 1993). Zur korrekten präimplantatorischen Entwicklung eines Embryos müssen bestimmte auto- und endokrine sowie exogene Faktoren einem festgelegten räumlichen und zeitlichen Muster entsprechen (GURDON, 1992; GANDOLFI et al., 1995).

Biochemische und zellbiologische Studien haben gezeigt, dass sehr frühe Embryonalstadien nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivität zeigen. Diese Phase der Entwicklung steht daher vorwiegend unter der Kontrolle maternaler Genprodukte (DURANTHON und RENARD, 2001; DWORKIN und DWORKIN-RASTL, 1990;

SPIRIN, 1994). Dies sind sowohl mRNAs als auch Proteine, die während der Oogenese gebildet wurden und auch nach der Ovulation noch aktiv sind (VALDIMARSSON et al., 1991; WASSARMAN und KINLOCH, 1992). Erst im Laufe der frühen Embryonalentwicklung setzt die Transkription des embryonalen Genoms ein.

Die Aktivierung des embryonalen Genoms wird maternal-embryonic-transition (MET) genannt (SCHULTZ, 1993; TELFORD et al., 1990). Während der MET finden neben der weitgehenden Degradierung maternaler mRNAs und dem Auftreten embryonaler mRNAs auch qualitative Veränderungen des von den embryonalen Zellen exprimierten Proteinarsenals statt (FIRST und BARNES, 1989; TELFORD et al., 1990, KIDDER, 1992). Die MET findet bei der Maus nach der ersten Teilung, also im 2-Zellstadium statt (CLEGG und PIKO, 1983; HOWLETT und BOLTON, 1985). Beim Rind wird das embryonale Genom dagegen erst nach der dritten oder vierten Teilung, also ab dem 8-16-Zellstadium transkribiert (CAMOUS et al., 1986).

In Abbildung 1 auf der nächsten Seite ist die frühe Embryonalentwicklung bei Säugern schematisch dargestellt.



**Abb. 1** Schema der Embryonalentwicklung bei Säugetieren. Links sind Bilder boviner Embryonalstadien abgebildet. Beim Rind findet der Übergang der Embryonen in den Uterus etwa am Tag 4, d.h. im 8-16-Zellstadium statt.

### **1.3 In vitro-Produktion (IVP) von Embryonen**

Die assistierte Reproduktion unter Verwendung in vitro produzierter Embryonen hat in den letzten Jahren nicht nur beim Menschen, sondern auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren erheblich an Bedeutung gewonnen (HEYNER und TUCKER, 2000; KATO und IRITANI, 1993). Während sie beim Menschen ausschließlich der Therapie von Fertilitätsstörungen dient, sind mögliche Anwendungen in der Landwirtschaft neben der Vermehrung wertvoller, z.T. auch subfertiler Tiere die Erstellung größerer Zahlen von Nachkommen z.B. wertvoller weiblicher Tiere bei Arten mit langer Tragzeit und kleinen Wurfzahlen oder bedrohter Rassen (NIEMANN und MEINECKE, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden Genexpressionsmuster in vitro produzierter Embryonen erstellt. Es handelte sich hierbei um Embryonen, die durch In vitro-Fertilisation unter Verwendung verschiedener Kultursysteme und durch Kerntransfer erzeugt wurden.

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

Die zur Erstellung von IVP-Embryonen benötigten Eizellen können durch ultraschallgeleitete Follikelpunktion (Ovum pick-up, OPU) gesammelt werden (BUNGARTZ und NIEMANN, 1994; GALLI et al., 2001). Eine vorausgehende Superovulationsbehandlung kann dabei bei bestimmten Individuen die Ausbeute an Oozyten pro Tier deutlich erhöhen (WARD et al., 2000). Weiterhin besteht beim Rind die Möglichkeit, unreife Oozyten aus den Ovarien von Schlachttieren zu gewinnen.

Immature Oozyten müssen vor ihrer Befruchtung in Medien, denen entsprechende Reifungshormone zugesetzt werden, unter definierten Bedingungen in vitro gereift werden (NAGAI, 2000). Solche in vitro gereiften Oozyten weisen häufig eine im Vergleich zu in vivo gereiften Oozyten verminderte Entwicklungskompetenz auf (HASHIMOTO et al., 1998; MOOR et al., 1998, WATSON et al., 2000). Durch Verwendung in vitro gereifter Oozyten kann mit relativ geringem Aufwand eine große Anzahl von Embryonen erzeugt werden (NIEMANN und MEINECKE, 1993).

Es ist üblich, zur Kontrolle der In vitro-Maturation einen Teil der gereiften Oozyten zu entkumulieren und lichtmikroskopisch auf ihren Reifungsstatus und ihre Qualität hinzu beurteilen, wobei Dichte und Beschaffenheit des umgebenden Verbandes aus Kumuluszellen, das Vorhandensein eines Polkörperchens sowie Farbe und Homogenität des Ooplasmas zur Beurteilung herangezogen werden (HASHIMOTO et al. 1998; ECKERT, 1994).



### **1.3.2 In vitro-Fertilisation (IVF)**

Bei der In vitro-Fertilisation erfolgt die Befruchtung in vivo oder in vitro gereifter Eizellen unter definierten Bedingungen außerhalb des weiblichen Genitaltraktes (HEYNER und TUCKER, 2000; KATO und IRITANI, 1993; FIRST und PARRISH, 1987). Die so produzierten Embryonen können weiter kultiviert oder zur Erzeugung von Nachkommen auf einen entsprechend vorbereiteten Empfängerorganismus übertragen werden (SMITH, 2002).

Die Methode der In vitro-Fertilisation findet ihre Anwendung in der Humanmedizin zur Therapie von Fertilitätsproblemen und hat dort in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen (RACOWSKY, 2002; TROUNSON et al., 2001). Bei Versuchs- und Nutztieren nimmt die Anwendung der In vitro-Fertilisation ebenfalls stetig zu, neben der Erstellung hochwertiger Zuchttiere stehen hier jedoch auch Forschungsaspekte und die Erzeugung genetisch veränderter Nachkommen im Vordergrund (NIEMANN und MEINECKE, 1993).

Zur Befruchtung der Eizellen wird meist tiefgefrorenes Spermia verwendet. Die Spermien werden vor ihrer Verwendung einer Selektionsprozedur unterzogen (PARRISH et al., 1988) und durch Inkubation in glykosaminoglykanhaltigen Medien kapazitiert, um die Voraussetzungen für den Ablauf der Akrosomenreaktion und die Verschmelzung von Spermium und Oozyte zu schaffen (ESTEVES et al., 2000). Durch Kokultur von reifen Oozyten und Spermien in speziellen Fertilisationsmedien unter definierten Bedingungen wird die Befruchtung erreicht (HEYNER und TUCKER, 2000; KATO und IRITANI, 1993).

### **1.3.3 In vitro-Kultur (IVC)**

Die Kultur früher Teilungsstadien bis zum Embryonentransfer oder einer anderen Verwendung erfolgt in speziellen Kulturmedien. Die in vitro erstellten Embryonen können dann z.B. als Blastozystenstadien auf einen entsprechend vorbereiteten Empfängerorganismus übertragen werden (SPELL et al., 2001; HASLER, 2001). Eine weitere Möglichkeit ist das Tiefgefrieren der erstellten Embryonen bis zu einer späteren Übertragung auf einen Empfängerorganismus (DOBRINSKY, 2002). Die In vitro-Kulturbedingungen wurden bei Mensch und Rind in den vergangenen Jahren immer weiter verbessert.

Dabei fand eine Entwicklung weg von Medien mit schlecht definierten Komponenten wie fötalem Kälberserum oder bovinem Serumalbumin hin zu definierten Medien statt, in denen diese Proteinsupplemente durch Polyvinylalkohol ersetzt wurden. Dahinter steht die Absicht, durch die Verwendung definierter Medien Embryonen von

gleichbleibend hoher Qualität zu erzeugen (GARDNER, 1999; KRISHER et al., 1999; MIZUSHIMA und FUKUI, 2001; ZHENG et al., 2001).

#### **1.3.4 Kerntransfer (NT)**

Bei Säugetieren wurde das Verfahren des Kerntransfers unter Verwendung kultivierter embryonaler oder somatischer Zellen als Kernspender zur Erstellung lebender Nachkommen zum erstenmal erfolgreich an Schafen angewendet (CAMPBELL et al., 1996; WILMUT et al., 1997). Das Kerntransferverfahren beinhaltet die Übertragung eines somatischen oder embryonalen Zellkerns in eine reife Oozyte, aus der zuvor die Metaphasenchromosomen entfernt wurden (HEYMAN et al., 1998; PRATHER und FIRST, 1990; KISHI et al., 2000; ZAKHARTCHENKO et al., 2001). Der Transfer des Spenderkerns in die enukleierte Oozyte (Ooplast) erfolgt entweder durch direkte Injektion eines isolierten Zellkerns (WAKAYAMA et al., 1998) oder durch Elektrofusion (NEIL und ZIMMERMANN, 1993; OGURA et al., 2000) einer Spenderzelle mit dem Ooplasten.

Die von der somatischen Zelle stammende differenzierte DNA wird nach dem Transfer in den Ooplasten durch einen noch weitgehend unverstandenen Mechanismus reprogrammiert (KIKYO und WOLFFE, 2000; KONO, 1997). Die entstehende diploide Zelle ist dann fähig, einen kompletten Organismus zu generieren. Dies wurde bereits an verschiedenen Labor- und Nutztierarten demonstriert (CAMPBELL et al., 1996; WELLS et al. 1999; WAKAYAMA et al., 1998). Die Verwendung genetisch identischer Donorzellkerne führt dabei zur genetischen Identität der erzeugten Embryonen und Nachkommen, weshalb diese Technik auch als Klonen bezeichnet wird.

Die Möglichkeit, Donorzellen vor ihrer Verwendung im Kerntransfer genetisch zu modifizieren und diese Modifikationen genau zu charakterisieren, erschließt dieser Technologie ein sehr großes Anwendungsspektrum. Dieses reicht von der Erstellung genetisch modifizierter Embryonen und Nachkommen zum Einsatz in der Grundlagenforschung über biomedizinische Anwendungen wie die Produktion von Pharmazeutika im Serum oder der Milch transgener Nutztiere oder die Generierung von genetisch modifizierten Nutztierorganen für die Xenotransplantation bis hin zur Erstellung größerer Bestände genetisch homogener, zucht- oder produktionstechnisch wertvoller Labor- und Nutztiere.

### **1.3.5 Leistungsfähigkeit von IVP-Systemen**

Ein IVP-System stellt immer eine Simulation der natürlichen Umgebung des Embryos während seiner frühen Entwicklungsphase dar. Durch Untersuchungen der physiologischen Bedürfnisse früher Embryonalstadien (GARDNER et al., 2001; GARDNER, 1998) und ihre Reaktion auf die In vitro-Kulturbedingungen (BAVISTER, 2000; KRISHER und BAVISTER, 1998) sowie der Umsetzung dieser Erkenntnisse in verbesserte Kultursysteme, existieren heute recht leistungsfähige IVP-Systeme für Mensch, Maus und Rind. Die ständige Weiterentwicklung der verwendeten Kultursysteme führt zu verbesserten Graviditäts- und Geburtenraten nach dem Transfer in vitro produzierter Embryonen. Trotzdem reichen die meisten heutzutage verwendeten IVP-Systeme in diesen Parametern nicht an die Raten der natürlichen Befruchtung heran (REYNOLDS et al., 2001; RIZOS et al., 2002).

Ein entscheidender Parameter zur Bewertung der Leistungsfähigkeit von IVP-Systemen ist neben der Anzahl vor allem die Qualität der erzeugten Embryonen (RIZOS et al., 2001, 2002; YOVICH et al., 1984). Ein ungestörtes Entwicklungspotential der in vitro erstellten Embryonen ist entscheidend für den erfolgreichen Verlauf der erzeugten Graviditäten und somit für die Anzahl und Lebensfähigkeit der erstellten Nachkommen. Es gibt eine ganze Reihe von Parametern, die in der Praxis zur Beurteilung der Embryonenqualität herangezogen werden. So wird z.B. bei der In vitro-Fertilisation humaner Embryonen zur Auswahl von Embryonen für den Transfer ein Vorkernscoring-System eingesetzt (BALABAN et al., 2001). Auch Teilungsraten, Metabolismusraten, Zellzahlen von Blastozysten zu einem bestimmten Zeitpunkt der In vitro-Kultur sowie Aussehen und Beschaffenheit des Zytoplasmas werden als Beurteilungskriterien herangezogen (DE WIT und KRUIP, 2001; LUNDIN et al., 2001; SAKKAS et al., 2001).

Die Beurteilung von Embryonen aufgrund derartiger morphologischer Betrachtungen erfordert viel Erfahrung und ist immer von einer subjektiven Komponente bestimmt (FARIN et al., 1999). Weiterhin ist oft nicht klar, inwieweit die morphologischen Eigenschaften von Embryonen sicher Aufschluss über deren Entwicklungspotential geben können. Die molekularen Grundlagen der Zusammenhänge zwischen Teilungsrate, Nucleoli-Zahl und -Verteilung in den Vorkernen, Zellzahl von Blastozysten oder Zytoplasmabeschaffenheit mit dem Entwicklungspotential von Embryonen sind bis heute nur wenig verstanden.

### **1.3.6 Probleme der In vitro-Produktion von Embryonen**

Die Anwendung der In vitro-Produktion von Embryonen ist sowohl beim Menschen als auch bei Nutztieren noch mit Problemen behaftet (RACOWSKY, 2002; STRÖMBERG et al., 2002). So weisen IVP-Systeme meist gegenüber den in vivo beobachteten Werten erhöhte fetale und perinatale Verlustraten, eine erhöhte Frequenz von Graviditätskomplikationen, eine erhöhte Sterblichkeit und ein erhöhtes Auftreten von Entwicklungsdefiziten und Mißbildungen bei den neugeborenen Nachkommen auf (DIELEMAN et al., 2002; ENRIGHT et al., 2000; EPPIG et al., 2000; FARIN et al., 2001; NATALE et al., 2001; NIEMANN und WRENZYCKI, 2000; YOUNG et al., 1998).

In Abhängigkeit vom Kultursystem kann die Zellzahl einzelner IVP-Embryonen verglichen mit der von in vivo erstellten Embryonen um bis zu 50% reduziert sein. Dies betrifft sowohl die Zahl der Trophektoderm- als auch der ICM-Zellen (MANNAERTS, 1986; TROUNSON et al., 1994; KIESSLING et al., 1991). Weiterhin wurde berichtet, dass Fragmentationserscheinungen gehäuft bei in vitro erstellten Embryonen auftreten (XU et al., 2001). Die Entwicklung von IVP-Embryonen verläuft außerdem in manchen Systemen langsamer als die von in vivo Embryonen (SIRARD und LAMBERT, 1985). Weiterhin gibt es deutliche Unterschiede im Metabolismus von IVP- und in vivo Embryonen (KHURANA und NIEMANN, 2000; AYABE et al., 1994; THOMPSON et al., 1996). In vitro produzierte Embryonen bleiben häufig in einem Stadium ihrer Entwicklung stehen, das zeitlich mit der MET zusammenfällt (FENG et al., 1994; HOSOI et al., 1995). Außerdem wurde von einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen bei in vitro erstellten bovinen Embryonen (WATSON et al., 2000). Durch die Entwicklung verbesserter Mediensysteme konnte der Anteil der Embryonen, die während der In vitro-Kultur an diesem Punkt ihrer Entwicklung stehen blieben jedoch deutlich gesenkt werden (LOUTRADIS et al., 2000; GARDNER, 1998).

Auch über Chromosomenabnormalitäten wie Mixoploidie bei in vitro erstellten Embryonen wurde berichtet (MUNNE et al., 1997; VIUFF et al. 1999, 2000). Beim Menschen kommt es weiterhin aufgrund der verbreiteten Praxis der Übertragung von drei IVF-Embryonen pro Behandlungszyklus zu einem häufigen Auftreten von Mehrlingsschwangerschaften (RACOWSKY, 2002; VIDAEFF et al., 2000).

Beim Rind und anderen Tierarten wurde häufig von einer im Vergleich zum in vivo Verlauf verlängerten Tragzeit und einem deutlich erhöhten Geburtsgewicht der Nachkommen aus in vitro erzeugten Embryonen berichtet (SINCLAIR et al., 2000; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1998; YOUNG et al. 1998). Dieser Symptomkomplex wird als Large Offspring Syndrome (LOS) bezeichnet.

## **1.4 Die Erstellung von Genexpressionsprofilen bei Embryonen**

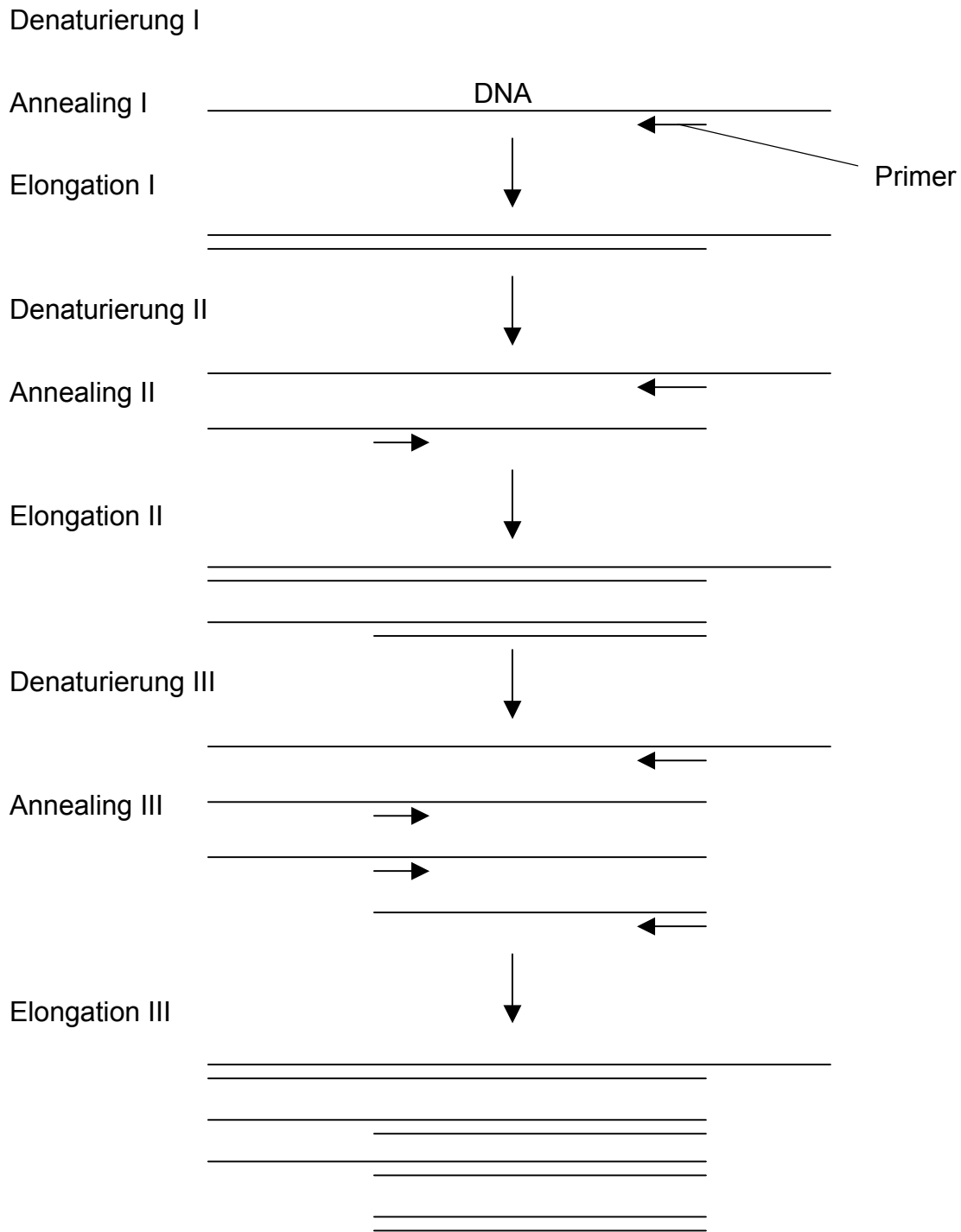
Ein Expressionsprofil beinhaltet Informationen über die Stärke der Expression einer Anzahl von Genen in der untersuchten biologischen Probe bezogen auf einen definierten Standard (RAETZ et al., 2001). Genexpressionsprofile ermöglichen eine genauere Beurteilung der Qualität von Embryonen und ermöglichen es, die Auswirkungen einzelner Parameter der In vitro-Kultur auf den transkriptionellen und physiologischen Status von Embryonen zu bestimmen.

### **1.4.1 Konventionelle Methoden zur Erstellung von Genexpressionsprofilen**

Der Nachweis der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Die Transkriptionsebene kann u.a. durch Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion oder in situ Hybridisierung, die Proteinebene durch Immunozytochemie untersucht werden (KIDDER, 1992; NISSON et al., 1989; NATALE et al., 2001; THOMPSON, 1995; WRENZYCKI et al., 2001).

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten (DELIDOW et al., 1996; WHITE et al., 1989). Hierfür wird die Eigenschaft kurzer Oligonukleotide (Primer) genutzt, sequenzspezifisch an einen Matrizenstrang zu binden und dort als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dienen zu können. Eine solche Polymerase verlängert die gebundenen Primer und synthetisiert einen dem Matrizenstrang komplementären DNA-Strang. So entsteht ein DNA-Doppelstrang. Durch Inkubation bei 94-100°C wird dieser Doppelstrang denaturiert, und die beiden Einzelstränge können bei Absinken der Temperatur von unverbrauchten Primermolekülen gebunden werden. In der PCR werden thermostabile DNA-Polymerasen wie z.B. Taq-DNA-Polymerase verwendet, die ein Temperaturoptimum bei 72°C aufweist. Beim Durchlaufen eines Temperaturzyklusses bestehend aus Denaturierungsschritt (94°C), Annealingschritt (meist 50-70°C) und Elongationsschritt (72°C) wird die Anzahl der Matrizenstränge daher theoretisch verdoppelt.

Man kann durch die Verwendung spezifischer Primer für beide DNA-Stränge das zwischen diesen Primern liegende DNA-Stück, das Amplicon, spezifisch amplifizieren. Durch die Quantifizierung derartiger Amplicons nach deren Amplifikation kann man Rückschlüsse auf die Menge der entsprechenden Nukleinsäure in der Ausgangsprobe ziehen (BUSTIN, 2000; SALOMON, 1995b). In Abbildung 2 auf der nächsten Seite ist die Amplifikation eines DNA-Stranges während der ersten drei Amplifikationszyklen einer PCR-Reaktion schematisch dargestellt.



**Abbildung 2** Schema der ersten drei Zyklen einer Polymerase-Kettenreaktion. Man beachte, dass die Anzahl der neu entstehenden DNA-Stränge, die die Sequenz zwischen beiden Primern beinhalten im weiteren Verlauf der Reaktion exponentiell zunimmt, während die Anzahl der sonstigen neu gebildeten DNA-Stränge im Verlauf der Reaktion nur linear ansteigt.

Die in der PCR verwendete Taq-Polymerase kann ausschließlich DNA als Matrize nutzen, nicht jedoch RNA (DELIDOW et al., 1996; ECKERT und KUNKEL, 1991). Um mRNA einer Amplifikation durch PCR zugänglich zu machen, muss diese daher zuvor in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht durch eine Reverse Transkriptase (RT), die an RNA-Strängen hybridisierte Primer verlängert und dabei DNA-Stränge synthetisiert. Der entstandene DNA-Strang kann dann als PCR-Matrize genutzt werden. Das Verfahren der Amplifikation von DNA-Sequenzen, die durch Reverse Transkription aus RNA erstellt wurden, nennt man RT-PCR (BUSTIN, 2000; ROMERO, 1999; SALOMON, 1995a).

Amplifiziert man nun durch RT-PCR eine bestimmte mRNA-Sequenz aus einzelnen Embryonen und quantifiziert die bei konstanten Reaktionsparametern erhaltene Ampliconmenge, so kann man Rückschlüsse auf die Häufigkeit des entsprechenden Transkriptes in dem jeweils analysierten Embryo ziehen (REUE, 1998; REUSS et al. 1997, SALOMON, 1995b; WRENZYCKI et al., 1999, 2000, 2001). Dies ermöglicht, den zeitlichen Verlauf der Expression von Genen während der Embryonalentwicklung ebenso zu untersuchen, wie den Einfluss externer Faktoren auf die Expression einzelner Gene (DOMASHENKO et al., 1997; WRENZYCKI et al., 1999).

Das Verfahren ist sehr sensitiv. So ist es möglich, aus einzelnen Blastozysten bis zu ca. zehn Amplifikationsprozeduren (für die Amplifikation je eines spezifischen Amplicons) durchzuführen. Die Quantifizierung erfolgt meist semi-quantitativ, bezogen auf einen externen oder internen Standard. In letzter Zeit hat sich die Real-Time-PCR stark weiterentwickelt, die eine quantitative Analyse der erhaltenen Amplicon-Fragmente ermöglicht (BUSTIN 2000; PRELLE et al., 2001), da bei diesem Verfahren im Gegensatz zur Endpunkt-PCR auch der Verlauf der Amplifikationsreaktion aufgezeichnet werden kann. Durch Optimierung der Reaktionsparameter für jedes verwendete Primerpaar erreicht man neben einer sehr hohen Sensitivität eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der erzeugten Ergebnisse. Die PCR-Technologie ist geeignet, selbst Transkripte, die nur im Bereich von etwa zehn Kopien pro Zelle vorkommen, in Einzelzellen semiquantitativ nachzuweisen (OHSHIMA et al., 1996).

#### **1.4.2 Beurteilung von Embryonen durch Genexpressionsanalyse**

Die Charakterisierung embryonaler Genexpressionmuster ermöglicht eine genauere Bestimmung der Qualität von Embryonen als die Betrachtung morphologischer Parameter (LATHAM et al., 2000). Sie erlaubt weiterhin Einblicke in die molekularen Mechanismen der Embryonalentwicklung und in die Auswirkungen einzelner Veränderungen der Umgebung auf Wachstum und Entwicklung von Embryonen (LEIBFRIED-RUTLEGE, 1999; SHEHU et al., 1996). Analysen der Genexpression von IVP-Embryonen beim Rind haben in den letzten Jahren stetig zugenommen. Durch die Technik der RT-PCR wurde es möglich, die Expression verschiedener Gene in einzelnen präimplantatorischen Embryonen qualitativ und quantitativ nachzuweisen (NIEMANN und WRENZYCKI, 2000; WRENZYCKI et al., 1999, 2001). Diese Arbeiten führten zu der Erkenntnis, daß eine Vielzahl von Transkripten in IVP-Embryonen anders exprimiert werden als in in vivo Embryonen (HO et al., 1994; NIEMANN und WRENZYCKI, 2000; WRENZYCKI et al., 2002; HYTTEL et al., 2000; STOJANOV und O'Neill, 1999; WRENZYCKI et al., 2001, 2000, 1999).

Derartigen Unterschieden in der Genexpression wird eine wichtige Rolle in verschiedenen Aspekten der mit der IVP verbundenen Probleme zugeschrieben (MENEZO et al., 2000; NIEMANN und WRENZYCKI, 2000). So wird z.B. angenommen, dass sich die veränderte Genexpression negativ auf Geburtenraten und Lebensfähigkeit der Nachkommen auswirken könnte (KHOSLA et al., 2001).

Es wird angestrebt, die Erkenntnisse aus vergleichenden molekularbiologischen Analysen von in vivo und in vitro erstellten Embryonen dazu zu nutzen, die IVP-Systeme dahingehend zu verbessern, dass die Genexpressionsmuster der aus ihnen erstellten Embryonen weitgehend denen in vivo erstellter Embryonen gleichen. So erhofft man sich eine deutliche Verbesserung der Leistungsfähigkeit von IVP-Systemen und eine deutlich geringere Frequenz von Entwicklungsabnormalitäten, wie z.B. dem in bovinen IVP-Systemen häufig zu beobachtenden Large Offspring Syndrome (MCEVOY et al., 2000, 2001).

Die Aufdeckung der molekularen Unterschiede zwischen in vivo und in vitro erstellten Embryonen ist der Schlüssel zur Optimierung der IVP-Systeme und der Minimierung der Frequenz derartiger Entwicklungsstörungen.



### **1.4.3 Nachweis apoptotischer Vorgänge in Embryonen**

#### **1.4.3.1 Allgemeines zur Apoptose**

Kontrollierte apoptotische Vorgänge sind auf der einen Seite unerlässlich für den korrekten Ablauf der frühen Embryonalentwicklung, können aber auf der anderen Seite zum Absterben des Embryos führen. Da die Untersuchung apoptotischer Vorgänge in bovinen IVP-Embryonen einer der Aspekte der vorliegenden Studie war, soll im Folgenden kurz in die molekularen Grundlagen der Apoptose eingeführt werden.

Der Begriff Apoptose tauchte 1972 zum ersten Mal in der biomedizinischen Fachliteratur auf, um den programmierten Zelltod in lebenden Geweben zu beschreiben (KERR et al., 1972). Im Gegensatz zur Nekrose, einem zytopathologischen Prozess aufgrund physikalischer oder chemischer Schädigungen der betroffenen Zelle durch äußere Faktoren, wie z.B. Hyperthermie oder bestimmte Toxine, ist die Apoptose ein physiologischer Vorgang, durch den Zellen gezielt und kontrolliert eliminiert werden (LEWIN 2000; NICOTERA et al., 1999). Durch Apoptose werden in vielzelligen Organismen nicht oder nicht mehr erwünschte Zellen, z.B. während der Fetalentwicklung, beseitigt (RAFF et al., 1994). Weiterhin ist der programmierte Zelltod ein wichtiger biologischer Mechanismus zur Erkennung und Eliminierung von Krebszellen (LEWIN, 2000).

Bereits auf morphologischer Ebene sind Nekrose und Apoptose klar voneinander zu unterscheiden (VERMES und HAANEN, 1994). Der Beginn der Nekrose ist durch einen Influx von Wasser und extrazellulären Ionen in die betroffenen Zellen sowie morphologischer Veränderungen der Zellorganellen, wie zum Beispiel einem Anschwellen der Mitochondrien, gekennzeichnet. Durch weiteren Wasserinflux kommt es dann zum Aufplatzen der Zellmembran, wodurch sich das Zytoplasma in den extrazellulären Raum ergießt. In vivo sind daher nekrotische Prozesse meist mit massiven inflammatorischen Reaktionen im betroffenen Gewebe assoziiert (VAN FURTH, 1986).

Bei der Apoptose sind die Zellen selbst zu einem großen Teil aktiv an ihrem eigenen Tod beteiligt (LEWIN, 2000; NICOTERA et al., 1999). Daher spricht man auch vom programmierten Selbstmord apoptotischer Zellen. Die Zellen zeigen dabei charakteristische morphologische Veränderungen: es kommt zu Chromatinaggregationen, nukleären sowie zytoplasmatischen Kondensationserscheinungen, zur Fragmentierung zunächst des Zellkerns, des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und schließlich des gesamten Zytoplasmas. So entsteht aus einer apoptotischen Zelle eine Anzahl sogenannter apoptotic bodies, kleiner Zellfragmente, die von einer intakten Membran umgeben

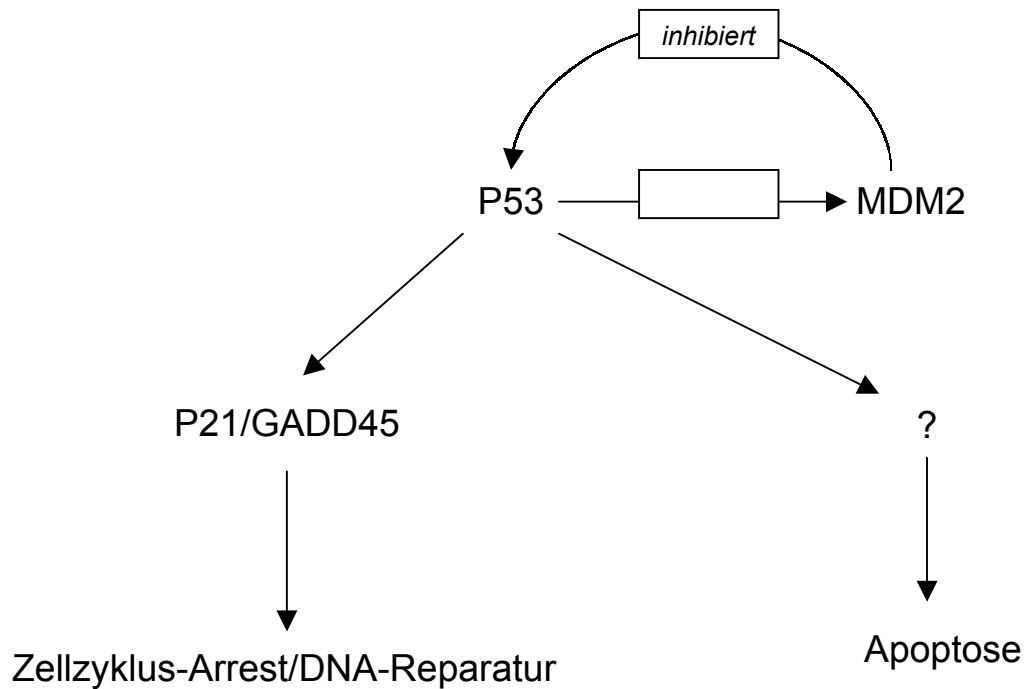
sind und u.a. Teile des Zellkerns, Ribosomen und morphologisch intakte Mitochondrien beinhalten (COHEN, 1993).

Auslösung oder Ausbleiben apoptotischer Vorgänge in einer Zelle entscheiden über deren Leben und Tod. Um Apoptose in unerwünschten Zellen auszulösen, gleichzeitig jedoch normale und noch benötigte Zellen möglichst nicht zu beeinträchtigen, bedarf es sehr feiner Erkennungs- und Regulationsmechanismen. Es wurde gezeigt, dass ein korrekter Ablauf apoptotischer Vorgänge essentiell für eine normale Embryonal- und Fetalentwicklung, die Homeostasis regenerativer Gewebe und die Abwehr mancher Pathogene ist (RAFF et al., 1994; VAUX et al., 1994; ADAMS et al., 2001). Weiterhin wird angenommen, dass Störungen der Kontrollmechanismen der Apoptose sowohl zur Entstehung von Krebs als auch von Autoimmun- und degenerativen Erkrankungen beitragen können (CORY, 1994, 1995; HUANG et al., 1997; CHAO und KORSMEYER, 1998; THOMPSON, 1995; REED, 1996, 1999).

#### **1.4.3.2 Molekulare Grundlagen der Apoptose**

Die Auslösung der Apoptose kann bei Zellen höherer Organismen auf verschiedenen Wegen erfolgen, z.B. durch den Entzug essentieller Wachstumsfaktoren (KAYE und HARVEY, 1995), durch  $\gamma$ -Strahlen, durch Glucokortikoide oder durch Aktivierung spezifischer membranständiger Rezeptoren durch die spezifische Bindung des entsprechenden Liganden. Auch die Attacke zytotoxischer Lymphozyten löst in deren Zielzellen apoptotische Vorgänge aus (LEWIN, 2000; VAUX und STRASSER, 1996).

Ein Protein, das unter anderem auch die Apoptose betroffener Zellen induzieren kann, ist das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53 (SHEN und WHITE, 2001; DING und FISHER, 2001). P53 weist eine ganze Reihe von molekularen Aktivitäten auf und ist an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt (IKAWA et al. 1999; WANG et al., 2001). Es ist ein DNA-bindendes Protein, das als Transkriptionsfaktor die Transkriptionsrate von Genen, deren Promotor mehrere Kopien eines bestimmten, unterbrochenen 10bp Palindroms aufweisen, steigern kann. Es kann u.a. auch als Repressor der Transkription fungieren. Der Mechanismus dieser Funktion ist jedoch weitgehend unverstanden (LEWIN, 2000). Ein vereinfachtes Schema der P53-Aktivierung und -Inhibition ist in Abbildung 3 dargestellt:



**Abbildung 3** Schema einiger Aktivitäten von P53. P53 aktiviert verschiedene unabhängige Signalwege sowie die Transkription seines Antagonisten mdm2.

P53 wird durch eine Schädigung der Zelle, z.B. durch DNA-Strangbrüche aktiviert (PLUQUET und HAINAUT, 2001). Es kann seinerseits mehrere Signalwege aktivieren (LIU und KULESZ-MARTIN, 2001), von denen zwei in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind. Je nach Zellzyklusstadium der geschädigten Zelle aktiviert P53 in Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, P21, was diese daran hindert, die G1-Phase zu verlassen, bis die Schädigung der Zelle behoben wurde. Bei einer Schädigung der DNA kann P53 GADD45 aktivieren, welches an der Reparatur von DNA-Schädigungen beteiligt ist (LEWIN, 2000). Befindet sich eine geschädigte Zelle dagegen gerade nicht in der G1-Phase des Zellzyklus, so löst P53 Apoptose aus (COX und LANE, 1995). Unter anderem ist bekannt, dass z.B. das pro-apoptotische apaf1-Gen eines der Zielgene der P53-Transkriptionsfaktorfunktion ist (WANG et al., 2001). Die P53-Aktivität wird durch den P53-Antagonisten MDM2 reguliert, der die P53-Aktivität inhibiert (MOMAND et al., 2000; LANE und HALL, 1997; PIETTE et al., 1997). Auch das mdm2-Gen ist ein Zielgen der P53-Transkriptionsfunktion, und somit sind P53- und MDM2-Funktion über eine negative Rückkopplung miteinander verbunden (PICKSLEY und LANE, 1993). Anhand des Beispiels von P53 wird deutlich, dass die molekularen Schalter, die zur Einleitung apoptotischer Vorgänge führen, durch ein präzise reguliertes Netzwerk anderer Genfunktionen kontrolliert werden.

Alle bisher bekannten Apoptosewege laufen auf der Ebene der Caspasen zusammen (STEGH und PETER, 2001; EARNSHAW et al., 1999; KHANNA und SINGH, 1999). Unter dem Begriff Caspasen (Cysteiny-aspartate-specific proteinases) wird eine Familie intrazellulärer Cysteinproteasen zusammengefaßt, die ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten. Diese von nahezu allen Zellen exprimierte Proteine werden zunächst als Zymogene synthetisiert, die durch spezifische Spaltung aktiviert werden können. Die Caspasen aktivieren sich gegenseitig in einer komplexen Hierarchie, ähnlich dem Blutgerinnungs- und dem Komplementsystem, nachdem ein Apoptosestimulus von der Zielzelle rezipiert und weitergeleitet wurde (EARNSHAW et al., 1999).

Die Substrate, die von den am Endpunkt dieser autokatalytischen Kaskade stehenden Proteinase wie Caspase3 gespalten werden, sind unter anderem Proteine des Zytoskeletts und der Kernlamina, wie Actin, Fodrin und nucleäre Lamine. Weiterhin aktivieren diese Caspasen spezifische Endonukleasen, die daraufhin die DNA des Zellkerns zwischen den Nucleosomen spalten (EARNSHAW et al., 1999). Die Zerstörung essentieller Strukturproteine und Enzyme sowie die Fragmentierung der DNA führen zur Ausprägung der morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose.

#### **1.4.3.3 Apoptose in der frühen Embryonalentwicklung**

Auch in der präimplantatorischen Embryonalentwicklung finden apoptotische Vorgänge statt (BETTS und KING, 2001; LEVY, 2001; LEVY et al., 2001; WARNER et al., 1998). Diese konzentrieren sich auf die ICM (PAMPFER, 2001) und es wird angenommen, dass auf diesem Weg Zellen mit abnormem Expressionsmuster und somit unzureichendem Differenzierungs- oder Entwicklungspotential aus der ICM beseitigt werden (BRISON, 2000; HARDY, 1989, 2001; PARCHMENT, 1993;). Es ist außerdem bekannt, dass kontrollierte apoptotische Vorgänge für den korrekten Ablauf der frühen Embryonalentwicklung notwendig sind (COUCOUVANIS und MARTIN, 1999).

Apoptotische Prozesse wurden bei in vitro erstellten murinen und bovinen Embryonen außerdem während der Aktivierung des embryonalen Genoms, also bei murinen 2-Zellstadien sowie bei bovinen 8-16 Zellstadien beschrieben (JURISICOVA et al., 1998; BYRNE et al., 1999; BRISON, 2000; MATWEE et al., 2000).

Wie bei anderen Zellen auch hängen Lebensfähigkeit und apoptotischer Status eines Embryos zu einem großen Teil vom Vorhandensein bestimmter Wachstumsfaktoren im umgebenden Medium ab (DIAZ-CUETO und GERTON, 2001; HARDY et al., 2001, HARDY und SPANOS, 2002; IZADYAR et al., 2000; KAYE und HARVEY,

1995). Ein wichtiges Ziel der Erstellung von Genexpressionsprofilen bei in vitro produzierten Embryonen ist es, die Auswirkungen einzelner Komponenten von IVP-Systemen auf den apoptotischen Status von Embryonen zu charakterisieren und die gewonnenen Erkenntnisse zur Verbesserung der verwendeten Kultursysteme zu nutzen.

#### **1.4.4 Grenzen konventioneller Methoden zum Nachweis der Genexpression**

Der große Nachteil konventioneller Methoden zum Nachweis der Genexpression in Embryonen ist, dass pro Experiment nur eine begrenzte Zahl von Genprodukten untersucht werden kann. Dies betrifft Methoden wie die in situ Hybridisierung und die Immunocytochemie ebenso wie die RT-PCR. Die Einschränkung der Zahl der untersuchten Gene pro Analyse schließt eine quantitative oder semiquantitative Erfassung der Expression einer großen Zahl von Genen in präimplantatorischen Einzelembryonen praktisch aus. Dies führt dazu, dass die Untersuchung der komplexen regulatorischen Netzwerke, die die frühe Embryonalentwicklung auf Genexpressionsebene steuern, unter Verwendung der genannten Methoden kaum durchführbar ist. Weiterhin ist es mit Hilfe dieser Methoden praktisch nicht möglich, die transkriptionellen Aktivitäten eines einzelnen Embryos in ihrer Gesamtheit abzubilden.

## **1.5 Die cDNA-Array-Technologie**

### **1.5.1 Grundlagen der cDNA-Array-Technologie**

Die Methode der Wahl zur semi-quantitativen oder quantitativen Analyse einer großen Anzahl unterschiedlicher mRNA-Spezies pro untersuchter Probe ist die cDNA-Array Technologie (ARCELLANA-PANLILIO und ROBBINS, 2002; BARD et al., 1998; CLEWLEY, 2000; SCHENA et al., 1995; SCHENA, 1996). Sie ermöglicht die Erfassung einer großen Anzahl von Transkripten in einer einzigen Hybridisierungsreaktion. Zur Zeit sind diverse Arrays von kommerziellen Anbietern erhältlich, die 500-10000 Sonden pro Array enthalten. Als Sonden werden dabei sowohl cDNAs als auch Oligonukleotide oder ESTs (expressed sequence tags) eingesetzt. Der Zahl der Sonden pro Array ist dabei nach oben hin theoretisch keine Grenze gesetzt (NAKANISHI et al., 2001; SCHENA, 1996; SCHENA et al., 1995).

Die cDNA-Array Technologie nutzt die Möglichkeit des spezifischen Nachweises bestimmter Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung mit einer komplementären cDNA-Sequenz (GABIG und WEGRZYN, 2001; BURGESS, 2001, SCHENA et al., 1995, 1996, 1998; WATSON und CRICK, 1953).

Hybridisieren zwei komplementäre Nukleinsäurestränge miteinander, so entsteht eine durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken stabilisierte Doppelhelix. Die Stabilität einer solchen Formation wird bereits durch einzelne nicht komplementäre Basen deutlich herabgesetzt (STRYER, 1993). Dieser Mechanismus der spezifischen Nukleinsäurehybridisierung wird u.a. auch beim Northern und Southern Blot, sowie bei der in situ Hybridisierung ausgenutzt (WETMUR, 1991; FREEMAN et al., 1999).

Zur Untersuchung der Transkriptionsebene einer Zelle oder Zellpopulation wird die mRNA aus einer Probe quantitativ aufgereinigt, markiert und mit einem cDNA-Array hybridisiert. Ein cDNA-Array besteht aus einem Trägermedium, etwa einer Membran oder einem Glas-Chip, auf das cDNA-Sonden, wie z.B. PCR-Produkte, punktförmig aufgebracht wurden. Jede einzelne cDNA-Sonde wird dabei an einer unterschiedlichen Stelle des Arrays aufgetragen und dort fixiert (HEGDE et al., 2000). Unter geeigneten Bedingungen hybridisieren die markierten mRNA-Stränge nun ausschließlich mit den Strängen der komplementären cDNA-Sonde, sofern sie auf dem Array vorhanden ist. Nach Abwaschen von überschüssigem und nicht korrekt hybridisiertem Material können die hybridisierten RNA-Stränge anhand ihrer Markierung detektiert und über die bei der Detektion erhaltene Signalstärke quantifiziert werden (HEGDE et al., 2000; WETMUR, 1991). Da die Zahl der Sondenpunkte auf einem cDNA-Array theoretisch unbegrenzt ist, stellt diese Technik

eine Möglichkeit zur Verfügung, in einem einzigen Experiment die Expressionsstärken aller Transkripte eines Genoms zu erfassen.

### **1.5.2 Technische Aspekte der cDNA-Array-Technologie**

Konventionelle Hybridisierungsassays, die in den 70er Jahren entwickelt wurden, benutzten zumeist flexible Trägermedien wie Nitrocellulose- oder Nylonmembranen zusammen mit der radioaktiven Markierung der verwendeten Nukleinsäuren und deren Nachweis durch Autoradiographie. In den letzten Jahren setzte ein starker Trend zur Miniaturisierung der Arrays ein, der ein Umschwenken auf starre Trägersubstrate, speziell Glas und Plastik, mit sich brachte (DOLAN et al., 2001; LOBENHOFER et al., 2001).

Der Vorteil nicht poröser Trägermedien und kleinerer cDNA-Array-Formate liegt vor allem darin, dass bei deren Hybridisierung deutlich geringere Flüssigkeitsvolumina eingesetzt werden können. So werden konventionelle Membran-Arrays meist mit einem Volumen von 5-50ml Hybridisierungspuffer hybridisiert, während Glas-Arrays bereits mit 5-200µl erfolgreich hybridisiert werden können (NAKANISHI et al., 2001; SCHENA et al., 1996). Dies bedeutet, dass bei gleicher Konzentration markierter mRNA im Hybridisierungspuffer deutlich weniger Ausgangsmaterial benötigt wird, bzw. bei gleichem Ausgangsmaterial eine deutlich höhere mRNA-Konzentration erreicht werden kann.

Die zur Analyse der mRNA-Expression eingesetzten cDNA-Sonden, ESTs oder Oligonukleotide zeigen idealerweise keinerlei Homologie zu anderen bekannten codierenden Gensequenzen, was eine Kreuzhybridisierung mit anderen mRNA-Spezies als der Ziel-mRNA ausschließt (SCHENA et al., 1998; SCHADT et al., 2001; HIPPO et al. 2002; LOCKHART et al., 1996). Die Sonden werden in einem speziellen Denaturierungspuffer gelöst entweder durch Metallnadeln, Saugapparaturen, durch Pipettieren oder durch die Verwendung der Tintenstrahltechnik auf das jeweilige Substrat aufgebracht (OKAMOTO et al., 2000). Die Fixierung der cDNA-Stränge auf das Trägermedium erfolgt bei Membranen meist durch UV-Crosslinking, während bei Glas- und Plastikchips meist das 5'-Ende der cDNA- oder Oligonukleotid-Stränge kovalent an die entsprechend vorbereitete Substratoberfläche gebunden wird (KUMAR et al., 2000; ROCKETT und DIX, 2000).

Mittlerweile ist eine große Anzahl verschiedener Arrays von diversen kommerziellen Anbietern erhältlich. Verschiedene Formate, wie Nylonmembranen, Glas- und Plastikchips, auf die entweder PCR-Produkte oder Oligonucleotide aufgebracht sind, können mit diversen Markierungs- und Detektionstechniken kombiniert werden. Die erhältlichen Arrays für die Analyse von Samples höherer Organismen konzentrieren

sich dabei auf die Spezies Mensch, Maus und Ratte. Für die Analyse boviner Zellen ist jedoch bis heute kein cDNA-Array System von einem kommerziellen Anbieter erhältlich.

Die Analyse der mRNA-Expression mit cDNA-Arrays liefert eine je nach Größe des verwendeten Arrays mehr oder weniger große Menge an Daten. Prozessierung, Auswertung und Interpretation der Daten großer Arrays, die mehrere tausend cDNA-Sonden beinhalten, erfolgen in der Regel über eine entsprechende Software und sind mittlerweile ein eigenständiger Zweig der Bioinformatik (BRAZMA et al., 2001; BRAZMA und VILO, 2001).

Grundsätzlich werden zunächst die gewonnenen Rohdaten, d.h. die in den einzelnen Spots erhaltenen Signalintensitäten um den gemessenen Signalhintergrund des Trägermediums bereinigt und anschließend normalisiert, um die Werte mehrerer Samples (z.B. von normalem und malignem Gewebe) miteinander vergleichen zu können. Hierbei kann die Summe aller gemessenen Signalintensitäten ebenso als Standard verwendet werden, wie die mit speziellen externen oder internen Standard-cDNA-Sonden gemessenen Signalintensitäten (YANG et al., 2002; TSENG et al., 2001).

Die meisten kommerziellen Arrays weisen eine Reihe verschiedener derartiger Standards auf, die zur Normalisierung der Array-Rohdaten herangezogen werden. Die Verwendung von Negativkontrollen, z.B. von bakteriellen oder pflanzlichen cDNAs bei der Analyse muriner oder humaner Zellen, ermöglicht es, die Hybridisierungsbedingungen zu optimieren und einen Grenzwert der Signalintensität festzulegen, ab dem ein Signal als positiv gilt (BROWN et al., 2001; HILL et al., 2001; MUTCH et al., 2001).

Nach dem Prozessieren der Rohdaten können die Expressionsdaten zweier biologischer Proben untereinander verglichen und qualitative und quantitative Unterschiede in deren mRNA-Expression detektiert werden (SCHENA, 1999). Derartige Analysen geben Aufschluss über den funktionellen Status der untersuchten Zellen, z.B. kann so der Einfluss von Umgebungsfaktoren, wie der Temperatur oder eines Pharmazeutikums auf die Genexpression von Zellen oder Geweben untersucht werden. Ein aktuelles Forschungsfeld sind auch die Unterschiede in der Genexpression zwischen gesundem und malignem Gewebe. Anhand entsprechender Algorithmen können die unter dem Einfluss eines Umweltfaktors oder der Tumorigenese regulierten Gene zu funktionellen Clustern zusammengefasst werden, was entscheidend zur Entschlüsselung und Charakterisierung komplexer



regulativer Netzwerke auf Transkriptionsebene beiträgt (EISEN et al., 1998; BARD et al., 1998; XU et al., 2001).

### **1.5.3 Grenzen der cDNA-Array Technologie**

Obwohl die Automatisierung der Herstellung und des Auslesens von cDNA-Arrays in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht hat und die Anzahl der Anwender dieser Methode rapide gewachsen ist, ist die cDNA-Array Technologie noch immer recht kostenintensiv (LOBENHOFER et al., 2001). Die Verwendung kommerzieller Array-Systeme sowie die kommerzielle Auswertung hybridisierter Arrays ist mit hohen Kosten verbunden. Die Eigenproduktion von Arrays erfordert die Erstellung eines entsprechenden Sondenarsenals und einen gewissen apparativen Aufwand zum kontrollierten Aufbringen der Sonden.

Ein weiteres Problem der Array-Technologie ist ihre Sensitivität. Konventionelle Hybridisierungsprotokolle sehen den Einsatz von etwa 1-5µg markierten mRNA-abgeleiteten Materials in der Hybridisierung vor, um eine ausreichende Signalintensität zu erreichen (HEGDE et al., 2000; LOU et al., 2001; WILDSMITH et al., 2001). Solche Mengen sind zwar leicht aus Gewebe oder aus Zellkulturen aufzureinigen, zahlreiche klinische und biologische Proben (z.B. einzelne präimplantatorische Embryonen oder Tumorbiopsien) liefern jedoch deutlich geringere Mengen an mRNA und sind daher einer cDNA-Array-Analyse nicht ohne weiteres zugänglich. Aus einer einzelnen murinen Blastozyste sind z.B. nur etwa 1,5ng Gesamt-RNA bzw. 1,5pg mRNA zu extrahieren, während eine einzelne bovine Blastozyste etwa 4-5ng Gesamt-RNA enthält (PIKO und CLEGG, 1982; BILODEAU-GOESEELS und SCHULTZ, 1997).

### **1.5.4 Strategien zur cDNA-Array-Analyse sehr kleiner mRNA-Mengen**

Um sehr kleine klinische oder biologische Proben analysieren zu können, bedarf es einer globalen Amplifikation der aus diesen Proben extrahierten mRNA (AL-TAHER et al., 2000; BRADY, 2000). Diese Amplifikation darf die quantitative Repräsentation der einzelnen mRNA-Spezies in der Originalprobe dabei nicht verändern (SALUNGA et al., 1999). In jüngster Vergangenheit wurden verschiedene Strategien entwickelt, um auch sehr kleine mRNA-Mengen global und repräsentativ für eine cDNA-Array-Analyse zu amplifizieren: Sowohl die Amplifikation mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase (EBERWINE, 1996; VAN GELDER et al., 1990) als auch die globale PCR (AL-TAHER et al., 2000; BRAIL et al., 1999) wurden erfolgreich zu diesem Zweck eingesetzt.

#### **1.5.4.1 T7-Polymerase Amplifikation**

Konvertiert man die gewonnene mRNA durch eine Reverse Transkription, die durch einen modifizierten oligo-d(T)-Primer, der am 5'-Ende die Consensus-Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase trägt, in cDNA, so enthalten die entstandenen cDNA-Moleküle alle die gleiche T7-Promotorsequenz an ihrem 5'-Ende (EBERWINE, 1996; VAN GELDER et al., 1990). Die T7-RNA-Polymerase ist ein Enzym, das an cDNA-Molekülen, die am Ende eine T7-Promotorsequenz aufweisen, eine komplementäre RNA synthetisiert (MCALLISTER, 1993). Da die T7-RNA-Polymerase nur doppelsträngige Substrate bindet, kann die produzierte cDNA erst nach einer Zweitstrangsynthese als Matrize für die In vitro-Transkription eingesetzt werden (EBERWINE, 1996).

Der limitierende Schritt bei der In vitro-Transkription ist die Anlagerung der RNA-Polymerase an ihre Promotorsequenz (KOCHETKOV et al., 1998). Durch das Vorhandensein der gleichen T7-Promotorsequenz in sämtlichen in der RT erzeugten cDNAs werden sie alle mit der gleichen Effizienz vom Enzym gebunden und transkribiert. Die In vitro-Transkription ist im Gegensatz zur PCR eine lineare Reaktion, die durch Denaturierung des Enzyms oder Depletion eines Reaktionsteilnehmers beendet wird (EBERWINE, 1996; PHILLIPS und EBERWINE, 1996).

Durch In vitro-Transkription kann man aus der eingesetzten mRNA etwa die zehnbis einhundertfache Menge an aRNA (amplifizierte RNA) gewinnen (SALUNGA et al., 1999). Ist eine Reaktion nicht ausreichend, so kann man die erzeugte aRNA aufreinigen, wieder in cDNA umschreiben und erneut in der In vitro-Transkription einsetzen (EBERWINE et al., 1992).

Zur Herstellung ausreichender aRNA-Mengen aus biologischen Proben, die weniger als 10ng gesamt-RNA enthalten, sind mindestens drei IVT-Runden nötig, wobei eine IVT-Runde etwa 12h in Anspruch nimmt (EBERWINE, 1996; SALUNGA et al., 1999). Dieses Verfahren ist daher für die Analyse von Kleinstproben wenig praktikabel, da es sehr zeitintensiv ist. Ein weiterer Nachteil der T7-Amplifikation von mRNA-Extrakten ist der Verlust von 5'-terminalen Sequenzen der mRNAs bei der Durchführung von mehr als einer IVT-Reaktion (SALUNGA et al., 1999).

#### **1.5.4.2 Globale PCR**

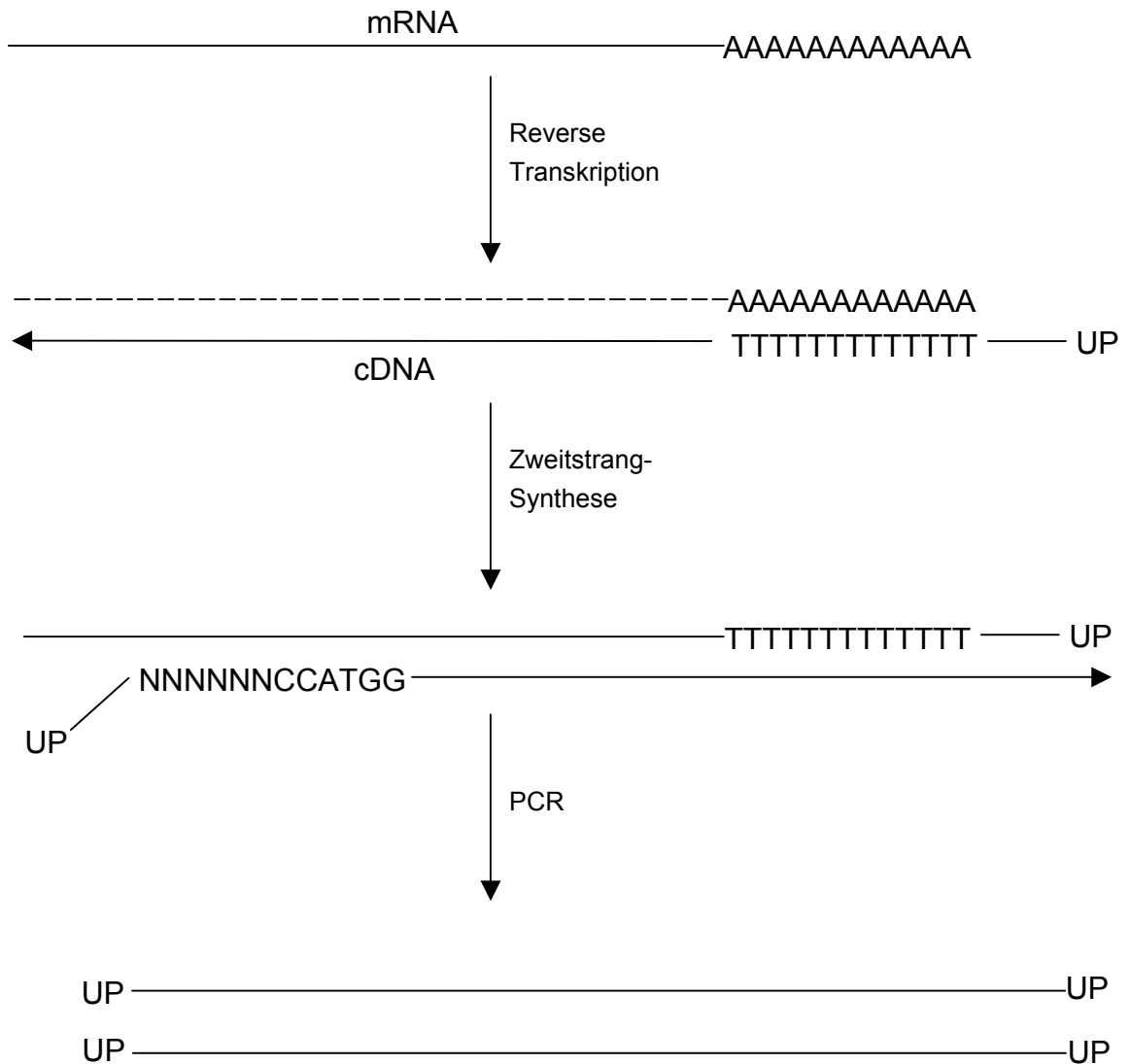
Eine weitere Möglichkeit zur Amplifikation von Nukleinsäuren ist die globale PCR mit universellen Primern (AL-TAHER et al., 2000; BARNARD et al., 1994). Ziel einer globalen PCR ist es, die Gesamtheit der vorkommenden Amplicons mit der gleichen Rate zu amplifizieren. Die Amplifikationsrate einer Nukleinsäuresequenz in einer PCR hängt von mehreren Faktoren ab. Einer der wichtigsten ist die Effizienz des Annealings der Oligonucleotidprimer an die zu ihnen komplementären Sequenzabschnitte der Matrizenstränge. Diese ist spezifisch für die Sequenz des verwendeten Oligonucleotidprimers (DELIDOW et al., 1996; WHITE et al., 1989), was dazu führt, dass die Amplifikationsrate eines bestimmten Amplicons bei sonst konstanten Reaktionsparametern je nach verwendetem Primerpaar stark schwanken kann. In der globalen PCR werden alle Nukleinsäuresequenzen mit demselben Primerpaar (universelle Primer) amplifiziert. Die Verwendung universeller Primer gewährleistet, dass alle Matrizenstränge mit der gleichen Effizienz von den jeweiligen universellen Primern gebunden werden und eliminiert damit diese Quelle der Variabilität.

Um eine cDNA-Präparation mit universellen Primern global amplifizieren zu können, müssen sämtliche cDNAs dieser Präparation an ihren Enden die jeweiligen Primer-Bindungsstellen aufweisen. Diese können durch die Wahl entsprechender Oligonucleotide bei der Reversen Transkription und der Zweitstrangsynthese für die Konvertierung eines mRNA-Extraktes in cDNA an die neu synthetisierten cDNA-Stränge angehängt werden.

Ein mittlerweile gut etabliertes Verfahren, das diesen Zweck verfolgt, ist die SMART-PCR (ZHU et al., 2001). Die SMART-Technologie nutzt die terminale Desoxyribonucleotidtransferaseaktivität bestimmter Reverser Transkriptasen, die nach der Durchschrift der mRNA-Stränge ans Ende des entstandenen DNA-Stranges eine kurze Sequenz von Nucleotiden, und zwar bevorzugt d(C) anhängen. Der so entstehende oligo-d(C)-Überhang kann nun mit einer kurzen d(G)-Sequenz am 3'-Ende des SMART-II Oligonucleotids hybridisieren. Das SMART-II Oligonucleotid kann dann von der Reversen Transkriptase weiter durchgeschrieben werden, und es entsteht eine cDNA, die an ihrem 3'-Ende die komplette SMART-II-Sequenz enthält, welche als Priming-Sequenz für einen universellen Primer ("UP") in einer globalen PCR dienen kann. Die SMART-PCR reichert voll durchgeschriebene cDNAs an, da die verwendete Reverse Transkriptase einzelne Desoxyribonucleotidreste bevorzugt an Enden von DNA-RNA-Hybriden, die keinen Nukleinsäureüberhang oder einen 3'-DNA-Überhang aufweisen, anhängt (ZHU et al., 2001).

Der kritische Schritt bei der globalen Amplifikation von mRNA-Extrakten mit Hilfe der PCR ist die Erstellung des zweiten cDNA-Stranges unter Einführung der zweiten universellen Primer-Sequenz in die cDNA. Ein konventionelles Priming, wie z.B. durch ein Gemisch aller denkbaren Hexanukleotide (Random Hexamers) oder eine willkürlich gewählte Primersequenz (Arbitrary Primer) hat gegenüber dem SMART-Mechanismus den Vorteil einer höheren Effizienz. Auf der anderen Seite steht allerdings der Nachteil, dass 5'-nahe Sequenzen des mRNA-Extraktes in einer durch Random- oder Arbitrary Priming der Zweitstrangsynthese cDNA-Präparation unterrepräsentiert sind, da die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation einer Sequenz mit deren Abstand vom 3'-Ende der mRNA abnimmt (SALUNGA et al., 1999).

Das Startcodon der Translation 5'-AUG-3' ist bei Säuger-mRNAs in die Kozak-Consensus-Sequenz 5'-GCCAUGG-3' eingebettet, wobei jedoch alle Positionen außerhalb des Startcodons eine gewisse Variabilität aufweisen (KOZAK, 1987, 1989, 1991, 1992, 1999; PESOLE et al., 1999). Diese Sequenz könnte eine Möglichkeit zum Priming der Zweitstrangsynthese bieten, die die gesamte translatierte mRNA-Sequenz einer globalen Amplifikation zugänglich machen, die 5'-untranslatierten Sequenzen allerdings davon ausschließen würde.



**Abbildung 4** Schema der globalen Amplifikation von mRNA mit Hilfe des Arbitrary Primings. Als Primer in der Transkription ist ein oligo-d(T)-Primer mit angehängter universeller Primer-Sequenz (UP) dargestellt. Die Zweitstrangsynthese wird mit einem Arbitrary Primer durchgeführt, der am 3'-Ende die Sequenz CCATGG aufweist. Direkt oberhalb dieses willkürlichen Hexamers liegt ein Random Hexamer, das hier mit NNNNNN dargestellt ist. Dieses Hexamer stabilisiert die Bindung der 3'-Sequenz des Primers an deren Zielsequenz. Das 5'-Ende des Primers weist ebenfalls die UP-Sequenz auf, wodurch die erstellten cDNAs einer globalen PCR mit universellen UP-Primern zugänglich werden.

## **1.6 Ziele der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methodik zur Erstellung von Genexpressionsprofilen einzelner präimplantatorischer Säugerembryonen über cDNA-Arrays. Neben dem Aufbau eines sensitiven cDNA-Array Systems sollte hierzu ein Protokoll zur globalen Amplifikation embryonaler mRNA-Präparationen erarbeitet und charakterisiert werden.

Die entwickelte Methodik sollte genutzt werden, um die Genexpression in murinen und bovinen Embryonen auf Transkriptionsebene zu untersuchen.

Durch die Analyse einzelner muriner und boviner Embryonen sollten Informationen über komplexe regulatorische Zusammenhänge der embryonalen Genexpression erhalten werden.

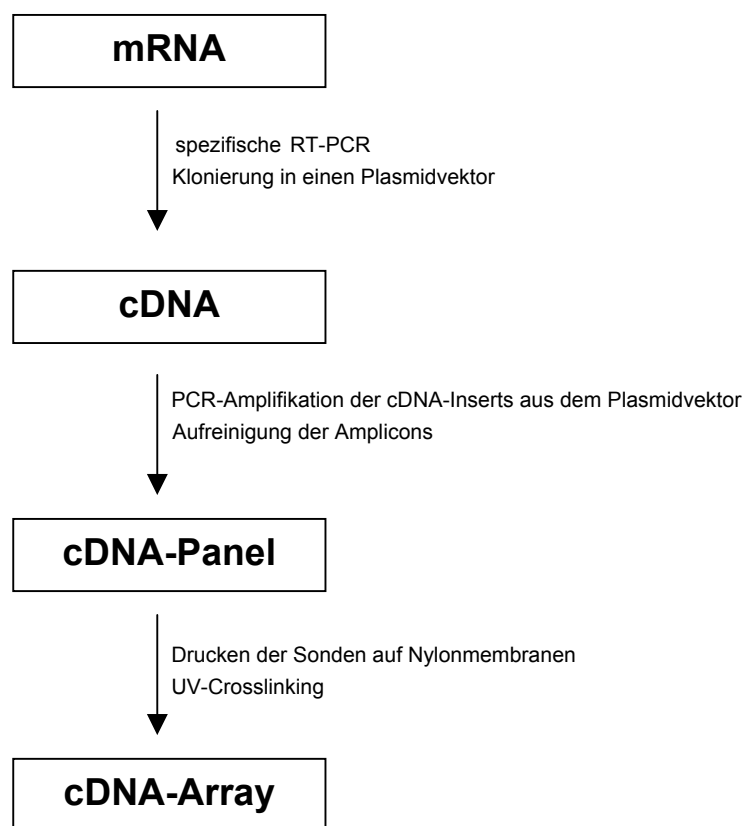
Die Analyse muriner Entwicklungsstadien sollte Einblicke in die zeitliche Regulation der Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung geben.

Aus der Analyse boviner Embryonen unterschiedlicher Herkunft sollten Rückschlüsse auf den Einfluss des Produktionssystems und hier speziell der Proteinsupplementation der verwendeten Medien auf die embryonale Genexpression gezogen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 cDNA Arrays

Die verwendeten cDNA Arrays wurden im Labor eigenständig angefertigt. Hierzu wurde zunächst eine Anzahl cDNA-Sonden erstellt, die in einen Standard-Plasmidvektor kloniert wurden. Nach Transfektion von Bakterien, deren Kultur und der Rückgewinnung der Plasmide wurden die einzelnen sequenzverifizierten Inserts per PCR aus den Vektoren reamplifiziert, aufgereinigt, auf eine Nylonmembran aufgetragen und dort fixiert. Die einzelnen Schritte der cDNA-Array Produktion sind im folgenden Schema (Abbildung 5) zusammengefasst:



**Abbildung 5** Schematischer Ablauf der cDNA-Array Produktion.

### 2.1.1 RT-PCR

Die Sequenzen der als Sonden für den Array in Frage kommenden murinen cDNAs wurden durch GenBank Recherche ermittelt. Durch Datenbank-Recherche wurde sichergestellt, dass die ausgewählten Ampliconsequenzen keine starke Homologie zu anderen bekannten murinen Genen aufwiesen. Weiterhin wurden bevorzugt Sequenzbereiche ausgewählt, die zwischen Maus, Mensch, Rind und Schwein eine hohe Homologie aufwiesen. Zum computergestützten Design geeigneter Primerpaare wurde eine entsprechende Software (Oligo 4, National Biosciences) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei einem kommerziellen Anbieter (MWG Biotech AG) synthetisiert, im Labor auf eine Konzentration von 20mM eingestellt und zur Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen in der RT-PCR eingesetzt. Als mRNA-Quelle wurde murines Lebergewebe verwendet. Die extrahierte mRNA wurde bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die RT wurde in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert, angegeben wurden die Ausgangskonzentrationen der Stocklösungen:

0,1µg mRNA

1µl lower Primer, 20mM

→ 72°C, 2'

→ 42°C, 1'

2µl 10x PCR-Buffer (Perkin Elmer)

2µl MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco BRL)

2µl dNTP's, 15mM (Amersham Pharmacia)

1µl RNasIn, 20U (Perkin Elmer)

1µl MULV-RT, 50U (Perkin Elmer)

ad 20µl H<sub>2</sub>O

→ 42°C, 60'

Zunächst wurden mRNA und Primer zusammengegeben und für 2 min auf 72°C erhitzt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf 42°C wurden die restlichen Komponenten hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 42°C inkubiert, dann erfolgte die Denaturierung der RT innerhalb von 10 min bei 65°C.

Die so gewonnene einzelsträngige cDNA wurde als Template in der folgenden PCR eingesetzt. Der gesamte RT-Ansatz wurde dabei entsprechend folgendem Schema auf ein Gesamtvolumen von 100µl verdünnt:



20µl RT-Reaktionsansatz  
50µl PCR-Master (2x konzentriert, Roche)  
2,5µl upper Primer, 20mM  
1,5µl lower Primer, 20mM  
ad 100µl H<sub>2</sub>O

Der eingesetzte PCR-Master Mix (Roche) enthielt neben dem Reaktionspuffer und MgCl<sub>2</sub> auch die nötigen Desoxynukleotidtriphosphate, sowie eine durch einen entsprechenden Antikörper inhibierte Taq-Polymerase. Diese wurde zunächst durch eine Denaturierung der Antikörpers bei 95°C für 5 min aktiviert. Anschließend erfolgte ein 35 Zyklen umfassendes PCR-Programm, wobei ein einzelner Zyklus einen Denaturierungsschritt bei 94°C, einen Annealingschritt bei der spezifischen Annealingtemperatur des verwendeten Primerpaares, sowie einen Elongationsschritt bei 72°C umfasste. Die Reaktionsansätze wurden dabei jeweils für 15s bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Nach Abschluss der PCR wurden 2µl jedes PCR Ansatzes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen, um die erhaltene Fragmentgröße mit der Größe des erwarteten Amplicons abzugleichen.

### **2.1.2 Klonieren der PCR-Produkte in pGemTeasy**

Die auf dem Array befindlichen cDNAs wurden in den Plasmidvektor pGem<sup>®</sup>-T Easy (Promega) kloniert. Die PCR-Produkte wurden zunächst über Silica-Säulen (Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) von Primerdimeren, überschüssigen Oligonukleotiden und Desoxynukleotidtriphosphaten gereinigt und in TE-Puffer resuspendiert. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Ligationsansätze nach folgendem Schema pipettiert:

5µl 2x Ligation Buffer  
1µl (50ng) pGem<sup>®</sup>-T Easy linearisierter Vektor  
1µl T4 DNA-Ligase  
25-50ng cDNA  
ad 10µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann zur Transfektion kompetenter Bakterien verwendet.

### **2.1.3 Transfektion kompetenter Bakterien**

Zur Replikation und Amplifikation von Plasmidvektoren wurden kompetente Bakterien der Escherichia coli Stämme DH5 $\alpha$ F' und JM109 verwendet. Die Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen wurden 100 $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension mit 10 $\mu\text{l}$  des jeweiligen Ligationsansatzes versetzt und  $30^{\circ}\text{C}$  auf Eis inkubiert. Nach 5 min Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden 500 $\mu\text{l}$  LB Kulturmedium zugegeben, und es wurde nochmals 30 min inkubiert.

### **2.1.4 Bakterienkultur**

Zu Kultur der transfizierten Bakterien wurden LB-amp-Platten hergestellt. Hierfür wurden 10g Tryptone (Difco, Detroit, MI), 5g Yeast Extract (Difco) und 10g NaCl (Roth, Karlsruhe) mit 1l H<sub>2</sub>O versetzt. Nach Zugabe von 15g Bacto-Agar (Difco) wurde die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf  $45^{\circ}\text{C}$  wurden 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$  einer 100mg/ml Ampicillin-Lösung zugegeben und jeweils 30ml in eine Petrischale gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Kultur der Bakterien auf selektiven LB-amp-Platten fand bei  $37^{\circ}\text{C}$  statt. Nach einer Kulturdauer von 16-24h wurden einzelne Kolonien gepickt und in 2ml LB-amp-Medium transferiert. Die Flüssigkultur fand ebenfalls bei  $37^{\circ}\text{C}$  und unter ständigem Schütteln (200rpm) für maximal 16h statt.

### **2.1.5 Miniprep**

Aus den Schüttelkulturen der einzelnen Bakterienklone wurde jeweils 1ml Medium in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 $\mu\text{l}$  50mM Tris-HCl (Roth), 10mM EDTA (pH8, Roth) resuspendiert und mit 100 $\mu\text{l}$  200mM NaOH (Roth), 1%SDS (Roth) versetzt. Die Ansätze wurden bis zur kompletten Lyse der Bakterien vorsichtig durchmischt. Nach maximal 5min Inkubation wurden 100 $\mu\text{l}$  3M Kaliumacetat, (pH5,2) zugegeben. Zum Abtrennen der ausgefallenen bakteriellen Zelltrümmer wurden die Ansätze 10min bei 10000 G zentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 $\mu\text{l}$  in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 $\mu\text{l}$  einer Phenol (Roth) / Chloroform (Merck, Darmstadt) / Isoamylalkohol (Roth) (25:24:1) Lösung extrahiert. Nach einer Phasentrennung durch erneute Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1ml 100% Ethanol (Roth) ausgefällt, durch Zentrifugation für 10min bei 10000 G pelletiert, mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und dann bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 50 $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach der Bestimmung der optischen Dichte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.1.6 Restriktionsverdau**

Zur Analyse der Länge der klonierten cDNAs wurden 0,5µg des gereinigten Plasmidvektors mit 5U EcoR1 (New England Biolabs) verdaut. EcoR1 schneidet den pGem<sup>®</sup>-T Easy Vektor jeweils unmittelbar neben der Insertionsstelle der klonierten cDNA. Der Verdau fand in 20µl Gesamtvolumen in dem mitgelieferten Restriktionspuffer statt. Die Reaktionsansätze wurden jeweils für 3h bei 37°C inkubiert. Nach Denaturierung des Enzyms bei 65°C wurde ein Aliquot jedes Reaktionsansatzes einer Gelelektrophorese unterzogen.

### **2.1.7 Sequenzierung**

Zeigte ein Insert die erwartete Größe, so wurde es mit Hilfe der PCR aus dem Standardvektor reamplifiziert (s.u.) und nach Aufreinigung des Amplicons über Silica-Säulen (Qiagen) durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech AG) sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der vorher ausgewählten Zielsequenz zur Sequenzverifizierung verglichen. Bei Übereinstimmung der Sequenzen wurde der Vektor in das Panel der cDNA-Sonden aufgenommen. Im Einzelnen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten sequenzverifizierten cDNA-Sonden eingesetzt:

#	Sonde	Primer (5'-3')
1	apaf1	upper TCCTAAGCATGTTGTCCCTGTGGAG lower TCCGTTTCCAAGTCCCAGAGAACG
2	apc	upper TGAACGTGGTAGGGATGAACTCTGG lower TTATCGCAGGCTTGGGCTCCAAAC
3	atm	upper CATACGCCAAACAAGATTGCCTCTG lower TGCTCGTTTCCAGGGAGATCCTTC
4	$\beta$ -actin	upper TGATGGTGGGAATGGGTCAGAAGG lower TCACAATGCCTGTGGTACGACCAG
5	bad	upper TCCAGATCCCAGAGTTTGAGCC lower TAAGCTCCTCCTCCATCCCTTC
6	bax	upper GCGAATTGGAGATGAACTGGATAG lower GATCAGCTCGGGCACTTTAGTG
7	bcl 2	upper ATGGGAAGCAGAGCAAGGGGTTAG lower TCCAGGGACTTGGAGAATTTGCC
8	bcl x long	upper CATCAATGGCAACCCATCCTG lower ACTACCTGCTCAAAGCTCTGATACG
9	$\beta$ -catenin	upper TGACGGGCAGTATGCAATGACTAGG lower TGCAGTGTCGTGATGGCGTAGAAC
10	e-cadherin	upper TCAGAAGACAGAAACGAGACTGGG lower TGTGTCACTTTCAGCCAGCCTG
11	caspase 2	upper ATGTGGAACCTCAACCTGCTGC lower TTTCTGTGCGGTCTGGTCATGTAG
12	caspase 3	upper GAGCACTGGAATGTCATCTCGC lower CCACTGTCTGTCTCAATGCCACAG
13	caspase 8	upper TGGAGGAAGGCAATCTGTCTTTC lower CCCGAGGTTTGTTCCTTCATTTG
14	caspase 11	upper GGTGAAATGCTTCTCCAGACATTC lower CCCTCTGCTGTAAGCTCCTCTTTC
15	cdc 2	upper GGAATTGTGTTTTGCCACTCCCG lower ATCTCTGAGTCGCCGTGGAAAAGC
16	cdc 6	upper CCGACATTTAAGGCTTCCCC lower TTTTCCAGTCCCAGGAGCG
17	cdc 25a	upper ACCAAGACACCTTTCACCTCATCGAC lower AGGGATAGAGACTGGGATGGAAGCTG
18	cdk 4	upper CCCAATGTTGTACGGCTGATGGATG lower CCAGCTTGACGGTCCCATTACTTG

#	Sonde	Primer (5'-3')
19	connexin 43	upper GTCAGCTTGGGGTGATGAACAG upper CAATCTGCTTCAGGTGCATCTCC
20	cyclin B	upper TGTGAACCAGAGGTGGAACCTTGCTG lower TTCTTGGGCACACAACCTGTTCTGC
21	cyclin C	upper TGTTTCTGGCATCCAAAGTAGAGG lower TATCCTCCATGCAAGGGGAAGCAG
22	cyclin D1	upper TGCGTGCAGAAGGACATCCAAC lower AACACTACCAGTTCCCACTCCAGC
23	cyclin D2	upper TGCGTGCAGAAGGACATCCAA lower TACCAGTTCCCACTCCAGCAG
24	cyclin E	upper TGCATTTTCAGCCTCGGAAAATCAG lower GCAAACCTGGTGCAACTTTGGAGGG
25	daxx	upper TTCGGGAAAATCGAACCTTGGC lower AAAGTCTGAAGGCGATGTGGGACTC
26	egf	upper GGATCTCCTGTTTCGATATTGACG lower TGATGTCATGCTTCTGCCCGTAGC
27	e2f5	upper TTGGCTGTGAGGCAAAAGCG lower AAACCACTGGCTTAGATGAACTGG
28	erb A	upper CGCCGCACAARCCAGAAGAATCTC lower GGGGTGATGATCTTGGTAAACTCGC
29	fas-antigen	upper TTGAGGACTGCAAATGAATGGGG lower CAACAACCATAGGCGATTTCTGGG
30	fas-ligand	upper TGCAGAAGGAACTGGCAGAACTCC lower TGTGGTTTAGGGGCTGGTTGTTGC
31	c-fos	upper TGCGTTGCAGACTGAGATTGC lower TTGACTGGCTCCAAGGATGGCTTG
32	gadd 45	upper GTTTTTCAGAAAGAACCGTGCTGTC lower ACCTCCCTTCCAAGCATGTACC
33	ket (p63)	upper GGCGGTGCTCGACTGCTGG lower CACAGTACACGAACCTGG
34	max	upper GCTTGCAGGTTTCAATCTGCGG lower GGCCTTGGTGTAGAGGCT
35	mdm 2	upper GACGAGAAGCAGCAGCACATTGTG lower CACCAGAATGCTCACTTACGCCAGC
36	mdm x	upper TCCATAGTGTGATCCTGTGCGAG lower TTCAGCATCTGACAGTGCTTGC

#	Sonde	Primer (5'-3')
37	miz 1	upper GGAAAATGAGGCTGACAATCCCG lower TGCTTGCATCACTGGCTACAGTCAC
38	mnt	upper TAGTGACCAATTCCCCGCAGTCTC lower TTTGTTGTGGACTTCTCTGGTTCCG
39	mxi	upper ACAGAAACACAGCAGTGGAAGCAGC lower TTCGTATCCGCTCCATCTCCTGAG
40	myb	upper CAGAAATATGGTCCGAAGCGTTGG lower CATGCCCAAACCCCATCAAATG
41	c-myc	upper TTTTATCTGCGACGAGGAAGAG lower AAGACCACTGAGGGGTCAATGCAC
42	l-myc	upper CCCAAAGTCGTGATCCTCAGCAAG lower TCGAGGTTACCAAGAATGCAAGCC
43	p 15	upper CAGAGCTGCTGCTGCTCCAC lower CCCAGGCGTCACACACATCC
44	p 16	upper AACTGCGAGGACCCCACTACCTCC lower CGGTACACAAAGACCACCCAGC
45	p 19	upper TGATGTTTGGAAAGTCCAGCAGTTGC lower TCCCTGTGGTGGAGATCAGATTCAG
46	p 21	upper TGTTCCGCACAGGAGCAAAG lower TCAGACACCAGAGTGCAAGACAGC
47	p 42	upper TTGAAGACACAGCACCTCAGCAATG lower GGCACCTTATTTTTGTGCGGGAG
48	p 73	upper GGTCCCTGACCAGTACCGTAG lower GTTGGGGATCGTGATGG
49	p 53	upper GCGGTCAGCGGTTTATGCC lower GTGATTCCCGAGTATCTGG
50	p 107	upper CGCAAGAGCATCATTCCACTGTGG lower GCAAAGATCAGGTCCAAGCAGCAC
51	rasH	upper CGGAAACAGGTGGTCATTGATG lower AAATACACAGAGGAAGCCCTCCCC
52	rasK	upper AAAGTTGTGGTGGTTGGAGCTTGC lower AAAGTTGTGGTGGTTGGAGCTG
53	rip	upper ACCCTTTACTACATGGCACCCGAAC lower TGCACACTGCGATCATTCTCGTCC
54	rb	upper GCAAATTAGAACGGACGTGTGAAC lower TTCTGGGTGTTTCGAGGTGAACC

#	Sonde	Primer (5'-3')
55	c-src	upper CATGCGAGCAAGCTGAGCATTG lower ATAGTCCACCAAACCTCCCCTTGGC
56	tag	upper CTTGAAAGGAGTGCCTGGGG lower GAGTCAGCAGTAGCCTCATCATCAC
57	tef 1	upper ACGGGAAAGACAAGGACCAGGAAG lower CTCTGCTGTTCAAGGAAAGCGGAG
58	tf I	upper CGCAACCTTGAAGTGGATTTTG lower TGCTCTTTAGCCTCTTGGTGGGTG
59	tgf $\beta$	upper ACCTGCAAGACCATCGACATGG lower TTGTTGCGGTCCACCATTAGCACG
60	tgf $\beta$ -r	upper AGCATCTACGATGGCTTCCACG lower TGCGTCTCTTAAACTTCCTGAGAGC
61	ubiquitin	upper AGAGTCAACCCTGCACCTGGTCCTC lower CACATTCTCGATGGTGTCACTG
62	telo I	upper AGGTGTCATCCCTGAAAGAG lower CAACAGTAGCATCCATGCAC
63	telo II	upper CGTTCCTGTTCTGGATGATGGACA lower GGTGATGCCTGACCTCCTCTTGTG
64	fibronectin	upper AGGAGAACAGTGGCAGAAAGAA lower GTAGGGTGGGGCTGGAAAGA
65	fgfr2 I(2+4)	upper CACTCGGGGATAAATAGTTCC lower TTGCTGTTTTGGCAGGAC
66	fgfr2 II	upper GCCGCCGGTGTTAACAC lower TGAAAGGATATCCCAATAGAATTACC
67	vimentin I	upper CTTGACCTTGAACGGAAAGTGG lower CACATCACGCAGGGCAGCAGT
68	vimentin II	upper AACAGCTTTCAAGTGCCTTTTA lower TTGAATACCATTAAACTGCTTTT
69	collagen	upper ATGGGTCCTTCTGGTCCTCGTG lower GGCACCATCCAAACCACTGAAG
70	ck-endo A	upper CAGCAGCAGAAGACGTCGAGGA lower AAAGTGAGGCGGCGTAAGAGGA
71	c-jun	upper GCAATGGGCACATCACCCTACAC lower TGAAGTTGCTGAGGTTGGCGTAGAC
72	afp	upper TGTGCGACGAAGACGAGACC lower CTTGTTAGAGAGTTCCGTCTCATGG

#	Sonde	Primer (5'-3')
73	albumin	upper TCCTATCAACCCCACTTAGCCTC lower TGCAAAGTCTGTTACTTCCTGCAC
74	c/ebp- $\alpha$	upper GAGCCGAGATAAAGCCAAACAAC lower TAGAGATCCAGCGACCCGAAAC
75	cdk2	upper AAAAGGTGGAGAAGATGGGAGAGG lower AATTTCTTGAGGTCCTGGTGCAG
76	cyp1a2	upper TGAGGCAGGGAGATGACTTCAAG lower CGATTGCAGTAACCACGGTAC
77	cyp1b1	upper TCTCCAGCTTTTTGCCTGTCAC lower CGTCACACTACTATAAGAGTCACCC
78	cyp2b13	upper AGCCCAGTGTCTACTCCTCCTTG lower GGAGAACCCTTTGGAGAACGT
79	dbp	upper ACACCCGTGGAGGTGCTAATGA lower TGAGTCTTCTTGCATCTCTCGACC
80	gapdh	upper TGCATCCTGCACCACCAACT lower AACACGGAAGGCCATGCCAG
81	otc	upper GAAAGGGTCACACTTCTGTGGTTC lower GCCTGTTTCTGTGGACAGTCTTG
82	pepck	upper GACTTCTCTGCCAAGGTTATCCAG lower TGATGACTGTCTTGCTTTCGATCC
83	sdh	upper CAAAGCTCTTTCCTACCCGATCAC lower AGGCTCTGTCCACCAAATGCAC
84	tat	upper CTACGTGATTCAGACGGATGTCG lower CTGTAGGCAGGTTCCCAAACAC
85	tdo	upper CCCGTTTGCAGGAAACAGTG lower CGAACAGAATCTAGTTCCAGAGG
86	telo III	upper GCACTTTGGTTGCCCAATGC lower AGCATCCATGCACCACTGACAC
87	transferrin	upper AAGACTTCCAAGTGTGTTGAGCTCTCC lower TCCCTCACTGATGATGCTCCAC
88	18S rRNA	upper TACGAGAGGATGGCGGAGAA lower CCAGCAGACGGCGGTAGGTG

**Tabelle 1** Liste der auf den Arrays aufgetragenen cDNA-Sonden und der zur ihrer Klonierung verwendeten Primer. Angegeben wurde jeweils upper und lower Primer, die zur Klonierung der entsprechenden Sonde verwendet wurden.



### **2.1.8 Amplifikation der Inserts mit universellen Primern**

Zur Herstellung der Arrays wurden die jeweiligen sequenzverifizierten cDNA-Sonden aus den Plasmidvektoren per PCR reamplifiziert. Hierbei wurde bei allen cDNAs ein Standard-Primerpaar (T7/SP6) verwendet. Als Matrize diente jeweils eine 1:500 Verdünnung des jeweiligen Plasmidstocks in H<sub>2</sub>O. Die einzelnen Sonden wurden nach folgendem Schema pipettiert:

8µl 10x PCR-Buffer (Gibco)  
7µl MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco)  
4µl dNTP's je 10mM (Amersham)  
5µl T7 Primer, 20mM (5'-ACTCACTATAGGGCGAATTG-3')  
6µl SP6 Primer, 20mM (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATACTC-3')  
49µl H<sub>2</sub>O  
2µl verdünnte Vektor-Präparation

Es wurde eine Hot Start-PCR durchgeführt, d.h. zunächst wurden die Reaktionsteilnehmer ohne Anwesenheit der Taq-Polymerase für 2min bei 97°C denaturiert, dann wurden 2U Taq DNA-Polymerase zugegeben. Zur Erleichterung des Pipettiervorganges wurde hierzu ein Hot Start-Mix nach folgendem Schema zusammengestellt:

2µl 10x PCR-Buffer (Gibco)  
0,4µl Taq DNA-Polymerase, 2U (Gibco)  
17,6µl H<sub>2</sub>O

Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 100µl. Es wurden 40 PCR-Zyklen gefahren. Die spezifische Annealingtemperatur des verwendeten Primerpaares betrug 57°C. Die einzelnen Inkubationsschritte wurden auf eine Dauer von jeweils 15s eingestellt.

Bei der Amplifikation der cDNA-Sonden mit dem T7/SP6-Primerpaar aus dem verwendeten Vektor wurden an beiden Enden der cDNA-Inserts Teile der Multiple Cloning Site des Vektors mit amplifiziert, da die Erkennungssequenzen der Primer nicht direkt neben Insertionsstelle liegen. Um diese unerwünschten flankierenden Sequenzen weitestgehend von den amplifizierten cDNAs abzutrennen, wurde den einzelnen PCR-Ansätzen nach Abschluss des PCR-Programms jeweils 10U EcoR1 (NEB) zugesetzt. Der Verdau wurde bei 37°C über Nacht ausgeführt.

### **2.1.9 Gelelektrophorese**

Zur Verifizierung der erwarteten Fragmentgröße der Amplicons wurden je 2µl der einzelnen Reaktionen auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem Gleichstromfeld aufgetrennt. DNA-Moleküle wandern dabei entsprechend ihrer negativen Nettoladung in Richtung der Anode durch eine Gelmatrix. Der Widerstand, den die Hydrogelstruktur den wandernden Nukleinsäuremolekülen dabei entgegensetzt, steigt mit zunehmender Länge der Nukleinsäureketten immer weiter an, so dass längere Moleküle sich im Gel langsamer in Richtung der Kathode bewegen als kürzere.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (BMA, 50004) wurde in TAE-Puffer [4,84g Tris-Base (Sigma, T1503), 1,14ml Eisessig (Merck, Darmstadt) und 2ml 5mM EDTA-Lösung in einem Endvolumen von 1l gelöst und auf pH8 eingestellt] unter Erhitzen aufgelöst. Nach Zugabe von 10µl/100ml 1%iger Ethidiumbromidlösung wurde die noch warme Lösung in eine Gussform eingegossen und bis zur völligen Erkaltung stehen gelassen. Die Gelelektrophorese wurde in TAE-Laufpuffer durchgeführt. Die DNA-Ansätze wurden mit der entsprechenden Menge 10x Ladepuffer ersetzt und dann in die Taschen des Gels eingefüllt. Nach Anlegen des Gleichstromfeldes erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente. Die einzelnen DNA-Banden wurden mit Hilfe eines Transilluminators unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### **2.1.10 Gelextraktion**

Nach Abschluss der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Ansätze wurden die cDNA-Sonden unter Verwendung von Silicasäulen (Qiagen) wieder aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug jeweils 100µl.

### **2.1.11 Vakuumzentrifugation**

Die aufgereinigten cDNA-Sonden wurden in einer Vakuumzentrifuge der Firma Eppendorf bei 45°C getrocknet, anschließend in 8µl H<sub>2</sub>O wieder aufgelöst und in eine 96-well Platte (Greiner) pipettiert.

### **2.1.12 Denaturierung**

Zur Denaturierung der cDNA-Sonden vor dem Drucken der Arrays wurden in jede Vertiefung der 96-well Platte je 2µl frisch angesetzter 5x Denaturierungslösung (2N NaOH/50mM EDTA) gegeben und durch Pipettieren durchmischt. Die Platte wurde bis zum Drucken der Arrays 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

### **2.1.13 Drucken der Arrays**

Die cDNA-Sonden wurden mit einem 96-Nadel Replikator (#VP409, V&P Scientific, San Diego) auf Nylonmembranen gedruckt. Die Nadeln dieses Replikators wurden mit Hilfe einer speziellen Führungsmechanik in die Vertiefungen der 96-well Platte eingetaucht und langsam wieder herausgezogen. Die dabei an den einzelnen Nadeln verbleibenden Tropfen der cDNA-Lösungen wurden dann mit Hilfe einer zweiten Führungsmechanik auf eine vorbereitete Membran aufgebracht. Als Trägermedium diente Hybond N Nylonmembran (Amersham Pharmacia). Jede cDNA-Sonde wurde pro Membran in zwei nebeneinander liegenden Tropfen aufgetragen. Nach dem Eintrocknen der aufgetragenen cDNA-Sonden wurden diese durch UV-Crosslinking (Stratalinker, Stratagene) fixiert, in PE-Folie eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei 4° gelagert. Ein Überblick über die Position der einzelnen cDNA-Sonden auf dem Array findet sich in Abbildung 6 auf der nächsten Seite.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	apaf1	apc	atm	$\beta$ -actin	bad	bax	bcl2	bclx	$\beta$ -cat	e- cad	casp 2	casp 3
B	casp 8	casp 11	cdc 2	cdc 6	cdc 25a	cdk 4	cx 43	cyc B	cyc C	cyc D1	cyc D2	cyc E
C	daxx	egf	e2f5	erb A	fas-ag	fas- lig	c-fos	gadd 45	p63	max	mdm 2	mdm x
D	miz 1	mnt	mxi	myb	c-myc	l-myc	p 15	p16	p 19	p 21	p 42	p 73
E	p 53	p 107	ras-H	ras-K	rip	rb	c-src	t- ag	tef-1	tf-1	tgf- $\beta$	tgf- $\beta$ -r
F	ubi	telo I	telo II	fibro	fgfr21Ib	fgfr2Ic	vim I	vim II	col	ck- endoa	c-jun	afp
G	albumin	c/ebp- $\alpha$	cdk 2	cyp 1a2	cyp 1b1	cyp 2b13	dbp	gapdh	PGCSlo	PGCSu p	pBR322	pBR322
H	otc	pepck	sdh	tat	tdo	telo III	tf	-	pGemT	Globin	pBKS	18S

**Abbildung 6** Membranatlas der verwendeten cDNA-Arrays

## **2.2 Tiermaterial und Tierhaltung**

### **2.2.1 Mäuse**

Für die Gewinnung muriner Embryonen wurden weibliche, 6-15 Wochen alte NMRI-Mäuse der Firma Harlan Winkelmann verwendet. Zur Verpaarung wurden männliche CD2F1-Mäuse mit einem Alter von mindestens 20 Wochen eingesetzt. Die Tiere wurden in Gruppen von jeweils 5 oder 6 Tieren in Macrolonkäfigen der Größe II (Ebeco, Berlin) in der klimatisierten Mäusestallanlage des Institutes gehalten. Die Temperatur betrug zwischen 19°C und 23°C, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 50-65%. Es wurde ein Belichtungsprogramm von 12 Stunden gefahren. Die Beleuchtung war dabei zwischen 6:00 und 18:00 Uhr eingeschaltet. Die Mäuse wurden auf Labortiereinstreu gehalten, und mit Leitungswasser und Alleinfuttermittel ad libitum versorgt.

### **2.2.2 Rinder**

Für die Gewinnung boviner in vivo Blastozysten wurden 4-8 Jahre alte Kühe der Rasse Schwarzbunt mit unterschiedlich hohem HF-Anteil aus den Herden des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee verwendet. Die Kühe wurden im Sommer auf der Weide und von Oktober bis Mai in Anbindehaltung im Stall des Instituts gehalten. Die Tiere wurden mit betriebseigener Silage, Heu und ab einer Milchleistung von 18kg/d mit 0,5kg Milchleistungsfutter pro kg Milch gefüttert und mit Wasser ad libitum versorgt.

## **2.3 Superovulationsbehandlungen**

Um die Ausbeute an Blastozysten zu erhöhen, wurden alle Spendertiere nach tierartspezifischem Applikationsschema mit exogenen gonadotropen Hormonen superovuliert. Die Mäuse wurden anschließend verpaart, während die Kühe besamt wurden.

### **2.3.1 Mäuse**

Die verwendeten Mäuse wurden unabhängig von Alter und Gewicht mit einer intraperitonealen Gabe von 10IU equinem Choriogonadotropin (eCG, Intergonan, Vemie, Kempen), 46-48h später gefolgt von einer intraperitonealen Gabe von 10IU humanem Choriogonadotropin (hCG, Primogonyl, Schering, Berlin) superovuliert. Unmittelbar nach der Primogonylapplikation wurden die Tiere einzeln mit den jeweiligen männlichen CD2F1-Mäusen verpaart. Nach HOGAN et al. (1986) findet die Ovulation bei der Maus etwa 10-13h nach der Choriogonadotropingabe statt. Da die Primogonylapplikation i.d.R. gegen 16:00 Uhr vorgenommen wurde, konnte die Ovulation in der darauffolgenden Nacht erwartet werden. Die erfolgreiche Paarung

wurde am nächsten Morgen durch das Vorhandensein eines vaginalen Koagulationspfropfes festgestellt.

### **2.3.2 Rinder**

Den Spenderkühen wurden zwischen dem 9. und 13. Tag des Reproduktionszyklus 3000 IU eCG (Intergonan) intramuskulär injiziert. Nach 48h erfolgte eine intramuskuläre Gabe von 526µg Cloprostenol-Na (Estrumate, Pitman-Moore, Burgwedel) zur Luteolyse. Zum Zeitpunkt der superovulatorischen Brunst, d.h. weitere 48h später, erfolgte eine zweimalige Insemination im Abstand von 12h.

## **2.4 Embryongewinnung, -kultur und -lagerung**

### **2.4.1 Murine Oozyten**

Murine Oozyten wurden 20h nach Primogonylapplikation aus unverpaarten Mäusen gewonnen. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchhöhle wurde durch einen Medianschnitt und zwei seitliche Entlastungsschnitte eröffnet. Die inneren Geschlechtsorgane wurden freipräpariert und die Eileiter in ein 35mm Petrischälchen mit PBS/ 0,1%PVA (beides Sigma, Deisenhofen) überführt. Unter einem Binokular (Wild, Heerburg) wurden die Eileiter eröffnet und so die Oozyten freigesetzt. Die Oozyten wurden gesammelt und etwa 5min in 1x Trypsin/EDTA (Sigma) inkubiert, um die umgebenden Kumuluszellen abzulösen. Nach dem Verdau wurden die Oozyten dreimal mit PBS/PVA gewaschen und anschließend beurteilt. Intakte Oozyten, die einen Polkörper aufwiesen, wurden als gereift klassifiziert, zu Fünfergruppen zusammengefasst, mit möglichst wenig Medium in ein 0,5ml mit Silikon beschichtetes Reaktionsgefäß (Roth) überführt und sofort in Flüssigstickstoff (Linde) eingefroren.

### **2.4.2 Murine Zweizeller**

Die Gewinnung muriner Zweizeller erfolgte analog zur Gewinnung der Oozyten, nur dass hierbei erfolgreich verpaarte Tiere am Tag 2 p.c. als Spender verwendet wurden. Eileiter und Uterus wurden präpariert und zum Ausschwemmen vorhandener Zweizellstadien mehrmals vom Infundibulum aus mit PBS/PVA durchgespült. Die Zweizellstadien wurden bei 40facher Vergrößerung unter dem Binokular beurteilt. Es wurden zwei Fünfergruppen eingefroren, die nach der Lyse der Embryonen zusammengeführt wurden.

### **2.4.3 Murine Blastozysten**

Zur Gewinnung muriner Blastozysten wurden verpaarte Spendertiere am Tag 3.5 p.c. getötet. Eileiter und Uterus wurden präpariert und in PBS/PVA überführt. Vom Infundibulum aus wurden dann die Uterushörner mit PBS/PVA durchgespült, um die Blastozysten auszuschwemmen. Die Blastozysten wurden bei 40facher Vergrößerung beurteilt, expandierte und nicht expandierte Blastozysten, die ein deutliches Blastozoele und eine klar sichtbare innere Zellmasse zeigten, wurden gesammelt und einzeln eingefroren.

### **2.4.4 In vivo produzierte bovine Blastozysten**

Die in vivo erstellten Blastozysten wurden freundlicherweise von K. G. Hädeler (Mariensee) gewonnen und zur Verfügung gestellt.

Am Tag 8 nach der ersten Besamung wurden Ovarreaktion und Gelbkörperanzahl durch rektale Palpation beurteilt. Die Blastozysten wurden durch Spülung der beiden Uterushörner mit je 400ml warmer PBS/ 1%NBCS (Newborn Calf Serum, Roche) nach Epiduralanästhesie mit 4-6 ml Hostacain (Hoechst, Frankfurt) gewonnen. Hierzu wurde ein Ballonspülkatheter (Minitüb, Tiefenbach) transzervikal in das jeweilige Uterushorn eingeführt, durch Aufblasen des Ballons nach kaudal abgedichtet, das Spülmedium mit einer Pumpe (Vetec, Dummersdorf) in den Uterus eingebracht und anschließend in einer Glasflasche wieder aufgefangen. Das Spülmedium wurde im Labor durch ein Sieb (75µm Maschenweite, Jürgens, Hannover) gegossen. Die im Sieb verbleibenden Blastozysten wurden mit Spülflüssigkeit in Petrischalen ausgespült, unter einem Binokular gesammelt und beurteilt. Als geeignet beurteilte Blastozysten wurden in PBS/PVA gewaschen, einzeln eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.4.5 In vitro produzierte bovine Blastozysten**

Die in vitro produzierten Blastozysten wurden freundlicherweise von Dr. A. Lucas-Hahn, K. Korsawe und E. Lemme (Mariensee) erzeugt und zur Verfügung gestellt.

Zur Erstellung boviner in vitro Blastozysten wurden Kumulus-Oocyten-Komplexe (KOK) aus Rinderovarien, die in einem örtlichen Schlachthaus gesammelt wurden, gewonnen, in vitro gereift und befruchtet und bis zum Blastozystenstadium kultiviert, wobei zwei Mediensysteme verwendet wurden: eines, in dem Reifungs- und Kulturmedien mit BSA-supplementiert wurden und ein zweites, in dem diese Medien ECS als Proteinsupplement enthielten.

#### **2.4.5.1 Ovariengewinnung**

Die Ovarien zur KOK-Gewinnung wurden in einem Schlachthof in Minden/Lübbecke nach dem Eröffnen der Bauchhöhle geschlachteter weiblicher Tiere entnommen. Ovarien von offensichtlich erkrankten, stark abgemagerten oder hoch tragenden Tieren wurden nicht verwendet. Die Ovarien wurden mit PBS gewaschen und bis zur Ankunft im Labor in einem mit 28°C warmer PBS gefüllten Thermogefäß aufbewahrt. Dort fand ein erneutes Waschen mit PBS statt.

#### **2.4.5.2 KOK-Gewinnung**

Die Oberfläche der Ovarien wurde im Labor in PBS, unter Zusatz von 2IU Heparin/100ml mit Hilfe eines Vielklingenmessers angeritzt (Slicing-Methode, ECKERT und NIEMANN, 1995), wodurch die in den angeritzten Follikeln befindlichen KOK in die Sammelflüssigkeit freigesetzt wurden. Die Sammelflüssigkeit wurde durch ein Sieb gegossen und zur Sedimentation der KOK für etwa 15-20min bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde unter einem Binokular bei 15facher Vergrößerung auf KOK durchmustert. Die KOK wurden in PBS gesammelt und in Anlehnung an die von ECKERT (1994) und WRENZYCKI (1995) verwendeten Beurteilungskriterien bewertet. Je nach Beschaffenheit des die Oozyten umgebenden Cumulus oophorus und des Eizellplasmas wurden die KOK in zwei Klassen eingeteilt: Klasse 1-KOK wiesen ein homogenes, dunkles Ooplasma und einen kompakten, mindestens dreilagigen Cumulus oophorus auf. Klasse 2-KOK weisen ebenso wie die der Klasse 1 ein dunkles, homogenes Ooplasma auf, jedoch war der Cumulus oophorus stellenweise weniger als drei Lagen dick. KOK, die ein nicht homogenes Ooplasma, einen stark aufgelockerten, degenerierten oder gar keinen Cumulus aufwiesen, wurden verworfen. Die ausgewählten KOK der Klassen 1 und 2 wurden in PBS gesammelt und innerhalb von 3h nach Ankunft der Ovarien im Labor in Reifungsmedium übertragen.

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

Für die In vitro-Reifung wurde TCM 199 (mit L-Glutamin und 25mM Hepes) supplementiert mit 2,2µg Pyruvat, 22µg NaHCO<sub>3</sub>, 50µg Gentamycin pro ml als Basismedium verwendet. Je nach Mediensystem wurden 0,1% BSA (Sigma, A7030) bzw. 10% ECS zugesetzt. Weiterhin wurden pro ml Medium 10IU eCG und 5IU hCG (Suigonan, Intervet) zugegeben. Gruppen von 20-25 KOK wurden jeweils dreimal in äquilibrtem Maturationsmedium gewaschen und anschließend in 100µl Tropfen, in 35mm Petrischalen (Greiner) mit Silikonöl überschichtet, für 24h bei 39°C und 5%CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der 24h wurden die gereiften Oozyten in vitro befruchtet.



#### **2.4.5.4 In vitro-Fertilisation (IVF)**

Zunächst wurden Sperm-TALP und Fert-TALP Medium (mit 6mg BSA pro ml supplementiert) vorbereitet. Die KOK wurden in Fert-TALP gewaschen, und in Fert-TALP, dem 10µM Hypotaurin (Sigma, H1384), 1µM Epinephrin (Sigma, E1635 ), 0,1 IU Heparin (Serva) sowie 6mg BSA pro ml zugesetzt wurden, fertilisiert.

Zur Befruchtung wurde tiefgefrorenes Sperma des Bullen "Erwin" verwendet, welches sich bereits in vorhergehenden Versuchen im Labor bewährt hatte. Nach Auftauen der in Flüssigstickstoff gelagerten Spermienproben in einem Wasserbad bei 37°C wurden diese in Fert-TALP-Medium entsprechend der modifizierten Swim-up Methode (PARRISH et al., 1986 u. 1988) aufbereitet. Nach der Swim-up-Separation wurden die Spermien gewaschen und in Fert-TALP mit Heparin und BSA resuspendiert. Die Befruchtung erfolgte durch eine Kokultur der KOK und der Spermien in einer Endkonzentration von 10<sup>6</sup>Spermien/ml für 19h bei 39°C und 5%CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

#### **2.4.5.5 In vitro-Kultur von Embryonen (IVK)**

Die in vitro fertilisierten oder durch Kerntransfer erstellten Embryonen wurden in synthetischer Eileiterflüssigkeit (Synthetic Oviduct Fluid, SOF) kultiviert (TERVIT et al., 1972). Dabei wurden zwei verschiedene Kultursysteme verwendet. Im BSA-System wurde das SOF-Grundmedium mit 1% BSA versetzt, während es im ECS-System mit 10% ECS supplementiert wurde. Die Kultur fand in einer sauerstoffreduzierten, wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, und 90% N<sub>2</sub> (Air Products, Hattingen) bei 39°C in modularen Inkubationskammern (ICN Biomedicals, OH) statt. Am Tag 8 nach Befruchtung bzw. chemischer Aktivierung wurden die erzeugten Blastozysten gesammelt, in PBS mit 0,1% PVA gewaschen, einzeln eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **2.4.5.6 Kerntransfer (NT)**

Als Zellkerndonoren für den Kerntransfer wurden primäre Kulturen fetaler boviner Fibroblasten verwendet. Als Ooplasten wurden gereifte bovine Oozyten eingesetzt, die nach Hoechst33342-Färbung in TCM-air, das mit 7,5µg/µl CytochalasinB (Sigma, C6762) supplementiert wurde, durch Aspiration des Polkörpers und der Metaphasenplatte entkernt wurden. Die erfolgreiche Enukleation wurde durch die Identifikation der aspirierten chromosomalen DNA unter UV-Licht bestätigt.

Nach dem Entkernen der Eizellen wurde je eine Donorzelle in den Perivitellarraum der Ooplasten eingebracht und durch Elektrofusion mit diesem verschmolzen (ZIMMERMANN et al., 1987; WELLS et al., 1999). Die Elektrofusion fand dabei 26h nach Beginn der Oozytenmaturation statt und wurde 30min nach dem Elektropuls lichtmikroskopisch bestätigt.

Die Kerntransferembryonen wurden 27h nach Beginn der Oozytenmaturation durch eine Inkubation für 5min in TCM 199, welches 5µM Ionomycin (Sigma, 0634) enthielt, chemisch aktiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3-4h bei 37°C in TCM 199, das mit 2mM 6-DMAP (Sigma, D2629) versetzt war.

#### **2.4.5.7 Erstellung parthenogenetischer Embryonen**

Parthenogenetische Embryonen entstehen durch Aktivierung von Oozyten ohne Spermienbeteiligung. Gereifte Rinder-Oozyten wurden 27h nach Beginn der Maturation analog zu den Kerntransferembryonen chemisch aktiviert. Dies geschah durch eine fünfminütige Inkubation der Embryonen in TCM 199, das 5µM Ionomycin enthielt, und einer anschließenden 3-4h dauernden Inkubation bei 37°C in TCM 199, das mit 2mM 6-DMAP versetzt war. Die aktivierten Eizellen wurden in SOF-BSA in vitro kultiviert. Am Tag 8 nach der Aktivierung wurden die erzeugten Blastozysten analog zu den anderen Embryonen gesammelt und einzeln in PBS mit 0,1% PVA eingefroren.

## **2.5 mRNA Extraktion aus Embryonen**

Embryonale mRNA wurde durch Dynabead (Dynal, Oslo) Extraktion (WRENZYCKI et al., 1999) aus Embryonengruppen und Einzelembryonen gewonnen. Dieses Verfahren beinhaltet die Hybridisierung der Poly-(A)-Sequenzen am 3'-Ende der mRNA-Moleküle mit kovalent an magnetische Beads gebundenen Poly-d(T)-Sequenzen. Die mit mRNA beladenen Beads können dann mit einem entsprechenden Separator, der einen Magnetstreifen enthält, vom Überstand abgetrennt und die gebundenen mRNA-Moleküle durch eine Reihe von Waschschritten weiter aufgereinigt werden. Die vom Hersteller vorgegebene Extraktionsprozedur wurde dabei wie folgt modifiziert: Pro Embryo wurden 5µl, pro Embryonengruppe 10µl Dynabeadsuspension eingesetzt. Die beladenen Dynabeads wurden einmal mit Waschpuffer A und dreimal mit Waschpuffer B gewaschen, bevor die gebundene mRNA in 11µl H<sub>2</sub>O eluiert wurden. Die Elution wurde durch die Zugabe des Wassers zu den gewaschenen Beads und anschließende Inkubation für 2min bei 65°C vorgenommen.

## **2.6 Murines Gewebe**

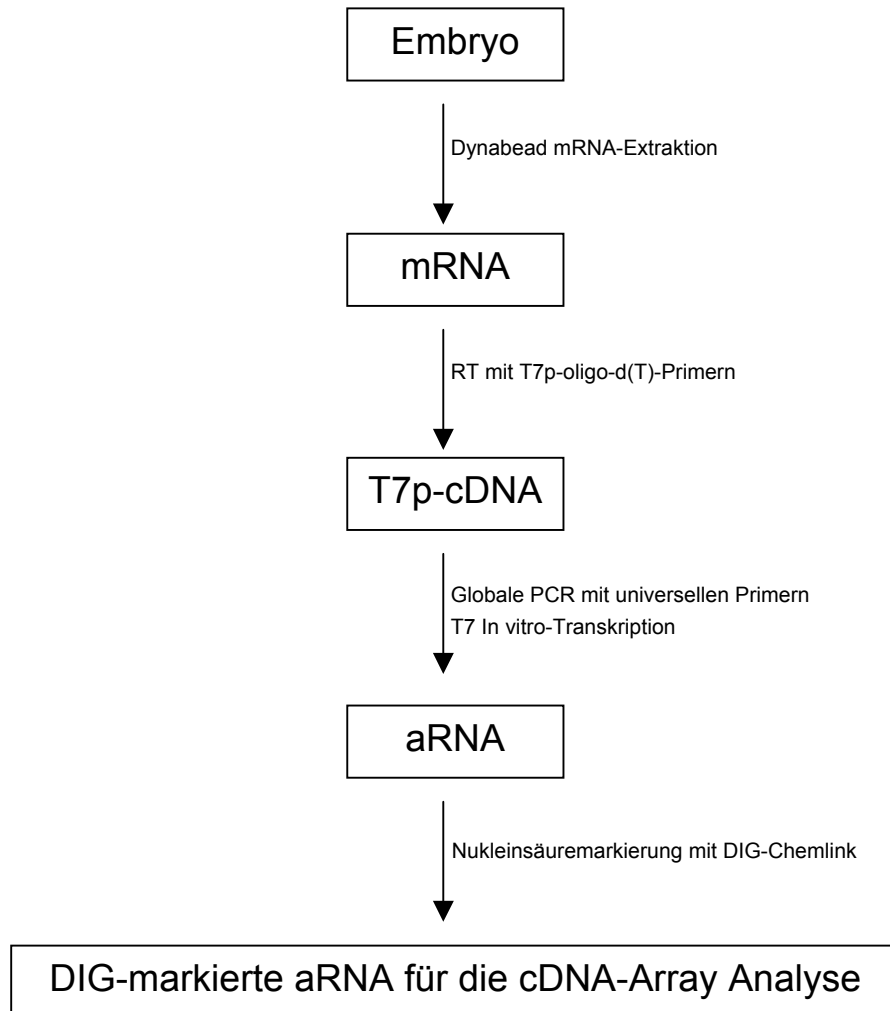
Zur Gewinnung muriner Nieren-mRNA wurden NMRI-Mäusen im Alter von 8 Wochen nach zervikaler Dislokation die Nieren entnommen. Diese wurden in etwa 1mm<sup>3</sup> große Stücke zerteilt, welche einzeln eingefroren und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80°C gelagert wurden.

## **2.7 RNA Extraktion aus murinem Gewebe**

Die Extraktion von mRNA aus Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy- und des Oligotex mRNA Extraktionskits (Qiagen) durchgeführt. Zunächst wurde mit den im RNeasy-Kit enthaltenen Silica-Säulen entsprechend dem Herstellerprotokoll die gesamte RNA des Gewebes extrahiert. Aus dieser wurde dann durch Oligotex-Extraktion die mRNA aufgereinigt. Hierbei hybridisieren die Poly-(A)-Sequenzen am 3'-Ende der mRNA-Moleküle nach einem Denaturierungsschritt mit kovalent an Trägerbeads gebundenen Poly-d(T)-Sequenzen, welche dann durch Zentrifugation oder Filtration vom Überstand, der die restlichen RNA-Spezies, u.a. ribosomale und Transfer-RNAs enthält, abgetrennt werden können. Die Herstellervorgaben wurden dabei insoweit modifiziert, als dass Denaturierung und Hybridisierung zweimal durchgeführt wurden, um die Kontamination der mRNA mit rRNA weiter zu vermindern. Extrahierte mRNA wurde bei -80°C eingefroren und gelagert.

## 2.8 aRNA-Präparation für die cDNA-Array Analyse

Die cDNA-Array Analyse von Embryonen erfordert die globale Amplifikation der embryonalen mRNA. Im folgenden Schema sind die Arbeitsschritte zur cDNA-Analyse von Embryonen zusammengefasst:



**Abbildung 7** Schema der aRNA-Präparation aus Embryonen für die cDNA-Array Analyse

### **2.8.1 cDNA Synthese**

Zur Amplifikation der mRNA für die cDNA-Array-Analyse wurde zunächst durch reverse Transkription (RT) eine komplementäre, doppelsträngige cDNA hergestellt. Durch Verwendung eines entsprechenden Primers in der RT wurde dieser cDNA eine Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase angefügt. Die so erstellten cDNAs wurden dann in einer PCR-Reaktion global voramplifiziert und dienten anschließend als Matrizen in einer In vitro-Transkriptionsreaktion. Das Ergebnis dieser Prozedur waren amplifizierte Antisense-RNAs, die durch cDNA-Array-Hybridisierung analysiert wurden.

#### **2.8.1.1 Erststrangsynthese**

Als Primer für die Erststrangsynthese wurde ein modifizierter Oligo-d(T)-Primer eingesetzt, der am 5'-Ende eine T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz enthielt. Die Sequenz dieses, im Folgenden als T7-T21 bezeichneten Primers war: 5'TCT AGT CGA CGG CCA GTG CCT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT3'. Die RT-Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

11µl RNA-Extrakt  
0,5µl T7-T21-Primer, 20mM  
0,5µl H<sub>2</sub>O

Primer und mRNA wurden für 5min bei 70°C denaturiert. Danach wurden die Ansätze zur Hybridisierung der Primer an ihre Zielsequenzen für 5min bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation auf Eis wurden die Reaktionen durch Zugabe folgender Komponenten komplettiert:

2µl 10x PCR-Puffer (Perkin Elmer)  
2µl MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco)  
2µl dNTP's, 10mM (Amersham Pharmacia)  
1µl RNasin, 20U ( Perkin Elmer)  
1µl MULV-RT, 50U (Perkin Elmer)

Die RT-Ansätze wurden 60min lang bei 42°C inkubiert und danach bei 4°C gelagert.

### **2.8.1.2 Zweitstrangsynthese**

Zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer (DOP) verwendet. Diese Primer enthielten neben einer universellen Sequenz am 5'-Ende eine 6 Basen lange degenerierte Nukleotidsequenz (Random Hexamer). Diese Region wurde von einer willkürlich gewählten, GC-reichen Hexanukleotidsequenz (Arbitrary Hexamer) am 3'-Ende flankiert. Bei einer Annealingtemperatur von 30°C binden die 3'-Enden solcher Primer ihre Zielsequenz auf den Matrizensträngen, wobei diese Bindung durch das benachbarte Random hexamer stabilisiert wird. Nach der Polymerisation des zweiten cDNA-Stranges enthalten die entstandenen cDNA-Stränge neben der T7-T21-Sequenz am 3'-Ende auch die DOP-Sequenz am 5'-Ende.

5' CCGACTCGAG NNNNNN ATGTGG 3'

Universelle	Random	Arbitrary
Sequenz	Hexamer	Hexamer

**Abbildung 8** Aufbau des verwendeten degenerierten Oligonukleotidprimers (DOP)

Zur Zweitstrangsynthese wurden den 20µl-RT-Ansätzen folgende Komponenten hinzugefügt:

50µl 2x DOP PCR Master Mix (Roche, Mannheim)  
0,5µl DOP, 40mM  
24,5µl H<sub>2</sub>O

Zur Aktivierung der im DOP PCR Mastermix enthaltenen und durch einen Antikörper inhibierten Taq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze zunächst für 5min bei 95°C inkubiert. Die Hybridisierung des DOP erfolgte innerhalb von 90s bei 30°C, gefolgt von einem kontrollierten Anheben der Temperatur um 0,2°C/s bis auf eine Endtemperatur von 72°C. Zur vollständigen Elongation und damit dem Abschluß der Zweitstrangsynthese wurde für 3min bei 72°C inkubiert.

### **2.8.2 Globale PCR**

Die erhaltenen Zweitstränge wurden nun mit den Primern T7-T21 und DOP, die identisch mit denen der Erst- und Zweitstrangsynthese waren, in einer PCR global amplifiziert. Hierzu wurden am Ende des 72°C-Inkubationsschrittes der Zweitstrangsynthese den Reaktionsansätzen folgende Komponenten hinzugefügt:

2,5µl T7-T21-Primer, 20mM  
2,5µl DOP, 40mM

Dann wurden 25 Zyklen eines PCR-Programmes mit folgenden Parametern gefahren: Denaturierung bei 94°C für 30s, Annealing der Primer bei 60°C für 30s, Elongation der Primer bei 72°C für 4min. Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden die cDNA-Präparationen bis zur weiteren Verwendung bei 7°C inkubiert.

### **2.8.3 Aufreinigung der voramplifizierten cDNAs**

Die cDNAs wurden aus den PCR-Ansätzen mit Hilfe von Mini-Spin Silica-Säulen (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und in einem Volumen von 50µl in 0,1x TE eluiert. Die eluierten cDNAs wurden in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf) getrocknet, in 12µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und als Template in der folgenden In vitro-Transkription eingesetzt.

### **2.8.4 In vitro-Transkription (IVT)**

Die cDNAs wurden in vitro mit dem T7-Ampliscribe-Kit (Epicentre Technologies) transkribiert. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die IVT-Ansätze folgendermaßen zusammengestellt:

12µl cDNA-Präparation  
2µl 10x IVT-Reaktionspuffer  
2µl dNTP-Mix (ATP,CTP,GTP,UTP, jeweils 100mM)  
2µl DTT, 0,1mM (Gibco)  
2µl T7-RNA-Polymerase, 2U

Die Reaktionsansätze wurden für 3h bei 42°C inkubiert, dann erfolgte ein DNase1-Verdau: jedem Ansatz wurde nach Abkühlung auf 37°C 1U DNase1 hinzugefügt und anschließend wurde für 15min bei 37°C inkubiert. Die Transkripte wurden mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt, in einem Volumen von 35µl H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration auf Eis gelagert.

### **2.8.5 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm gemessen. Hierzu wurde eine Quarzglasküvette mit 5µl Fassungsvermögen bei einer Schichtdicke von 0,5cm verwendet. Eine Extinktion von 1OD<sub>260nm</sub> entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA, 33 mg/ml einzelsträngiger DNA (z.B. Oligonukleotide) bzw. 40 mg/ml RNA (SAMBROOK et al., 1989). Das Verhältnis der bei 260 nm zu der bei 280 nm gemessenen Extinktion (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) liegt bei einem sauber präparierten Nukleinsäureansatz zwischen 1,8 und 2.

### **2.8.6 Nukleinsäure-Markierung**

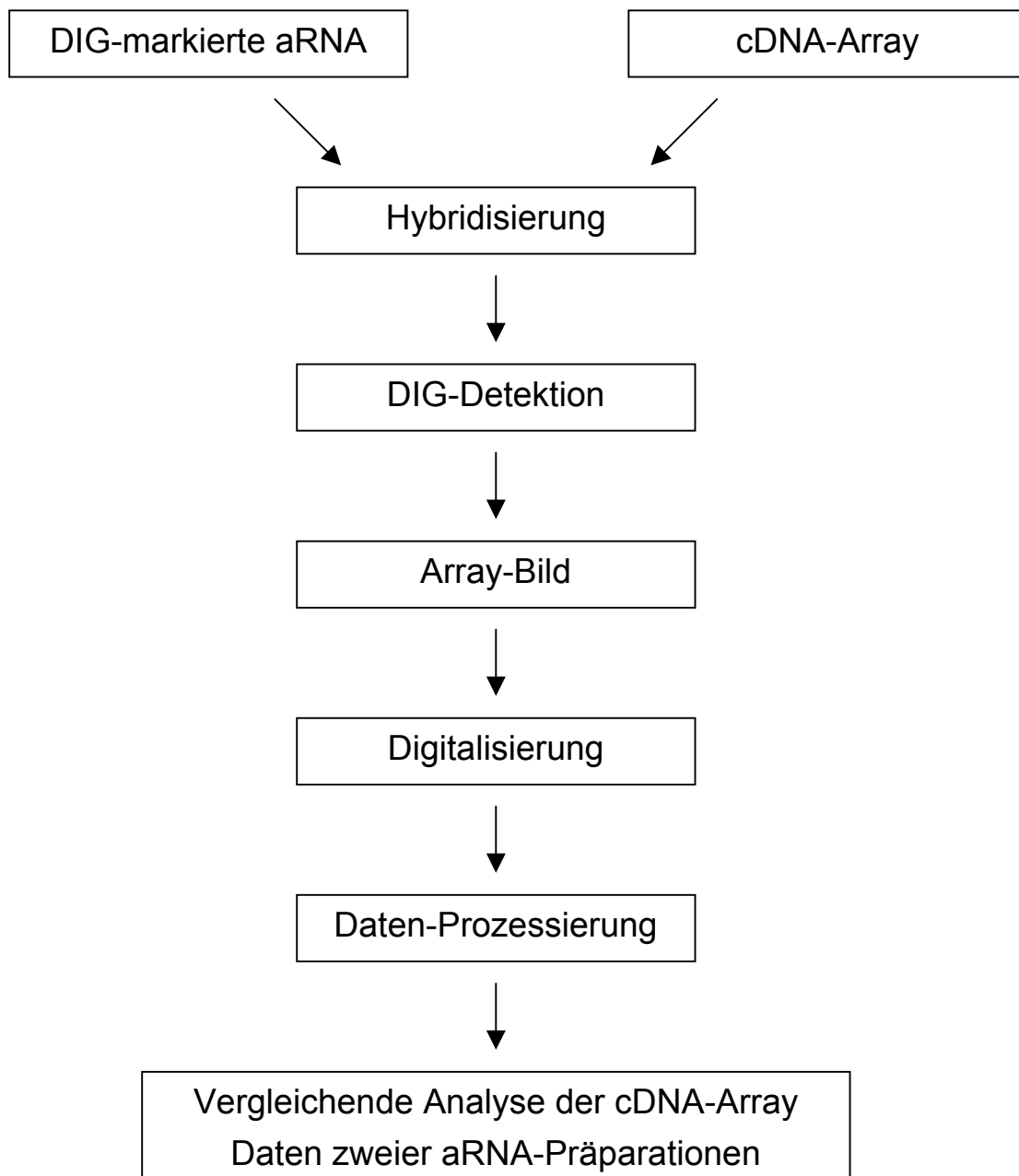
Die Markierung der aRNAs wurde nicht-enzymatisch durchgeführt. Das verwendete DIG-Chem-Link-Reagenz (Roche) markiert Nukleinsäuren mit einem Digoxigeninrest, der über eine koordinative Bindung an die Position N7 der Guanosin- und Adenosinbasen angelagert wird. Diese Bindung ist stark genug, um die verwendeten Hybridisierungs- und Wasch-Schritte zu überstehen.

Nach der Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurden jeweils 2µg aRNA mit jeweils 1,5µl DIG-Chem-Link-Reagenz versetzt und für 30min bei 85°C inkubiert. Dann wurden 5µl Stop-Lösung zugegeben, um die Reaktion zu beenden. Die markierte aRNA wurde ohne weitere Aufreinigung in der Hybridisierung verwendet.



## 2.9 cDNA-Array Analyse von mRNA- bzw. aRNA-Präparationen

Der grundsätzliche Ablauf der cDNA-Array Analyse embryonaler aRNA-Präparationen ist in folgendem Schema dargestellt:



**Abbildung 9** Schema der cDNA-Array Analyse von aRNA-Präparationen

### **2.9.1 Nukleinsäure-Hybridisierung**

Zunächst wurden die cDNA-Arrays in High-SDS-Puffer, supplementiert mit 3µg pGemT<sup>®</sup>-Easy ohne Insert für mindestens 1h bei 54°C vorhybridisiert. Die Inkubation fand in 100ml Hybridisierungsröhrchen (Fa. Hybaid) in einem Hybridisierungsöfen (Fa. GFL) unter ständigem, langsamem Drehen der Röhrchen statt. Nach Beendigung der Vorhybridisierung wurde die jeweilige markierte aRNA direkt in die Vorhybridisierungslösung pipettiert, so dass die Endkonzentration der markierten aRNA in der Hybridisierungslösung 200ng/ml betrug. Die Hybridisierungsansätze wurden mindestens 12h lang bei 54°C inkubiert. Nach dem Abnehmen der Hybridisierungslösung wurden die hybridisierten Arrays zunächst zweimal 5min bei Raumtemperatur in jeweils 100ml 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal 15min bei 55°C in jeweils 100ml 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

### **2.9.2 Detektion hybridisierter Nukleinsäuren**

Die Detektion der hybridisierten Nukleinsäuren wurde mit dem im DIG-Chem-Link Kit enthaltenen Anti-DIG-AP-Antikörper durchgeführt. Dies ist ein Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, welche unter alkalischen Reaktionsbedingungen ein Fluoreszenzsubstrat (CSPD, Roche) spalten kann. Die bei der Spaltung des Substrates entstehende Fluoreszenz kann mit einem Biolumineszenzfilm detektiert werden.

Zunächst wurden die gewaschenen cDNA-Arrays zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 30min bei Raumtemperatur in 100ml Block-Lösung (Roche) auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde jeweils 1µl der Anti-DIG-AP-Antikörperlösung hinzupipettiert und weitere 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann in 100ml Waschlösung überführt und 30min lang darin gewaschen. Die Waschlösung wurde dabei nach 15min ausgetauscht.

Zur Herstellung eines für die alkalische Phosphatase geeigneten Reaktionsmilieu wurde die Membran nach dem Waschen für 5min in 50ml Detektionspuffer äquilibriert, anschließend aus dem Puffer herausgenommen, unter Zugabe von 1ml CSPD-Lösung (Roche) in PE-Folie eingeschweißt und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der überschüssigen CSPD-Lösung wurden die Fluoreszenzsignale mit Hilfe von Biomax-Film (Kodak) detektiert. Die Belichtungszeiten betragen dabei jeweils etwa 15-20min.

### **2.9.3 Digitalisierung**

Die belichteten Filme wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (Quantix, Photometrix Ltd.), die über IP-Lab-Software (Signal Analytics Corporation) gesteuert wurde, in einen Computer eingelesen. Hierbei wurde eine Kamera mit einer Auflösung von 4000 Graustufen verwendet.

### **2.9.4 Densitometrie**

Die Graustufenbilder der Arrays wurden mit Hilfe der IP-Lab-Software densitometrisch vermessen. Auf diese Weise konnte für jeden Sondenpunkt eine um die Hintergrundsignale der direkten Umgebung dieses Sondenpunktes bereinigte Signalintensität bestimmt werden.

### **2.9.5 Normalisierung**

Um verschiedene Arrays miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Rohdaten prozessiert. Dies beinhaltete die Normalisierung der Signalintensitäten in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die gemessenen Signalstärken der einzelnen Sonden auf die Gesamtsumme der Signalintensitäten bezogen normalisiert. Dieses Verfahren eliminiert Differenzen, die aus versuchsbedingten Variablen, wie z.B. unterschiedlich effizienten Markierungsreaktionen. In einem zweiten Schritt wurden die so vornormalisierten Daten noch auf einen internen Standard bezogen normalisiert. Als Standard wurde die Signalintensität der GAPDH-cDNA-Sonde verwendet. Dies ist ein Verfahren, das auch bei der Normalisierung von RT-PCR-Daten vielfach Anwendung findet. In RT-PCR-Vorversuchen wurde bestätigt, dass die Expressionsstärke von GAPDH bei in vitro erstellten bovinen Embryonen nahezu konstant war. Somit können die Werte der GAPDH-cDNA-Sonde als Bezugspunkt für die Werte der anderen cDNA-Sonden definiert werden, wodurch Datensätze verschiedener Embryonen vergleichbar werden. Die Korrelation zweier Datensätze untereinander wurde durch Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten ermittelt.

### **2.9.6 Berechnung des Cutoff-Value**

Um positive von negativen Signalen abzugrenzen, wurde ein Cutoff-Value aus den Versuchsdaten ermittelt. Dieser entsprach der Summe der mittleren Signalintensität der vier auf dem Array befindlichen Negativkontrollen und dem Doppelten ihrer Standardabweichung.

## **2.10 Verwendete Geräte und Lösungen**

### **2.10.1 Geräte**

CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	NUAIRE, NU 2700E, Zapf Instrumente, Sarstedt Heraeus, Typ Heracell und Function Line, Kendro, Hanau
Feinwaagen	Analytic AS210S, BP3100S, Sartorius, Göttingen
Fluorimeter	GeneQuant, Pharmacia, Cambridge, UK
Fusionsgerät	Multiporator mit Fusionsmodul 4308806001, Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	Eigenbau
Gelfotografie	Prozessor: Cybertech CS1 Thermoprinter: Mitsubishi P68E Papier: Mitsubishi K65MM-CE, Mitsubishi Electric, Japan
Stromquelle f. Elektrophor.	PP2-79, Daela ApS, Uldum, Danmark
Hybridisierungsflaschen	Hybaid, Heidelberg
Hybridisierungsöfen	Typ 7601, Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Kühlzentrifugen	Eppendorf-Zentrifuge 5402C, Eppendorf
PCR-Cycler	PTC-200, MJ Research, Watertown, MA
Pipettenspitzen	Safeseal-Tips (0,25µl: #690005, 10µl: #692140, #692150, 100µl: #692155, 1000µl: #691000)
Plastikröhrchen	15 ml und 50 ml, Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	0,2ml: #711080, Biozym, Hess. Oldendorf 0,5ml: #7060.1, Roth, Karlsruhe 1,5ml: #0030 120.086, Eppendorf, Hamburg #ZMQSVFT1, Millipore, Eschborn
Reinstwasseranlage	
Schüttelinkubator	Gerhardt Thermoshake, Jürgens, Gehrden
Schüttler	Typ 3015, GFL, Burgwedel
Thermoschüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Typen 5415, 5417R, Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Chromato-Vue TM-20, UVP, USA
UKW-Radio	Panasonic RF-5452, Matsushita Electric, Taiwan
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumpzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg

## **2.10.2 Lösungen**

### **2.10.2.1 Medien für die Zell- und Embryonenkultur**

#### Fert-TALP:

2mM	Calciumchlorid (Merck, #102382)
1µM	Epinephrin (Sigma, #E4250)
50mg/l	Gentamycin (Sigma, #G3632)
10IU/l	Heparin (Serva, #24590)
10µM	Hypotaurin (Sigma, #H1384)
3,2mM	Kaliumchlorid (Sigma, #P5405)
0,5mM	Magnesiumchlorid (Merck, 5833)
114mM	Natriumchlorid (Roth, #3957)
0,3mM	Natriumdihydrogenphosphat (Merck, #6346)
25mM	Natriumhydrogencarbonat (Merck, #6329)
10mM	Natriumlaktat (Sigma, #L1375)
0,2mM	Natriumpyruvat (Sigma, #P4562)
0,02mM	Penicillin (Sigma, #P4875)
0,01mg/l	Phenolrot (Merck, #7241)

#### Sperm-TALP:

2mM	Calciumchlorid (Merck, #102382)
50mg/l	Gentamycin (Sigma, #G3632)
10mM	HEPES (Sigma, #H6147)
3,1mM	Kaliumchlorid (Sigma, #P5405)
0,4mM	Magnesiumchlorid (Merck, #5833)
100mM	Natriumchlorid (Roth, #3957)
0,3mM	Natriumdihydrogenphosphat (Merck, #6346)
25mM	Natriumhydrogencarbonat (Merck, #6329)
21,6mM	Natriumlaktat (Sigma, #L1375)
1mM	Natriumpyruvat (Sigma, #P4562)
0,01mg/l	Phenolrot (Merck, #7241)

#### PBS:

9,65g/l	PBS-Pulver Sigma (Sigma, #D5773)
0,036g/l	Natriumpyruvat (Sigma, #P4562)
0,05g/l	Streptomycinsulfat (Sigma, #S6501)
1g/l	D-Glucose (Riedel-de-Haen, #16325)
0,104g/l	Calciumchlorid (Merck, #102382)
0,06g/l	PenicillinG Natriumsalz (Sigma, #Pen-Na)

TCM 199:

15,1g	TCM 199 Pulver (Sigma, #M2520)
0,5g	Gentamycinsulfat (Sigma, #G3632)
0,22g	Natriumpyruvat (Sigma, #P3663)
3,5g	Natriumhydrogencarbonat (Merck, #6329)

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

TCM 199-air:

15,1g	TCM 199 Pulver (Sigma, #M2520)
0,5g	Gentamycinsulfat (Sigma, #G3632)
0,22g	Natriumpyruvat (Sigma, #P3663)
2,2g	Natriumhydrogencarbonat (Merck, #6329)

Der pH wurde durch Rühren an der Luft auf 7,4 eingestellt.

Fusionsmedium:

285mM	Mannitol (Sigma, #M4125)
0,1mM	Magnesiumsulfat (Merck, #5886)
0,05%	BSA (Sigma, #A7030)

SOF:

20ml/l	Aminosäuren, essentiell (Sigma, #B6766)
10ml/l	Aminosäuren, nicht essentiell (Sigma, #M7145)
1,7mM	Calciumchlorid (Merck, #102382)
50mg/l	Gentamycin (Sigma, #G3632)
1,5mM	Glucose (Riedel-de-Haen, #16325)
1mM	Glutamin (Sigma, #G1517)
7,2mM	Kaliumchlorid (Sigma, #P5405)
0,5mM	Magnesiumchlorid (Merck, #5833)
108mM	Natriumchlorid (Roth, #3957)
1,2mM	Kaliumdihydrogenphosphat (Serva, #???)
25mM	Natriumhydrogencarbonat (Merck, #6329)
3,3mM	Natriumlaktat (Sigma, #L1375)
0,33mM	Natriumpyruvat (Sigma, #P4562)
10mg/l	Phenolrot (Merck, #7241)

Proteinsupplemente:

BSA (Sigma, #A9647)
PVA (Sigma, #P8136)
ECS Östrisches Kuhserum, aus dem Blut östrischer, Kühe gewonnen. Nach Hitzeinaktivierung (56°C, 30min) bei -20°C gelagert.

### **2.10.2.2 Medium für die Bakterienkultur**

LB-Medium:

- 10g/l Tryptone (DIFCO, #0127-17-9)
- 5g/l Yeast Extract (DIFCO, #0123-17-3)
- 10g/l NaCl (Roth, #3957)

### **2.10.2.3 Lösungen für die cDNA-Array Analyse**

Block-Lösung: Stammlösung (aus Roche, #1585614) 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnt

High-SDS-Puffer: 70g/l Natriumdodecylsulfat (Roth, #2326)  
1g/l N-Lauroylsarcosine (Sigma, #L9159)  
50% v/v deionisiertes Formamid (Roth, #P040)  
25% v/v 20x SSC  
5% v/v Phosphatpuffer  
20% v/v ddH<sub>2</sub>O

20x SSC: 3M NaCl (Roth, #3957)  
300mM Natriumcitrat (Roth, #3580)  
pH7

Phosphatpuffer: 21% v/v 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Roth, #K300)  
79% v/v 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Roth, #P030)

Detektionspuffer: 0,1M Tris-HCl, (Roth, #4855)  
0,1M NaCl (Roth, #3957)  
pH 9,5

Maleinsäure-Puffer: 0,1M Maleinsäure (Roth, #K304)  
0,15M NaCl (Roth, #3957)  
pH 7,5

Wasch-Puffer: Maleinsäure-Puffer mit 0,3% TWEEN 20 (Sigma, #P1370)

CSPD: Roche, #1755633

## **2.11 Ablauf der Experimente**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit gliederte sich in drei Teile:

Im ersten Teil erfolgten in Vorversuchen Entwicklung und Optimierung eines Protokolls zur cDNA-Array-Analyse embryonaler mRNA-Präparationen.

In einem zweiten Abschnitt wurde die Qualität der mit Hilfe des entwickelten Verfahrens erzielbaren Genexpressionsdaten evaluiert.

Der dritte Abschnitt umfasste die Analyse der Genexpression muriner und boviner Blastozysten sowie die Analyse der Genexpression in verschiedenen Embryonalstadien der Maus.



### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Vorversuche**

Die Strategie zur Amplifikation limitierter mRNA-Mengen aus Embryonen bestand in der Kombination der bereits etablierten Verfahren der reversen Transkription, der globalen PCR und der T7-RNA-Polymerase-Amplifikation. Die beiden letztgenannten Verfahren sind bereits erfolgreich in der Aufbereitung von mRNA-Präparationen aus sehr kleinen Ausgangsmengen angewendet worden. Jedoch bietet keines dieser Verfahren für sich allein die Möglichkeit, aus derart geringen mRNA-Mengen, wie sie aus einer einzelnen Blastozyste extrahiert werden können, genügend amplifiziertes mRNA-abgeleitetes Material für eine cDNA-Array-Analyse zu generieren.

Die Untersuchungen zur Entwicklung und Etablierung eines Protokolls mit einer für die cDNA-Array-Analyse präimplantatorischer Einzelembryonen ausreichenden Amplifikationsleistung gliederten sich in zwei Phasen: zunächst wurden verschiedene Oligodesoxynukleotid-Kombinationen auf ihre Leistungsfähigkeit in der globalen PCR geprüft. Hierbei wurden neben zwei verschiedenen degenerierten Oligonukleotidprimern auch das SMART-II-Oligonukleotid untersucht. In einem zweiten Schritt wurden einzelne Parameter der cDNA-Synthese, der PCR und der T7-Amplifikation optimiert.

Verwendete Oligonukleotide:

T7-T21: 5'-TCT AGT CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT  
AGG GCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'

DOP: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'

Kozak-DOP: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NCC ATG G-3'

SMART-II: 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'

UP: 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3'

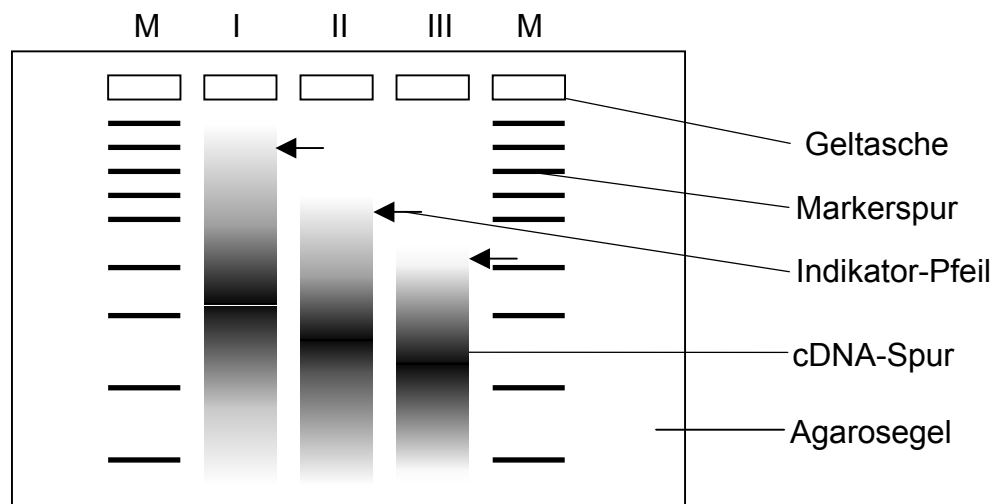
Zur Evaluierung des entwickelten Verfahrens, wurde die Qualität der cDNA-Array-Daten aus der Analyse von mRNA- und aRNA-Präparationen charakterisiert. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Erhaltung der in der Originalprobe enthaltenen Mengenverhältnisse der einzelnen mRNA-Spezies während der Amplifikation waren wichtige Ziele der Entwicklung des Amplifikationsprotokolls.

### **3.1.1 Vergleich verschiedener Strategien der globalen RT-PCR**

Es gibt bereits eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Systeme zur globalen PCR-Amplifikation komplexer Nukleinsäurepräparationen. Die grundsätzliche Strategie ist die Einführung von zwei universellen Primer-Bindungssequenzen am 5'- und am 3'-Ende der zu amplifizierenden Nukleinsäurestränge.

Für die reverse Transkription wurde ein modifizierter Poly-d(T)-Primer (T7-T21) verwendet, der am 5'-Ende die T7-Promotorsequenz enthielt. Für die Zweitstrangsynthese wurde ein kommerziell erhältlicher degenerierter Oligonukleotidprimer (DOP, Roche) und ein modifizierter degenerierter Oligonukleotidprimer, der einen Teil der Kozak-Consensus-Sequenz enthielt (Kozak-DOP), getestet. Weiterhin wurde die SMART-Technologie auf ihre Leistungsfähigkeit in der globalen PCR hin geprüft. Hierbei wurde das SMART-II-Oligonukleotid in Kombination mit dem T7-T21-Primer verwendet.

Bei der globalen Amplifikation eines mRNA-Extraktes entsteht ein Gemisch von Nukleinsäurefragmenten unterschiedlicher Länge, das im Idealfall die Längenverteilung der Moleküle des mRNA-Extraktes widerspiegelt. In der Praxis beinhalten sowohl das Arbitrary-Priming der Zweitstrangsynthese als auch die SMART-Technologie ein gewisses Potential zum Verlust 5'-naher Sequenzen der mRNA. Ein solcher Verlust macht sich in einer generellen Verkürzung der amplifizierten Sequenzen bemerkbar. Durch gelelektrophoretische Auftrennung kann man Rückschlüsse auf die Längenverteilung der amplifizierten Sequenzen erhalten. Bei der Erstellung eines globalen PCR-Verfahrens zur Amplifikation embryonaler mRNA-Extrakte wurde angestrebt, ein Protokoll zu finden, das eine Amplifikation möglichst langer Sequenzen erlaubt, um den Verlust 5'-naher Sequenzen möglichst gering zu halten. Hauptkriterium bei der Bewertung der geprüften methodischen Ansätze war daher die Länge der größten amplifizierten Fragmente, also die Lage der oberen Grenze der sichtbaren Spur des Amplifikates nach dessen Auftrennung im Gel. Um dies zu verdeutlichen, wurde in Abbildung 10 auf der nächsten Seite ein typisches Gel schematisch dargestellt:



**Abbildung 10** Schematisierte Darstellung eines Gels nach elektrophoretischer Auftrennung drei verschiedener globaler PCR-Reaktionsansätze (I-III). Links und rechts sind DNA-Längenstandards als Marker (M) dargestellt. Die Indikator-Pfeile zeigen das obere Ende des sichtbaren Schmiere in der Gelspur des jeweiligen Reaktionsansatzes, d.h. die maximale Fragmentlänge im entsprechenden Reaktionsansatz an.

Im Falle des im Schema dargestellten Gels wäre dementsprechend dem Protokoll, nach dem der Ansatz I amplifiziert wurde, gegenüber den Protokollen, die zur Amplifikation der Ansätze II und III verwendet wurden, der Vorzug gegeben worden.

### **3.1.2 Vergleich von DOP-RT-PCR und SMART-Technologie**

Zuerst wurde ein Vergleich zwischen DOP und SMART-II in Verbindung mit T7-T21 vorgenommen. Die Firma Clontech empfiehlt für das SMART-System die Verwendung einer RNaseH<sup>-</sup>-RT wie z.B. Superscript-II RT (SSII), da diese mRNAs mit höherer Effizienz ganz durchschreiben kann. Da im Labor in Mariensee ein RT-Protokoll mit Perkin-Elmer MULV-RT (Murine Leukemia Virus-RT) etabliert war, wurde diese ebenfalls für die Amplifikation mit DOP-Primern getestet. Weiterhin wurde die Auswirkung der zeitlichen Ausdehnung des Elongationsschrittes auf die Länge der erzeugten PCR-Fragmente im DOP-System untersucht.

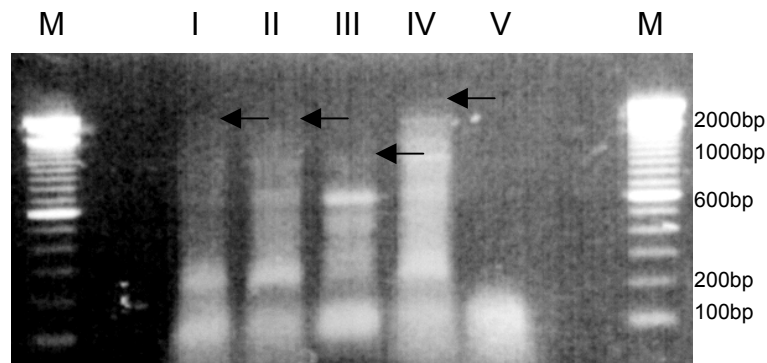
Hierzu wurde die mRNA aus fünf bovinen IVF-Blastozysten mittels Dynabeads extrahiert, in 50µl H<sub>2</sub>O eluiert, in fünf Aliquots aufgeteilt und mit jeweils 1µl T7-T21 und in einem Ansatz zusätzlich mit 1µl SMART-II versetzt. Anschließend erfolgte eine Denaturierung der mRNA und der Primer bei 72°C für 2min. Nach einer Inkubationszeit von 1min bei 37°C wurden die restlichen Reaktionskomponenten der RT als Mastermix zugegeben. Dieser Mastermix bestand aus je 2µl 10x RT-Puffer (für Superscript-II RT: 10xSS-II-Puffer (Gibco), für MULV RT: 10xPCR-Puffer (PE)), 2µl MgCl<sub>2</sub>, 2µl dNTP's und 1µl RNasin pro Reaktionsansatz. Jedem Ansatz wurden 7µl hiervon zugefügt. Weiterhin wurde jedem Ansatz 1µl Superscript-II bzw. MULV-RT beigefügt. Ein Ansatz fungierte als Negativkontrolle, um eine Amplifikation nicht mRNA-abgeleiteter Sequenzen auszuschließen, und wurde anstatt mit RT mit H<sub>2</sub>O supplementiert. Die Reaktionsansätze wurden dann bei 42°C für 1h inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 65°C für 5min gestoppt. Die Ansätze wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Bei den Ansätzen, die nicht mit SMART-II versetzt wurden, wurde eine Zweitstrangsynthese durchgeführt. Hierzu wurde neben dem PCR-Puffer und den dNTP's noch der entsprechende Zweitstrangprimer zugegeben.

In allen Ansätzen wurde ein Hot Start durchgeführt, d.h. die Taq-Polymerase wurde bei einer Temperatur von 72°C zugegeben. Zum Annealing der Zweitstrangprimer wurden die Reaktionsansätze für 90s bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte eine langsame Temperaturerhöhung um 0,2°C/s bis auf 72°C. Zur Elongation der Primer wurde für 4min bei 72°C inkubiert. Nach Abschluss der Zweitstrangsynthese wurden den einzelnen Reaktionsansätzen die jeweiligen PCR-Primer zugefügt und eine PCR durchgeführt. Diese bestand aus 35 Zyklen, die jeweils einen Denaturationschritt bei 94°C für 30s, einen Annealingschritt bei 60°C für 30s und einen Elongationsschritt bei 72°C für 2min bzw. 3min umfassten. Nach Abschluss der PCR wurden die Ansätze bei 4°C gelagert. Tabelle 2 fasst die einzelnen Pipettier- und Reaktionsschritte zusammen:

Ansatz	I	II	III	IV	V
mRNA-Extrakt	10µl				
Primer	1µl T7-T21		1µl T7-T21 1µl SMART-II	1µl T7-T21	
H <sub>2</sub> O	1µl		-	1µl	
Denaturierung	72°C, 2' 37°C, 1'				
MasterMix	7µl				
RT	1µl SS-II	1µl MULV	1µl SS-II	1µl MULV	1µl H <sub>2</sub> O
RT-Reaktion	42°C, 60' 65°C, 10' 4°C, ∞				
2x PCR-Buffer	50µl				
Zweitstrang-Primer	1µl DOP		-	1µl DOP	
dNTP's	2µl				
H <sub>2</sub> O	21µl		22µl	21µl	
Hot Start	95°C, 5' 72°C, 1'				
Taq-Polymerase	1µl				
Zweitstrang-synthese	30°C, 90" +0,2°C/s bis 72°C 72°C, 4'		4°C, ∞	30°C, 90" +0,2°C/s bis 72°C 72°C, 4'	
Primer	2,5µl T7-T21 2,5µl DOP		2,5µl T7-T21 2,5µl NUP	2,5µl T7-T21 2,5µl DOP	
Globale PCR	94°C, 30" 60°C, 30" 72°C, 2' 35 Zyklen 4°C, ∞			94°C, 30" 60°C, 30" 72°C, 3' 35 Zyklen 4°C, ∞	

**Tabelle 2** Pipettierschema zum Vergleich von DOP-RT-PCR und SMART-Technologie. Das mRNA-Eluat aus 5 bovinen IVF-Blastozysten wurde in Aliquots aufgeteilt und mit unterschiedlichen Primern amplifiziert. Die Abkürzungen sind im vorhergehenden Text erläutert. ∞: bis zur weiteren Aufarbeitung; ': Minute(n); '' : Sekunde(n);

Nach der PCR wurden 10µl Aliquots der Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (Abbildung 11). Als Standard wurde eine 100bp-Leiter aufgetragen.



**Abbildung 11** Die Ansätze I-V des Vergleiches der DOP-RT-PCR und der SMART-Technologie nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Indikatorpfeile markieren das obere Ende der sichtbaren cDNA-Spuren. Zusammensetzung und Reaktionsparameter der einzelnen Ansätze sind in der vorhergehenden Tabelle dargestellt.

Ein Vergleich der Laufspuren I (DOP, Superscript II-RT, 2min Elongationszeit) und II (DOP, MULV-RT, 2min Elongationszeit) auf dem Gel ergab, dass beide Ansätze eine ähnlichen maximalen Fragmentlänge aufwiesen. Die beiden Spuren ließen auf eine maximale Fragmentlänge von etwa 1,3-1,5kbp in den aufgetragenen Ansätzen schließen. Spur III (SMART, 3min Elongationszeit) zeigte im Vergleich zu den anderen Laufspuren eine deutlich herabgesetzte maximale Länge der erzielten Fragmente. Die geschätzte maximale Fragmentlänge lag bei nur etwa 1kbp. Spur IV (DOP, 3min Elongationszeit) wies eine im Vergleich zu den Spuren I, II und III deutlich erhöhte maximale Fragmentlänge von über 2kbp auf. Der Kontrollansatz ohne RT lieferte außer den Primer-Dimeren keinerlei Signal.

Dieser Versuch wurde zweimal mit identischen Ergebnissen reproduziert. Die Resultate machten deutlich, dass die MULV-RT bei Verwendung des DOP-Primers für die Zweitstrangsynthese eine gleichwertige Alternative zur Superscript-II RT darstellte. Ferner wurde festgestellt, dass das modifizierte DOP-System in Verbindung mit dem T7-T21-Primer längere cDNA-Fragmente als das SMART-System liefern konnte. Eine Verlängerung der Elongationszeit von zwei auf drei Minuten wirkte sich positiv auf die maximale Länge der amplifizierten Sequenzen aus. Um die Methode im Hinblick auf die zu erzielende maximale Länge der amplifizierten Sequenzen weiter zu optimieren, konzentrierten sich die weiteren Versuche auf das DOP-System, das in diesem Punkt das größere Potential aufzuweisen schien.

### **3.1.3 Optimierung des PCR-Schrittes der globalen RT-PCR**

Das DOP-System kann zusammen mit einem zweifach konzentrierten PCR-Puffer (DOP-Master) bezogen werden. Dieser enthält neben anderen für die PCR nötigen Komponenten auch eine DNA-Polymerase, die durch einen Antikörper inaktiviert und gleichzeitig stabilisiert wird. Erst durch eine fünfminütige Inkubation bei 95°C wird der Antikörper denaturiert und somit die DNA-Polymerase aktiviert. Dies bedeutet eine nicht unerhebliche Erleichterung bei der Durchführung des Hot Starts, da die Taq-Polymerase nicht mehr in einem zusätzlichen Pipettierschritt zu den jeweiligen Ansätzen hinzugegeben werden muss. Der Wegfall eines Pipettierschrittes ist weiterhin vorteilhaft, da hierdurch eine Kontaminationsquelle ausgeschaltet wird.

Um die Leistungsfähigkeit der DOP-Master Taq-Polymerase mit der im Labor verwendeten Gibco Taq-Polymerase zu vergleichen, wurde mit beiden Systemen mRNA aus bovinen Blastozysten amplifiziert. Hierzu wurde die mRNA aus vier bovinen IVF-Blastozysten extrahiert, in 40µl H<sub>2</sub>O eluiert und in vier Aliquots aufgeteilt, welche mit jeweils 1µl T7-T21 versetzt wurden. Nach Denaturierung von mRNA und Primern bei 72°C für 2min und Inkubation bei 37°C für 1min wurden die restlichen Reaktionsteilnehmer der RT als Mastermix zugegeben. Dieser Mastermix bestand aus je 2µl 10x PCR-Puffer (PE), 2µl MgCl<sub>2</sub>, 2µl dNTP's, 1µl RNasIn und 1µl MULV-RT pro Ansatz. Jedem Reaktionsansatz wurden 8µl dieses Mastermixes zugegeben. Die Ansätze wurden dann bei 42°C für 1h inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 65°C für 5min gestoppt, und die Ansätze wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

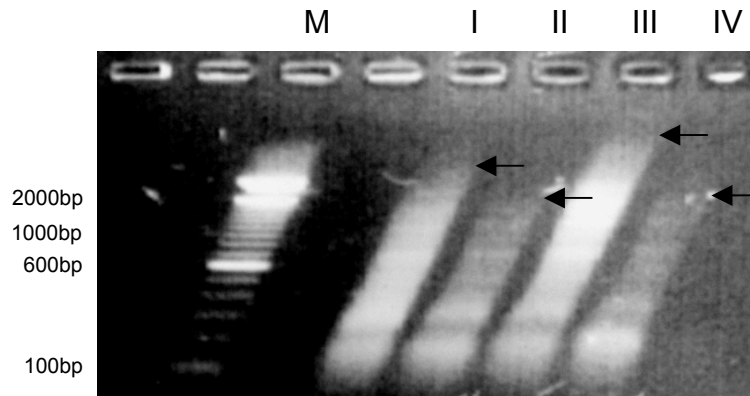
Die Zweitstrangsynthese erfolgte durch Zugabe von 50µl DOP-Master bzw. 50µl 2x PCR-Puffer und 2µl dNTP's, sowie 1µl DOP. Analog zur obigen Versuchsbeschreibung wurde in allen Ansätzen ein Hot Start durchgeführt. Die Hybridisierung des DOP an seine Zielsequenz erfolgte bei 30°C für 90s. Es schloss sich eine langsame Temperaturerhöhung um 0,2°C/s bis auf 72°C an. Zur Elongation der Primer wurde für 4min bei 72°C inkubiert. Nach Abschluss der Zweitstrangsynthese wurden den einzelnen Ansätzen jeweils 2,5µl DOP und 2,5µl T7-T21 zugefügt. Dann erfolgte eine PCR mit 35 Zyklen wie oben beschrieben. Die Elongationszeit der PCR-Zyklen betrug in den ersten beiden Ansätzen jeweils 3min und in den Ansätzen III und IV jeweils 4min. Die einzelnen Pipettier- und Reaktionsabläufe sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

<b>Ansatz</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>mRNA-Extrakt</b>	10µl			
<b>T7-T21</b>	1µl			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1µl			
<b>Denaturierung</b>	72°C, 2' 37°C, 1'			
<b>MasterMix</b>	8µl			
<b>RT-Reaktion</b>	42°C, 60' 65°C, 10' 4°C, ∞			
<b>DOP-Master (mit DOP-Taq)</b>	-	<b>50µl</b>	-	<b>50µl</b>
<b>2x PCR-Buffer</b>	<b>50µl</b>	-	<b>50µl</b>	-
<b>DOP</b>	1µl			
<b>dNTP's</b>	2µl	-	2µl	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>	21µl	24µl	21µl	24µl
<b>Hot Start</b>	95°C, 5' 72°C, 1'			
<b>Gibco Taq- Polymerase</b>	<b>1µl</b>	-	<b>1µl</b>	-
<b>Zweitstrang- Synthese</b>	30°C, 90" +0,2°C/s bis 72°C 72°C, 4'			
<b>Primer</b>	2,5µl T7-T21 2,5µl DOP			
<b>Globale PCR</b>	94°C, 30" 60°C, 30" 72°C, <b>3'</b> 35 Zyklen 4°C, ∞		94°C, 30" 60°C, 30" 72°C, <b>4'</b> 35 Zyklen 4°C, ∞	

**Tabelle 3** Pipettierschema zur Optimierung der DOP-RT-PCR: mRNA-Eluat aus vier bovinen IVF-Blastozysten wurde in verschiedenen Ansätzen amplifiziert. Die Leistungsfähigkeit von DOP-Master Taq-Polymerase und Gibco Taq Polymerase wurden verglichen. Weiterhin wurde die Auswirkung der Verlängerung der Elongationszeit um eine Minute untersucht. ∞: bis zur weiteren Aufarbeitung; ': Minute(n); ": Sekunde(n);



Von jedem Ansatz wurden nach Abschluss der PCR 10µl auf ein Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (Abbildung 12). Als Marker wurde eine 100bp-Leiter aufgetragen. Das Gel drehte sich während der Gelelektrophorese leicht in der Kammer, weshalb die einzelnen Spuren etwas schräg durchs Gel liefen.



**Abbildung 12** Gelelektrophoretische Auftragung der Reaktionsansätze zur Optimierung der DOP-PCR. Die Indikatorpfeile zeigen das obere Ende der jeweiligen cDNA-Spur an. Zusammensetzung und Reaktionsparameter der einzelnen Ansätze sind in der vorhergehenden Tabelle dargestellt.

Der Vergleich der Spuren I (Gibco Taq-Polymerase, 3min Elongationszeit) und III (Gibco Taq-Polymerase, 4min Elongationszeit) mit den Spuren II (DOP-Master Taq-Polymerase, 3min Elongationszeit) und IV (DOP-Master Taq-Polymerase, 4min Elongationszeit) ließ darauf schließen, dass sich durch den Einsatz von Gibco Taq-Polymerase eine höhere maximale Länge der amplifizierten Sequenzen erreichen ließ als durch den Einsatz der DOP-Master Taq-Polymerase. Der Vergleich der Spuren I (3min Elongationszeit) und III (4min Elongationszeit) ergab, dass sich die Verlängerung der Elongationszeit auf 4min positiv auf die erzielte maximale Länge der amplifizierten Sequenzen auswirkte.

### **3.1.4 Optimierung der Zweitstrangsynthese**

Das Grundprinzip des Arbitrary-Primings ist, dass der Primer irgendwo auf der mRNA einen zu seiner 3'-Basensequenz komplementären Sequenzabschnitt bindet. Die Position solcher Bindungssequenzen auf den mRNA-Strängen legt somit die Länge der in der PCR amplifizierten Sequenzen fest. Über Datenbank-Analysen kann man nachweisen, dass in zahlreiche mRNAs die exakte DOP-Bindungssequenz nicht vorhanden ist. Die 3'-Basensequenz dieses Primers ist jedoch G-reich und damit vermutlich bei der für die Zweitstrangsynthese verwendeten Annealingtemperatur so "klebrig", dass auch der DOP-Bindungssequenz sehr ähnliche Sequenzen gebunden werden können. Die Verwendung eines degenerierten Arbitrary-Primers, dessen Bindungssequenz zur Kozak-Consensus-Sequenz komplementär ist (DOP-CCATGG), sollte entsprechend dieser Überlegungen in der Lage sein, in der großen Mehrzahl der mRNAs die hierzu komplementäre Sequenz auf dem ersten cDNA-Strang zu binden. Somit könnte theoretisch die gesamte translatierte Region samt der 3'-untranslatierten Region dieser mRNAs einer globalen Amplifikation zugänglich werden.

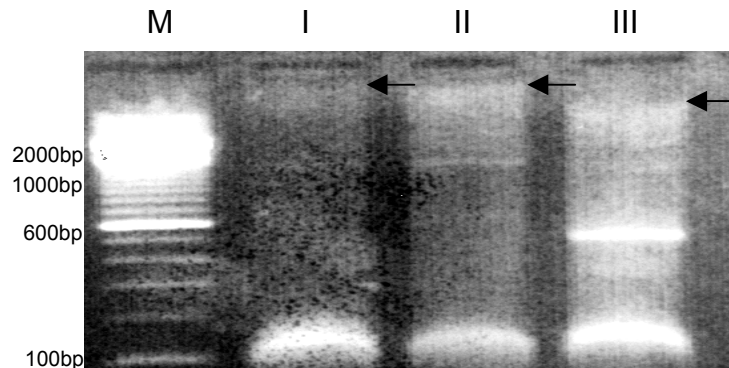
Um DOP und "Kozak-DOP" zu vergleichen, wurde die mRNA aus drei bovinen IVF-Blastozysten extrahiert, in drei Aliquots aufgeteilt und mit jeweils 1µl T7-T21 pro Aliquot versetzt. Nach Denaturierung der Ansätze bei 72°C für 2min und Inkubation bei 37°C für 1min wurden der RT-Mastermix zugegeben. Dieser bestand aus je 2µl 10x PCR-Puffer (PE), 2µl MgCl<sub>2</sub>, 2µl dNTP's, 1µl RNasIn und 1µl MULV-RT pro Ansatz. Jedem Reaktionsansatz wurden 8µl dieses Mastermixes zugefügt. Die Ansätze wurden für die reverse Transkription 1h lang bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 65°C für 5min beendet und die Ansätze wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Zweitstrangsynthese erfolgte durch Zugabe von 50µl 2x PCR-Puffer und 2µl dNTP's, sowie 1µl DOP bzw. Kozak-DOP. Anschließend wurde der Hot Start und darauf folgend das Primer-Annealing bei 30°C für 90s durchgeführt. Dann wurde die Temperatur um 0,2°C/s bis auf 72°C erhöht und bei dieser Temperatur 4min inkubiert. Nach Abschluss der Zweitstrangsynthese wurden den einzelnen Reaktionsansätzen jeweils 2,5µl DOP bzw. Kozak-DOP, sowie 2,5µl T7-T21 zugefügt. Dann erfolgte die PCR mit 35 Zyklen wie bereits oben beschrieben. Die Elongationszeit der PCR-Zyklen betrug im ersten Ansatz jeweils 4min und in den Ansätzen III und IV jeweils 5min. Die einzelnen Pipettier- und Reaktionsabläufe sind in Tabelle 4 aufgeführt:

<b>Ansatz</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
<b>mRNA-Extrakt</b>	10µl		
<b>T7-T21</b>	1µl		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1µl		
<b>Denaturierung</b>	72°C, 2' 37°C, 1'		
<b>RT-MasterMix</b>	8µl		
<b>Reverse Transkription</b>	42°C, 60' 65°C, 5' 4°C, ∞		
<b>2x PCR-Buffer</b>	50µl		
<b>Zweitstrang-Primer</b>	<b>1µl DOP</b>	<b>1µl Kozak-DOP</b>	
<b>dNTP's</b>	2µl		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	22µl		
<b>Hot Start</b>	95°C, 1' 72°C, 1'		
<b>Taq-Polymerase</b>	1µl		
<b>Zweitstrang-Synthese</b>	30°C, 90'' +0,2°C/s bis 72°C 72°C, 3'		
<b>Primer</b>	<b>2,5µl T7-T21</b> <b>2,5µl DOP</b>	<b>2,5µl T7-T21</b> <b>2,5µl Kozak-DOP</b>	
<b>Globale PCR</b>	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' 35 Zyklen 4°C, ∞	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 5' 35 Zyklen 4°C, ∞	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' 35 Zyklen 4°C, ∞

**Tabelle 4 Pipettierschema zur Optimierung der Zweitstrangsynthese:** mRNA-Eluat aus drei bovinen IVF-Blastozysten wurde in verschiedenen Ansätzen amplifiziert. Leistungsfähigkeit von DOP und „Kozak-DOP“ wurden verglichen. Weiterhin wurde die Auswirkung der Verlängerung der Elongationszeit um eine Minute bei Verwendung von DOP in der Zweitstrangsynthese untersucht. ∞: bis zur weiteren Aufarbeitung; ': Minute(n); '': Sekunde(n);

Von den einzelnen Ansätzen wurden jeweils 10µl auf ein Gel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (Abbildung 13). Als Marker wurde eine 100bp-Leiter aufgetragen.



**Abbildung 13** Die Ansätze I-III zur Optimierung der Zweitstrangsynthese nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Indikatorpfeile zeigen das obere Ende der cDNA-Spuren. Zusammensetzung und Reaktionsparameter der einzelnen Ansätze sind in der vorhergehenden Tabelle dargestellt.

Der Vergleich der Spuren I (DOP, 4min Elongationszeit) und II (DOP, 5min Elongationszeit) ergab, dass in beiden Ansätzen die maximale Länge der amplifizierten Sequenzen etwa gleich groß war. Spur III (Kozak-DOP, 4min Elongationszeit) zeigte dagegen eine herabgesetzte maximale Fragmentlänge der amplifizierten Sequenzen.

Die Verlängerung der Elongationszeit führte somit nicht zu einer weiteren Steigerung der maximal erreichten Fragmentgröße. Die Versuche wurden daher im Folgenden mit einer Elongationszeit von 4min durchgeführt.

### **3.1.5 Reproduzierbarkeit der globalen RT-PCR aus Einzelembryonen**

Die in den Versuchen gewonnenen Daten und Erkenntnisse wurden zu einem Protokoll zur globalen PCR von mRNA-Präparationen aus Einzelembryonen zusammengefasst, das im weiteren Verlauf der Untersuchungen verwendet wurde. Zu den formulierten Parametern dieser Prozedur gehörten das Primerpaar DOP/T7T21, die MULV-RT, die Kombination von Reaktionspuffer und Taq-Polymerase sowie die Elongationszeit von 4min pro Zyklus.

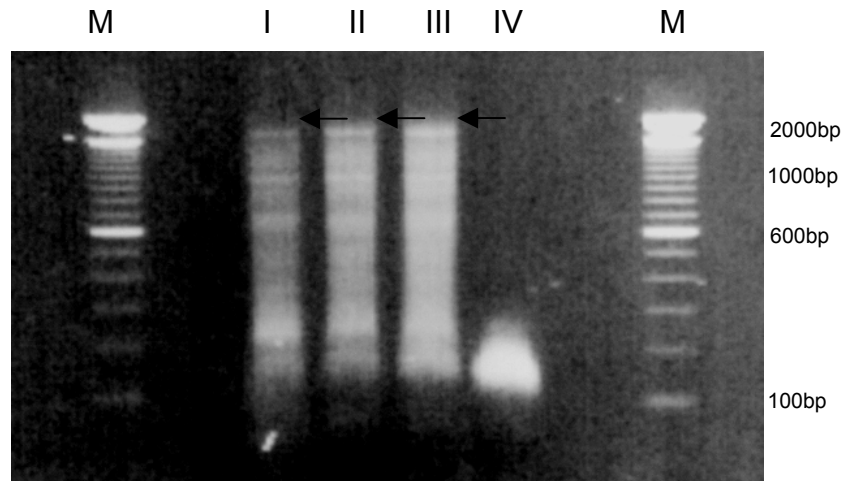
Um zu untersuchen, ob das entwickelte Protokoll zur globalen Amplifikation embryonaler mRNA-Präparationen reproduzierbare Resultate lieferte, wurden mRNA-Extrakte aus drei einzelnen murinen Blastozysten separat amplifiziert und jeweils 10µl der entsprechenden PCR-Ansätze auf ein Gel aufgetragen. Ein vierter mRNA-Extrakt einer murinen Blastozyste wurde einer Amplifikationsprozedur ohne Zugabe von Reverser Transkriptase unterzogen, um eine Amplifikation DNA-abgeleiteter Sequenzen ausschließen zu können. Die Pipettier- und Reaktionsschritte sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der globalen PCR wurden nur murine Blastozysten verwendet, da angesichts der Tatsache, dass durch die Verwendung des Primerpaares DOP/T7T21 mRNA-Sequenzen unspezifisch global amplifiziert werden, davon ausgegangen wurde, dass mRNA-Präparationen verschiedener Arten nach einem identischen Mechanismus amplifiziert werden.

<b>Ansatz</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>mRNA-Extrakt</b>	10µl			
<b>T7-T21</b>	1µl			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1µl			2µl
<b>Denaturierung</b>	72°C, 2' 37°C, 1'			
<b>MasterMix (ohne RT)</b>	7µl			
<b>MULV-RT</b>	1µl			-
<b>Reverse Transkription</b>	37°C, 1' 42°C, 60' 65°C, 5' 4°C, ∞			
<b>2x PCR-Buffer</b>	50µl			
<b>DOP</b>	1µl			
<b>dNTP's</b>	2µl			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	22µl			
<b>Hot Start</b>	95°C, 1' 72°C, 1'			
<b>Taq-Polymerase</b>	1µl			
<b>Zweitstrang- Synthese</b>	30°C, 90'' +0,2°C/s bis 72°C 72°C, 3'			
<b>Primer</b>	2,5µl T7-T21 2,5µl DOP			
<b>Globale PCR</b>	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' <b>30 Zyklen</b> 4°C, ∞	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' <b>32 Zyklen</b> 4°C, ∞	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' <b>35 Zyklen</b> 4°C, ∞	94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C, 4' <b>35 Zyklen</b> 4°C, ∞

**Tabelle 5** Pipettierschema zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der globalen PCR: mRNA-Extrakte aus vier murinen Blastozysten wurden separat amplifiziert. Es wurden unterschiedliche Zyklenzahlen durchgeführt. Die Abkürzungen sind im vorhergehenden Text erläutert. ∞: bis zur weiteren Aufarbeitung; ': Minute(n); '': Sekunde(n);

Nach Abschluss der PCR-Reaktionen wurden 10µl von jedem PCR-Ansatz auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (Abbildung 14). Als Marker diente eine 100bp-Leiter.



**Abbildung 14** Reproduzierbarkeit der DOP-PCR aus Einzelebryonen. Die Indikatorpfeile zeigen das obere Ende des cDNA Schmiere der jeweiligen Gelspur an. Zusammensetzung und Reaktionsparameter der einzelnen Ansätze sind in der vorhergehenden Tabelle dargestellt.

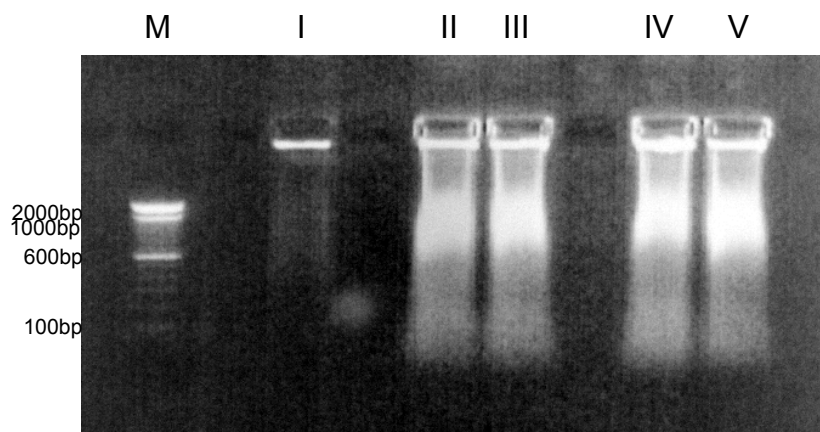
Der Vergleich der Spuren I, II und III ließ auf eine sehr ähnliche Längenverteilung der cDNA-Fragmente in diesen drei PCR-Ansätzen schließen. Die maximale Länge der amplifizierten Sequenzen betrug bei allen drei Reaktionsansätzen etwas über 2kb. Offenbar verlief die Amplifikation der mRNA-Extrakte in allen drei Ansätzen ähnlich. Die Spur von Ansatz IV (ohne reverse Transkriptase) zeigte keine Amplifikation DNA-abgeleiteter Sequenzen.

Die hohen Zyklenzahlen der bisher durchgeführten PCR-Reaktionen dienten der Sichtbarmachung der amplifizierten cDNAs. Derart hohe Zyklenzahlen bergen die Gefahr, in die Plateauphase der PCR-Reaktion zu gelangen, was eine Verzerrung der Ergebnisse bedeuten könnte. Daher wurde die Voramplifikation der cDNAs in den weiteren Versuchen auf 25 Zyklen beschränkt.

### 3.1.6 In vitro-Transkription von cDNA-Fragmenten aus der globalen RT-PCR

Aus murinem Nierengewebe wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Aus vier jeweils 5ng Gesamt-RNA enthaltenden Aliquots wurde die mRNA extrahiert und einer globalen PCR-Voramplifikation unterzogen. Die voramplifizierten cDNAs wurden über Silicasäulen aufgereinigt und so von nicht eingebauten Nukleotiden und Primer-Dimeren befreit. Die gereinigten cDNAs wurden dann in 50µl 1/10 TE-Puffer eluiert und durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Die pelletierten cDNAs wurden in 13µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und als Template in der IVT eingesetzt. Hierzu wurde der T7-Ampliscribe Kit der Fa. Epicentre mit einem leicht modifizierten Protokoll des Herstellers (s.u.) verwendet.

Die erstellten Transkripte wurden über Mini-Spin Säulen der Fa. Qiagen aufgereinigt, in 35µl H<sub>2</sub>O eluiert und mittels eines Fluorimeters quantifiziert. Jeweils 5µl aRNA-Lösung wurden auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen (Abbildung 15, Spuren II-V). Als Referenz wurde eine 100bp-Leiter verwendet. Weiterhin wurde aus der restlichen Gesamt-RNA der Nierenprobe die mRNA aufgereinigt und auf das Gel aufgetragen (Abbildung 15, Spur I).



**Abbildung 15** Gelelektrophoretische Auftrennung von mRNA (I) und aus der gleichen Quelle amplifizierten aRNA-Präparationen (II-V)

Der mRNA-Extrakt lieferte eine nur sehr schwache Spur im Gel. Die Spuren II-V waren dagegen sehr kräftig mit einer Verdichtung im Bereich von etwa 600-2000bp. Die IVT-Reaktion hatte in allen vier IVT-Ansätzen eine fast identische Längenverteilung der erstellten Transkripte zur Folge, die der des mRNA-Extraktes stark ähnelte, welcher ebenfalls eine Konzentration im Bereich von 600-2000bp aufwies.



## **3.2 Erstellung eines Protokolls zur cDNA-Array-Analyse von mRNA-Präparationen aus einzelnen Säugerembryonen nach RT-PCR-IVT**

Die aus den Erkenntnissen der Vorversuche entwickelte Methode zur Aufbereitung von amplifizierter RNA aus einzelnen pränimplantatorischen Säugerembryonen soll im Folgenden im Detail dargestellt werden:

### **3.2.1 mRNA-Extraktion**

Die mRNA Extraktion wurde mit dem Dynabead mRNA-direkt Kit der Firma Dynal durchgeführt. Das Protokoll des Herstellers wurde leicht modifiziert. Dieses modifizierte Protokoll war bereits im Labor etabliert und hatte sich bei der mRNA-Extraktion aus Embryonen bewährt.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Embryonen wurden aus der Tiefkühltruhe entnommen und, noch bevor sie aufgetaut waren, mit  $20\mu\text{l}$  Lysis-Puffer versetzt. Nach Vortexen wurden sie für 10min bei Raumtemperatur zur Lyse der Embryonen stehengelassen.

Pro Embryo bzw. Embryonengruppe wurden  $5\mu\text{l}$  bzw.  $10\mu\text{l}$  der im Kit enthaltenen Dynabead-Suspension zugegeben, vermischt und die Ansätze 5min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler zur Hybridisierung inkubiert. Die Dynabeads wurden vor ihrer Zugabe dreimal in je einem Aliquot Lysis-Puffer gewaschen. Nach der Hybridisierung wurden die Ansätze in einen magnetischen Separator gestellt. Der Überstand wurde von den Dynabeads abgenommen und verworfen. Die mit mRNA beladenen Dynabeads wurden nun einmal mit Waschpuffer A und dann dreimal mit Waschpuffer B gewaschen. Der Überstand wurde jedes Mal komplett abgenommen.

Die Rückgewinnung der an die Dynabeads hybridisierten mRNA erfolgte durch Inkubation der Dynabeads für 2min bei  $65^{\circ}\text{C}$  in einem entsprechenden Volumen  $\text{H}_2\text{O}$ . Der mRNA-haltige Überstand wurde abgenommen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.2 Erststrangsynthese**

Die Überstände aus der mRNA-Extraktion wurden zunächst mit 1µl T7-T21 versetzt und zur Denaturierung der Templatestränge und der Primer 2min bei 70°C inkubiert. Zum Annealing der Primer wurde dann bei 37°C für 1h inkubiert und danach auf Eis gelagert.

Der RT-Mastermix wurde den Ansätzen zugefügt, bestehend aus:

- 2µl 10x PCR-Puffer (Perkin Elmer)
- 2µl MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco)
- 2µl dNTP's, 15mM (Amersham Pharmacia)
- 1µl RNasin, (20IU, Perkin Elmer)
- 1µl MULV-RT (50IU, Perkin Elmer)

Eventuell an 20µl fehlendes Volumen wurde schließlich noch mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden bei 42°C für 60min inkubiert und dann durch eine Inkubation für 5min bei 65°C beendet.

### **3.2.3 Zweitstrangsynthese**

Die 20µl RT-Ansätze wurden folgendermaßen supplementiert:

- 20µl RT-Ansatz
- 50µl 2xPCR-Puffer
- 2µl dNTP's
- 1µl DOP
- 22µl H<sub>2</sub>O

Die Zweitstrangsynthese wurde mit einem Hot Start begonnen. Hierbei wurden die Ansätze zunächst für 5min auf 95°C erhitzt, dann auf 72°C abgekühlt und erst dann mit 1µl Taq-Polymerase versetzt.

Zum Annealing des DOP wurden die Ansätze 90s lang bei 30°C inkubiert. Dies ermöglichte die Bindung des Arbitrary-Hexamers am 3'-Ende des Primers mit dessen Zielsequenz oder sehr ähnlichen Sequenzen. Zur Elongation wurde die Temperatur zunächst mit einer Rate von 0,2°C/s erhöht, bis auf 72°C gesteigert und für 4min konstant gehalten.

### **3.2.4 Globale PCR**

Nach Abschluss der Zweitstrangsynthese wurden die Reaktionsansätze bei 72°C inkubiert und sofort mit den PCR-Primern (jeweils 2,5µl T7-T21 und DOP) versetzt. Dann wurde eine 25 Temperaturzyklen umfassende PCR durchgeführt. Die einzelnen Zyklen folgten dabei diesem Schema:

94°C, 30"

60°C, 30"

72°C, 4'

Nach Durchlaufen der 25 PCR-Zyklen wurden die Ansätze bei 4°C gehalten.

### **3.2.5 In vitro-Transkription**

Vor Verwendung der cDNA-Fragmente als Matrizen in der T7-IVT wurden diese über eine Silica-Matrix aufgereinigt. Diese Aufreinigung wurde mit dem GFX-PCR DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die gereinigten cDNAs wurden in 50µl 1/10 TE eluiert und anschließend durch Vakuumzentrifugation auf ein Volumen von 12µl aufkonzentriert.

Zur in vitro Transkription wurde der T7-Ampliscribe Kit (Epicentre Technologies) verwendet. Die IVT-Ansätze wurden jeweils wie folgt zusammengestellt:

12µl cDNA-Lösung

2µl 10x Rxn Buffer

2µl NTP-Mix (ATP, CTP, GTP, UTP, 100mM)

2µl DTT

2µl T7 RNA Polymerase

Die IVT-Ansätze wurden dann für 3h bei 42°C inkubiert. Danach wurde jedem Ansatz 1IU DNase1 zugegeben und für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Transkripte mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigte aRNA wurde in 35µl H<sub>2</sub>O eluiert und mittels eines Fluorimeters quantifiziert.

### **3.2.6 Markierung der aRNA**

Jeweils 2µg aRNA wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1,5µl DIG-Chem-Link (Roche) versetzt und 30min bei 85°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl Stopp-Lösung beendet. Die markierten aRNA-Präparationen wurden direkt in die Hybridisierungslösung gegeben.

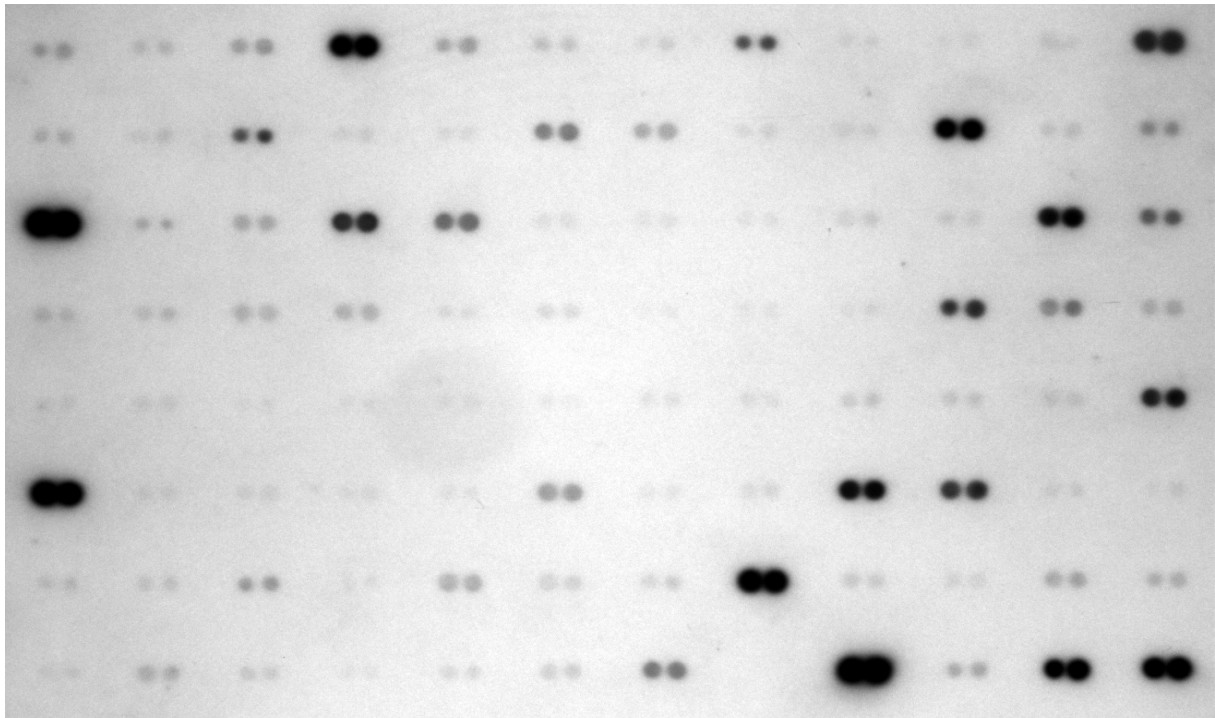
Das verwendete Markierungsprotokoll ist im Gegensatz zu anderen bekannten Protokollen, in denen die Nukleinsäuren durch den Einbau modifizierter Nukleotidreste während der DNA- oder RNA-Synthese markiert werden, eine Reaktion, die ohne die Beteiligung eines Enzyms auskommt. Das DIG-Chem-Link Reagenz ist eine cis-Platinverbindung, bei der eine der vier Koordinationsstellen des Platinatoms über einen aliphatischen Spacer mit einem DIG-Molekül verbunden ist. Zwei weitere Koordinationsstellen sind von einem Diaminoethanliganden besetzt, während die letzte einen leicht abspaltbaren Nitratliganden trägt. Bei Inkubation dieser Verbindung mit Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgt unter Abspaltung des Nitratrestes eine koordinative Bindung des Platinatoms an die Position N7 der Guanosin- und Adenosin-Reste der Nukleinsäuren.

### **3.2.7 cDNA-Array-Hybridisierung**

Die Arrays wurden mindestens eine Stunde lang bei 54°C in 10ml High-SDS Puffer mit 1% Blocking Reagenz und 3µg nicht markiertem pGemTeasy ohne Insert vorhybridisiert. Nach Ablauf der Vorhybridisierungszeit wurde jedem Hybridisierungsansatz die jeweilige markierte RNA direkt zugegeben. Die Hybridisierung der Arrays erfolgte über mindestens 8h.

Die hybridisierten Arrays wurden zweimal 5min in 100ml 0,5x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und anschließend zweimal 15min in 100ml 0,1x SSC, 0,1% SDS bei 54°C gewaschen. Die Detektion der DIG-Markierungen erfolgte mit dem im DIG-Chem-Link Kit enthaltenen Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen geschah durch Inkubation der Arrays für 30min bei Raumtemperatur in 100ml Block-Lösung. Dieser Lösung wurde dann jeweils 1µl Anti-DIG-Antikörper zugesetzt. Nach weiteren 30min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden die Arrays zweimal 15min in 100ml Waschpuffer geschwenkt und danach 5min in Detektionspuffer äquilibriert.

Die Arrays wurden einzeln in PE-Folie eingeschweißt und pro Array wurde 1ml CSPD-Substrat zugefügt. Nach einer Aktivierung der alkalischen Phosphatase durch Inkubation für 15min bei 37°C konnten die chemilumineszenten Signale auf den Arrays durch Exposition eines Biomax Films (Kodak) detektiert werden. Die Entwicklung des Films erfolgte nach den Angaben des Herstellers. In Abbildung 16 ist beispielhaft ein Bild eines entwickelten cDNA-arrays dargestellt:



**Abbildung 16** cDNA-Array-Bild einer einzelnen murinen Blastozyste vom Tag 3,5. Jede cDNA-Sonde wurde in zwei direkt nebeneinander liegenden punktförmigen Arealen aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	apaf1	apc	atm	$\beta$ -actin	bad	bax	bcl2	bclx	$\beta$ -cat	e-cad	casp 2	casp 3
B	casp 8	casp 11	cdc 2	cdc 6	cdc 25a	cdk 4	cx 43	cyc B	cyc C	cyc D1	cyc D2	cyc E
C	daxx	egf	e2f5	erb A	fas-ag	fas- lig	c-fos	gadd 45	p63	max	mdm 2	mdm x
D	miz 1	mnt	mxi	myb	c-myc	l-myc	p 15	p16	p 19	p 21	p 42	p 73
E	p 53	p 107	ras-H	ras-K	rip	rb	c-src	t- ag	tef-1	tf-1	tgf- $\beta$	tgf- $\beta$ -r
F	ubi	telo I	telo II	fibro	fgfr21Ib	fgfr2Ic	vim I	vim II	col	ck-endoa	c-jun	afp
G	albumin	c/ebp- $\alpha$	cdk 2	cyp 1a2	cyp 1b1	cyp 2b13	dbp	gapdh	PGCSlo	PGCSup	pBR322	pBR322
H	otc	pepck	sdh	tat	tdo	telo III	tf	-	pGemT	Globin	pBKS	18S

**Abbildung 17** Schema der auf dem Array befindlichen cDNA-Sonden und Kontrollen.

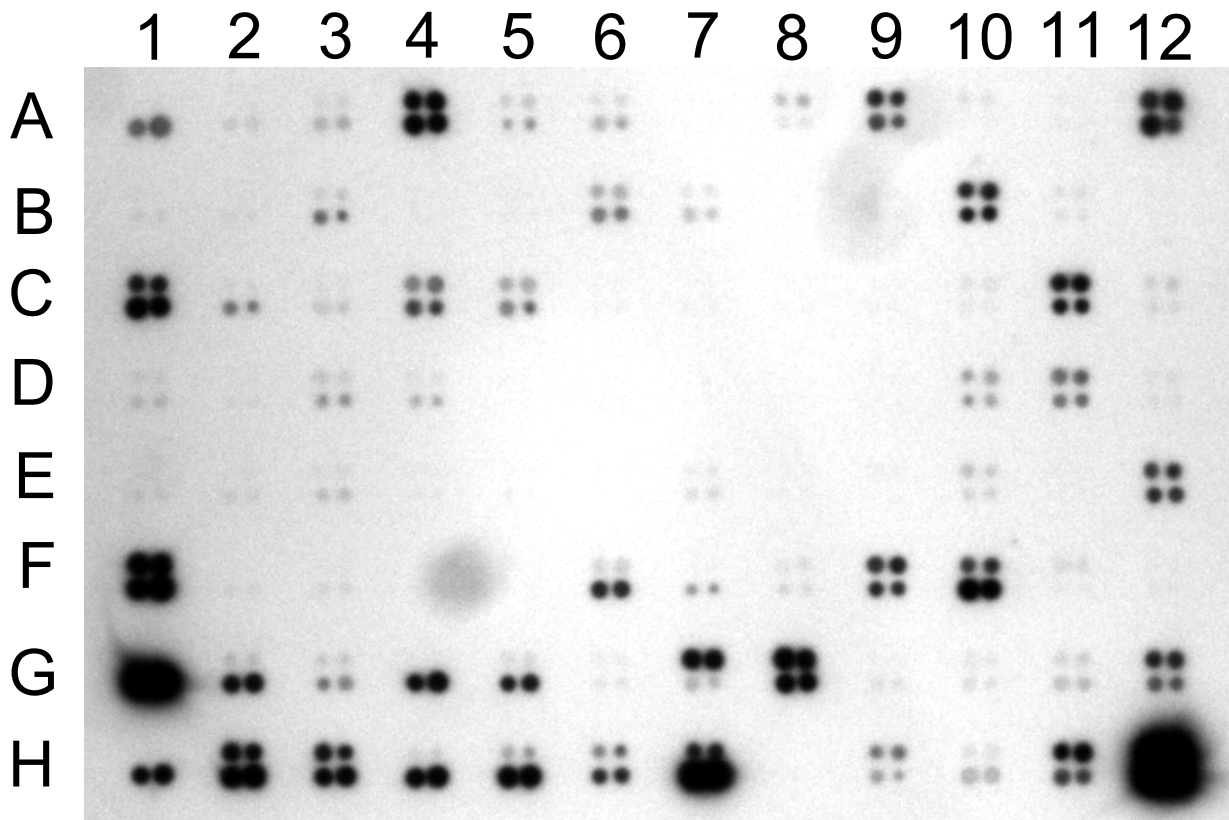
### **3.3 Evaluierung des erstellten Protokolls**

Nach der Etablierung des Protokolls zur globalen Amplifikation sehr kleiner mRNA-Mengen wurde die erstellte Methode evaluiert. Besonderer Augenmerk lag dabei auf der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten. Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße die ursprünglichen Mengenverhältnisse der einzelnen mRNA-Spezies untereinander durch die Amplifikation verzerrt wurden, wurden weiterhin Daten aus amplifizierten RNA-Präparationen mit Daten, die aus nicht amplifizierten RNA-Präparationen gleicher Herkunft gewonnen wurden, verglichen.

#### **3.3.1 Analyse von mRNA-Präparationen verschiedener Maus-Gewebe**

Um zu untersuchen, ob sich die aus dem Array-System erhobenen Genexpressionsdaten in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten befanden und um in Erfahrung zu bringen, ob sich Unterschiede in der Genexpression zwischen zwei biologischen Proben in den erhaltenen Signalmustern widerspiegeln, wurden cDNA-Arrays aus mRNA verschiedener muriner Gewebe produziert und verglichen.

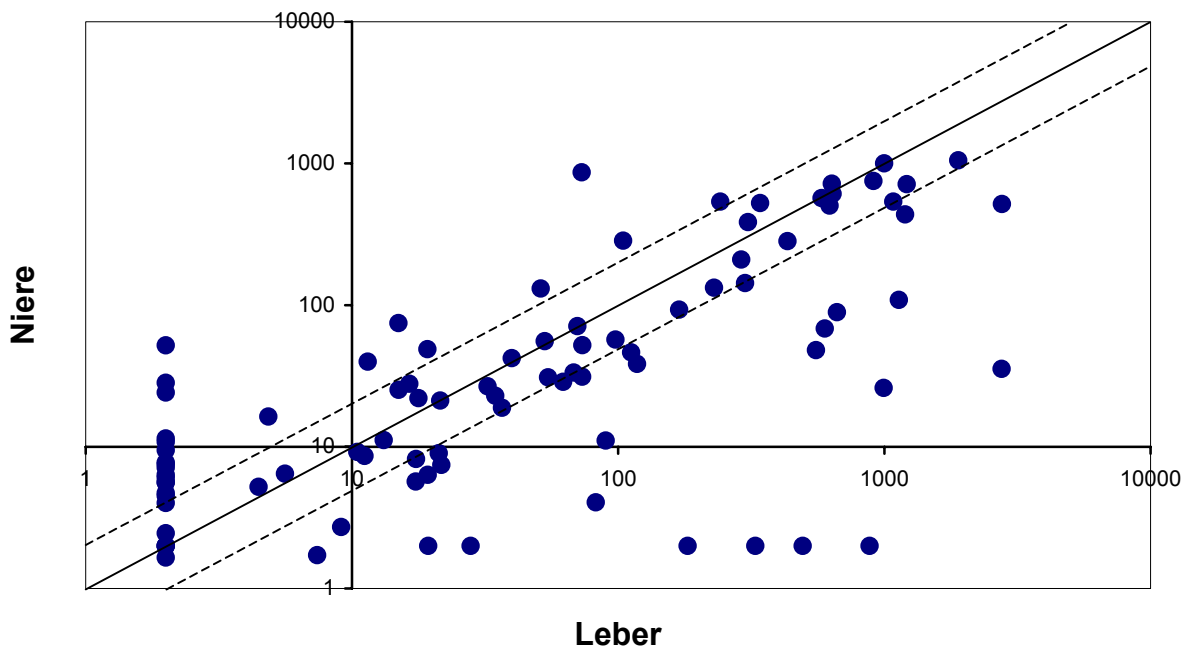
Hierzu wurden jeweils 2µg mRNA aus murinem Nieren- und Lebergewebe markiert und mit einem Array hybridisiert. Zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Genexpressionsmuster wurden in Abbildung 18 zwei der erzeugten (transparenten) Array-Bilder so übereinandergelegt, dass die Punkte der jeweils gleichen cDNA-Sonden sich einander direkt gegenüberlagern. Im so aufgenommenen Bild ließen sich differentiell exprimierte Gene identifizieren.



**Abbildung 18** zeigt zwei cDNA-Arrays aus Maus Nieren- bzw. Leber-mRNA. Die beiden Array Bilder wurden leicht versetzt übereinander gelegt und aufgenommen, so dass die Signale der cDNA-Sonden des Nieren-mRNA Blots direkt über den Signalen der korrespondierenden cDNA-Sonden des Leber-mRNA-Blots zu liegen kamen.

Zu beachten ist, dass es sich bei den dargestellten Bildern um die noch nicht prozessierten Rohdaten handelt. Jedoch lieferte der interne Standard, nämlich die *gapdh*-Sonde auf G8, in beiden Arrays eine etwa gleiche Signaintensität. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass einige Sonden, wie zum Beispiel die für *albumin* (G1), *transferrin* (H7), *cyp1a2* (G4), *fgfr2* (F6), *tat* (H4) und *tdo* (H5) im Leber-Array deutlich stärkere Signale gaben als im Nieren-Array, während es bei der *dpb*-Sonde (G7) genau umgekehrt war. Die Sonden der Gene *gapdh* (G8),  $\beta$ -actin (A4) und *ubiquitin* (F1) lieferten in beiden Arrays etwa gleich starke Signale.

Zur Analyse differentiell exprimierter Gene wurden die erhaltenen Signalwerte der einzelnen cDNA-Sonden beider Arrays gegeneinander in einem Scatter-Plot aufgetragen (Abbildung 19):



**Abbildung 19** Scatter-Plot eines murinen Leber- und eines murinen Nieren-Expressionsprofils. Die dimensionslosen relativen Signalintensitäten der gleichen cDNA-Sonde in beiden Expressionsprofilen wurden gegeneinander aufgetragen, wobei die Werte des Leber-Arrays auf der y-Achse und die des Nieren-Arrays auf der x-Achse aufgetragen wurden. Auf diese Weise können differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

Für den Fall der Übereinstimmung der relative Signalstärkewerte einer cDNA-Sonde auf beiden Arrays, läge der erzeugte Datenpunkt im Scatter-Plot irgendwo auf der Ausgleichsgeraden der Steigung 1 durch den Nullpunkt des Plots (dies trifft z.B. für die Signalintensität des internen Standards *gapdh* zu, dem in allen Arrays ein Wert von 1000 zugewiesen wurde. Der Datenpunkt der *gapdh*-Sonde im Scatter-Plot liegt dementsprechend immer bei "1000/1000"). Um der Unschärfe der Methode gerecht zu werden, definiert man einen Faktor der Abweichung der relativen Signalintensitäten zweier Proben, ab dem ein Gen als reguliert betrachtet werden kann. Die gestrichelten Linien in Abb. 19 geben den Bereich an, in dem alle Datenpunkte liegen, deren x- und y-Werte um weniger als einen Faktor 2 voneinander abweichen. Die Werte der anderen cDNA-Sonden wurden analog gegeneinander aufgetragen. Relativen Signalintensitäten unter dem Cutoff-Value wurde der Wert 2 zugewiesen, da sich Nullwerte im gewählten Koordinatensystem nicht darstellen lassen. Wird mit einer Sonde eines Arrays ein stärkeres oder schwächeres Signal gemessen als auf dem Vergleichsarray, so verschiebt sich der jeweilige Datenpunkt entsprechend. Die relative Verschiebung kann unabhängig von der absoluten Signalstärke am besten in einem doppelt logarithmierten Scatter-Plot dargestellt werden.

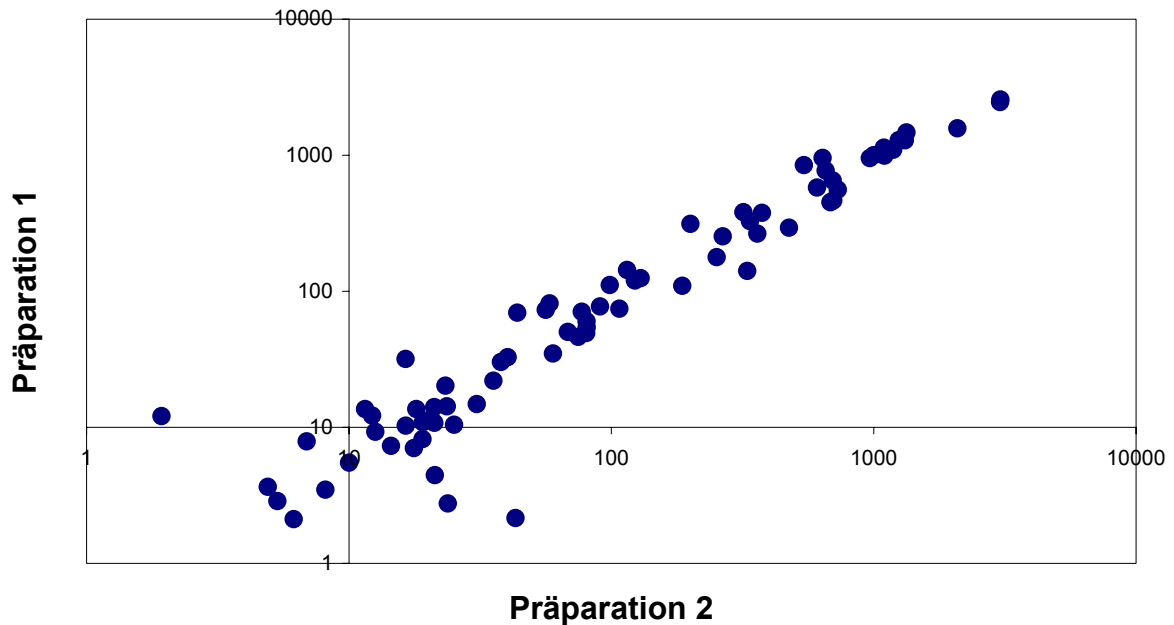


In Abbildung 19 können die cDNA-Sonden, die z.B. nur im Leber-mRNA-Array ein positives Signal lieferten, daran identifiziert werden, dass ihre y-Koordinate 2 beträgt. Auch andere differentiell exprimierte Transkripte können in dieser Abbildung leicht identifiziert werden. So ergab beispielsweise die cDNA-Sonde für albumin-mRNA, die leberspezifisch exprimiert wird, im Leber-mRNA Array einen Wert von 2760 (x-Koordinate), während sie im Nieren-mRNA Array nur einen Wert von 35 (y-Koordinate) lieferte. Die dbp-Sonde ergab dagegen im Leber-mRNA-Array nur einen Wert von 73 (x-Koordinate), während sie im Nieren-mRNA-Array einen Wert von 864 (y-Koordinate) lieferte.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass Unterschiede in der Genexpression muriner Gewebe bei einem Vergleich entsprechender Arrays als Unterschiede in den erzeugten cDNA-Array-Signalmustern deutlich erkennbar waren. Das verwendete cDNA-Array-System erschien somit geeignet zur Untersuchung relativer Häufigkeiten muriner Transkripte in RNA-Präparationen.

### 3.3.2 Analyse separat präparierter mRNA-Extrakte

Um Variabilität in mRNA-Extraktion und -Markierung der cDNA-Array-Prozedur zu evaluieren, wurde aus einer murinen Lebergewebeprobe die Gesamt-RNA aufgereinigt und in zwei Aliquots aufgeteilt, aus denen anschließend separat die mRNA isoliert wurde. Jeweils 2µg dieser mRNA wurden markiert, mit einem Array hybridisiert und die erhaltenen Daten der cDNA-Sonden der beiden Arrays wurden gegeneinander in einem Scatter-Plot aufgetragen (Abbildung 20).

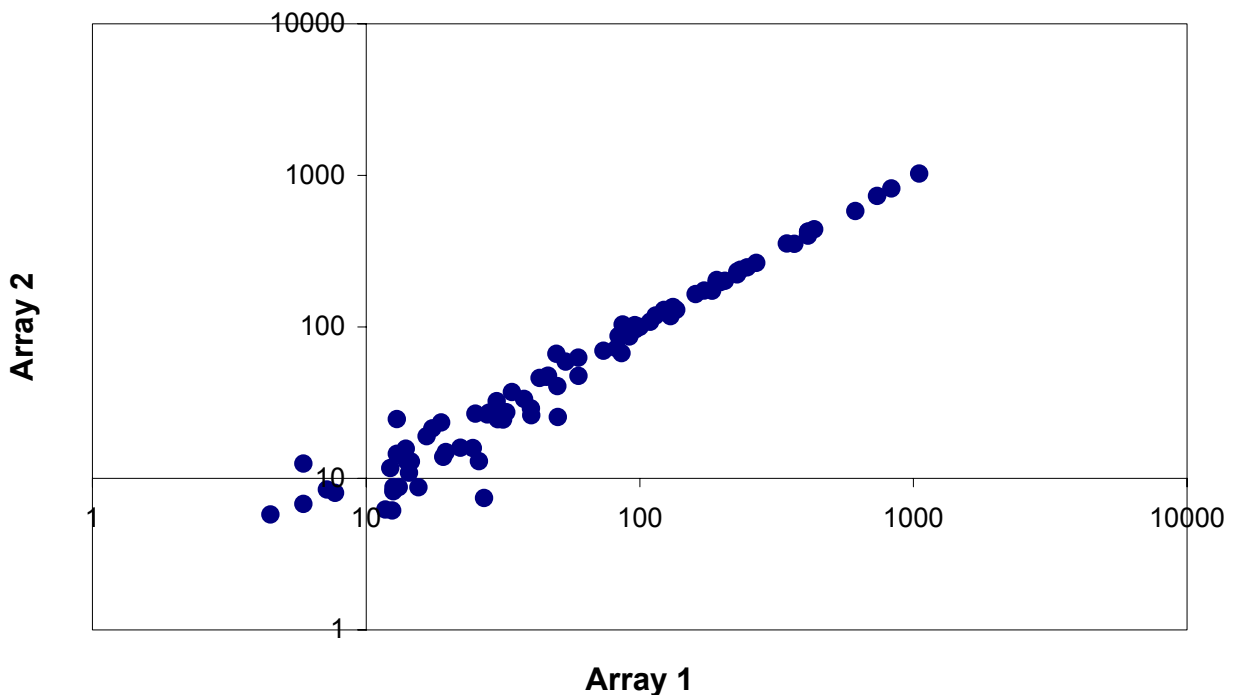


**Abbildung 20** Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Analyse nicht amplifizierter RNA-Präparationen. Scatter-Plot der relativen Signalintensitäten zweier Arrays aus zwei Leber-mRNA-Präparationen. Die mRNA-Präparationen wurden separat aus Teilen derselben murinen Leber aufgereinigt und markiert. Die relativen Signalintensitäten der Präparation 1 wurden gegen die korrespondierenden relativen Signalintensitäten der Präparation 2 aufgetragen. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient der beiden Datensätze lag bei 0,983.

Aus diesen Daten konnte abgeleitet werden, dass die durch die RNA-Präparation eingeführte Variabilität der erhaltenen Daten minimal war und vernachlässigt werden konnte. Diese Aussage ließ sich jedoch aus diesem Versuch nur für nicht amplifizierte RNA-Präparationen machen.

### 3.3.3 Analyse einer aRNA-Präparation in separaten Markierungs- und Hybridisierungsreaktionen

Um den Einfluss von Markierung, Hybridisierung und Bildgebung bei der cDNA-Array-Analyse amplifizierter RNA-Präparationen zu bestimmen, wurden von der aRNA, die aus einer murinen Tag 3,5-Blastozyste präpariert wurde, zwei Aliquots von 2µg separat markiert und mit jeweils einer Array-Membran hybridisiert. Nach Entwicklung der beiden Arrays wurden die erhaltenen Signalstärken in einem Scatter-Plot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 21).

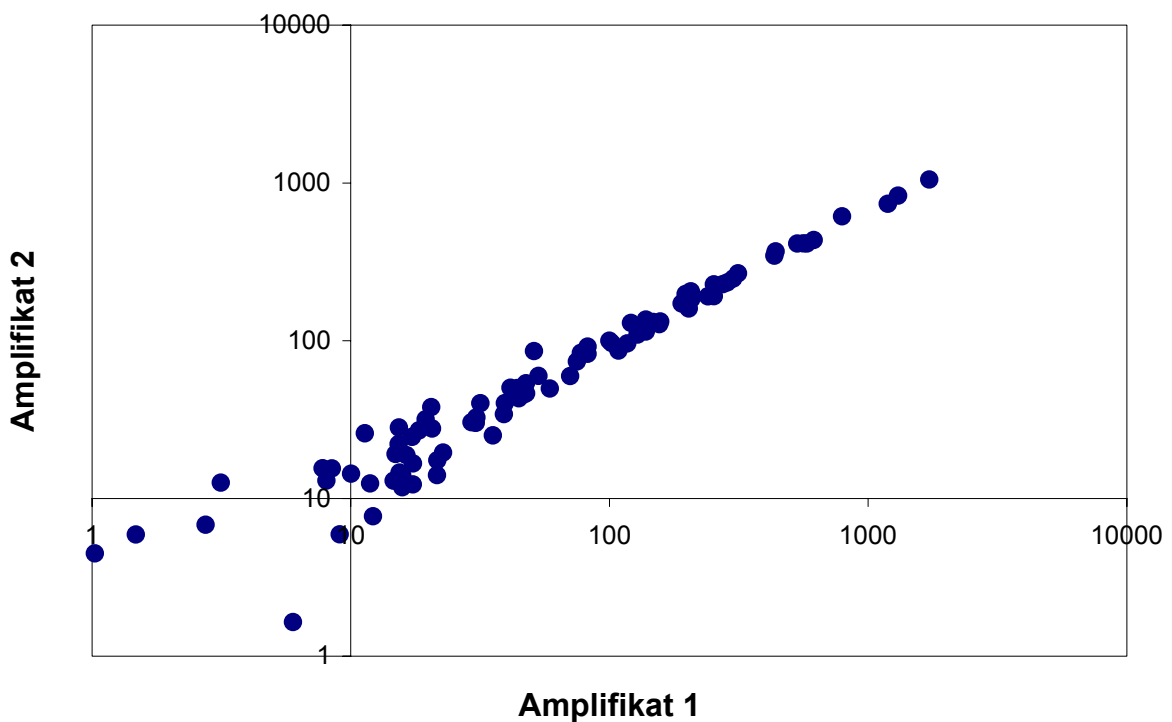


**Abbildung 21** Reproduzierbarkeit der cDNA-Array-Analyse amplifizierter RNA-Präparationen. Scatter-Plot der relativen Signalintensitäten zweier Arrays aus derselben aRNA-Präparation. Zwei Aliquots einer aRNA-Präparation aus einer murinen Blastozyste wurden separat markiert und mit jeweils einem cDNA-Array hybridisiert. Die relativen Signalintensitäten des Arrays 1 wurden gegen die korrespondierenden relativen Signalintensitäten des Arrays 2 aufgetragen. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient der beiden Datensätze lag bei 0,999.

Die erhaltenen Daten ergaben, dass der Beitrag von Markierungseffizienz, Hybridisierung und Bildgebung zur Variabilität der Ergebnisse vernachlässigbar klein war.

### 3.3.4 Analyse aus einer mRNA-Quelle separat amplifizierter aRNA-Präparationen

Um herauszufinden, ob die Methode zur globalen Amplifikation muriner mRNA-Präparationen aus einzelnen Blastozysten reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wurde die mRNA aus Gruppen von jeweils zwei murinen Tag 3,5-Blastozysten extrahiert und revers transkribiert. Die RT-Ansätze wurden in jeweils zwei Aliquots aufgeteilt, aus denen dann separat aRNA amplifiziert wurde. Die Daten aus der cDNA-Array-Analyse dieser beiden aRNA-Präparationen wurden miteinander verglichen, indem die normalisierten Signalstärken der jeweils korrespondierenden Sondenpunkte in einem Scatter-Plot gegeneinander aufgetragen wurden. Einer der erhaltenen Scatter-Plots ist in Abbildung 22 dargestellt:



**Abbildung 22** Scatter-Plot der relativen Signalintensitäten zweier Arrays aus zwei separat präparierten aRNA-Präparationen. Die mRNA zweier muriner Blastozysten wurde extrahiert und in zwei Aliquots aufgeteilt, aus denen jeweils aRNA präpariert wurde. Die relativen Signalintensitäten des Amplifikates 1 wurden gegen die korrespondierenden relativen Signalintensitäten des Amplifikates 2 aufgetragen. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient der beiden Datensätze lag bei 0,991.

Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der mittlere Pearson'sche Korrelationskoeffizient lag dabei bei  $0,979 \pm 0,01$ , was eine gute Reproduzierbarkeit der erzielten Daten bedeutet.

### **3.3.5 Analyse amplifizierter und nicht amplifizierter RNA-Präparationen aus derselben mRNA-Quelle**

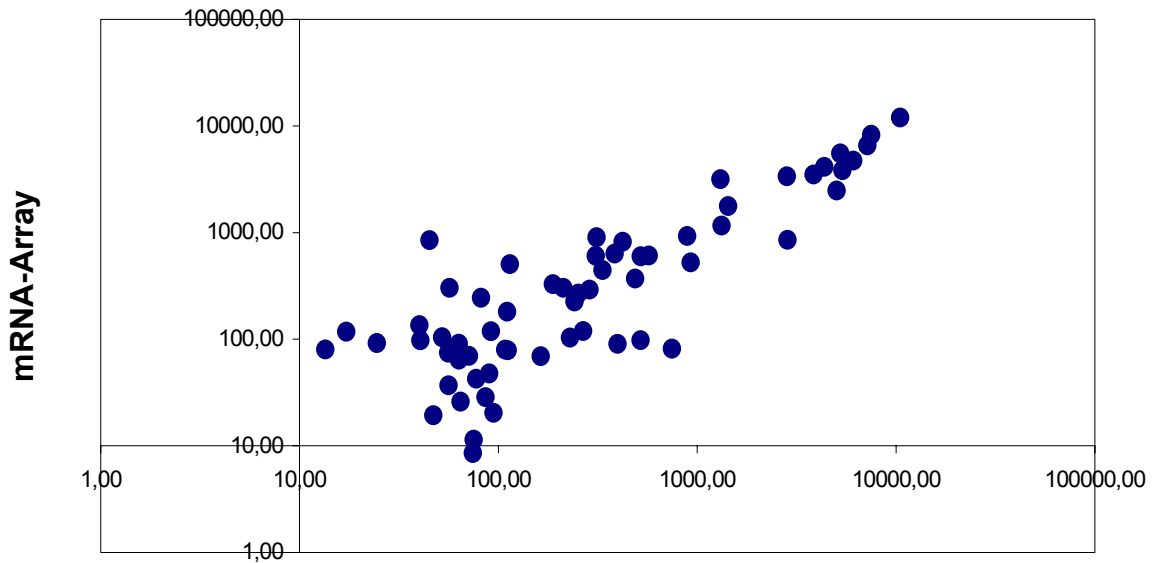
Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Qualität von cDNA-Array-Daten, die aus der Analyse amplifizierter RNA-Präparationen gewonnenen wurden, ist die Erhaltung der relativen Mengenverhältnisse der verschiedenen mRNA-Spezies zueinander. Eine Verzerrung dieser in der Originalprobe vorhandenen Verhältnisse würde die aus derartigen Experimenten erhobenen Daten stark entwerten.

Um die Genauigkeit der Signalrepräsentation in Datensätzen aus cDNA-Array-Analysen amplifizierter RNA-Präparationen zu bestimmen, wurden diese mit solchen aus nicht amplifiziertem Material verglichen. Da die Erstellung von cDNA-Arrays aus Embryonen ohne eine mRNA-Amplifikation nicht nur mit sehr hohem Aufwand, sondern auch mit sehr hohem Tierverbrauch verbunden ist, weil einige tausend Embryonen gewonnen werden müssten, wurden diese Versuche mit murinem Nierengewebe durchgeführt.

Aus Nierengewebe wurde zunächst die gesamt-RNA gewonnen. Diese wurde quantifiziert, und es wurde ein Aliquot von 5ng, also die in etwa der in einer einzelnen bovinen Blastozyste enthaltenen gesamt-RNA entsprechende Menge, abgenommen. Aus der restlichen Gesamt-RNA wurde die mRNA durch Oligotex-Extraktion gewonnen. In der Array Hybridisierung wurden 2µg markierte (nicht amplifizierte) Nieren-mRNA eingesetzt. Aus dem gesamt-RNA Aliquot von 5ng wurde die mRNA durch Dynabead Extraktion gewonnen und amplifiziert. In der Array Hybridisierung wurden 2µg markierte (amplifizierte) Nieren-aRNA eingesetzt.

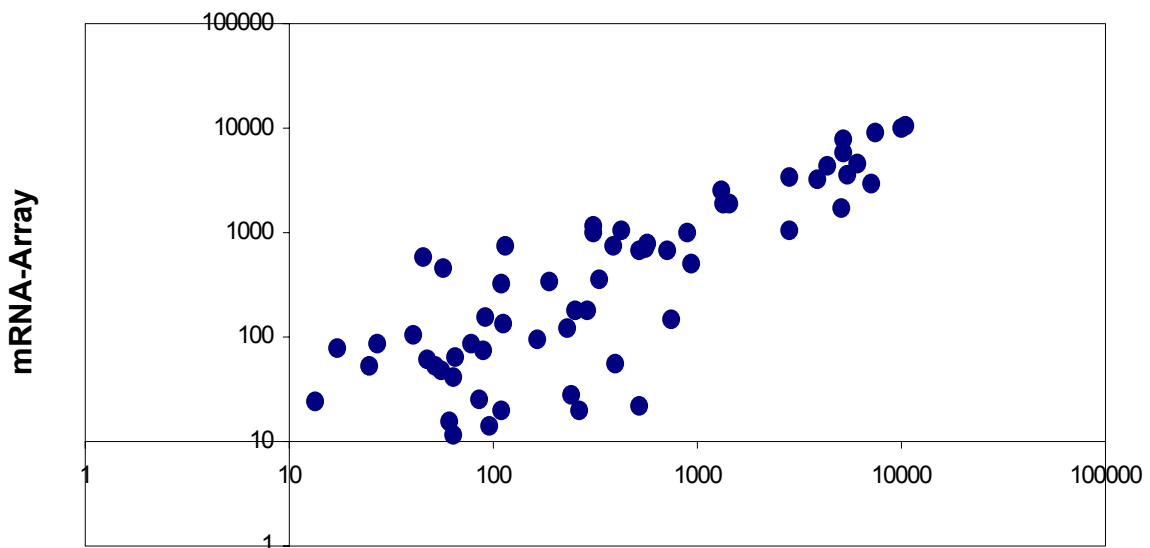
Der Vergleich der Datensätze, die aus nicht amplifizierter und aus amplifizierter muriner Nieren-mRNA gewonnen wurden, erfolgte wiederum durch Auftragen der normalisierten Signalstärken der jeweiligen Arrays in einem Scatter-Plot. Die Korrelation der Datensätze aus amplifiziertem und nicht amplifiziertem Material wurde durch Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten bestimmt.

Dieser Versuch wurde insgesamt viermal durchgeführt. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient lag dabei bei  $0,950 \pm 0,02$ . In den Abbildungen 23 und 24 wurden die am besten und am schlechtesten korrelierten Datensätze jeweils in einem Scatter-Plot gegeneinander aufgetragen.



**aRNA-Array #4**

**Abbildung 23** Scatter-Plot der relativen Signalintensitäten eines Arrays aus einer Nieren mRNA-Präparation und eines Arrays aus einer Nieren aRNA-Präparation. Aus einem 5ng Gesamt-RNA entsprechenden Aliquot der Nieren-mRNA wurde aRNA präpariert. Beide Präparationen wurden separat mit einem cDNA-Array analysiert. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient der dargestellten Datensätze lag bei 0,968. In dieser Abbildung sind die beiden Datensätze mit der besten Korrelation, die in diesem Experiment erzielt wurde, dargestellt.



**aRNA-Array #2**

**Abbildung 24** Scatter-Plot der relativen Signalintensitäten eines Arrays aus einer Nieren mRNA-Präparation und eines Arrays aus einer Nieren aRNA-Präparation. Aus einem 5ng Gesamt-RNA entsprechenden Aliquot der Nieren-mRNA wurde aRNA präpariert. Beide Präparationen wurden separat mit einem cDNA-Array analysiert. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient der dargestellten Datensätze lag bei 0,921. In dieser Abbildung sind die beiden Datensätze mit der schlechtesten Korrelation, die in diesem Experiment erzielt wurde, dargestellt.

Es wurde festgestellt, dass in 4 der auf dem Array befindlichen cDNA-Sonden bei der Analyse amplifizierter RNA-Präparationen falsch negative Signale detektiert wurden. Die falsch negativen Signale wurden immer in den gleichen Sondenpunkten, die in Kapitel 3.3.6 aufgeführt sind, auf dem Array beobachtet. Die entsprechenden cDNA-Sonden wurden daher als nicht mit der Amplifikationsmethode kompatibel klassifiziert, und die Daten dieser Sonden wurden in weiteren Analysen von aRNA-Präparationen nicht berücksichtigt.

### **3.3.6 Sequenzanalyse falsch negativer cDNA-Sonden**

Das Arbitrary-Priming der Zweitstrangsynthese bei der Amplifikationsprozedur impliziert den Verlust 3'-ferner Sequenzen der mRNA-Präparation. Die Ergebnisse der Vorversuche zur maximalen Länge der in der globalen PCR amplifizierten cDNA-Sequenzen (s.o.) ließen vermuten, dass lange mRNA-Moleküle nach deren Amplifikation nicht komplett in der aRNA-Präparation repräsentiert sind.

Um zu prüfen, ob diese Aussagen sich im Einklang mit den experimentellen Daten befanden, wurde die Position der cDNA-Sonden auf der korrespondierenden mRNA mit in die Auswertung der Daten der Arrays aus amplifizierter und nicht amplifizierter muriner Nieren-mRNA einbezogen. Es fiel auf, dass die falsch negativen Signale alle in Sonden, die 3'-ferne Sequenzen der korrespondierenden mRNA repräsentierten, gefunden wurden, wie aus Tabelle 6 deutlich wird:

<b>Sonde</b>	<b>cDNA-Accession-#</b>	<b>cDNA-Länge</b>	<b>Position der Sonde</b>
β-catenin	NM_007614	2702	345-850
dbp	U29762	5527	3563-3735
pepck	AF009605	12141	5922-6118
sdh	AF095938	1596	55-314

**Tabelle 6** Identität falsch negativer cDNA-Sonden. Die angegebenen Sonden lieferten bei der Analyse amplifizierter RNA-Präparationen falsch negative Ergebnisse. Aufgeführt sind die Gen-Bank Accession-Nummern der cDNAs und die Position der als Sonden verwendeten Sequenzen darauf.

Unter den verwendeten cDNA-Sonden befanden sich noch weitere, deren Zielsequenzen weit entfernt vom 3'-Ende der jeweils korrespondierenden mRNA lagen. Diese waren jedoch sowohl in den mRNA-Arrays als auch in den aRNA-Arrays negativ. Aufgrund der vorliegenden Daten zur Längenverteilung der amplifizierten cDNAs und zum Abstand der Sequenzen falsch negativer Sonden zum 3'-Ende der jeweiligen mRNAs wurden Signale aus Sonden, deren Sequenz mehr als 1,5kb vom 3'-Ende der korrespondierenden mRNA entfernt lagen, und für die eine korrekte Signalrepräsentation nicht nachgewiesen werden konnte, nicht in die weitere Analyse

amplifizierter RNA-Präparationen einbezogen. Dies betraf die in Tabelle 7 aufgeführten cDNA-Sonden.

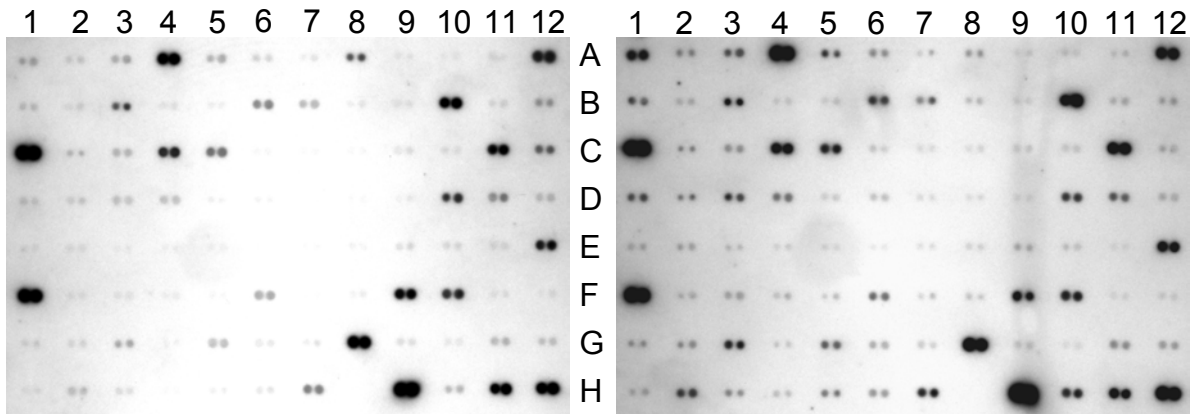
<b>Sonde</b>	<b>cDNA-Accession-#</b>	<b>cDNA-Länge</b>	<b>Position der Sonde</b>
afp	V00743	2009	88-350
albumin	AJ011413	2050	2-257
cyp1b1	NM_009994	5128	1524-1753
tat	X02741	2362	106-366
telomerase III	AF073311	3369	143-417

**Tabelle 7** Identität verwendeter cDNA-Sonden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit falsch negative Signale bei der Analyse amplifizierter Sonden lieferten und deren Daten von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden.



### 3.4 cDNA-Array-Analyse einzelner muriner Tag 3,5-Blastozysten

Die erste Anwendung des neu entwickelten Verfahrens bestand darin, die Genexpression von fünf einzelnen in vivo produzierten murinen Tag 3,5-Blastozysten zu untersuchen. Zwei der so entstandenen Array-Bilder sind in Abbildung 25 und 26 dargestellt:



**Abbildung 25** cDNA-Array-Bild: murine Blastozyste vom Tag 3,5 (Blastozyste I)

**Abbildung 26** cDNA-Array-Bild: murine Blastozyste vom Tag 3,5 (Blastozyste III)

Die normalisierten Signalintensitätswerte der dargestellten Arrays sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Weiterhin wurde das Genexpressionsprofil einer Gruppe aus 10 murinen Tag 3,5-Blastozysten erstellt. Die Einbeziehung dieser Blastozystengruppe erfolgte zum Einen, um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß die erzielten Ergebnisse von der Menge der eingesetzten Embryonen beeinflusst werden. Zum Zweiten sollte auf diese Weise das Expressionsprofil eines Querschnittes einer Blastozystenpopulation erzeugt werden, in der die individuellen Unterschiede durch den Einsatz einer größeren Zahl von Blastozysten kompensiert waren, um einschätzen zu können, in welchem Ausmaß die Werte der untersuchten Einzelblastozysten von diesem „Standard“-Expressionsprofil abwichen.

Nach Normalisierung und Berechnung des Cutoff-Value konnten die in Tabelle 8 angegebenen Gene in den einzelnen Blastozysten und der Blastozystengruppe als positiv klassifiziert werden. Angegeben wurde jeweils die mittlere relative Signalintensität der entsprechenden beiden cDNA-Sondenpunkte auf dem Array. Der mittleren Signalintensität von gapdh wurde der Wert 1000 zugewiesen.

Sonde	Pos.	I	II	III	IV	V	Gruppe (n=10)	MW±SD	VK (%)
apaf1	A1	-	175	426	545	205	572	321±229	71
atm	A3	-	-	-	-	237	247	81±124	-
β-actin	A4	882	989	939	942	893	1172	970±107	11
bad	A5	-	-	-	-	360	204	95±153	-
bax	A6	-	-	-	-	333	236	95±149	-
casp3	A12	624	621	640	693	469	784	638±103	16
cdc2	B3	232	140	279	435	402	584	345±160	46
cdk4	B6	239	381	351	444	486	476	396±93	24
conx43	B7	137	-	188	247	344	194	185±114	62
cycD1	B10	763	797	802	752	770	996	813±92	11
cycE	B12	-	-	-	-	333	-	56±136	-
daxx	C1	1066	974	955	708	552	939	866±194	22
e2f5	C3	-	-	-	-	329	352	114±175	-
erbA	C4	552	461	629	631	611	663	591±74	12
fas	C5	325	309	441	433	439	428	396±61	16
max	C10	-	-	-	-	-	306	52±124	-
mdm2	C11	617	867	754	698	703	713	725±83	11
mdmx	C12	236	249	-	-	393	612	248±235	94
miz	D1	-	-	-	327	-	379	118±182	-
mxi	D3	-	-	228	-	-	-	39±93	-
p19	D9	-	-	-	-	491	-	83±200	-
p21	D10	389	352	292	546	927	441	491±230	47
p42	D11	206	182	219	282	399	239	254±79	31
tef1	E9	-	267	-	-	411	517	200±232	116
tgf-β-r	E12	470	511	566	583	671	636	573±75	13
ubiquitin	F1	973	815	869	901	700	959	870±101	12
fgfr2	F6	202	200	206	344	357	285	266±73	28
collagen	F9	682	759	510	749	829	724	709±109	15
ck-ea	F10	479	518	419	631	693	639	563±107	19
gapdh	G8	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	0

**Tabelle 8** Normalisierte relative Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Sonden. Angegeben sind die Werte für fünf einzelne Blastozysten (I-V) sowie eine Gruppe aus 10 Blastozysten (VI). -: Werte unter dem Cutoff Value. Aus den normalisierten Werten wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der Variationskoeffizient (VK) ermittelt.

Die Variationskoeffizienten wurden in Tabelle 8 nur für cDNA-Sonden angegeben, die in mehr als der Hälfte aller untersuchter Embryonenpräparationen positiv waren. Die Angabe des Variationskoeffizienten für die relativen Signalintensitäten von cDNA-Sonden, die nur in der Minderheit der untersuchten Embryonenpräparationen positive Signale lieferten, erschien nicht sinnvoll. Sechzehn der verwendeten cDNA-Sonden lieferten in allen erstellten cDNA-Arrays ein positives Signal. Vier weitere Sonden waren in mindestens drei der analysierten sechs Embryonenpräparationen positiv, während in neun Sonden nur bei zwei oder einer der erfassten Embryonenpräparationen ein positives Signal erhalten wurde.

Die Datensätze der Einzelblastozysten waren untereinander mit einem mittleren Koeffizienten von  $0,91 \pm 0,05$  korreliert, während der mittlere Korrelationskoeffizient des Datensatzes der Blastozystengruppe im Bezug auf die der Einzelblastozysten  $0,91 \pm 0,02$  betrug. Dies ließ darauf schließen, dass die Menge des eingesetzten Ausgangsmaterials die relativen Signalintensitäten nicht wesentlich beeinflusste.

Tabelle 9 ermöglicht eine Betrachtung der Variationskoeffizienten einzelner cDNA-Sonden und verdeutlicht die Variabilität des jeweils erhaltenen Signals innerhalb der einzelnen Array-Bilder:

<b>Sonde</b>	<b>MW±SD</b>	<b>VK (%)</b>
<b>β-actin</b>	970±107	11
<b>cycD1</b>	813±92	11
<b>mdm2</b>	725±83	11
<b>erbA</b>	591±74	12
<b>ubiquitin</b>	870±101	12
<b>tgf-β-r</b>	573±75	13
<b>collagen</b>	709±109	15
<b>caspase3</b>	638±103	16
<b>fas-antigen</b>	396±61	16
<b>ck-ea</b>	563±107	19
<b>daxx</b>	866±194	22
<b>cdk4</b>	396±93	24
<b>fgfr2</b>	266±73	28
<b>p42</b>	254±79	31
<b>cdc2</b>	345±160	46
<b>p21</b>	491±230	47
<b>conx43</b>	185±114	62
<b>apaf1</b>	321±229	71
<b>mdmx</b>	248±235	94
<b>tef1</b>	200±232	116

**Tabelle 9** Mittelwerte der normalisierten relativen Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Sonden nach der Größe des Variationskoeffizienten geordnet. Abkürzungen wie in Tabelle 8.

Es fiel auf, dass eine Gruppe von cDNA-Sonden in allen Arrays eine nur gering schwankende Signalintensität lieferte. Hierzu zählten u.a. β-actin und ubiquitin ebenso wie cycD1, mdm2 und caspase3.

Eine weitere Gruppe von cDNA-Sonden lieferte dagegen stärker schwankende Werte, wozu u.a. cdc2, p21, connexin43, mdmx, apaf1 und tef1 gehörten.

### 3.5 cDNA-Array-Analyse muriner Embryonalstadien

Um die Genregulation während der Maus-Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurden jeweils 10 Embryonen umfassende Gruppen der einzelnen Entwicklungsstadien einer cDNA-Array-Analyse unterzogen. Im einzelnen wurden reife Oozyten mit umgebenden Kumulus-Zellen (OC), reife Oozyten ohne Kumulus-Zellen (Oo), 2-Zeller (2C) und Blastozysten (BL) untersucht.

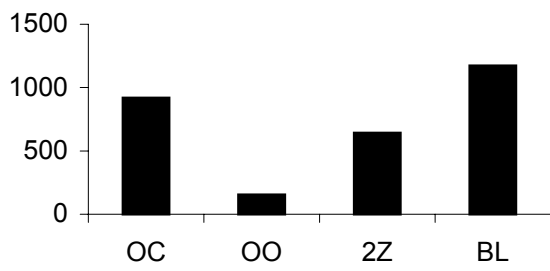
Die erhaltenen Werte der als positiv klassifizierten Sonden sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Angabe der Mittelwerte (MW) nebst Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizienten (VK) ermöglichte die Identifikation während der Embryonalentwicklung differentiell sowie relativ konstant exprimierter Gene.

Sonde	OC	Oo	2C	BL	MW±SD	VK (%)
apaf1	214	523	-	572	327±269	82
Apc	-	124	-	-	32±61	194
Atm	-	477	265	247	247±195	79
β-actin	918	154	641	1172	721±436	60
Bad	150	307	-	204	165±128	77
bax	-	287	-	236	131±152	116
casp3	529	908	739	784	740±158	21
casp11	159	-	-	-	40±79	195
cdc2	197	275	367	584	356±167	47
cdk4	246	440	339	476	375±104	28
conx43	-	272	-	194	117±138	118
cycB	-	516	337	-	214±256	120
cycC	-	-	330	-	83±165	198
cycD1	641	1065	690	996	848±214	25
cycD2	-	186	-	-	47±93	196
cycE	-	-	456	-	115±227	198
daxx	989	1370	838	939	1034±233	22
erbB	-	184	-	-	47±91	196
e2f5	-	955	696	352	501±415	83
erbA	521	813	485	663	620±149	24
fas	272	518	423	428	410±102	25
max	-	155	-	306	116±146	126

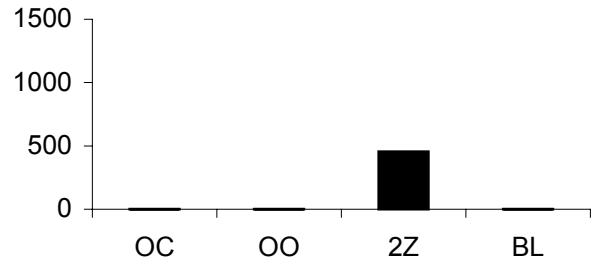
Sonde	OC	OO	2C	BL	MW±SD	VK (%)
mdm2	716	1446	1072	713	987±350	35
mdmx	-	328	417	612	339±255	75
miz	-	231	339	379	237±169	71
mut	-	223	-	-	57±111	196
mxi	-	204	-	-	52±101	196
myb	-	254	-	-	64±127	197
l-myc	-	-	232	-	59±115	197
p15	-	127	-	-	32±63	194
p21	1170	292	576	441	620±384	62
p42	-	260	356	239	214±151	70
p73	-	151	-	-	38±75	195
p107	-	-	267	-	67±133	197
ras-h	-	-	479	-	121±239	198
tef-l	-	-	-	517	130±258	198
tgfβ-r	465	733	480	636	579±129	22
ubiquitin	861	1677	1328	959	1206±372	31
fgfr2	-	257	-	-	65±128	197
fgfr2	218	211	239	285	238±33	14
collagen	658	337	789	724	627±201	32
ck-ea	506	259	364	639	442±166	37
gapdh	1000	1000	1000	1000	1000±0	0

**Tabelle 10** Normalisierte relative Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Sonden. Angegeben sind die Werte für die analysierten Gruppen aus jeweils 10 Oozyten mit Kumulus-Zellen (OC), Oocyten ohne Kumulus-Zellen (OO), 2-Zellern (2C) und Blastozysten (BL). -: Werte unter dem Cutoff Value. Aus den normalisierten Werten wurde der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der Variationskoeffizient ermittelt.

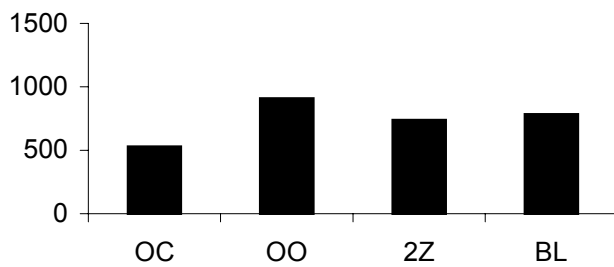
Um einen besseren Überblick über die Veränderungen der Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Sonden zu geben, wurden diese im Folgenden für einige Sonden grafisch dargestellt. In den Abbildungen 27 bis 41 sind die dimensionslosen Signalintensitäten der einzelnen Embryonengruppen wiedergegeben.



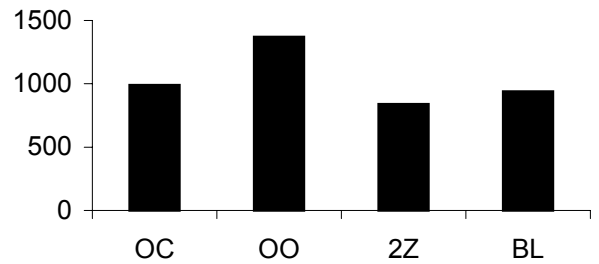
**Abbildung 27** Expression von  $\beta$ -actin mRNA in murinen Embryonalstadien



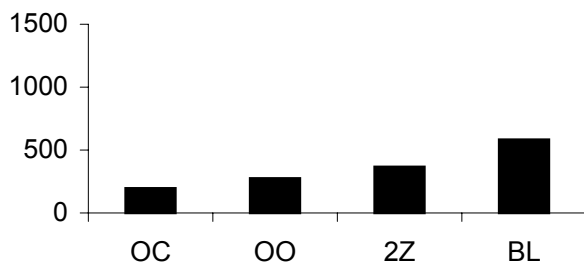
**Abbildung 31** Expression von **cyclinE** mRNA in murinen Embryonalstadien



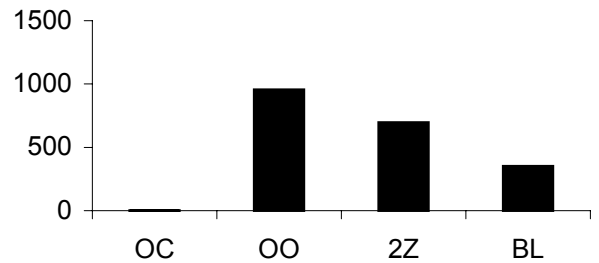
**Abbildung 28** Expression von **caspase3** mRNA in murinen Embryonalstadien



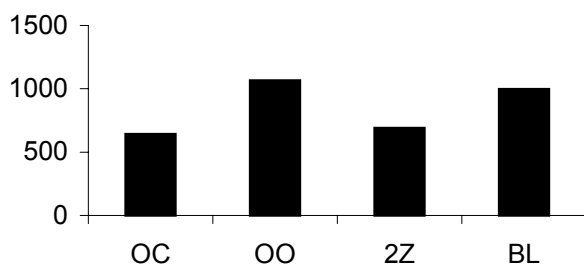
**Abbildung 32** Expression von **daxx** mRNA in murinen Embryonalstadien



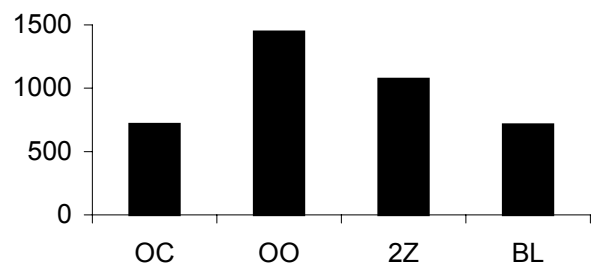
**Abbildung 29** Expression von **cdc2** mRNA in murinen Embryonalstadien



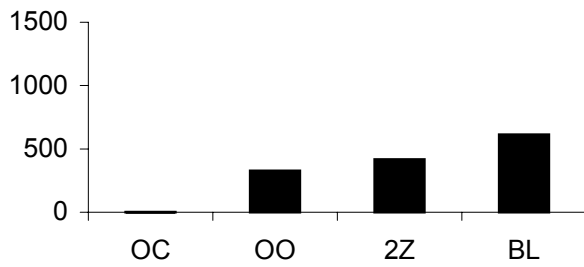
**Abbildung 33** Expression von **e2f5** mRNA in murinen Embryonalstadien



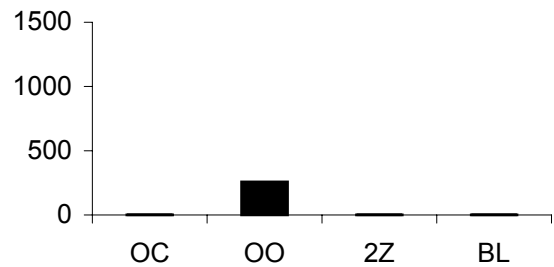
**Abbildung 30** Expression von **cyclinD1** mRNA in murinen Embryonalstadien



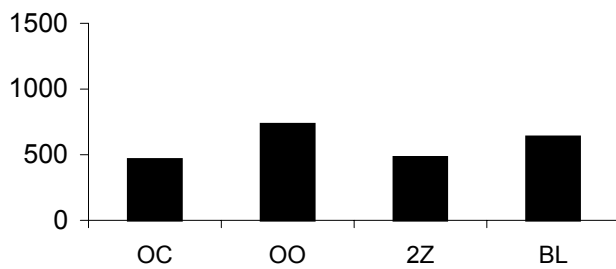
**Abbildung 34** Expression von **mdm2** mRNA in murinen Embryonalstadien



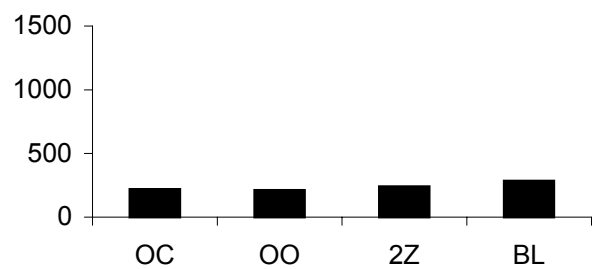
**Abbildung 35** Expression von **mdmx** mRNA in murinen Embryonalstadien



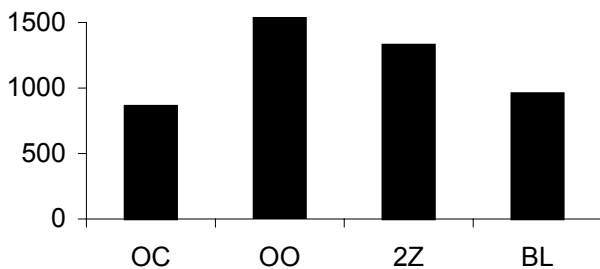
**Abbildung 39** Expression von **fgfr2-IIIb** mRNA in murinen Embryonalstadien



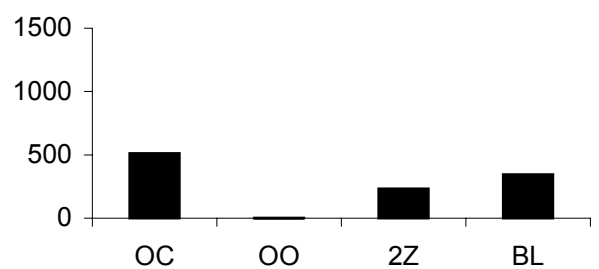
**Abbildung 36** Expression von **tgfbeta-rezeptor** mRNA in murinen Embryonalstadien



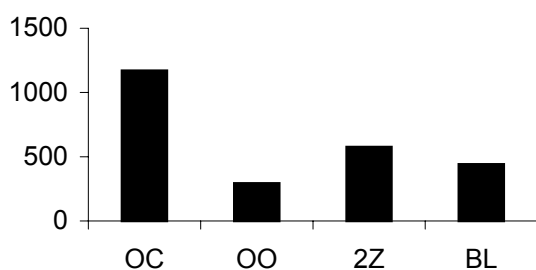
**Abbildung 40** Expression von **fgfr2-IIIc** mRNA in murinen Embryonalstadien



**Abbildung 37** Expression von **ubiquitin** mRNA in murinen Embryonalstadien



**Abbildung 41** Expression von **transferrin** mRNA in murinen Embryonalstadien



**Abbildung 38** Expression von **p21** mRNA in murinen Embryonalstadien



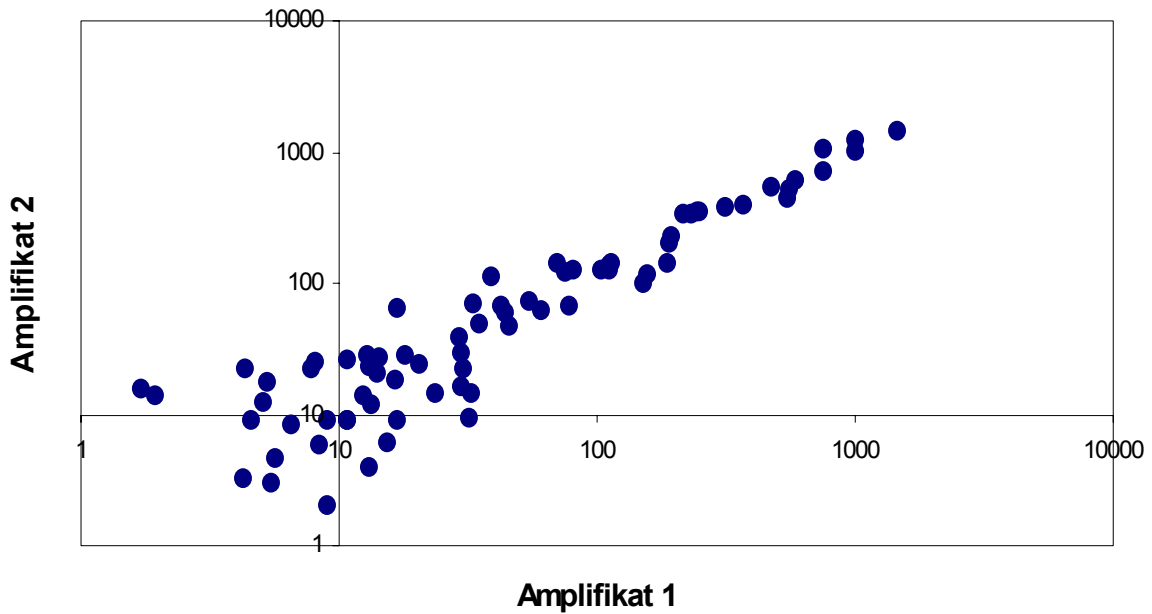
### **3.6 Evaluierung des erstellten Amplifikationsprotokolls zur Analyse boviner aRNA-Präparationen über heterologe cDNA-Array-Hybridisierung**

Das bovine Genom ist im Gegensatz zum murinen oder humanen Genom bislang nur zu einem sehr kleinen Teil sequenziert. Daher ist es oft nicht möglich, die cDNA-Sequenz einer interessierenden bovinen mRNA ohne aufwendige Sequenzierarbeiten zu erhalten. Um bovine RNA-Präparationen über cDNA-Arrays analysieren zu können, liegt im Anbetracht der Tatsache, dass insbesondere die translatierten Sequenzen vieler mRNAs in den verschiedenen Säugerspezies hochkonserviert sind, die Strategie nahe, diese mit murinen cDNA-Arrays zu hybridisieren.

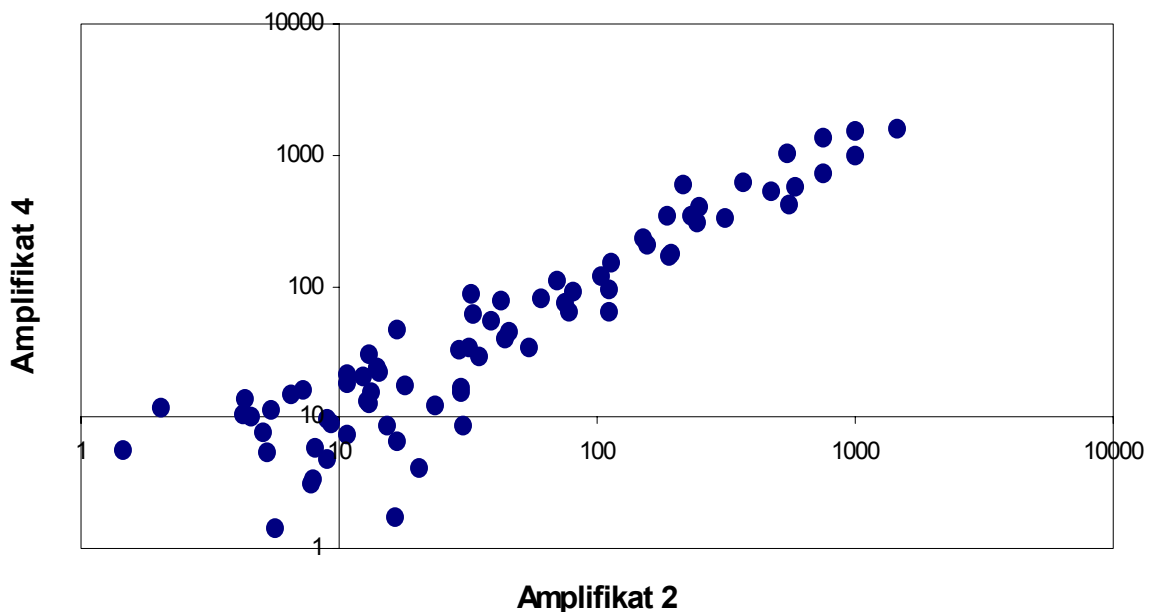
Dabei können stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren nicht 100% homologer Sequenzen beeinträchtigen oder gar verhindern. Dies kann bei murinen cDNA-Sonden, die keine ausreichende Homologie zu ihrer bovinen Zielsequenz aufweisen, zur Abschwächung oder zum Ausbleiben eines Signals trotz Anwesenheit der entsprechenden Zielsequenz in der untersuchten bovinen RNA-Präparation führen. Eine Veränderung der Hybridisierungs- und Waschparameter hin zu einer niedrigeren Stringenz dagegen kann zu einer Kreuzhybridisierung nicht-homologer Sequenzen und somit zu falsch positiven Signalen führen.

In Analysen boviner Blastozysten über heterologe cDNA-Array-Hybridisierung, wurde die Stringenz der Hybridisierungs- und Waschbedingungen im Vergleich zur Analyse homologer RNA-Präparationen nicht verändert, da der Möglichkeit, einige Signale zu verlieren, vor der Alternative, einige falsch positive Signale zu erhalten, der Vorzug gegeben wurde.

Um zu untersuchen, ob die Analyse boviner RNA-Präparationen mit Arrays, die murine cDNA-Sonden enthielten, die Variabilität der erhaltenen Expressionsdaten vergrößerte und somit deren Qualität minderte, wurde die mRNA aus einer Gruppe von fünf bovinen IVF-Blastozysten extrahiert und in fünf Aliquots aufgeteilt. Diese mRNA-Aliquots wurden separat amplifiziert und über die gleichen cDNA-Arrays analysiert, die bereits in der Analyse muriner RNA-Präparationen eingesetzt wurden. Die Datensätze der einzelnen Arrays wurden miteinander verglichen und in Scatter-Plots gegeneinander aufgetragen. Der mittlere Korrelationskoeffizient der erzielten Datensätze lag bei  $0,968 \pm 0,01$ . In den Abbildungen 42 und 43 sind die am besten und die am schlechtesten korrelierten Datensätze gegeneinander aufgetragen:



**Abbildung 42** Scatterplot zweier Datensätze aus der Analyse zweier aus derselben mRNA separat amplifizierter aRNA-Präparationen durch heterologe cDNA-Array-Hybridisierung. Aus einer Gruppe von fünf bovinen Blastozysten wurde die mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in fünf Aliquots aufgeteilt. Aus diesen wurde separat aRNA präpariert und über heterologe cDNA-Array-Hybridisierung analysiert. Der Korrelationskoeffizient der beiden oben dargestellten Datensätze lag bei 0,984. Dies waren die beiden am besten korrelierten Datensätze bei der Analyse der Reproduzierbarkeit der heterologen Hybridisierung.



**Abbildung 43** Scatterplot zweier Datensätze aus der Analyse zweier aus derselben mRNA separat amplifizierter aRNA-Präparationen durch heterologe cDNA-Array-Hybridisierung. Aus einer Gruppe von fünf bovinen Blastozysten wurde die mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in fünf Aliquots aufgeteilt. Aus diesen wurde separat aRNA präpariert und über heterologe cDNA-Array-Hybridisierung analysiert. Der Korrelationskoeffizient der beiden oben dargestellten Datensätze lag bei 0,955. Dies waren die beiden am schlechtesten korrelierten Datensätze bei der Analyse der Reproduzierbarkeit der heterologen Hybridisierung.

### **3.7 cDNA-Array-Analyse individueller boviner Tag 8-Blastozysten**

Es wurden bovine Tag 8-Blastozysten unterschiedlicher Herkunft untersucht. Hierbei handelte es sich um zwei in vivo erstellte Blastozysten, jeweils sechs Blastozysten, die durch IVF im BSA- oder ECS-System erstellt worden waren, drei Kerntransfer-Blastozysten sowie drei parthenogenetische Blastozysten.

Die Tabellen 11 und 12 auf den nächsten Seiten geben einen Überblick über die normalisierten relativen Signalintensitäten der entsprechenden cDNA-Sondenpunkte auf den Arrays der einzelnen Blastozysten.

Die erhaltenen Daten belegen, dass in den Blastozystengruppen unterschiedlicher Herkunft verschiedene mRNAs unterschiedlich stark exprimiert wurden. Auffallend war dabei, dass die Variabilität in der relativen Signalstärke der einzelnen cDNA-Sondenpunkte von Blastozyste zu Blastozyste beim Rind höher war, als bei den untersuchten Maus-Blastozysten.

Bei allen individuellen Unterschieden in der Genexpression gab es jedoch auch Sonden, die nur in Arrays von Blastozysten bestimmter Herkunft positive bzw. negative Signalwerte lieferten. So ließen sich Transkripte des Fibroblastenwachstumsfaktor II Rezeptors in der Spleißvariante IIIc zwar in in vivo erstellten und in IVF-BSA- und parthenogenetischen Blastozysten, nicht aber in IVF-ECS-Blastozysten und NT-Blastozysten nachweisen.

Eine weitere Beobachtung war, dass drei Blastozysten (Vivo II, IVF-ECS IV und NT III) sich in der Expressionsstärke einzelner Gene stark ähnelten. Alle drei wiesen starke Signalwerte in der p53- und der p107-Sonde auf. Jeweils zwei dieser Blastozysten lieferten erhöhte Signalwerte in der apaf1- bzw. in der caspase3-Sonde.

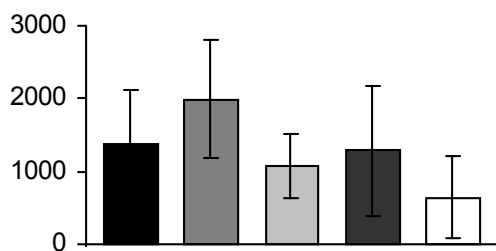
Sonde	In vivo		IVF-Blastozysten (BSA)						IVF-Blastozysten (ECS)					
	I	II	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
apaf1	360	823	400	217	452	332	409	217	210	-	-	776	-	-
apc	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
atm	87	-	155	286	-	-	162	188	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -actin	1899	840	1801	3024	2816	1223	2070	1001	1476	966	1653	501	749	1109
bad	103	-	138	353	254	-	-	156	235	-	235	-	-	-
bax	82	-	409	-	-	-	403	-	350	-	336	671	-	-
e-cad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	652	-	-
casp3	424	756	496	829	439	454	514	543	351	378	338	477	-	-
casp8	55	-	-	-	221	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cdc2	111	-	261	348	-	-	236	151	-	-	-	-	-	-
cdk4	212	-	242	485	277	339	236	230	256	-	237	-	-	-
cycB	181	-	261	363	191	-	238	-	-	-	-	-	-	-
cycD1	241	-	512	836	616	358	510	250	633	-	615	-	-	-
daxx	451	-	829	1560	826	391	828	366	569	-	558	-	-	-
e2f5	-	-	-	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
erbA	377	378	524	909	638	606	548	590	587	571	568	-	-	-
fas-ag	81	-	188	286	188	352	187	244	274	-	277	576	-	-
mdm2	2087	-	1396	2510	1507	1428	1439	1448	1430	795	1489	-	590	347
miz1	190	-	145	374	138	-	154	-	-	-	-	-	-	-
mut	-	-	-	333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mxi	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	63	-	-	-	-	205	-	189	-	-	-	-	-	-
P42	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P53	-	478	-	-	-	-	-	-	-	-	-	677	-	-
p107	-	406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	695	-	-
ha-ras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	490	-	-
rip	110	-	-	261	216	-	143	-	-	-	-	-	-	-
Tgf- $\beta$ -r	236	598	315	-	324	543	321	474	363	348	361	672	-	-
ubiquitin	1701	918	1485	2834	2441	1051	1597	747	1001	573	1033	-	989	1043
fib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	504	-	-
fgfr2	143	-	192	712	1021	383	189	315	-	-	-	-	-	-
collagen	311	477	618	299	662	729	608	754	633	501	613	-	-	-
ck-ea	189	532	393	-	262	526	400	556	416	494	409	736	756	645
gapdh	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
trf	-	-	121	150	-	226	134	193	-	-	-	702	-	-

**Tabelle 11** Relative Signalintensitäten der Genexpressionsmuster einzelner boviner Blastozysten. In vivo: In vivo erstellte Blastozysten, IVF-Blastozysten: durch in vitro Fertilisation erstellte Blastozysten, BSA: BSA-supplementierte Medien; ECS: ECS-supplementierte Medien, -: die relative Signalintensität lag unter dem für den entsprechenden Array berechneten Cutoff-Value.

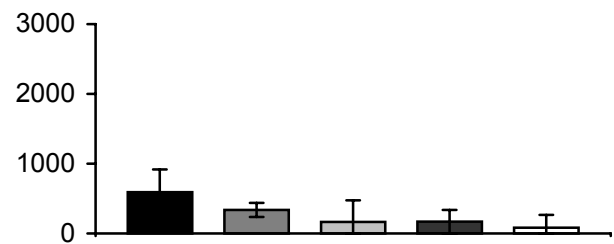
Sonde	In Vivo		NT-Blastozysten			Parth. Blastozysten		
	I	II	I	II	III	I	II	III
apaf1	360	823	337	169	-	-	248	-
apc	61	-	-	-	-	-	-	-
atm	87	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -actin	1899	840	2304	931	605	-	896	1035
bad	103	-	-	-	-	-	-	-
bax	82	-	249	-	695	571	-	332
e-cad	-	-	-	-	663	593	-	-
casp2	-	-	-	-	643	581	-	-
casp3	424	756	104	890	849	574	893	730
casp8	55	-	-	-	-	-	-	347
cdc2	111	-	-	-	-	-	-	-
cdk4	212	-	106	243	-	-	-	251
cycB	181	-	-	-	-	-	-	-
cycD1	241	-	112	342	-	-	-	-
daxx	451	-	509	281	-	-	-	-
erbA	377	378	511	388	-	-	327	444
fas-ag	81	-	130	196	-	-	-	-
mdm2	2087	-	417	1367	1076	662	1600	407
miz1	190	-	-	-	-	-	-	-
mxi	69	-	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	-	-	653	516	-	-
P21	63	-	-	191	-	-	-	250
P42	65	-	-	-	-	-	-	-
P53	-	478	-	-	683	-	-	-
p107	-	406	-	-	630	602	-	-
ha-ras	-	-	-	-	-	547	-	-
rip	110	-	188	-	-	-	-	-
tgf- $\beta$ -r	236	598	142	652	628	655	499	601
ubiquitin	1701	918	1614	668	515	-	304	1623
fgfr2	143	-	-	-	-	-	272	-
collagen	311	477	367	683	-	-	451	400
ck-ea	189	532	138	487	525	740	452	299
gapdh	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
trf	-	-	-	210	549	665	238	258

**Tabelle 12** Relative Signalintensitäten der Genexpressionsmuster einzelner boviner Blastozysten. In vivo: In vivo erstellte Blastozysten. NT-Blastozysten: durch Kerntransfer erstellte Blastozysten, Parth. Blastozysten: parthenogenetische Blastozysten, -: die relative Signalintensität lag unter dem für den entsprechenden Array berechneten Cutoff-Value.

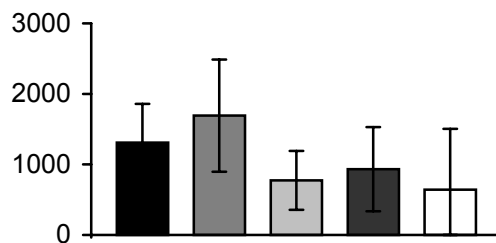
Die relativen Signalwerte einiger ausgewählter cDNA-Sonden wurden in den Abbildungen 44 bis 49 grafisch dargestellt. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Signalwerte der einzelnen Blastozystengruppen. Für alle Abbildungen gilt der folgende Farbcode:



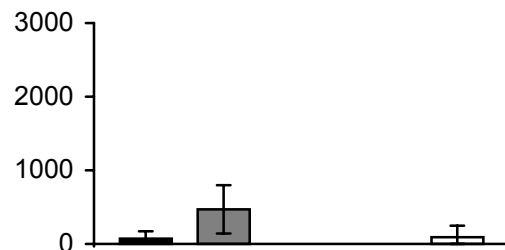
**Abbildung 44** Relative Signalwerte der  $\beta$ -actin cDNA-Sonde



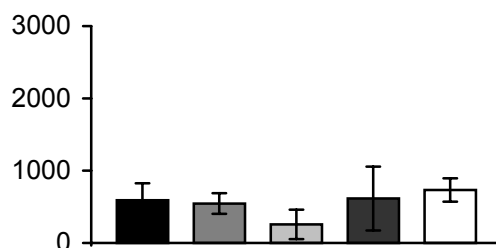
**Abbildung 47** Relative Signalwerte der apaf1 cDNA-Sonde



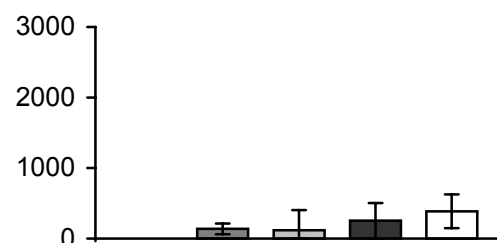
**Abbildung 45** Relative Signalwerte der ubiquitin cDNA-Sonde



**Abbildung 48** Relative Signalwerte der fgfr2-IIIc cDNA-Sonde



**Abbildung 46** Relative Signalwerte der caspase3 cDNA-Sonde



**Abbildung 49** Relative Signalwerte der transferrin cDNA-Sonde

Der Schwerpunkt dieses Versuchs lag in der Beurteilung der Genexpression von Blastozysten aus verschiedenen In vitro-Produktionssystemen. In Tabelle 13 sind die Mittelwerte (MW) der Signalstärken mit deren Standardabweichungen (SD) für die aus dem IVF-BSA- und dem IVF-ECS-System stammenden Blastozysten angegeben. Weiterhin wurden die Variationskoeffizienten (VK) berechnet.

Sonde	MW±SD <sub>IVF-BSA</sub>	MW±SD <sub>IVF-ECS</sub>	VK <sub>IVF-BSA</sub> (%)	VK <sub>IVF-ECS</sub> (%)
apaf1	338±101	165±311	30	188
atm	132±112	-	85	0
β-actin	1989±820	1076±435	41	40
bad	150±139	79±121	92	153
bax	136±209	227±275	154	121
e-cad	-	109±266	0	243
casp3	546±144	258±205	26	79
casp8	38±90	-	238	0
cdc2	166±143	-	86	0
cdk4	302±99	83±127	33	153
cycB	176±147	-	83	0
cycD1	513±204	209±322	40	154
daxx	800±432	189±291	54	154
e2f5	31±74	-	237	0
erbA	636±140	288±315	22	109
fas-ag	241±68	188±233	28	124
mdm2	1621±437	775±592	27	76
miz1	135±137	-	101	0
mut	56±136	-	241	0
p21	66±101	-	153	0
p53	-	114±276	0	243
p107	-	117±283	0	243
rasH	-	82±200	0	242
rip	104±119	-	114	0
tgf-β-r	330±187	291±256	57	88
ubiquitin	1693±803	773±418	47	54
fib	-	85±205	0	242
fgfr2-IIIc	469±332	-	71	0
collagen	612±164	292±322	27	110
ck-ea	356±203	576±157	57	27
gapdh	1000±0	1000±0	0	0
trf	137±77	118±286	56	243

**Tabelle 13** Mittelwerte der Signalintensitäten (MW), deren Standardabweichungen (SD) und Variationskoeffizienten (VK) von cDNA-Sonden in den untersuchten IVF-BSA- und IVF-ECS-Blastozysten. -: in allen untersuchten Blastozysten dieser Gruppe negativ.

Aus Tabelle 13 lässt sich entnehmen, dass die aus dem BSA-System stammenden Blastozysten insgesamt eine geringere Variabilität in der Expression der einzelnen Transkripte aufwiesen als die Vergleichsgruppe aus dem ECS-System.



Acht der 32 dargestellten cDNA-Sonden lieferten nur bei jeweils einer der zwölf IVF-Blastozysten ein positives Signal. Dies betraf die cDNA-Sonden für e-cadherin, caspase8, e2f5, mut, p53, p107, rasH und fibronectin.

Sechzehn der cDNA-Sonden wurden bei Blastozysten aus beiden Gruppen als positiv klassifiziert. Die durchschnittliche Signalstärke in den einzelnen Gruppen war jedoch bei einzelnen dieser cDNA-Sonden durchaus unterschiedlich.

Sechs der dargestellten Sonden schließlich lieferten bei mehr als der Hälfte der Blastozysten einer Gruppe ein positives Signal, während sie in der jeweils anderen Gruppe negativ waren.

Im Folgenden sollen einige der Sonden, die unterschiedliche Signale in beiden Blastozystengruppen ergaben, detaillierter beschrieben werden:

Die Sonde für apaf1 ergab bei allen IVF-BSA-Blastozysten positive, wenn auch niedrige Signalwerte. Im Gegensatz dazu war sie nur in zwei Blastozysten der ECS-Gruppe positiv. Einer dieser beiden Werte lag dabei genau doppelt so hoch wie die durchschnittliche Signalstärke in der IVF-BSA-Gruppe.

Die atm-cDNA-Sonde lieferte in vier der IVF-BSA-Blastozysten schwache bis mäßige Signalwerte, war jedoch in allen IVF-ECS-Blastozysten negativ.

Die  $\beta$ -actin-Sonde lieferte in den IVF-ECS-Blastozysten im Durchschnitt deutlich schwächere Signalwerte als in den IVF-BSA-Blastozysten. Diese Sonde wies in beiden Gruppen einen fast identischen Variationskoeffizienten von etwa 40 auf.

Die cdc2-Sonde lieferte in vier BSA-Blastozysten positive Signale, war jedoch in allen ECS-Blastozysten negativ.

Die cdk4-Sonde lieferte in allen BSA-Blastozysten positive Signale mit geringer Streuung, bei den ECS-Blastozysten ergaben vier kein positives Signal, während zwei ein sehr ähnliches Signal lieferten.

Die cycB-Sonde war nur in BSA-Blastozysten positiv. Die CyclinD1-Sonde wurde in allen BSA-Blastozysten, aber nur in zwei ECS-Blastozysten positiv bewertet.

Die erbA-Sonde lieferte in allen BSA-Blastozysten positive Werte, jedoch nur in drei der ECS-Blastozysten.

Die mdm2-Sonde ergab in allen BSA-Blastozysten starke Signalwerte. In der ECS-Gruppe wiesen nur zwei der untersuchten Blastozysten starke Signalwerte auf, während drei weitere nur mäßige Signalwerte lieferten und bei einer Blastozyste diese Sonde negativ war.

Die fgfr2 IIIc-Sonde lieferte in allen BSA-Blastozysten mäßig bis stark positive Signalwerte, während sie in allen ECS-Blastozysten negativ blieb.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methodische Aspekte der cDNA-Array-Technologie beim Nachweis der mRNA-Expression in präimplantatorischen Säugerembryonen**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, erstmalig Genexpressionsprofile aus präimplantatorischen Embryonen von Maus und Rind über cDNA-Arrays zu erstellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine reproduzierbare semiquantitative Erfassung zahlreicher Transkripte in präimplantatorischen Embryonen von Maus und Rind mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie nach vorhergehender mRNA-Amplifikation möglich ist. Die relativen Mengenverhältnisse der untersuchten mRNA-Spezies zueinander blieben während der globalen Amplifikation durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methodik weitgehend erhalten. Der entwickelte methodische Ansatz bietet eine Fülle von Anwendungsmöglichkeiten, von denen in der vorliegenden Arbeit die Erstellung von Genexpressionsprofilen aus murinen Einzelblastozysten, von verschiedenen murinen Embryonalstadien und von bovinen Einzelblastozysten unterschiedlicher Herkunft demonstriert wurden.

Zum heutigen Zeitpunkt existiert bereits eine Vielzahl von Strategien zur Amplifikation sehr kleiner mRNA-Ausgangsmengen für die cDNA-Array-Analyse. So demonstrierten SALUNGA et al. (1999), dass es möglich ist, durch T7-Amplifikation mRNA-Extrakte aus Zellteilen, die mittels Laser Capture Microdissection aus Gewebepreparaten isoliert wurden, über cDNA-Arrays zu analysieren. Die eingesetzte Menge an Zellmaterial entsprach dabei etwa 500 einzelnen Zellen. Bereits auf dem Markt befinden sich Reaktions-Kits zur mRNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR. Das von der Fa. Clontech vertriebene SMART-System beinhaltet eine derartige Technologie. Die Untergrenze für deren Anwendung wird vom Hersteller mit etwa 10ng Gesamt-RNA angegeben.

Da Zellzahl bzw. RNA-Gehalt von präimplantatorischen Säugerembryonen deutlich unter der Grenze der für die existierenden Verfahren nötigen Ausgangsmengen liegen (PIKO und CLEGG, 1982; BILODEAU-GOESELS und SCHULTZ, 1997), erforderte die cDNA-Array-Analyse einzelner präimplantatorischer Embryonen eine deutliche Steigerung der Leistungsfähigkeit der bekannten Amplifikationsverfahren. Eine solche Steigerung bedeutet für die T7-Amplifikation die Durchführung zusätzlicher Amplifikationszyklen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Durchführung eines Zyklus etwa 12 Stunden in Anspruch nimmt und in der Arbeit von SALUNGA

et al. (1999) bereits 3 Zyklen zur Amplifikation von mRNA-Extrakten aus etwa 500 Zellen benötigt wurden, wurde diese Möglichkeit wegen des damit verbundenen hohen Arbeits- und Zeitaufwands als nicht praktikabel angesehen.

Auch für die globale PCR bedeutet eine Steigerung der Amplifikationsleistung in der Regel eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl. Dies ist nicht wünschenswert, da bei hoher Zyklenzahl in der PCR die Gefahr besteht, die der linearen Amplifikationsphase folgende Plateauphase zu erreichen, was die Mengenverhältnisse der einzelnen Amplicons zueinander verzerren kann (ECKERT und KUNKEL, 1991; SALOMON, 1995b).

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit die Kombination beider Verfahren gewählt, d.h. die Konvertierung der extrahierten mRNA in cDNA, die mittels einer globalen PCR voramplifiziert werden konnte, und der Einsatz der voramplifizierten cDNA als Template in einer T7-IVT-Reaktion. Damit konnte die Anzahl der Zyklen in der globalen PCR auf 25 begrenzt werden. Ebenso war eine Beschränkung auf einen IVT-Amplifikationszyklus möglich, was im Vergleich zu mehreren IVT-Reaktionsdurchläufen eine deutliche Zeit-, Arbeits- und Kostenersparnis darstellt.

Der Schlüssel zur globalen Amplifikation eines mRNA-Extraktes liegt in der quantitativen Konvertierung der mRNA in cDNA-Moleküle, die an ihren Enden universelle Priming-Sequenzen aufweisen und somit einer globalen PCR zugänglich sind. Zum Erreichen dieses Zieles sind verschiedene Strategien denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Arbitrary-Primings der Zweitstrangsynthese gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass mRNA-Präparationen aus einzelnen präimplantatorischen Embryonen mit dieser Methode reproduzierbar amplifiziert werden konnten. Die separate Amplifikation mehrerer Aliquots aus dem gleichen Ausgangsmaterial ergab neben einem gut reproduzierbaren cDNA-Array-Signalmuster auch eine reproduzierbare Größenverteilung der erzeugten Amplicons.

Die ebenfalls getestete SMART-Technologie lieferte bei der Amplifikation der verwendeten mRNA-Extrakte eine geringere maximale Fragmentlänge als das Arbitrary Priming. Die SMART-Technologie reichert voll durchgeschriebene cDNAs an, da die verwendete reverse Transkriptase einzelne Desoxyribonukleotide bevorzugt an überhangsfreien "blunt"-Enden von DNA-RNA-Hybriden oder 3'-Überhängen anhängt, während dieser Mechanismus bei 5'-Überhängen bedeutend weniger effizient abläuft (ZHU et al., 2001). Wenn bei der reversen Transkription die quantitative Durchschrift der Template RNA-Moleküle nicht erreicht wird, führt dies dementsprechend zu einem Verlust nur teilweise durchgeschriebener Sequenzen. Die Effizienz, mit der eine bestimmte mRNA-Sequenz während der RT-Reaktion von

der reversen Transkriptase vollständig durchgeschrieben wird, hängt unter anderem von Länge und Nukleotidfolge dieser Sequenz ab. Dies führt dazu, dass die Repräsentation dieser mRNA-Sequenz im SMART-Amplifikat ebenfalls von diesen Faktoren abhängig ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mRNA-Amplifikationsstrategie zu entwickeln, deren Effizienz vernachlässigbar gering oder gar nicht von Länge und Nukleotidfolge der einzelnen mRNA-Sequenzen abhängt. Die Effizienz der vollständigen Durchschrift einzelner mRNA-Sequenzen ist einer experimentellen Manipulation jedoch nicht gut zugänglich. Daher erschien eine Strategie, deren Erfolg nicht von einer vollständigen Durchschrift der Template-Moleküle abhängt, zum Erreichen dieses Zieles besser geeignet. Eine solche Strategie stellt das Arbitrary-Priming der Zweitstrangsynthese dar. Durch die Verwendung von DOP als Primer der Zweitstrangsynthese konnte außerdem eine im Vergleich zu den anderen getesteten Systemen höhere maximale Fragmentlänge der in der globalen PCR amplifizierten cDNAs erreicht werden.

Durch die Versuche zum Vergleich von Arrays nicht amplifizierter mRNAs mit Arrays amplifizierter RNA-Präparationen konnte nachgewiesen werden, dass die verwendete Technologie in der Lage ist, die meisten der in den Array cDNA-Sonden enthaltenen Sequenzen korrekt zu konvertieren und zu amplifizieren. Dies lässt den Schluss zu, dass die Amplifikation der betrachteten Transkripte mit der hier entwickelten Methodik mit annähernd identischer Effizienz verläuft, was Voraussetzung für die Erhaltung der Mengenverhältnisse der einzelnen mRNA-Spezies zueinander ist. Für die Zweitstrangsynthese bedeutet das, dass das DOP-Priming der cDNAs der betrachteten Transkripte mit annähernd identischer Effizienz ablaufen muss.

Dies ist umso bemerkenswerter, als dass es eine Vielzahl von mRNAs gibt, die das entsprechende 3'-DOP-Hexamere gar nicht enthalten und somit einem DOP-Priming theoretisch gar nicht zugänglich sein dürften. Dies ist zum Beispiel für die transferrin-mRNA, aus der die entsprechende Array-Sonde kloniert wurde, der Fall. Es handelt sich hierbei um eine 393 Basen lange mRNA (Gen-Bank Accession-#: J03299), die keine 5'-ATG TGG-3' Sequenz aufweist. Die Zielsequenz dieser cDNA-Sonde wurde jedoch durch das entwickelte Amplifikationsverfahren korrekt amplifiziert, was im Vergleich nicht amplifizierter und amplifizierter Nieren-RNA-Präparationen belegt werden konnte. Dementsprechend müssen die amplifizierten Sequenzen, die an die transferrin-cDNA-Sonde auf dem Array gebunden haben, auf anderem Wege als durch ein spezifisches Priming der DOP Zielsequenz 5'-ATG TGG-3' entstanden sein.

Eine mögliche Erklärung liefert die Architektur des DOP in Verbindung mit der verwendeten niedrigen Annealing Temperatur bei der Zweitstrangsynthese. Das 3'-Ende des DOP ist durch seinen hohen G-Anteil ausgesprochen "klebrig" (DELIDOW et al., 1996). Es kann daher vermutlich neben exakt komplementären Sequenzen bei niedrigen Temperaturen auch noch leicht variierende Sequenzen binden, wie beispielsweise 5'-ATC TGG-3', welche sich bei der transferrin-mRNA sehr nah an deren 5'-Ende befindet. Derartige Sequenzen, die von der DOP 3'-Sequenz in nur einem Nukleotid abweichen, finden sich bei fast allen mRNAs aus denen im Rahmen dieser Arbeit cDNA-Sonden für die verwendeten Arrays kloniert wurden.

Aus den Ergebnissen der Experimente lässt sich ableiten, dass die Verwendung von DOP bei einer niedrigen Annealingtemperatur offenbar ein Weg ist, um an einer Vielzahl von Erststrang-cDNAs mit annähernd gleicher Effizienz einen zweiten Strang zu synthetisieren.

Das verwendete Amplifikationsprotokoll lieferte aus einzelnen murinen oder bovinen Blastozysten, die zwischen etwa 1,5ng und 5ng Gesamt-mRNA enthalten (PIKO und CLEGG, 1982; BILODEAU-GOESSELS und SCHULTZ, 1997), etwa 10-15µg aRNA. Das Protokoll des Herstellers des zur T7-Amplifikation der voramplifizierten cDNA verwendeten Reaktionskits wurde dahingehend verändert, dass eine reduzierte Menge an Nukleotidtriphosphaten eingesetzt wurde. Für die Array-Hybridisierung wurde entsprechend jeweils nur ein kleiner Teil der erzeugten aRNA benötigt, was vermuten lässt, dass das System mit der Produktion von aRNA aus mRNA-Präparationen einzelner muriner oder boviner Blastozysten keineswegs an der Grenze seiner Leistungsfähigkeit stehen dürfte, sondern dass diese z.B. durch die Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls zur T7-Amplifikation weiter gesteigert werden kann. Die Verwendung eines modernen cDNA-Array-Systems und hier vor allem der Einsatz eines nicht porösen Trägermaterials, das die Reduktion des eingesetzten Volumens des Hybridisierungspuffers und damit eine Steigerung der Konzentration der Zielsequenzen im Hybridisierungspuffer ermöglicht, ist eine weitere Möglichkeit, die Sensitivität des Verfahrens noch weiter zu steigern (NAKANISHI et al., 2001).

Die Ergebnisse des Vergleichs der Genexpressionsprofile verschiedener muriner Gewebe ergaben, dass eine unterschiedliche mRNA-Expression in murinen Gewebeproben sich in deutlich unterschiedlichen Signalprofilen der aus ihnen erstellten Arrays niederschlägt. Das verwendete cDNA-Array-System kann damit als geeignet zur Analyse von RNA-Präparationen im Hinblick auf die Detektion differentiell exprimierter Transkripte angesehen werden. Die erzeugten cDNA-Array-

Bilder bestätigen die von anderen Arbeitsgruppen publizierten Daten zur Genexpression in Leber und Niere (MASER und CALVET, 1995; XU et al., 2001b). So lieferten die Sonden für  $\beta$ -actin, ubiquitin und gapdh in beiden Geweben etwa gleich starke Signale, während cDNA-Sonden für leberspezifische Transkripte wie albumin, tdo und transferrin starke Signale in den Leber-Arrays lieferten, jedoch in den Nieren-Arrays nur schwache oder negative Signale gaben. Die starken Signale der 18S rRNA-Sonde deuteten auf eine Kontamination der verwendeten mRNA-Präparationen mit ribosomalen RNAs hin.

Bei der cDNA-Array-Analyse amplifizierter RNA-Präparationen gibt es eine ganze Reihe von Faktoren, die als Ursache von Datenvariabilität in Frage kommen. Die Evaluationsversuche ergaben, dass Bildgebung, Markierung und Hybridisierung kaum zur Variabilität der Daten im verwendeten System beitrugen. Die mRNA-Amplifikation war sowohl im homologen als auch im heterologen System sehr gut reproduzierbar, was durch die Korrelationskoeffizienten von  $0,979 \pm 0,01$  bei homologer Hybridisierung und von  $0,968 \pm 0,01$  bei heterologer Hybridisierung unterstrichen wird. Die vergleichende cDNA-Array-Analyse nicht amplifizierter mRNAs mit aus der gleichen Quelle erzeugten aRNAs wies darauf hin, dass es durch die Amplifikation zu leichten Verschiebungen der im Ausgangsmaterial vorhandenen Mengenverhältnisse der einzelnen mRNA-Sequenzen zueinander kommt. Der ermittelte Korrelationskoeffizient von  $0,950 \pm 0,02$  belegte jedoch, dass das Ausmaß dieser Verschiebungen nur sehr gering war. Die Datensätze der einzelnen aRNA-Präparationen waren untereinander mit einem mittleren Koeffizienten von  $0,975 \pm 0,01$  korreliert, was bedeutet, dass die Verschiebung der Mengenverhältnisse selbst ein reproduzierbarer Prozess ist. Dies macht die entwickelte Amplifikationsprozedur für die vergleichende Analyse einzelner Embryonen oder anderer kleiner klinischer oder biologischer Proben sehr wertvoll.

Vergleiche der cDNA-Array-Daten nicht amplifizierter mRNAs mit aus derselben Quelle amplifizierten aRNA-Präparationen ergaben, dass cDNA-Sonden, die Sequenzen, die weit vom 3'-Ende der korrespondierenden mRNA entfernt sind, repräsentieren, nicht mit der Amplifikationsprozedur kompatibel sind, da sie bei der cDNA-Array-Analyse amplifizierter RNA-Präparationen falsch negative Signale erzeugten. Diese Beobachtung reflektiert die Annahme, dass vom 3'-Ende der mRNAs entfernte Sequenzen durch das Arbitrary Priming der Zweitstrangsynthese im RNA-Amplifikat unterrepräsentiert sind. Dieses Phänomen wurde bei vier cDNA-Sonden beobachtet.

Die cDNA-Sonde mit der geringsten Distanz zwischen Sondensequenz und Poly-(A)-Sequenz der entsprechenden mRNA unter den als nicht mit der Amplifikationsprozedur kompatibel eingestuften cDNA-Sequenzen war die sdh-Sonde. Hier betrug diese Distanz 1228 Nukleotide. Interessanterweise gibt es aber auch cDNA-Sonden, deren Zielsequenzen trotz einer ähnlichen Distanz zur Poly-(A)-Sequenz der korrespondierenden mRNA korrekt amplifiziert werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass keine für alle mRNAs gültige kritische Distanz existiert, von der ab sicher mit einem Verlust der entsprechenden Sequenzen in den erzeugten aRNA-Präparationen gerechnet werden kann, sondern dass die Länge der im Amplifikat darstellbaren aRNA-Fragmente für jede mRNA-Sequenz spezifisch ist. Die Verteilung potentieller DOP Priming-Sites in einer mRNA-Sequenz dürfte die Länge der aus ihr amplifizierbaren aRNA-Fragmente im Amplifikat entscheidend beeinflussen.

Zur Klärung dieses Phänomens sind weitere Experimente erforderlich. Aus den vorliegenden Daten kann jedoch abgeleitet werden, dass bei der Auswahl der cDNA-Sonden für Arrays, mit denen auf die vorgestellte Weise amplifizierte aRNA-Präparationen untersucht werden sollen, darauf zu achten ist, dass die eingesetzten cDNA-Sonden nicht zu weit von der poly-(A)-Sequenz der jeweiligen mRNA entfernte Sequenzen repräsentieren. Eine mRNA-Sequenzanalyse im Hinblick auf die Positionen möglicher Zielsequenzen des verwendeten Zweitstrangsynthese-Primers kann bei der Wahl geeigneter Sondensequenzen ebenfalls wertvolle Hilfestellung geben.

Ein großes Problem der Genexpressionanalyse biologischer Proben von anderen Säugern als Mensch, Maus und Ratte, für die bereits eine Vielzahl von cDNA-Arrays auf dem Markt sind, stellt die bisher nur lückenhaft aufgeklärte genomische DNA-Sequenz dieser Spezies dar. So ist zum heutigen Zeitpunkt nur ein relativ kleiner Teil des bovinen oder porcinen Genoms sequenziert, was die Erstellung von cDNA-Arrays mit bovinen oder porcinen Sonden stark erschwert. In Anbetracht des hohen Konservierungsgrades zahlreicher translaterter mRNA-Sequenzen innerhalb der verschiedenen Säugerspezies (ARPAGAUS et al., 1991) erscheint die Analyse von RNA-Präparationen nicht muriner Herkunft mit Arrays, die murine oder humane cDNA-Sonden enthalten, als gangbarer Weg zur Erstellung von Genexpressionsprofilen. Die Evaluationsversuche zur heterologen Hybridisierung ergaben, dass sich die aus derartigen Experimenten erhaltenen Daten gut reproduzieren lassen.

Die Hybridisierung heterologer Nukleinsäurestränge ist mit einer verminderten Hybridisierungseffizienz verbunden. Daher können bei der cDNA-Array-Analyse



heterologer RNA-Präparationen Signale zum Teil oder ganz verloren gehen. Dies kann durch eine herabgesetzte Stringenz von Hybridisierungs- und Waschparametern umgangen werden. Ein solches Vorgehen kann jedoch durch Kreuzhybridisierung zu falsch positiven Signalen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Weg der Beibehaltung stringenter Wasch- und Hybridisierungsschritte gewählt. Aus den Resultaten der Versuche zur heterologen Hybridisierung konnte nicht abgeleitet werden, ob und welche der verwendeten cDNA-Sonden unter den verwendeten Reaktionsparametern in der heterologen Hybridisierung falsch negative Ergebnisse lieferten. Die Effizienz der Hybridisierung von Sonden- und RNA-Strängen ist entscheidend vom Homologiegrad beider Sequenzen abhängig. Aufgrund der festgestellten hohen Reproduzierbarkeit der heterologen Hybridisierung kann jedoch angenommen werden, dass der Grad des Signalverlustes bei der cDNA-Array-Analyse heterologer RNA-Präparationen eine für jede cDNA-Sonde spezifische und bei konstanten Hybridisierungs- und Waschparametern ebenfalls konstante Größe sein dürfte.

Dies bedeutet, dass zwar das Ausmaß des Signalverlustes von cDNA-Sonde zu cDNA-Sonde unterschiedlich ist, jedoch die Werte der gleichen cDNA-Sonde bei der Analyse desselben Amplifikates in verschiedenen Arrays nur im Rahmen der aus der homologen Hybridisierung bekannten Variabilität schwanken. Damit sind die Daten aus der cDNA-Array-Analyse heterologer RNA-Präparationen der gleichen Spezies untereinander ebenso vergleichbar wie die Daten aus der cDNA-Array-Analyse homologer RNA-Präparationen es untereinander sind.

Aus einer negativen cDNA-Sonde bei der Analyse heterologer RNA-Präparationen kann nicht unbedingt der Schluss gezogen werden, dass das entsprechende Transkript nicht vorhanden sei, sondern nur der, dass dieses Transkript mit der gewählten Sonde unter den verwendeten Reaktionsparametern nicht nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu reflektieren Veränderungen in der Signalstärke der positiven Sonden aufgrund der oben angeführten hohen Reproduzierbarkeit der heterologen Hybridisierungsreaktion Veränderungen in der Menge des entsprechenden Targets in der Hybridisierungslösung.

Die obigen Ausführungen zur heterologen Hybridisierung führen zum Einen zu dem Schluss, dass ein Vergleich von cDNA-Array-Daten muriner und boviner Blastozysten aufgrund der unterschiedlichen Hybridisierungseffizienz der jeweiligen Targetmoleküle mit den murinen cDNA-Sonden unzulässig ist. Zum anderen kann aber abgeleitet werden, dass der Vergleich von Arrays boviner Embryonen untereinander zulässig ist.

## **4.2 Genexpressionsanalyse bei murinen Blastozysten**

Die Analyse der Genexpression einzelner Blastozysten und einer Gruppe aus zehn Blastozysten ergab, dass die Menge des eingesetzten Ausgangsmaterials das erzielte Signalmuster auf dem Array nur unwesentlich veränderte.

Die Array-Daten zeigten, dass es eine Gruppe von cDNA-Sonden gibt, die in allen Arrays eine nur geringen Schwankungen unterliegende relative Signalintensität aufwiesen. Dieser Gruppe wurden alle cDNA-Sonden zugeordnet, deren relative Signalintensitäten innerhalb der verschiedenen untersuchten aRNA-Präparationen einen Variationskoeffizienten von weniger als 20 ergaben. Sie umfasst die Sonden für  $\beta$ -actin, cycD1, mdm2, erbA, ubiquitin,  $\text{tgf}\beta$ -r, collagen, caspase3, fas-antigen und ck-endoA. Andererseits gab es eine Gruppe von cDNA-Sonden, deren Variationskoeffizienten mehr als 40 betrug, die jedoch in der Mehrzahl der untersuchten Embryonen positive Signale ergaben. Hierzu zählen cdc2, p21, connexin43, apaf1, mdmx und tefl. Eine dritte Gruppe umfasst jene Sonden, die nur in einzelnen der untersuchten Embryonen ein positives Signal lieferten, wie z.B. atm, bad, bax, cycE, e2f5, max, mxi, p19.

Die erhaltenen Expressionsprofile spiegelten eine Vielzahl von Eigenschaften der Genexpression muriner Blastozysten wider, die weitgehend mit bereits aus anderen Arbeiten vorliegenden, mit anderen methodischen Ansätzen gewonnenen Daten übereinstimmen. So existieren beispielsweise Veröffentlichungen über die Expression von  $\beta$ -actin, gapdh, cyclinE, caspase3,  $\text{tgf}\beta$ -rezeptor, fas-antigen, ck-endoA, fgfr2, connexin43 in murinen Blastozysten (CHOW et al., 2001; DOMASHENKO et al., 1997; EXLEY et al., 1999; HAFFNER-KRAUSZ et al., 1999; HO et al., 1995; KIDDER und WINTERHAGER, 2001; ZIMMERMANN und SCHULTZ, 1994; ZOU et al., 2000).

In den aufgeführten Publikationen wird jedoch jeweils nur einen kleiner Teil der im Array untersuchten Transkripte abgebildet. Die Möglichkeit, mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie komplexe Genexpressionsprofile aus einzelnen Embryonen darzustellen, stellt insofern einen gewaltigen Fortschritt dar.

Die Analyse der Blastozystengruppe lieferte 26 positive cDNA-Sonden. Dieser Wert wurde nur von einer der analysierten Einzelblastozysten erreicht, während die Werte der anderen analysierten Blastozysten deutlich darunter lagen, was durch einen Ausgleich der individuellen Unterschiede in der Genexpression durch die Verwendung einer Embryonengruppe oder aber mit der beginnenden Degradierung der embryonalen mRNA vor deren Isolierung erklärt werden kann. Diese könnte

beispielsweise beim Auftauen der eingefrorenen Embryonen in den lysierten Zellen stattgefunden haben, bevor die endogenen RNasen deaktiviert werden konnten. Eine solche RNA-Degradierung führt bei der Aufreinigung der mRNA aus Einzelembryonen möglicherweise eher zu einem Verlust gerade von mRNA-Spezies, die nur in geringer Kopienzahl pro Zelle vorliegen, als bei der mRNA-Präparation aus Embryonengruppen. Diese Aussagen sollten aber immer vor dem Hintergrund der relativ kleinen Zahl untersuchter Embryonen und vor allem der Existenz von Daten aus nur einer Embryonengruppe gesehen werden.

Unterschiede in der Expression apoptoserelevanter Gene wie *mdmx* und *apaf1* deuten auf einen unterschiedlichen Apoptose-Status der einzelnen Blastozysten hin. Die beiden Blastozysten mit den höchsten relativen *apaf1*-Signalwerten wiesen gleichzeitig als einzige kein positives Signal in der *mdmx*-Sonde auf. Dies deutet auf eine entgegengesetzte Regulation des pro-apoptotischen *apaf1*- und des anti-apoptotischen *mdmx*-Gens hin. Die relativ konstante Expression des ebenfalls apoptoserelevanten *caspase3*-Transkriptes steht dabei mit der Tatsache im Einklang, dass die Aktivität dieses Proteins posttranslational reguliert wird (COHEN, 1997).

#### **4.3 Genexpressionsanalyse embryonaler Entwicklungsstadien der Maus**

Die Analyse von kleinen Gruppen embryonaler Entwicklungsstadien der Maus ergab hingegen deutlich größere Schwankungen in den relativen Signalintensitäten einzelner Sonden als die Analyse einzelner Blastozysten. Die Darstellung der relativen Signalintensitäten der einzelnen Sonden in Säulendiagrammen lieferte einen Eindruck über Schwankungen in den relativen Signalintensitäten entlang der Zeitachse der Embryonalentwicklung. Einige der erhaltenen Signalverläufe reflektieren bereits in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen veröffentlichte Ergebnisse (DOMASHENKO et al., 1997; GIEBELHAUS et al., 1983; NISSON et al., 1989).

So demonstrierten DOMASHENKO et al. (1997), dass die relative Häufigkeit von  $\beta$ -actin Transkripten vom Entwicklungsstadium der Oozyte bis hin zur Blastozyste stark ansteigt. NISSON et al. (1989) wiesen nach, dass die Menge an  $\beta$ -actin mRNA in murinen Blastozysten deutlich höher ist als in Achtzellstadien. GIEBELHAUS et al. (1983) ermittelten weiterhin, dass Blastozysten eine etwa 4-5mal höhere relative Häufigkeit von  $\beta$ -actin-mRNA aufwiesen als Achtzellstadien. In der vorliegenden cDNA-Array-Analyse wurde in Oozyten ein schwaches  $\beta$ -actin Signal detektiert. Die relative Signalintensität der  $\beta$ -actin-Sonde lag bei den Zweizellern etwa viermal so hoch und bei den Blastozysten etwa siebeneinhalb mal so hoch wie bei den Oozyten,

was die obigen Befunde bestätigt und die Zuverlässigkeit des entwickelten methodischen Ansatzes unterstreicht.

DOMASHENKO et al. (1997) konnten weiterhin nachweisen, dass max-Transkripte in Oozyten und Blastozysten nachweisbar waren, deren relative Häufigkeit aber im späten Zweizellstadium deutlich unter denen der anderen beiden Stadien lag. In der cDNA-Array-Analyse lag das Signal der Zweizellstadien unter dem ermittelten Cutoff-Wert, während in Oozyten und Blastozysten relativ schwache Signale detektiert werden konnten. Es wurde weiterhin belegt, dass die relative Häufigkeit von cyclinE-Transkripten in Oozyten sehr gering war, im Zweizellstadium stark anstieg und im Blastozystenstadium fast wieder auf den Ausgangswert absank (DOMASHENKO et al. 1997). In der cDNA-Array-Analyse konnte in Zweizellern ein moderates cyclinE-Signal detektiert werden, während die Signale dieser Sonde bei den anderen Entwicklungsstadien unter den berechneten Cutoff-Werten lagen. Auch diese Resultate bestätigen die Zuverlässigkeit der entwickelten Strategie zur cDNA-Array-Analyse präimplantatorischer Embryonen.

NISSON et al. (1989) und GIEBELHAUS et al. (1983) demonstrierten, dass murine Blastozysten cytokeratin endoA mRNA exprimieren. Die relative Häufigkeit von endoA Transkripten wurde um einen Faktor 10-20 höher als die von  $\beta$ -actin-Transkripten eingeschätzt. In der cDNA-Array-Analyse muriner Blastozysten war die relative Signalintensität der  $\beta$ -actin-Sonde nur um etwa einen Faktor 2 größer als die der endoA-Sonde.

Ein wichtiger Gesichtspunkt ist, dass der Zusammenhang zwischen relativer Signalintensität und Menge der vorhandenen Zielsequenz der einzelnen cDNA-Sonden sehr stark durch die spezifische Hybridisierungseffizienz von cDNA-Sonde und Zielsequenz beeinflusst wird (SCHENA, 1999). Daher erscheint ein Vergleich der Signalintensitäten verschiedener cDNA-Sonden eines Arrays nicht zulässig. Der Vergleich der normalisierten relativen Signalintensitäten der gleichen cDNA-Sonde zweier unter den gleichen Bedingungen hybridisierter und gewaschener cDNA-Arrays ist dagegen zulässig, da für diese eine konstante Hybridisierungseffizienz der jeweiligen cDNA-Sonden mit ihren Zielsequenzen angenommen werden kann (SCHENA, 1999). Dies gilt natürlich nur für die Analyse von Zielsequenzen mit identischem Homologiegrad zu den verwendeten cDNA-Sonden.

Das Einsetzen der Transkriptionsaktivität während des Zweizellstadiums der murinen Embryonalentwicklung (PIKO und CLEGG, 1982) wurde durch einige der erhaltenen Datenreihen einzelner cDNA-Sonden bei der cDNA-Array-Analyse verschiedener

muriner Embryonalstadien bestätigt. So lieferte beispielsweise die  $\beta$ -actin-Sonde ein starkes Signal in Oozyten, die von Kumuluszellen umgeben waren, während sie bei entkumulierten Oozyten einen etwa sechsmal niedrigeren Wert aufwies. Dies deutete auf eine starke Expression von  $\beta$ -actin-mRNA in den Kumuluszellen hin, der eine relativ schwache Expression in den Oozyten gegenübersteht. Das starke Signal dieser Sonde bei den Zweizellern ließ auf die einsetzende Transkription der Zielsequenz schließen. Bei den untersuchten Blastozysten schließlich war der Wert der  $\beta$ -actin-Sonde gegenüber dem bei Zweizellern noch weiter erhöht.

Ein derartiger Verlauf –Absinken oder Gleichbleiben der relativen Signalintensität bei Oozyten mit Kumulus zu Oozyten ohne Kumulus und dann ein erneuter Anstieg bei Zweizell- oder Blastozystenstadien– ließ sich bei einer Reihe von cDNA-Sonden beobachten. Hierzu zählen die Sonden für  $\beta$ -actin, p21, I-myc, p107, rasH, tefl, fgfr2 IIIc, collagen und cytokeratin endoA.

Aus dem Vergleich von Oozyten mit und ohne Kumulus kann abgeleitet werden, welcher Anteil der detektierten Zielnukleinsäure von den Kumuluszellen und welcher von den Oozyten stammt. So ließen z.B. die Werte der p21-Sonde darauf schließen, dass dieses Transkript stark in Kumuluszellen und schwach in Oozyten exprimiert ist. P21 führt bei starker Expression zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (BOULAIRE et al., 2000; GARTEL et al., 1996; ROUSSEAU et al., 1999).

Auf der anderen Seite gibt es eine Vielzahl von cDNA-Sonden, die in den entkumulierten Oozyten deutlich stärkere relative Signalwerte lieferten als in den nicht entkumulierten. Hierzu zählen beispielsweise apaf1, caspase3, cdk4, cycB, cycD1, daxx, e2f5, erbA, fas-antigen, mdm2, mdmx, tgfb-r, ubiquitin und fgfr2 IIIb. In Anbetracht des geringen mRNA-Gehaltes der Oozyte im Vergleich zu anderen Zellen erscheint es widersprüchlich, in diesen Zellen eine höhere Häufigkeit an mRNA einer Spezies zu finden als in Oozyten mit umgebendem Kumulus (PIKO und CLEGG, 1982). Der beobachtete Effekt kann als eine Verschiebung des Verhältnisses von gapdh-Signalintensität zu den jeweiligen Signalintensitäten der betreffenden cDNA-Sonden aufgefasst werden, was auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden kann. So würde eine in den Kumuluszellen heraufregulierte gapdh-Expression zu einem Absinken der normalisierten Signalintensitäten aller anderen Werte führen. Umgekehrt würde eine im Vergleich zu den Kumuluszellen herunterregulierte gapdh-Expression in den Oozyten zu einem Anstieg der normalisierten Signalintensitäten führen, was letztlich den gleichen Effekt bedeuten würde.

Die Verwendung der Signalwerte der gapdh-cDNA-Sonde als interner Standard in experimentellen Ansätzen zum Vergleich der Genexpression in Kumuluszellen und frühen Embryonen muss daher kritisch diskutiert werden. Möglicherweise ist die Normalisierung der Signalwerte über den gapdh-Wert bei der Analyse so unterschiedlicher Zelltypen wie Oozyten und Kumuluszellen nicht zulässig. Zur Evaluation der Eignung des gapdh-Signalwertes als Standard für die Normalisierung der Expressionsdaten verschiedener Zelltypen sind weitere Experimente nötig.

Weiterhin darf nicht unbeachtet bleiben, dass die obigen Aussagen vor dem Hintergrund nur jeweils einer analysierten Gruppe der jeweiligen Embryonalstadien gemacht wurden. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Schwankungen der Signalintensitäten einzelner cDNA-Sonden auf starken Abweichungen einzelner Mitglieder dieser Gruppen vom "Standard"-Expressionsprofil beruhen.

#### **4.4 Genexpressionsanalyse bei bovinen Blastozysten**

Ziel der In vitro-Produktion boviner Embryonen ist es, qualitativ hochwertige und somit voll entwicklungsfähige Embryonalstadien zu erzeugen. Als Referenz für die Qualität von IVP-Embryonen dienen dabei in vivo erzeugte Embryonen, die meist eine bessere Lebensfähigkeit und ein größeres Potential zur Implantation und korrekten Entwicklung aufweisen als in vitro erzeugte Embryonen (RIZOS et al., 2002; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1998). In der Annahme, dass Lebensfähigkeit und Entwicklungspotential eines Embryos Funktionen der von ihm exprimierten Genprodukte darstellen, können die Genexpressionsprofile in vivo erzeugter Embryonen als Referenz für die aus In vitro-Systemen stammenden Embryonen gelten (WRENZYCKI et al, 1996; FARIN et al., 2001).

Die Analyse einzelner boviner Blastozysten aus verschiedenen Produktionssystemen ergab, dass mit dem verwendeten cDNA-Array-System Unterschiede in den Genexpressionsprofilen der einzelnen Blastozysten reproduzierbar detektiert werden können. Der Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung von Unterschieden der Genexpressionsprofile in vitro produzierter Blastozysten aus verschiedenen Mediensystemen. Das BSA-System enthielt Medien, die mit bovinem Serumalbumin supplementiert wurden, während die Medien des ECS-Systems östrisches Kuhserum als Supplement enthielten. Östrisches Kuhserum enthält zahlreiche Wachstumsfaktoren in von Charge zu Charge stark unterschiedlichen Konzentrationen. Bovines Serumalbumin stellt dagegen eine Proteinpräparation aus bovinem Serum dar, deren Zusammensetzung weniger stark schwankt als die verschiedener ECS-Chargen. Durch die Verwendung von Proteinsupplementen mit semi-definierter Zusammensetzung soll in der In vitro-Produktion von Embryonen

eine konstante Qualität der Kulturmedien erreicht werden, was eine bessere Kontrolle über die Qualität der erstellten Embryonen ermöglicht (WRENZYCKI et al., 1999).

Die analysierten in vivo und in vitro erstellten bovinen Blastozysten wiesen untereinander eine größere Differenz in der Genexpression auf als die untersuchten in vivo erstellten murinen Blastozysten, was auf eine weniger stringente Synchronisation der präimplantatorischen Embryonalentwicklung hinweist, die beim Rind wesentlich länger ist und zeitlich weniger genau reguliert ist als bei der Maus (HOGAN et al., 1986; RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Die Untersuchungen ergaben weiterhin, dass es eine Gruppe von cDNA-Sonden gab, deren Zielsequenzen in nahezu allen untersuchten Blastozysten nachweisbar waren.

Die Beobachtung, dass die Variationskoeffizienten der meisten cDNA-Sonden für die Blastozysten aus dem BSA-System geringer war als die aus dem ECS-System erstellten Blastozysten, lässt auf eine konsistentere Qualität der untersuchten Blastozysten aus dem BSA-System im Vergleich zu denen aus dem ECS-System schließen. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass ECS-supplementierte Medien größeren Schwankungen in der Konzentration z.B. von Wachstumsfaktoren unterliegen als die semi-definierten, mit BSA-supplementierten Medien (KRISHER et al., 1999; LONERGAN et al., 1999).

Eine interessante Beobachtung war, dass die cDNA-Sonde für den fgfr2-Rezeptor in der Spleißvariante IIIc in allen IVF-BSA-Blastozysten positiv, jedoch in allen IVF-ECS-Blastozysten und allen geklonten Blastozysten negativ war. Dies deutet auf eine Regulation der Transkriptionsrate des fgfr2-Gens durch einen Faktor hin, der entweder nur in einem der Medien oder aber in beiden Medien mit einer unterschiedlichen Konzentration vorlag. Eine Beeinflussung der Transkriptionsrate des fgfr2-Gens, dem eine wichtige Rolle in der prä- und postimplantatorischen Entwicklung zugeschrieben wird (ARMAN et al., 1998), durch das gewählte IVP-System wurde bereits von DANIELS et al. (2000) für bovine IVF- und Kerntransferembryonen beschrieben. Von den beiden untersuchten In vivo-Blastozysten lieferte nur eine ein schwaches fgfr2 IIIc-Signal, während die Sonde in der zweiten In vivo-Blastozyste negativ war. Diese zweite Blastozyste zeigte jedoch ein Expressionsprofil, das auf eine p53 vermittelte Apoptose in den Zellen dieses Embryos schließen ließ. Aus den gewonnenen Daten bei In vivo-Blastozysten ist die "normale" Expressionsstärke des fgfr2IIIc-Transkriptes nicht sicher abzuleiten. Damit bleibt unklar, ob die erhöhte fgfr2-Expression in den IVF-BSA-Blastozysten oder die nicht detektierbare fgfr2-Expression in den IVF-ECS-Blastozysten eher dem Status

von In vivo-Blastozysten entsprechen. Weitere Analysen der fgfr2IIc-Expression bei In vivo-Blastozysten sind zur Klärung dieser Fragestellung erforderlich.

Bei weiteren Sonden (u.a. apaf1, cdk4, cycD1, daxx, erbA, fas-antigen und collagen) wurde eine Expression in allen untersuchten IVF-BSA-Blastozysten detektiert, während sie bei der Hälfte oder mehr als der Hälfte der analysierten IVF-ECS-Blastozysten negativ waren. Dies ist ebenfalls ein Indiz für die geringere Variabilität der Genexpression der IVF-BSA-Blastozysten gegenüber solchen aus dem ECS-System. Für die Expression der genannten Transkripte in bovinen Embryonen wurde keine Referenzliteratur gefunden.

Die  $\beta$ -actin-Sonde war in allen untersuchten IVF-Blastozysten positiv und ergab bei fast identischem Variationskoeffizienten in den IVF-BSA-Blastozysten im Durchschnitt ein etwa doppelt so starkes Signal wie in den IVF-ECS-Blastozysten. Dies lässt auf eine Erhöhung der relativen Mengen an  $\beta$ -actin-Transkripten in den IVF-BSA-Blastozysten schließen. Zum Vergleich der relativen Mengen von  $\beta$ -actin-Transkripten in bovinen Blastozysten unterschiedlicher Herkunft wurde ebenfalls keine Referenzliteratur gefunden.

Die Expressionsprofile der geklonten und der parthenogenetischen Blastozysten lieferten ein recht uneinheitliches Bild. Wie bereits oben angeführt, wiesen DANIELS et al. (2000) nach, dass die In vitro-Produktion und die Kerntransfer-Prozedur Auswirkungen auf die fgfr2-Expression in den betreffenden Embryonen haben können. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung bemerkenswert, dass sämtliche Kerntransferembryonen ebenso wie die IVF-ECS-Embryonen eine negative fgfr2 IIIc-cDNA-Sonde aufwiesen. Aufgrund der begrenzten Anzahl von nur jeweils drei untersuchten Blastozysten und großer Schwankungen in der relativen Signalstärke der einzelnen cDNA-Sonden innerhalb der Gruppen erscheint es zu diesem Zeitpunkt nicht sinnvoll, aus den erzeugten Expressionsprofilen Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Expression einzelner Gene durch die Kerntransferprozedur oder die Parthenogenese zu ziehen.

Eine interessante Beobachtung bei der Genexpressionsanalyse boviner Blastozysten war, dass drei der untersuchten Blastozysten (Vivo-I, ECS-IV und NT-III) ein starkes Signal in der cDNA-Sonde für p53 lieferten. In zwei dieser Blastozysten war die mdm2-Sonde negativ, und die apaf1-Werte dieser beiden Blastozysten lagen deutlich über dem Durchschnitt der anderen untersuchten bovinen Blastozysten. Bei diesen drei Blastozysten ergab die cDNA-Sonde des c-myc Repressors p107 starke Signalwerte, die sonst nur noch in einer einzigen anderen bovinen Blastozyste positiv



war. P53 kann verschiedene unabhängige Signaltransduktionswege aktivieren (BARGONETTI und MANFREDI, 2002). So kann es über die Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p21 in den entsprechenden Zellen das Verlassen der G1-Phase des Zellzyklus verhindern und das DNA-Reparatur-Protein GADD45 aktivieren (COX und LANE, 1995). Ferner kann p53 Apoptose in geschädigte Zellen induzieren (BARGONETTI und MANFREDI, 2002). Der Signalweg, über den dies geschieht, ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Regulation der p53-Aktivität erfolgt unter anderem über dessen Antagonisten mdm2 (MOMAND et al., 1992; OLINER et al., 1993; CHEN et al., 1994). Dessen E3-Ubiquitin-Ligasefunktion katalysiert die Ubiquitinierung von P53, wodurch die Degradation des P53-Proteins beschleunigt wird (LANE und HALL, 1997). Weiterhin bindet es direkt an den N-Terminus von p53 und inhibiert so dessen Funktion als Transkriptionsfaktor. Das mdm2-Gen ist eines der Zielgene des aktiven p53-Proteins. Die Interaktion von p53 und mdm2 erfolgt somit über eine negative Rückkoppelung, da eine hohe p53-Aktivität die mdm2-Transkription verstärkt (PICKSLEY und LANE, 1993).

FORTIN et al. (2000) und MORONI et al. (2000) demonstrierten in neuronalen und Tumorzellen, dass das Gen des Apoptose-Protease aktivierenden Faktors-1 (apaf1) eines der Zielgene von p53 ist, und dass dessen Transkriptionsrate mit der p53-Aktivität ansteigt. In den beiden Blastozysten, die ein starkes Signal in der p53-Sonde und kein Signal in der mdm2-Sonde aufwiesen, wurden die mit Abstand stärksten Signale für apaf1 unter den untersuchten Blastozysten detektiert. Aus dem Anstieg der relativen Signalintensität in der p53-Sonde und dem Ausbleiben des mdm2-Signals kann daher eine p53-vermittelte Apoptoseinduktion abgeleitet werden, was im Einklang mit der erhöhten relativen Signalintensität der apaf1-Sonden in den betreffenden Blastozysten steht. Im Gegensatz dazu lieferte die Blastozyste "NT-III" neben dem p53- ein durchschnittliches mdm2-Signal. Für diese Blastozyste kann somit eine p53 vermittelte Apoptoseinduktion nicht abgeleitet werden. Dies wird auch durch die negative apaf1-Sonde im Genexpressionsprofil dieser Blastozyste gestützt.

Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass sich mit Hilfe des hier entwickelten Verfahrens apoptotische Vorgänge in bovinen Blastozysten detektieren lassen. Dabei kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Mechanismus der p53 vermittelten Apoptose bei bovinen Blastozysten dem bereits bei anderen Spezies beschriebenen Mechanismus sehr ähnlich ist. So erscheint eine Ableitung des bovinen mdm2-Genproduktes als p53-Antagonist ebenso wie die des bovinen apaf1-Gens als Zielgen des aktiven bovinen P53

möglich. Diese Aussagen sollten jedoch vor dem Hintergrund der relativ kleinen Zahl untersuchter Blastozysten gesehen werden.

In den letzten Jahren beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Erforschung der Auswirkungen von Kultur- und Produktionssystem auf die Apoptoseraten bei bovinen Embryonen (MAKAREVICH und MARKKULA, 2002; KOLLE et al., 2002; MATWEE et al., 2000; BYRNE et al., 1999; WATSON et al., 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen die Aussage zu, dass durch die cDNA-Array-Analyse nicht nur der apoptotische Status eines Embryos sondern auch –unter Verwendung entsprechender cDNA-Sonden- der jeweilige molekulare Auslösemechanismus der Apoptose identifiziert werden kann.

#### **4.5 Grenzen und Perspektiven der cDNA-Array-Analyse präimplantatorischer Embryonen**

Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Daten erlauben Rückschlüsse auf den transkriptionellen und physiologischen Status präimplantatorischer Embryonen. Es sei aber bemerkt, dass es in vielen Fällen unklar ist, inwieweit sich eine Schwankung der relativen Transkriptmenge auf den physiologischen Status eines Embryos auswirkt. In Anbetracht zahlreicher Mechanismen zur posttranskriptionellen und posttranslationalen Regulation der Genfunktion ist ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Transkriptionsrate und der Genfunktion nicht in jedem Falle zu erwarten. Auf der anderen Seite können jedoch bereits minimale Veränderungen der Expressionsstärke eines Transkriptes deutliche physiologische Veränderungen mit sich bringen (YAN et al., 2002).

Weiterhin ist darauf zu verweisen, dass eine Reihe von Pseudogenen existiert, von denen zu funktionellen Transkripten homologe, jedoch nicht funktionelle Messenger transkribiert und prozessiert werden, die jedoch mit dem Verfahren der Nukleinsäurehybridisierung oft nicht oder nicht ohne Weiteres von den funktionellen Transkripten unterschieden werden können (GARBAY et al., 1996; MENON et al., 1991). Das  $\beta$ -actin-Gen weist bei verschiedenen Säugern mehrere solcher Pseudogene auf (DAVEY und WILDERMAN, 1995; NG et al., 1985). Der Nachweis, ob Schwankungen der relativen Signalintensität der betroffenen cDNA-Sonde von Schwankungen der Häufigkeit des funktionellen Transkriptes herrühren oder nicht, ist mit der cDNA-Array-Analyse in manchen Fällen nicht sicher zu erbringen.

Der Hauptvorteil der cDNA-Array-Technologie liegt in der semiquantitative Erfassung einer sehr großen Zahl von Transkripten einer biologischen oder klinischen Probe in einem einzigen Experiment. Dies erleichtert das Auffinden differentiell exprimierter

Gene in zwei unterschiedlichen biologischen Proben. Die erhaltenen Daten müssen jedoch aus den oben angeführten Gründen in weiterführenden Experimenten, z.B. durch spezifische, semi-quantitative RT-PCR oder den Nachweis des entsprechenden Proteins validiert werden, bevor weitere Aussagen im Hinblick auf die physiologische Bedeutung der Befunde getroffen werden können.

Die cDNA-Array-Technologie hat in den letzten Jahren eine rasante Fortentwicklung erfahren (ARCELLANA-PANLILIO und ROBBINS, 2002). Mit der Miniaturisierung der cDNA-Arrays und der Entwicklung immer leistungsfähigerer Verfahren zur Aufbereitung von RNA aus limitierten Ausgangsmengen wurde die Sensitivität der Technologie immer weiter gesteigert. Ein Ende dieser Entwicklung ist nicht abzusehen und auch die hier entwickelte Methodik kann in ihrer Leistungsfähigkeit noch verbessert werden. Eine Analyse einzelner Zellen oder sogar von Zellteilen oder Cytoplasmabiopsien z.B. von Oozyten erscheint mittelfristig möglich zu sein.

Auf der anderen Seite besitzt auch die Anzahl der cDNA-Sonden, die sich auf einem Array befinden, ein enormes Steigerungspotenzial. Arrays, auf denen Sonden für die Gesamtzahl der Transkripte eines Genoms aufgetragen werden, sind heute bereits denkbar. Die quantitative Erfassung aller Transkripte des Genoms aus einzelnen Blastomeren eines Embryos wird zu einem tieferen Verständnis der molekularen Mechanismen der Embryonalentwicklung beitragen. Dieses Wissen ist unerlässlich zur Optimierung von IVP-Systemen und der Beseitigung der Defizite der aus ihnen produzierten Embryonen.

Auch in anderen Bereichen der Biomedizin sind zahlreiche weitere Anwendungen denkbar. Insbesondere die Analyse kleiner klinischer Proben könnte eine breite Anwendung wie z.B. in der Beurteilung potentiell maligner Gewebebiopsien finden.

## **4.6 Schlußfolgerungen**

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Prototyp einer sensitiven Methode für die cDNA-Array-Analyse einzelner Embryonen von Maus und Rind entwickelt und evaluiert. Mit Hilfe des entwickelten Protokolls konnten sowohl Unterschiede in Genexpressionsprofilen muriner Embryonalstadien als auch Effekte verschiedener IVP-Systeme auf embryonale Genexpressionsprofile boviner Blastozysten aufgezeigt werden. Die erarbeiteten Befunde lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Protokoll zur Amplifikation embryonaler RNA-Extrakte ermöglicht die Analyse der Genexpression sowohl von einzelnen präimplantatorischen Säugerembryonen als auch von Embryonengruppen über die cDNA-Array-Technologie.

Die erzeugten cDNA-Array-Daten sind von hoher Reproduzierbarkeit und weisen eine gute Repräsentanz der relativen Mengenverhältnisse der einzelnen mRNA-Spezies im Ausgangsmaterial auf.

Die Methodik ist sensitiv genug, um Schwankungen in den relativen Mengen einzelner Nukleinsäure-Spezies in individuellen Embryonen zu detektieren. Aus den so gewonnenen Daten lassen sich Rückschlüsse auf den physiologischen Status der analysierten Embryonen ziehen.

Eine heterologe cDNA-Array-Hybridisierung kann erfolgreich und reproduzierbar durchgeführt werden, so dass Genexpressionsprofile auch von Embryonen anderer Spezies mit cDNA-Sonden muriner Herkunft untersucht werden können.

Die Verwendung der *gapdh*-Sonde zur Normalisierung der erhaltenen Array-Daten beim Vergleich embryonaler RNA-Präparationen mit RNA-Präparationen anderer Zelltypen erscheint wegen möglicherweise beträchtlicher Schwankungen in der GAPDH-Expression fraglich.

Die cDNA-Array-Analyse von Embryonen erlaubt es, die Transkriptionsebene in Embryonen komplex zu erfassen und abzubilden. Diese Funktion erscheint als wertvolles Hilfsmittel für die Optimierung von In vitro-Produktionssystemen ebenso wie für das vertiefte Verständnis regulatorischer Netzwerke und Mechanismen der frühen Embryonalentwicklung.

## **5 Zusammenfassung**

Untersuchungen auf Transkriptionsebene individueller präimplantatorischer Embryonalstadien können wertvolle Informationen über den physiologischen Status der betrachteten Embryonen, die z.B. zur Verbesserung der Systeme zur In vitro-Produktion von Embryonen genutzt werden können, liefern. Bisher fehlte es jedoch an einer geeigneten Technologie, um eine große Anzahl von Transkripten in einzelnen Embryonen zu erfassen. Mit vorhandenen Methoden, wie z.B. der RT-PCR, kann jeweils nur eine begrenzte Anzahl von Transkripten pro Embryo quantitativ untersucht werden. Die Erstellung komplexer Expressionsprofile aus biologischen Proben unterschiedlicher Herkunft ist durch die cDNA-Array-Technologie möglich. Dies erfordert jedoch den Einsatz von etwa 1-5µg mRNA bei der Array-Hybridisierung. Da aus einzelnen Säugerembryonen jedoch nur einige Pikogramm mRNA extrahiert werden können, war ein Einsatz dieser Technologie zur Analyse individueller Säugerembryonen bisher nicht möglich.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zur globalen mRNA-Amplifikation zu entwickeln, das die Analyse der Transkriptionsebene einzelner präimplantatorischer Embryonalstadien über die cDNA-Array-Technologie ermöglicht. Dazu wurde die Strategie gewählt, zwei bereits etablierte Amplifikationsverfahren, die Polymerasekettenreaktion und In vitro-Transkription, zu kombinieren, um so synergistische Effekte beider Verfahren zu nutzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das entwickelte Verfahren evaluiert, wobei verschiedene Aspekte der erstellten Amplifikationsprozedur untersucht wurden. Die Erhaltung der relativen Mengenverhältnisse einzelner mRNA-Spezies zueinander während der globalen mRNA-Amplifikation und die Reproduzierbarkeit von cDNA-Array-Daten, die aus amplifizierten Proben gewonnen wurden, standen dabei im Vordergrund.

Im dritten Teil der vorliegenden Studie wurden Genexpressionsprofile von murinen und bovinen Embryonen erstellt. Hierbei wurden im Labor in Mariensee produzierte und 96 Proben umfassende cDNA-Arrays verwendet.

Neben der Detektion individueller Unterschiede in den Genexpressionsprofilen einzelner muriner und boviner Blastozysten lag dabei ein Schwerpunkt in der Untersuchung der Auswirkungen verschiedener in vitro-Produktionssysteme auf die embryonale Genexpression. Hierzu wurden die Genexpressionsprofile von in vitro fertilisierten Embryonen, die in verschiedenen Mediensystemen kultiviert wurden, sowie von geklonten und parthenogenetischen Embryonen mit denen von in vivo

erstellten Embryonen verglichen. Weiterhin wurden Expressionsprofile kleiner Gruppen verschiedener muriner Embryonalstadien erstellt, um Einblicke in die transkriptionellen Abläufe während der frühen Embryonalentwicklung der Maus zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse erarbeitet:

In Vorversuchen wurde ein Protokoll zur globalen Amplifikation embryonaler mRNA-Extrakte entwickelt, das eine cDNA-Array-Analyse der Genexpression in einzelnen Embryonen ermöglichte. Das Protokoll beinhaltete die Reverse Transkription der mRNA in cDNA mit Hilfe eines modifizierten Oligo-d(T)-Primers, der an seinem 5'-Ende die Consensus-Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promotors aufwies. Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges geschah mit Hilfe eines degenerierten Oligonukleotidprimers (DOP), der an seinem 3'-Ende eine willkürlich gewählte Abfolge von sechs Basen (Arbitrary Hexamer) aufwies, der zum 5'-Ende hin eine zufällige Abfolge von sechs Basen (Random Hexamer) folgte. Am 5'-Ende wies der DOP eine spezifische Basenabfolge auf. Die so erstellte cDNA wurde in einer 25 Zyklen umfassenden PCR voramplifiziert und diente anschließend als Matrize für die T7-In vitro-Transkription, wodurch amplifizierte RNA entstand, die durch cDNA-Array-Hybridisierung analysiert werden konnte.

Die cDNA-Array-Analyse amplifizierter embryonaler mRNA-Extrakte lieferte gut reproduzierbare Genexpressionsdaten. Die relativen Mengenverhältnisse einzelner mRNA-Spezies zueinander wurden durch die Amplifikation nur in geringem Maße verändert. Es wurde weiterhin festgestellt, dass Sequenzen, die weiter als 1,5kb vom 3'-Ende der amplifizierten mRNA-Moleküle entfernt lagen, in den Amplifikaten unterrepräsentiert waren, was bei der Wahl der cDNA-Proben für die Analyse amplifizierter Proben über cDNA-Arrays zu beachten ist.

Die cDNA-Array-Daten von fünf einzelnen murinen Blastozysten und einer Gruppe von zehn murinen Blastozysten ergaben, dass die relativen Mengen einzelner Transkripte, die in allen analysierten mRNA-Extrakten nachweisbar waren, innerhalb der Blastozysten unterschiedlich stark schwankten. Die erhaltenen relativen Signalwerte der Proben für  $\beta$ -actin, cycD1, mdm2, erbA, ubiquitin, tgfb-r, collagen, caspase3, fas-antigen und cytokeratin endoA wiesen dabei innerhalb der untersuchten Embryonen einen Variationskoeffizienten von weniger als 20 auf. Die Signalwerte der Proben für cdc2, p21, connexin43, apaf1, mdmx und tefl wiesen dagegen einen Variationskoeffizienten von mehr als 40 auf. Weitere Proben lieferten nur in einzelnen Blastozysten positive Signalwerte. Die Expressionsdaten der

murinen Blastozysten befanden sich in Übereinstimmung mit Daten früherer Publikationen anderer Arbeitsgruppen.

Die Analyse der Genexpression in verschiedenen murinen Embryonalstadien lieferte Hinweise auf die Transkriptionsaktivitäten während der frühen Embryonalentwicklung. Die Daten zur Regulation von  $\beta$ -actin-, cyclinE- und cytokeratin endoA-Transkripten während der frühen Embryonalentwicklung bestätigten Aussagen früherer Publikationen anderer Arbeitsgruppen.

Die entwickelte Methodik ist somit geeignet, komplexe Genexpressionsprofile einzelner Blastozysten zu erstellen und Unterschiede in der Expressionsstärke einzelner Transkripte zu detektieren.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es möglich ist, über heterologe Hybridisierung Genexpressionsprofile boviner Blastozysten mit cDNA-Arrays, die murine Probensequenzen enthalten, reproduzierbar darzustellen.

Die Untersuchungen zur Genexpression bei bovinen Blastozysten ergaben, dass diese untereinander eine insgesamt höhere Variabilität in der Expressionsstärke einzelner Transkripte aufwiesen als die murinen Blastozysten.

Die Genexpressionsprofile in vitro fertilisierter boviner Blastozysten aus verschiedenen Mediensystemen gaben Hinweise auf Unterschiede in der Genexpression zwischen Blastozysten aus dem ECS-System und Blastozysten aus dem BSA-System. Die IVF-BSA-Blastozysten wiesen dabei eine insgesamt geringere Variabilität in der Expression einzelner Transkripte auf als die IVF-ECS-Blastozysten. Auch die durchschnittliche Expressionsstärke einiger Transkripte war in den einzelnen Blastozystengruppen unterschiedlich hoch. So wiesen die IVF-BSA-Blastozysten im Durchschnitt etwa doppelt so hohe relative Signalwerte für  $\beta$ -actin auf wie die IVF-ECS-Blastozysten. Weiterhin war in den IVF-BSA-Blastozysten die fgfr2IIIc-Probe positiv, während sie in allen IVF-ECS-Blastozysten negativ war.

Bei drei der untersuchten bovinen Blastozysten konnten Veränderungen im Expressionsprofil detektiert werden, die auf apoptotische Vorgänge schließen ließen. So war bei allen die nachgewiesene Menge an p53-Transkript gegenüber den restlichen untersuchten bovinen Blastozysten deutlich erhöht. In zwei dieser drei Blastozysten konnten im Vergleich zum Durchschnitt deutlich geringere Mengen des anti-apoptotischen mdm2-Transkriptes und deutlich erhöhte Mengen des pro-apoptotischen apaf1-Transkriptes nachgewiesen werden.

Die analysierten parthenogenetischen und geklonten bovinen Blastozysten lieferten recht uneinheitliche Expressionsprofile.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Genexpressionsprofile einzelner präimplantatorischer Säugerembryonen über cDNA-Array-Analyse erstellt. Die entwickelte Technologie ermöglicht es -bei Verwendung entsprechender cDNA-Array-Systeme-, eine theoretisch unbegrenzte Zahl von Transkripten in individuellen Säugerembryonen semiquantitativ zu erfassen. Dies ist ein wichtiger Schritt hin zu einem besseren Verständnis komplexer Regulationsabläufe während der frühen Embryonalentwicklung und einer besseren Beurteilung der Lebensfähigkeit und Entwicklungskompetenz in vitro produzierter Embryonen, was für die Verbesserung von In vitro-Produktionssystemen für Embryonen sowohl bei Tieren als auch beim Menschen unerlässlich ist.



## **6 Summary**

Transcript expression profiling in single mammalian embryos can provide valuable information about their physiological status and developmental competence that can be exploited to improve systems for embryo in vitro production. Conventional methodologies such as RT-PCR limit the number of transcripts that can be quantitatively screened in a single embryo to only a few. The recently emerged cDNA-technology provides the possibility to generate more complex expression profiles from various biological samples. However, the application of this technology to single preimplantation embryos is limited by the small amount of mRNA that can be extracted from a single mammalian embryo which is not sufficient for standard array hybridization protocols which require 2-5µg labelled mRNA, whereas a single mammalian blastocyst contains only picogram quantities of mRNA.

The purpose of this study was to develop and evaluate a methodology for the global amplification of mRNA that permits cDNA-array analysis of individual preimplantation embryos. For this purpose, two conventional amplification procedures – polymerase chain reaction and in vitro transcription – were combined to a global amplification procedure.

The methodology developed in the first part of the study was evaluated regarding different parameters of the amplification procedure such as maintenance of the relative transcript levels found in the original (non-amplified) sample throughout the amplification process and reproducibility of the results obtained from amplified material.

In the third part of this study cDNA-array profiles were generated from murine and bovine embryos. The model cDNA-arrays employed consisted of 96 probes and were produced in the laboratory in Mariensee.

The focus of this study was to establish a methodology to detect differentially expressed genes in individual murine and bovine embryos from the same origin and in bovine embryos derived from different in vitro production systems. Gene expression profiles from bovine in vivo and in vitro fertilised, cloned, and parthenogenetic embryos were generated to study the effects of different in vitro production procedures on embryonic gene expression. Furthermore, small pools of different murine cleavage stages were analyzed to investigate changes in mRNA expression during early mammalian development.

The following results were obtained:

A protocol for the global amplification of mRNA-pools obtained from single embryos was developed in preliminary experiments. In a first step the mRNA was converted to cDNA by reverse transcription using a modified oligo-d(T)-primer, containing a T7-RNA-polymerase consensus promotor sequence at its 5'-end. Second strand synthesis was carried out employing an degenerated oligonucleotide primer (DOP), containing an arbitrary hexamer followed by a random hexamer sequence at its 3'end and a specific priming site at its 5'-end. After a 25 cycles of a preamplification PCR using T7- and DOP- primers the generated double stranded cDNA was employed as a template for an in vitro transcription reaction. The procedure yielded amplified RNA in amounts sufficient for cDNA-array analysis of single preimplantation embryos.

The cDNA-array data generated from embryonic mRNA-pools were found to be highly reproducible. Furthermore, original relative mRNA levels were not significantly biased in amplified RNA preparations. However, sequences close to the 5'-end of the mRNA were not found correctly represented in amplified RNA samples. This has to be carefully considered for the design of cDNA-probes that are used to analyze RNA samples amplified with the above methodology.

In expression profiles generated from five single murine blastocysts and one pool of ten murine blastocysts expression levels of different transcripts varied at different rates among individual embryos. Relative signal values of the cDNA-probes for  $\beta$ -actin, cycD1, mdm2, erbA, ubiquitin,  $\text{tgf}\beta$ -r, collagen, caspase3, fas-antigen and cytokeratine endoA showed a coefficient of variance of less than 20 among the assessed embryos, whereas values obtained from the probes for cdc2, p21, connexin43, apaf1, mdmx and tefl showed a coefficient of correlation of more than 40. The data obtained from murine blastocyst expression profiles were in agreement with data previously published by other groups.

Expression profiles from different murine cleavage stages revealed the onset of transcription of different mRNAs during early murine development. The signal values detected in the cDNA-probes for  $\beta$ -actin-, cyclinE- and cytokeratine endoA- were in agreement with previous publications of other groups.

The method developed in this study can be used to generate complex gene expression profiles and to detect differentially expressed transcripts in individual murine blastocysts.

Furthermore, the protocol was evaluated regarding the possibility to generate expression profiles from bovine embryos using murine cDNA-probes. The evaluation experiments revealed that data obtained by using a heterologous hybridization protocol were highly reproducible.

Gene expression levels of different transcripts were found to be more variable in bovine blastocysts compared to their murine counterparts.

In vitro fertilized bovine blastocysts derived from two different media systems were analyzed and compared. Blastocysts generated and cultivated in media supplemented with BSA showed more consistent expression profiles compared to those of blastocysts generated and cultivated in media supplemented with ECS. Furthermore, the average expression levels of some transcripts were found to be different in these two groups. The average expression of  $\beta$ -actin was detected up by a factor of about 2 in IVF-BSA blastocysts compared to IVF-ECS blastocysts. The cDNA-probe for fgfr2-IIIc was positive only in in vivo derived blastocysts, IVF-BSA-blastocysts and parthenotes whereas it was negative in IVF-ECS- and cloned blastocysts.

In three of the assessed bovine blastocysts an increased expression of the pro-apoptotic p53-transcript could be detected. In two of these, expression of the anti-apoptotic mdm2-transcript was down- and apaf1-transcript (pro-apoptotic) expression was upregulated.

Parthenotes and cloned bovine blastocysts showed inhomogenous gene expression profiles.

In this study, for the first time, gene expression profiles were generated from single mammalian preimplantation embryos via model cDNA-arrays. Using state-of-the-art cDNA-arrays this technology features the quantitative screening of a virtually unlimited number of transcripts in individual blastocysts and cleavage stages. Complex expression profiles of preimplantation embryos will contribute to the understanding of the molecular mechanisms essential for embryogenesis. This is crucial for the improvement of systems for in vitro production of mammalian embryos.

## **7 Literaturverzeichnis**

**Adams V., Gielen, S., Hambrecht R., Schuler G.** Apoptosis in skeletal muscle *Front Biosci* 2001 Jan 1;6:D1-D11

**Adhya S., Gottesman M.** Control of transcription termination *Annu Rev Biochem.* 1978;47:967-96

**Agostoni E.** Preimplantation development of the mammalian embryo *Ann Ist Super Sanita* 1993;29(1):15-25

**Alberts B., Bray D., J Lewis., Raff M., Roberts K., Watson J. D.** *Molekularbiologie der Zelle*, 1990, VCH

**Al-TaHER A., Bashein A., Nolan T., Hollingsworth M., Brady G.** Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human potassium channel genes at the single cell level *Yeast* 2000 Sep 30;17(3):201-10

**Arcellana-Panlilio M., Robbins S. M. I.** Global gene expression profiling using DNA microarrays *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Mar;282(3):G397-402

**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 Apr 28;95(9):5082-7

**Arpagaus M., Chatonnet A., Masson P., Newton M., Vaughan T. A., Bartels C. F., Nogueira C. P., La Du B. N., Lockridge O.** Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):6966-74

**Ayabe T., Tsutsumi O., Taketani Y.** Hexokinase activity in mouse embryos developed in vivo and in vitro *Hum Reprod.* 1994 Feb;9(2):347-51

**Bachvarova R., Cohen E. M., De Leon V., Tokunaga K., Sakiyama S., Paynton B. V.** Amounts and modulation of actin mRNAs in mouse oocytes and embryos *Development* 1989 Jul;106(3):561-5.

**Balaban B., Urman B., Isiklar A., Alatas C., Aksoy S., Mercan R., Mumcu A., Nuhoglu A.** The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2357-61

**Bard J. B., Baldock R. A., Davidson D. R.** Elucidating the genetic networks of development: a bioinformatics approach *Genome Res* 1998 Sep;8(9):859-63

**Bargonetti J., Manfredi J. J.** Multiple roles of the tumor suppressor p53 *Curr Opin Oncol.* 2002 Jan;14(1):86-91

**Barnard R., Southard J. N., Talamantes F.** Two-step PCR amplification of multiple specific products from cDNA using one specific primer and oligo dT *Biotechniques* 1994 Feb;16(2):251-2

**Barnes F., Eyestone W. H.** Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryos *Theriogenology* 1990; 33; 141-152

- Bavister B. D.** Interactions between embryos and the culture milieu *Theriogenology* 2000 Jan 15;53(2):619-26
- Ben-Neriah Y.** Regulatory functions of ubiquitination in the immune system *Nat Immunol* 2002 Jan;3(1):20-6
- Benos D. J., Biggers J. D., Balaban R. S., Mills J. W., Overstrom E. W.** Developmental aspects of sodium-dependent transport processes of preimplantation rabbit embryos *Soc Gen Physiol Ser.* 1985;39:211-35
- Bertioli D.** Rapid amplification of cDNA ends *Methods Mol Biol* 1997;67:233-8
- Betts D. H., King W. A.** Genetic regulation of embryo death and senescence *Theriogenology* 2001 Jan 1;55(1):171-91
- Bilodeau-Goeseels S., Schultz G. A.** Changes in ribosomal ribonucleic acid content within in vitro-produced bovine embryos *Biol Reprod* 1997 May;56(5):1323-9
- Boulaire J., Fotedar A., Fotedar R.** The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1 *Pathol Biol (Paris)*. 2000 Apr;48(3):190-202
- Brady G.** Expression profiling of single mammalian cells--small is beautiful *Yeast* 2000 Sep 30;17(3):211-7
- Brail L. H., Jang A., Billia F., Iscove N. N., Klamut H. J., Hill R. P.** Gene expression in individual cells: analysis using global single cell reverse transcription polymerase chain reaction (GSC RT-PCR) *Mutat Res.* 1999 Aug;406(2-4):45-54
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C. A., Causton H. C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F. C., Kim I. F., Markowitz V., Matese J. C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M.** Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data *Nat Genet* 2001 Dec;29(4):365-71.
- Brazma A., Vilo J.** Gene expression data analysis *Microbes Infect* 2001 Aug;3(10):823-9
- Brisson D. R.** Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors *Hum Fertil (Camb)* 2000;3(1):36-47
- Brown C. S., Goodwin P. C., Sorger P. K.** Image metrics in the statistical analysis of DNA microarray data *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 31;98(16):8944-9
- Bungartz L., Niemann H.** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination *J Reprod Fertil.* 1994 Aug;101(3):583-91
- Burgess J. K.** Gene expression studies using microarrays *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001 Apr;28(4):321-8

- Bustin S. A.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays *J Mol Endocrinol* 2000 Oct;25(2):169-93
- Byrne A. T., Southgate J., Brison D. R., Leese H. J.** Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL *J Reprod Fertil* 1999 Sep;117(1):97-105
- Camous S., Kopecny V., Flechon J. E.** Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo *Biol Cell*. 1986;58(3):195-200
- Campbell K. H., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line *Nature* 1996 Mar 7;380(6569):64-6
- Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C. W., Appella E., Xu Y.** p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage *EMBO J* 2000 Sep 15;19(18):4967-75
- Chao D. T., Korsmeyer S. J.** BCL-2 family: regulators of cell death *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419
- Chen C. Y., Oliner J. D., Zhan Q., Fornace A. J. Jr, Vogelstein B., Kastan M. B.** Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2684-8
- Chisholm J. C., Johnson M. H., Warren P. D., Fleming T. P., Pickering S. J.** Developmental variability within and between mouse expanding blastocysts and their ICMs *J Embryol Exp Morphol* 1985 Apr;86:311-36
- Chow J. F., Lee K. F., Chan S. T., Yeung W. S.** Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGFbeta receptor (type I and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract *Mol Hum Reprod*. 2001 Nov;7(11):1047-56
- Claverie J. M.** Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1255-7
- Clegg K. B., Piko L.** Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos *J Embryol Exp Morphol*. 1983 Apr;74:169-82
- Clewley J. P.** DNA microarrays *Commun Dis Public Health* 2000 Mar;3(1):71-2.
- Cohen G. M.** Caspases: the executioners of apoptosis *Biochem J* 1997 Aug 15;326 ( Pt 1):1-16
- Cohen G. M., Sun X. M., Snowden R. T., Dinsdale D., Skilleter D. N.** Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation *Biochem J* 1992 Sep 1;286 ( Pt 2):331-4
- Cohen J. J.** Apoptosis and its regulation *Adv Exp Med Biol* 1996;406:11-20
- Cohen J. J.** Apoptosis *Immunol Today* 1993 Mar;14(3):126-30
- Cohen J. J.** Apoptosis: physiologic cell death *J Lab Clin Med* 1994 Dec;124(6):761-5

- Collins J., Fleming T.** Specific mRNA detection in single lineage-marked blastomeres from preimplantation embryos *Trends Genet* 1995 Jan;11(1):5-7
- Cory S.** Apoptosis. Fascinating death factor *Nature* 1994 Jan 27;367(6461):317-8
- Cory S.** Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family *Annu Rev Immunol* 1995;13:513-43
- Coucouvani E., Martin G. R.** BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo *Development*. 1999 Feb;126(3):535-46
- Cox L. S., Lane D. P.** Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage *Bioessays*. 1995 Jun;17(6):501-8
- Craig J. C., Eberwine J. H., Calvin J. A., Wlodarczyk B., Bennett G. D., Finnell R. H.** Developmental expression of morphoregulatory genes in the mouse embryo: an analytical approach using a novel technology *Biochem Mol Med* 1997 Apr;60(2):81-91
- Crick F.** Central dogma of molecular biology *Nature*. 1970 Aug 8;227(258):561-3
- Daniels R., Hall V., Trounson A. O.** Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei *Biol Reprod*. 2000 Oct;63(4):1034-40
- Darnell J. E. Jr.** Variety in the level of gene control in eukaryotic cells *Nature* 1982 Jun 3;297(5865):365-71
- Davey H. W., Wildeman A. G.** Molecular analysis of bovine actin gene and pseudogene sequences: expression of nonmuscle and striated muscle isoforms in adult tissues *DNA Cell Biol*. 1995 Jun;14(6):555-63
- De Sousa P. A., Caveney A., Westhusin M. E., Watson A. J.** Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors *Theriogenology*. 1998 Jan 1;49(1):115-28
- De Wit A. A., Kruip T. A.** Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity *Anim Reprod Sci* 2001 Jan 31;65(1-2):51-65
- Delidow B. C., Lynch J. P., Peluso J. J., White B. A.** Polymerase chain reaction *Methods Mol Biol* 1996;58:275-92
- Devaux F., Marc P., Jacq C.** Transcriptomes, transcription activators and microarrays *FEBS Lett* 2001 Jun 8;498(2-3):140-4
- Diaz-Cueto L., Gerton G. L.** The influence of growth factors on the development of preimplantation Mammalian embryos *Arch Med Res* 2001 Nov;32(6):619-26
- Dieleman S. J., Hendriksen P. J., Viuff D., Thomsen P. D., Hyttel P., Knijn H. M., Wrenzycki C., Kruip T. A., Niemann H., Gadella B. M., Bevers M. M., Vos P. L.** Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos *Theriogenology* 2002 Jan 1;57(1):5-20

- Ding H. F., Fisher D. E.** p53, caspase 8, and regulation of apoptosis after ionizing radiation *J Pediatr Hematol Oncol* 2001 Mar-Apr;23(3):185-8
- Dobrinsky J. R.** Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos *Theriogenology* 2002 Jan 1;57(1):285-302
- Dolan P. L., Wu Y., Ista L. K., Metzberg R. L., Nelson M. A., Lopez G. P.** Robust and efficient synthetic method for forming DNA microarrays *Nucleic Acids Res* 2001 Nov 1;29(21):E107-7
- Domashenko A. D., Latham K. E., Hatton K. S.** Expression of myc-family, myc-interacting, and myc-target genes during preimplantation mouse development *Mol Reprod Dev.* 1997 May;47(1):57-65
- Drapkin R., Reinberg D.** Transcription. The essential twist *Nature* 1994 Jun 16;369(6481):523-4
- Duprey P., Morello D., Vasseur M., Babinet C., Condamine H., Brulet P., Jacob F.** Expression of the cyokeratin endo A gene during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Dec;82(24):8535-9.
- Duranthon V., Renard J. P.** The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept *Theriogenology* 2001 Apr 1;55(6):1277-89
- Dworkin M. B., Dworkin-Rastl E.** Functions of maternal mRNA in early development. *Mol Reprod Dev.* 1990 Jul;26(3):261-97
- Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424
- Eberwine J.** Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA *Biotechniques* 1996 Apr;20(4):584-91
- Eberwine J., Yeh H., Miyashiro K., Cao Y., Nair S., Finnell R., Zettel M., Coleman P.** Analysis of gene expression in single live neurons *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Apr 1;89(7):3010-4
- Eckert J.** Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von PDGF in der in vitro Produktion von Rinderembryonen aus Kumulus-Oozyten-Komplexen unterschiedlicher morphologischer Qualitätsklassen 1994 Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Eckert K. A., Kunkel T. A.** DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction *PCR Methods Appl* 1991 Aug;1(1):17-24
- Edwards R. G.** The role of embryonic polarities in preimplantation growth and implantation of mammalian embryos *Hum Reprod* 2000 Dec;15 Suppl 6:1-8
- Eick D., Wedel A., Heumann H.** From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerises *Trends Genet.* 1994 Aug;10(8):292-6
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O., Botstein D.** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 8;95(25):14863-8



- Enright B. P., Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Ward F. A., Yang X., Boland M. P.** Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality *Theriogenology* 2000 Sep 15;54(5):659-73
- Eppig J. J., Hosoe M., O'Brien M. J., Pendola F. M., Requena A., Watanabe S.** Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid *Mol Cell Endocrinol* 2000 May 25;163(1-2):109-16
- Esteves S. C., Sharma R. K., Thomas A. J. Jr., Agarwal A.** Effect of swim-up sperm washing and subsequent capacitation on acrosome status and functional membrane integrity of normal sperm *Int J Fertil Womens Med* 2000 Sep-Oct;45(5):335-41
- Etkin L. D.** Early development and cell commitment *Dev Biol (N Y 1985)* 1989;6:1-12
- Evertsz E. M., Au-Young J., Ruvolo M. V., Lim A. C., Reynolds M. A.** Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays *Biotechniques* 2001 Nov;31(5):1182, 1184, 1186
- Ewing B., Green P.** Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):232-4
- Exley G. E., Tang C., McElhinny A. S., Warner C. M.** Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos *Biol Reprod.* 1999 Jul;61(1):231-9
- Farber E.** Programmed cell death: necrosis versus apoptosis *Mod Pathol* 1994 Jun;7(5):605-9
- Farin P. W., Crosier A. E., Farin C. E.** Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle *Theriogenology* 2001 Jan 1;55(1):151-70
- Farin P. W., Slenning B. D., Britt J. H.** Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro *Theriogenology.* 1999 Sep;52(4):659-70
- Feng H. L., Yang Q. Z., Sun Q. Y., Qin P. C., Liu J. M.** Development of early bovine embryos in different culture systems *Vet Rec* 1994 Sep 24;135(13):304-6
- First N. L., Barnes F. L.** Development of preimplantation mammalian embryos *Prog Clin Biol Res* 1989;294:151-70
- First N. L., Parrish J. J.** In-vitro fertilization of ruminants *J Reprod Fertil Suppl* 1987;34:151-65
- Fleming T. P., Goodall H.** Endocytic traffic in trophectoderm and polarised blastomeres of the mouse preimplantation embryo *Anat Rec.* 1986 Dec;216(4):490-503
- Fleming T. P., Javed Q., Collins J., Hay M.** Biogenesis of structural intercellular junctions during cleavage in the mouse embryo *J Cell Sci Suppl* 1993;17:119-25
- Fleming T. P., McConnell J., Johnson M. H., Stevenson B. R.** Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1 *J Cell Biol.* 1989 Apr;108(4):1407-18

- Fleming T. P., Sheth B., Fesenko I.** Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis *Front Biosci* 2001 Aug 1;6:D1000-7
- Fortin A., Cregan S. P., MacLaurin J. G., Kushwaha N., Hickman E. S., Thompson C. S., Hakim A., Albert P. R., Cecconi F., Helin K., Park D. S., Slack R. S.** APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death *J Cell Biol.* 2001 Oct 15;155(2):207-16
- Franklin G. C.** Mechanisms of transcriptional regulation *Results Probl Cell Differ* 1999;25:171-87
- Freeman T. C., Lee K., Richardson P. J.** Analysis of gene expression in single cells *Curr Opin Biotechnol* 1999 Dec;10(6):579-82
- Gabig M., Wegrzyn G.** An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis *Acta Biochim Pol* 2001;48(3):615-22
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G.** Embryo production by ovum pick up from live donors *Theriogenology* 2001 Apr 1;55(6):1341-57
- Gandolfi F., van Eijk M. J. T., Brevini T. A. L., Mauri L., Trounson A. O., Mummery C. L.** Expression pattern of the transcription factor oct-4 in bovine preimplantation embryos *Reprod Anim Breed.* 1995 *Advances and Strategy* 381-382
- Garbay B., Boue-Grabot E., Garret M.** Processed pseudogenes interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction controls *Anal Biochem.* 1996 May 15;237(1):157-9
- Gardner D. K.** Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture *Theriogenology* 1998 Jan 1;49(1):83-102. Review.
- Gardner D. K.** Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:461-75
- Gardner D. K.** Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts *Hum Reprod* 1998 Dec;13 Suppl 4:218-25
- Gardner D. K., Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB** Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential *Fertil Steril* 2001 Dec;76(6):1175-80
- Gardner R. L.** Cell allocation and lineage in the early mouse embryo *Ciba Found Symp* 1989;144:172-81; discussion 181-6, 208-11
- Gartel A. L., Serfas M. S., Tyner A. L.** p21--negative regulator of the cell cycle *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 Nov;213(2):138-49
- Giebelhaus D. H., Heikkila J. J., Schultz G. A.** Changes in the quantity of histone and actin messenger RNA during the development of preimplantation mouse embryos *Dev Biol* 1983 Jul;98(1):148-54.

- Gmuender H.** Perspectives and challenges for DNA microarrays in drug discovery and development *Biotechniques* 2002 Jan;32(1):152-4, 156, 158
- Gueth-Hallonet C., Maro B.** Cell polarity and cell diversification during early mouse embryogenesis *Trends Genet* 1992 Aug;8(8):274-9
- Gurdon J. B.** The generation of diversity and pattern in animal development *Cell* 1992 Jan 24;68(2):185-99
- Haffner-Krausz R., Gorivodsky M., Chen Y., Lonai P.** Expression of *Fgfr2* in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development *Mech Dev* 1999 Jul;85(1-2):167-72
- Hardy K., Handyside A. H., Winston R. M.** The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro *Development* 1989 Nov;107(3):597-604
- Hardy K., Spanos S.** Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo *J Endocrinol* 2002 Feb;172(2):221-36
- Hardy K., Spanos S., Becker D., Iannelli P., Winston R. M., Stark J.** From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 13;98(4):1655-60
- Hardy K., Wright C. S., Franks S., Winston R. M.** In vitro maturation of oocytes *Br Med Bull* 2000;56(3):588-602
- Hashimoto S., Saeki K., Nagao Y., Minami N., Yamada M., Utsumi K.** Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes *Theriogenology* 1998 Jun;49(8):1451-63
- Hasler J. F.** Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle *Theriogenology* 2001 Dec 1;56(9):1401-15
- Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J. E., Snesrud E., Lee N., Quackenbush J.** A concise guide to cDNA microarray analysis *Biotechniques* 2000 Sep;29(3):548-50, 552-4, 556
- Herschbach B. M., Johnson A. D.** Transcriptional repression in eukaryotes *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:479-509
- Heyman Y., Vignon X., Chesne P., Le Bourhis D., Marchal J., Renard J. P.** Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer *Reprod Nutr Dev* 1998 Nov-Dec;38(6):595-603.
- Heyner S., Tucker M. J.** In vitro fertilization *Methods Mol Biol* 2000;137:277-300
- Hill A. A., Brown E. L., Whitley M. Z., Tucker-Kellogg G., Hunter C. P., Slonim D. K.** Evaluation of normalization procedures for oligonucleotide array data based on spiked cRNA controls *Genome Biol* 2001;2(12)
- Hinck L., Van Der Smissen P., Heusterpreute M., Donnay I., De Hertogh R., Pampfer S.** Identification of caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease in rat blastocysts and their

implication in the induction of chromatin degradation (but not nuclear fragmentation) by high glucose  
Biol Reprod 2001 Feb;64(2):555-62

**Hippo Y., Taniguchi H., Tsutsumi S., Machida N., Chong J. M., Fukayama M., Kodama T., Aburatani H.** Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays  
Cancer Res 2002 Jan 1;62(1):233-40

**Ho Y., Wigglesworth K., Eppig JJ, Schultz RM** Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression Mol Reprod Dev. 1995 Jun;41(2):232-8

**Ho Y., Doherty A. S., Schultz R. M.** Mouse preimplantation embryo development in vitro: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. Mol Reprod Dev 1994 Jun;38(2):131-41.

**Hogan B., Costantini F., Lacy E.** Manipulating the mouse embryo 1986, Cold Spring Harbour Laboratory

**Holm P., Callesen H.** In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application Reprod Nutr Dev 1998 Nov-Dec;38(6):579-94

**Holm P., Shukri N. N., Vajta G., Booth P., Bendixen C., Callesen H.** Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex Theriogenology. 1998 Dec;50(8):1285-99

**Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R., Golub T. R., Lander E. S., Young R. A.** Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome Cell 1998 Nov 25;95(5):717-28

**Holstege F. C., Young R. A.** Transcriptional regulation: contending with complexity Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Jan 5;96(1):2-4

**Hosoi Y., Minami N., Iritani A.** Embryo culture in explanted oviducts in mice and cattle Horm Res 1995;44 Suppl 2:9-14

**Howlett S. K., Bolton V. N.** Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis J Embryol Exp Morphol. 1985 Jun;87:175-206

**Huang J. Q., Trasler J. M., Igdoura S., Michaud J., Hanal N., Gravel R. A.** Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases Hum Mol Genet 1997 Oct;6(11):1879-85

**Huang L., Guan R. J., Pardee A. B.** Evolution of transcriptional control from prokaryotic beginnings to eukaryotic complexities Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1999;9(3-4):175-82

**Hunter T.** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling Cell. 1995 Jan 27;80(2):225-36

**Hyttel P., Viuff D., Laurincik J., Schmidt M., Thomsen P. D., Avery B., Callesen H., Rath D., Niemann H., Rosenkranz C., Schellander K., Ochs R. L., Greve T.** Risks of in-vitro production of

cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology Hum Reprod 2000 Dec;15 Suppl 5:87-97

**Ikawa S., Nakagawara A., Ikawa Y.** p53 family genes: structural comparison, expression and mutation Cell Death Differ 1999 Dec;6(12):1154-61

**Izadyar F., Van Tol H. T., Hage W. G., Bevers M. M.** Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development Mol Reprod Dev 2000 Nov;57(3):247-55

**Jacob F., Monod J.** Genetic repression, allosteric inhibition, and cellular differentiation in: **Locke M.** Cytodifferentiation and macromolecular synthesis Academic press New York 1963; 30.64

**Johnson M. H., Maro B., Takeichi M.** The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres J Embryol Exp Morphol. 1986 Apr;93:239-55

**Jurecic R., Nguyen T., Belmont J. W.** Differential mRNA display using anchored oligo-dT and long sequence-specific primers as arbitrary primers Trends Genet. 1996 Dec;12(12):502-4

**Juriscova A., Latham K. E., Casper R. F., Casper R. F., Varmuza S. L.** Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development Mol Reprod Dev. 1998 Nov;51(3):243-53

**Kacharina J. E., Crino P. B., Eberwine J.** Preparation of cDNA from single cells and subcellular regions Methods Enzymol. 1999;303:3-18

**Karlson P.** Kurzes Lehrbuch der Biochemie 1984 Georg Thieme Verlag

**Kato H., Iritani A.** In vitro fertilization in cattle Mol Reprod Dev. 1993 Oct;36(2):229-31

**Kaye P. L., Harvey M. B.** The role of growth factors in preimplantation development Prog Growth Factor Res. 1995;6(1):1-24

**Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57

**Khanna N., Singh N.** Role of caspases in apoptosis and disease Indian J Physiol Pharmacol. 1999 Apr;43(2):151-9

**Khosla S., Dean W., Reik W., Feil R.** Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype Hum Reprod Update. 2001 Jul-Aug;7(4):419-27

**Khurana N. K., Niemann H.** Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo Theriogenology. 2000 Jul 15;54(2):313-26

**Kidder G. M.** The genetic program for preimplantation development Dev Gen 1992 Jul; 13:319-325

**Kidder G. M., Winterhager E.** Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions Front Biosci. 2001 May 1;6:D731-6

- Kiessling A. A., Davis H. W., Williams C. S., Sauter R. W., Harrison L. W.** Development and DNA polymerase activities in cultured preimplantation mouse embryos: comparison with embryos developed in vivo *J Exp Zool.* 1991 Apr;258(1):34-47
- Kikyo N., Wolffe A. P.** Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons *J Cell Sci.* 2000 Jan;113 ( Pt 1):11-20
- King H. C., Sinha A. A.** Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls *JAMA.* 2001 Nov 14;286(18):2280-8
- Kishi M., Itagaki Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N.** Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells *Theriogenology.* 2000 Sep 15;54(5):675-84
- Kochetkov S. N., Rusakova E. E., Tunitskaya V. L.** Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism *FEBS Lett.* 1998 Dec 4;440(3):264-7
- Kodama H., Fukuda J., Karube H., Matsui T., Shimizu Y., Tasdemir M., Tasdemir I., Tanaka T.** Prospective evaluation of simple morphological criteria for embryo selection in double embryo transfer cycles *Hum Reprod.* 1995 Nov;10(11):2999-3003
- Kolle S., Stojkovic M., Boie G., Wolf E., Sinowatz F.** Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos *Mol Reprod Dev.* 2002 Feb;61(2):180-6
- Kono T.** Nuclear transfer and reprogramming *Rev Reprod.* 1997 May;2(2):74-80
- Kornberg R. D.** Eukaryotic transcriptional control *Trends Cell Biol.* 1999 Dec;9(12):M46-9
- Kozak M.** An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs *Nucleic Acids Res.* 1987 Oct 26;15(20):8125-48
- Kozak M.** Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):187-208
- Kozak M.** Regulation of translation in eukaryotic systems *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:197-225
- Kozak M.** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation *J Biol Chem.* 1991 Oct 25;266(30):19867-70
- Kozak M.** The scanning model for translation: an update *J Cell Biol.* 1989 Feb;108(2):229-41
- Krammer P. H.** CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die *Adv Immunol.* 1999;71:163-210. Review
- Krisher R. L., Bavister B. D.** Responses of oocytes and embryos to the culture environment *Theriogenology.* 1998 Jan 1;49(1):103-14
- Krisher R. L., Lane M., Bavister B. D.** Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media *Biol Reprod.* 1999 Jun;60(6):1345-52

- Kumar A., Larsson O., Parodi D., Liang Z.** Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization *Nucleic Acids Res.* 2000 Jul 15;28(14):E71
- Kurella M., Hsiao L. L., Yoshida T., Randall J. D., Chow G., Sarang S. S., Jensen R. V., Gullans S. R.** DNA microarray analysis of complex biologic processes *J Am Soc Nephrol.* 2001 May;12(5):1072-8
- Kurkinen M.** Gene expression in the early mouse embryo and cultured cells *Basic Life Sci.* 1988;48:73-80
- Lane D. P., Hall P. A.** MDM2--arbiter of p53's destruction *Trends Biochem Sci.* 1997 Oct;22(10):372-4
- Lania L., Majello B., Napolitano G.** Transcriptional control by cell-cycle regulators: a review *J Cell Physiol.* 1999 May;179(2):134-41
- Latham K. E., De la Casa E., Schultz R. M.** Analysis of mRNA expression during preimplantation development *Methods Mol Biol.* 2000;136:315-31
- Lawson K. A.** Fate mapping the mouse embryo *Int J Dev Biol.* 1999;43(7 Spec No):773-5
- Lee T. I., Young R. A.** Transcription of eukaryotic protein-coding genes *Annu Rev Genet.* 2000;34:77-137
- Leese H. J., Donnay I., Thompson J. G.** Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals *Hum Reprod.* 1998 Dec;13 Suppl 4:184-202
- Lehtonen E., Ordonez G., Reima I.** Cytoskeleton in preimplantation mouse development *Cell Differ.* 1988 Aug;24(3):165-77
- Leibfried-Rutledge M. L.** Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos *Theriogenology.* 1999 Jan 15;51(2):473-85
- Leunda-Casi A., De Hertogh R., Pampfer S.** Decreased expression of fibroblast growth factor-4 and associated dysregulation of trophoblast differentiation in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro *Diabetologia.* 2001 Oct;44(10):1318-25
- Levy R.** Genetic regulation of preimplantation embryo survival *Int Rev Cytol.* 2001;210:1-37
- Levy R. R., Cordonier H., Czyba J. C., Guerin J. F.** Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 2):101-8
- Lewin B.** *Genes VII* Oxford University Press 2000
- Li H., Hong F.** Cluster-Rasch models for microarray gene expression data *Genome Biol.* 2001;2(8)
- Liang F., Holt I., Pertea G., Karamycheva S., Salzberg S. L., Quackenbush J.** Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):239-40
- Liu M., Subramanyam Y. V., Baskaran N.** Preparation and analysis of cDNA from a small number of hematopoietic cells *Methods Enzymol.* 1999;303:45-55

- Liu Y., Kulesz-Martin M.** p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding *Carcinogenesis*. 2001 Jun;22(6):851-60
- Lobenhofer E. K., Bushel P. R., Afshari C. A., Hamadeh H. K.** Progress in the application of DNA microarrays *Environ Health Perspect*. 2001 Sep;109(9):881-91
- Lockhart D., Dong H., Byrne M., Follettie M., Gallo M., Chee M., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.** Expression monitoring by hybridization to high-density Oligonucleotide arrays *Nat Biotechnol* 1996 14:1675-80
- Lonergan P.** Growth of preimplantation bovine embryos *Acta Vet Scand* 1994;35(4):307-20
- Lonergan P., O'Kearney-Flynn M., Boland M. P.** Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension *Theriogenology*. 1999 Jun;51(8):1565-76
- Lou X. J., Schena M., Horrigan F. T., Lawn R. M., Davis R. W.** Expression monitoring using cDNA microarrays. A general protocol *Methods Mol Biol*. 2001;175:323-40
- Loutradis D., Drakakis P., Kallianidis K., Sofikitis N., Kallipolitis G., Milingos S., Makris N., Michalas S.** Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:325-35
- Lundin K., Bergh C., Hardarson T.** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF *Hum Reprod*. 2001 Dec;16(12):2652-7
- Makarevich A. V., Markkula D.** Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture *M Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):386-92
- Mannaerts B. M.** Cytological parameters for rating bovine embryo quality *Curr Top Vet Med Anim Sci* 1986 34:216-222
- Maser R. L., Calvet J. P.** Analysis of differential gene expression in the kidney by differential cDNA screening, subtractive cloning, and mRNA differential display *Semin Nephrol*. 1995 Jan;15(1):29-42
- Matwee C., Betts D. H., King W. A.** Apoptosis in the early bovine embryo *Zygote*. 2000 Feb;8(1):57-68.
- McAllister W. T.** Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity) *Cell Mol Biol Res*. 1993;39(4):385-91
- McEvoy T. G., Robinson J. J., Sinclair K. D.** Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals *Reproduction*. 2001 Oct;122(4):507-18
- McEvoy T. G., Sinclair K. D., Young L. E., Wilmut I., Robinson J. J.** Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART *Hum Fertil (Camb)*. 2000;3(4):238-246



**McPherson J. D., Marra M., Hillier L., Waterston R. H., Chinwalla A., Wallis J., Sekhon M., Wylie K., Mardis E. R., Wilson R. K., Fulton R., Kucaba T. A., Wagner-McPherson C., Barbazuk W. B., Gregory S. G., Humphray S. J., French L., Evans R. S., Bethel G., Whittaker A., Holden J. L., McCann O. T., Dunham A., Soderlund C., Scott C. E., Bentley D. R., Schuler G., Chen H. C., Jang W., Green E. D., Idol J. R., Maduro V. V., Montgomery K. T., Lee E., Miller A., Emerling S., Kucherlapati H., Gibbs R., Scherer S., Gorrell J. H., Sodergren E., Clerc-Blankenburg K., Tabor P., Naylor S., Garcia D., de Jong P. J., Catanese J. J., Nowak N., Osoegawa K., Qin S., Rowen L., Madan A., Dors M., Hood L., Trask B., Friedman C., Massa H., Cheung V. G., Kirsch I. R., Reid T., Yonescu R., Weissenbach J., Bruls T., Heilig R., Branscomb E., Olsen A., Doggett N., Cheng J. F., Hawkins T., Myers R. M., Shang J., Ramirez L., Schmutz J., Velasquez O., Dixon K., Stone N. E., Cox D. R., Haussler D., Kent W. J., Furey T., Rogic S., Kennedy S., Jones S., Rosenthal A., Wen G., Schilhabel M., Gloeckner G., Nyakatura G., Siebert R., Schlegelberger B., Korenberg J., Chen X. N., Fujiyama A., Hattori M., Toyoda A., Yada T., Park H. S., Sakaki Y., Shimizu N., Asakawa S., Kawasaki K., Sasaki T., Shintani A., Shimizu A., Shibuya K., Kudoh J., Minoshima S., Ramser J., Seranski P., Hoff C., Poustka A., Reinhardt R., Lehrach H.** A physical map of the human genome *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):934-41

**Menezo Y. J., Veiga A., Pouly J. L.** Assisted reproductive technology (ART) in humans: facts and uncertainties *Theriogenology*. 2000 Jan 15;53(2):599-610

**Menon R. S., Chang Y. F., St Clair J., Ham R. G.** RT-PCR artifacts from processed pseudogenes *PCR Methods Appl*. 1991 Aug;1(1):70-1

**Mermillod P., Oussaid B., Cognie Y.** Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos *J Reprod Fertil Suppl*. 1999;54:449-60

**Merrick W. C.** Eukaryotic protein synthesis: an in vitro analysis *Biochimie*. 1994;76(9):822-30

**Merrick W. C.** Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis *Microbiol Rev*. 1992 Jun;56(2):291-315

**Mizushima S., Fukui Y.** Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium *Theriogenology*. 2001 Apr 15;55(7):1431-45

**Modrek B., Lee C.** A genomic view of alternative splicing *Nat Genet*. 2002 Jan;30(1):13-9.

**Momand J., Wu H. H., Dasgupta G.** MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein *Gene*. 2000 Jan 25;242(1-2):15-29

**Monk M., Holding C., Goto T.** Isolation of novel developmental genes from human germ cell, oocyte and embryo cDNA by differential display *Reprod Fertil Dev*. 2001;13(1):51-7

**Moor R. M., Dai Y., Lee C., Fulka J.** Oocyte maturation and embryonic failure *Hum Reprod Update*. 1998 May-Jun;4(3):223-36

**Moroni M. C., Hickman E. S., Denchi E. L., Caprara G., Colli E., Cecconi F., Muller H., Helin K.** Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53 *Nat Cell Biol*. 2001 Jun;3(6):552-8

- Munne S., Magli C., Adler A., Wright G., de Boer K., Mortimer D., Tucker M., Cohen J., Gianaroli L.** Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos *Hum Reprod.* 1997 Apr;12(4):780-4
- Mutch D. M., Berger A., Mansourian R., Rytz A., Roberts M. A.** Microarray data analysis: a practical approach for selecting differentially expressed genes *Genome Biol.* 2001;2(12)
- Nagai T.** The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes *Theriogenology.* 2001 Apr 1;55(6):1291-301
- Nagata S.** Fas-induced apoptosis *Intern Med.* 1998 Feb;37(2):179-81
- Nakanishi T., Oka T., Akagi T.** Recent advances in DNA microarrays *Acta Med Okayama.* 2001 Dec;55(6):319-28
- Natale D. R., De Sousa P. A., Westhusin M. E., Watson A. J.** Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR *Reproduction.* 2001 Nov;122(5):687-93
- Neil GA, Zimmermann U.** Electrofusion *Methods Enzymol.* 1993;220:174-96
- Ng S. Y., Gunning P., Eddy R., Ponte P., Leavitt J., Shows T., Kedes L.** Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes *Mol Cell Biol.* 1985 Oct;5(10):2720-32
- Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E.** Apoptosis and necrosis: different execution of the same death *Biochem Soc Symp.* 1999;66:69-73
- Niemann H., Meinecke B.** Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren 1993 Ferdinand Enke Verlag
- Niemann H., Wrenzycki C.** Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development *Theriogenology.* 2000 Jan 1;53(1):21-34
- Nikolov D. B., Burley S. K.** RNA polymerase II transcription initiation: a structural view *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 7;94(1):15-22
- Nisson P. E., Francis S., Crain W. R.** Spatial patterns of gene expression in preimplantation mouse embryos *Mol Reprod Dev* 1989;1(4):254-63.
- Nover L., Luckner M., Parthier B.** Zelldifferenzierung, molekulare Grundlagen und Probleme 1978 Gustav Fischer Verlag
- O'Dell D. M., Raghupathi R., Crino P. B., Morrison B. 3rd, Eberwine J. H., McIntosh T. K.** Amplification of mRNAs from single, fixed, TUNEL-positive cells *Biotechniques.* 1998 Oct;25(4):566-8, 570
- Ogura A., Inoue K., Takano K., Wakayama T., Yanagimachi R.** Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells *Mol Reprod Dev.* 2000 Sep;57(1):55-9

- Ohshima K., Hashimoto K., Izumo S., Suzumiya J., Kikuchi M.** Detection of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) DNA and mRNA in individual cells by polymerase chain reaction (PCR) in situ hybridization (ISH) and reverse transcription (RT)-PCR ISH *Hematol Oncol.* 1996 Jun;14(2):91-100
- Okamoto T., Suzuki T., Yamamoto N.** Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology *Nat Biotechnol.* 2000 Apr;18(4):438-41
- Oliner J. D., Pietenpol J. A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K. W., Vogelstein B.** Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53 *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):857-60
- O'Neill E. M., O'Shea E. K.** Transcriptional regulation. Cyclins in initiation *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):121-2
- Pal S. K., Crowell R., Kiessling A. A., Cooper G. M.** Expression of proto-oncogenes in mouse eggs and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 1993 May;35(1):8-15.
- Pampfer S.** Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages--a review *Placenta.* 2000 Mar-Apr;21 Suppl A:S3-10
- Parchment R. E.** The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo *Int J Dev Biol.* 1993 Mar;37(1):75-83
- Parrish J. J., Susko-Parrish J., Winer M. A., First N. L.** Capacitation of bovine sperm by heparin *Biol Reprod.* 1988 Jun;38(5):1171-80
- Parrish T. K.** How to survive a nightmare *J Natl Assoc Hosp Dev.* 1988 Fall;21-3
- Pelton T. A., Bettess M. D., Lake J., Rathjen J., Rathjen P. D.** Developmental complexity of early mammalian pluripotent cell populations in vivo and in vitro *Reprod Fertil Dev.* 1998;10(7-8):535-49
- Pesole G., Bernardi G., Saccone C.** Isochore specificity of AUG initiator context of human genes *FEBS Lett.* 1999 Dec 24;464(1-2):60-2
- Peter M. E., Krammer P. H.** Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis *Curr Opin Immunol.* 1998 Oct;10(5):545-51
- Phillips J., Eberwine J. H.** Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells *Methods.* 1996 Dec;10(3):283-8
- Picksley S. M., Lane D. P.** The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays.* 1993 Oct;15(10):689-90
- Piette J., Neel H., Marechal V.** Mdm2: keeping p53 under control *Oncogene.* 1997 Aug 28;15(9):1001-10
- Piko L., Clegg K. B.** Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos *Dev Biol.* 1982 Feb;89(2):362-78

- Platt T.** Transcription termination and the regulation of gene expression *Annu Rev Biochem.* 1986;55:339-72
- Pluquet O., Hainaut P.** Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction *Cancer Lett.* 2001 Dec 10;174(1):1-15
- Prather R. S., First N. L.** Cloning embryos by nuclear transfer *J Reprod Fertil Suppl.* 1990;41:125-34
- Prelle K., Stojkovic M., Boxhammer K., Motlik J., Ewald D., Arnold G. J., Wolf E.** Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos *Endocrinology.* 2001 Mar;142(3):1309-16
- Ptashne M.** How eukaryotic transcriptional activators work *Nature.* 1988 Oct 20;335(6192):683-9
- Pugh B. F.** Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein *Gene.* 2000 Sep 5;255(1):1-14
- Quinn P., Horstman F. C.** Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? *Hum Reprod.* 1998 Dec;13 Suppl 4:173-83
- Racowsky C.** High rates of embryonic loss, yet high incidence of multiple births in human ART: is this paradoxical? *Theriogenology.* 2002 Jan 1;57(1):87-96
- Raetz E. A., Moos P. J., Szabo A., Carroll W. L.** Gene expression profiling. Methods and clinical applications in oncology *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001 Oct;15(5):911-30
- Raff M. C., Barres B. A., Burne J. F., Coles H. S., Ishizaki Y., Jacobson M. D.** Programmed cell death and the control of cell survival *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Aug 30;345(1313):265-8
- Reed J. C.** Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2403-4
- Reed J. C.** Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer *Curr Opin Oncol.* 1999 Jan;11(1):68-75
- Reik W., Dean W., Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1089-93
- Reue K.** mRNA quantitation techniques: considerations for experimental design and application *J Nutr.* 1998 Nov;128(11):2038-44
- Reuss B., Hellmann P., Traub O., Butterweck A., Winterhager E.** Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev Genet.* 1997;21(1):82-90.
- Reynolds M. A., Schieve L. A., Jeng G., Peterson H. B., Wilcox L. S.** Risk of multiple birth associated with in vitro fertilization using donor eggs *Am J Epidemiol.* 2001 Dec 1;154(11):1043-50

- Rice G. A., Kane C. M., Chamberlin M. J.** Footprinting analysis of mammalian RNA polymerase II along its transcript: an alternative view of transcription elongation *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15;88(10):4245-9
- Rizos D., Ward F., Boland M. P., Lonergan P.** Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification *Theriogenology*. 2001 Jul 1;56(1):1-16
- Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M. P., Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality *Mol Reprod Dev*. 2002 Feb;61(2):234-48
- Robson P., Stein P., Zhou B., Schultz R. M., Baldwin H. S.** Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst *Dev Biol*. 2001 Jun 15;234(2):317-29
- Rockett J. C., Dix D. J.** DNA arrays: technology, options and toxicological applications *Xenobiotica*. 2000 Feb;30(2):155-77
- Romero J. R.** Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Dec;123(12):1161-9
- Rousseau D., Cannella D., Boulaire J., Fitzgerald P., Fotedar A., Fotedar R.** Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway *Oncogene*. 1999 Jul 29;18(30):4313-25
- Rüsse I., Sinowatz F.** *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere* 1991 Verlag Paul Parey
- Sakkas D., Percival G., D'Arcy Y., Sharif K., Afnan M.** Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection *Fertil Steril*. 2001 Dec;76(6):1150-6
- Salomon R. N.** Introduction to quantitative reverse transcription polymerase chain reaction *Diagn Mol Pathol*. 1995b Jun;4(2):82-4
- Salomon R. N.** Introduction to reverse transcription polymerase chain reaction *Diagn Mol Pathol*. 1995a Mar;4(1):2-3
- Salunga R. C., Guo H., Luo L., Bittner A., Joy K. C., Chambers J. R., Wan J. S., Jackson M. R., Erlander M.** Gene expression analysis via cDNA microarray of laser capture microdissected cells from fixed tissue in: **Schena M.** *DNA Microarrays A practical approach*, Oxford University Press, 1999, 121-138
- Schadt E. E., Li C., Ellis B., Wong W. H.** Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data *J Cell Biochem*. 2001;Suppl 37:120-5
- Schena M.** *DNA-Microarrays* 1999 Oxford University Press
- Schena M.** Genome analysis with gene expression microarrays *Bioessays*. 1996 May;18(5):427-31

- Schena M., Heller R. A., Theriault T. P., Konrad K., Lachenmeier E., Davis R. W.** Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics *Trends Biotechnol.* 1998 Jul;16(7):301-6
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):467-70
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., Davis R. W.** Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10614-9
- Schnorr B.** Embryologie der Haustiere 1985 Ferdinand Enke Verlag
- Schultz R. M.** Regulation of zygotic gene activation in the mouse *Bioessays.* 1993 Aug;15(8):531-8
- Schultz R. M., Davis W. Jr., Stein P., Svoboda P.** Reprogramming of gene expression during preimplantation development *J Exp Zool.* 1999 Oct 15;285(3):276-82
- Shehu D., Marsicano G., Flechon J. E., Galli C.** Developmentally regulated markers of in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote.* 1996 May;4(2):109-21.
- Shen Y., White E.** p53-dependent apoptosis pathways *Adv Cancer Res.* 2001;82:55-84
- Sinclair K. D., Young L. E., Wilmut I., McEvoy T. G.** In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men *Hum Reprod.* 2000 Dec;15 Suppl 5:68-86
- Sirard M. A., Lambert R. D.** In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy *Biol Reprod.* 1985 Sep;33(2):487-94
- Smith A. L.** Blastocyst culture in human IVF: the final destination or a stop along the way? *Theriogenology.* 2002 Jan 1;57(1):97-107
- Snow M. H.** Growth and its control in early mammalian development *Br Med Bull.* 1981 Sep;37(3):221-6
- Spell A. R., Beal W. E., Corah L. R., Lamb G. C.** Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle *Theriogenology.* 2001 Jul 15;56(2):287-97
- Spirin A. S.** Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Mol Reprod Dev.* 1994 May;38(1):107-17
- Stegh A. H., Peter M. E.** Apoptosis and caspases *Cardiol Clin.* 2001 Feb;19(1):13-29
- Stojanov T., O'Neill C.** Ontogeny of expression of a receptor for platelet-activating factor in mouse preimplantation embryos and the effects of fertilization and culture in vitro on its expression *Biol Reprod.* 1999 Mar;60(3):674-82
- Strömberg B., Dahlquist G., Ericson A., Finnstrom O., Koster M., Stjernqvist K.** Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study *Lancet.* 2002 Feb 9;359(9305):461-5

- Struhl K.** Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):1-4
- Stryer L. Freeman W. H.** *Biochemie* 1993 Spektrum Akademischer Verlag
- Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L.** Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development *Biol Reprod*. 1987 Feb;36(1):1-16.
- Tam P. P., Quinlan G. A.** Mapping vertebrate embryos *Curr Biol*. 1996 Feb 1;6(2):104-6
- Tam P. P., Williams E. A., Chan W. Y.** Gastrulation in the mouse embryo: ultrastructural and molecular aspects of germ layer morphogenesis *Microsc Res Tech*. 1993 Nov 1;26(4):301-28
- Taylor K. D., Piko L.** Quantitative changes in cytoskeletal beta- and gamma-actin mRNAs and apparent absence of sarcomeric actin gene transcripts in early mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 1990 Jun;26(2):111-21.
- Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A.** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species *Mol Reprod Dev*. 1990 May;26(1):90-100
- Terada Y., Fukaya T., Takahashi M., Yajima A.** Expression of growth hormone receptor in mouse preimplantation embryos *Mol Hum Reprod*. 1996 Nov;2(11):879-81
- Teruel M., Smith R., Catalano R.** Growth factors and embryo development *Biocell*. 2000 Aug;24(2):107-22
- Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E.** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova *J Reprod Fertil*. 1972 Sep;30(3):493-7
- Tesarik J.** Developmental control of human preimplantation embryos: a comparative approach *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1988 Dec;5(6):347-62
- Thompson C. B.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62
- Thompson E. M.** Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo *Reprod Nutr Dev*. 1996;36(6):619-35
- Thompson J. G., Partridge R. J., Houghton F. D., Cox C. I., Leese H. J.** Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos *J Reprod Fertil*. 1996 Mar;106(2):299-306
- Tjian R.** The biochemistry of transcription in eukaryotes: a paradigm for multisubunit regulatory complexes *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996 Apr 29;351(1339):491-9
- Trenkle T., Welsh J., McClelland M.** Differential display probes for cDNA arrays *Biotechniques*. 1999 Sep;27(3):554-60, 562, 564
- Trounson A., Anderiesz C., Jones G.** Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence *Reproduction*. 2001 Jan;121(1):51-75

- Trounson A., Pera M.** Potential benefits of cell cloning for human medicine *Reprod Fertil Dev.* 1998;10(1):121-5
- Trounson A., Pushett D., MacLellan L. J., Lewis I., Gardner D. K.** Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals *Theriogenology* 1994 41:57-66
- Tseng G. C., Oh M. K., Rohlin L., Liao J. C., Wong W. H.** Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 15;29(12):2549-57
- Valdimarsson G., De Sousa P. A., Beyer E. C., Paul D. L., Kidder G. M.** Zygotic expression of the connexin43 gene supplies subunits for gap junction assembly during mouse preimplantation development. *Mol Reprod Dev.* 1991 Sep;30(1):18-26.
- Van Berkum N. L., Holstege F. C.** DNA microarrays: raising the profile *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Feb;12(1):48-52.
- Van Furth R.** Cell kinetic and genetic aspects of macrophage activation *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1986 Mar-Apr;137C(2):192-7
- Van Gelder R. N., von Zastrow M. E., Yool A., Dement W. C., Barchas J. D., Eberwine J. H.** Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):1663-7
- Van Wagtendonk-De Leeuw A. M., Aerts B. J., den Daas J. H.** Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study *Theriogenology.* 1998 Apr 1;49(5):883-94
- Vaux D. L., Haecker G., Strasser A.** An evolutionary perspective on apoptosis *Cell.* 1994 Mar 11;76(5):777-9
- Vaux D. L., Strasser A.** The molecular biology of apoptosis *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2239-44
- Vermes I., Haanen C.** Apoptosis and programmed cell death in health and disease *Adv Clin Chem.* 1994;31:177-246
- Vidaeff A. C., Racowsky C., Rayburn W. F.** Blastocyst transfer in human in vitro fertilization. A solution to the multiple pregnancy epidemic *J Reprod Med.* 2000 Jul;45(7):529-39; discussion 539-40
- Viuff D., Greve T., Avery B., Hyttel P., Brockhoff P. B., Thomsen P. D.** Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination *Biol Reprod.* 2000 Oct;63(4):1143-8
- Viuff D., Rickords L., Offenberg H., Hyttel P., Avery B., Greve T., Olsaker I., Williams J. L., Callesen H., Thomsen P. D.** A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid *Biol Reprod.* 1999 Jun;60(6):1273-8
- Voet D., Voet J. G.** *Biochemie VCH Weinheim.* 1992 857-897
- Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R.** Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei *Nature.* 1998 Jul 23;394(6691):369-74



- Wakayama T., Yanagimachi R.** Cloning the laboratory mouse *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Jun;10(3):253-8
- Wang L., Wu Q., Qiu P., Mirza A., McGuirk M., Kirschmeier P., Greene J. R., Wang Y., Pickett C. B., Liu S.** Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):43604-10
- Ward F. A., Lonergan P., Enright B. P., Boland M. P.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology *Theriogenology.* 2000 Aug;54(3):433-46
- Warner C. M., McElhinny A. S., Wu L., Cieluch C., Ke X., Cao W., Tang C., Exley G. E.** Role of the *Ped* gene and apoptosis genes in control of preimplantation development *J Assist Reprod Genet.* 1998 May;15(5):331-7
- Wassarman P. M., Kinloch R. A.** Gene expression during oogenesis in mice *Mutat Res.* 1992 Dec;296(1-2):3-15
- Watson A. J.** The cell biology of blastocyst development *Mol Reprod Dev.* 1992 Dec;33(4):492-504
- Watson A. J., Barcroft L. C.** Regulation of blastocyst formation *Front Biosci.* 2001 May 1;6:D708-30
- Watson A. J., De Sousa P., Caveney A., Barcroft L. C., Natale D., Urquhart J., Westhusin M. E.** Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):355-64
- Watson G. D., Crick F. H. C.** A structure for DNA *Nature* 1953 April 25; 171:737-738
- Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells *Biol Reprod.* 1999 Apr;60(4):996-1005
- Wetmur J. G.** DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridisation *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1991;26(3-4):227-59
- White T. J., Arnheim N., Erlich H. A.** The polymerase chain reaction *Trends Genet.* 1989 Jun;5(6):185-9
- Wildsmith S. E., Archer G. E., Winkley A. J., Lane P. W., Bugelski P. J.** Maximization of signal derived from cDNA microarrays *Biotechniques.* 2001 Jan;30(1):202-6, 208
- Wiley L. M., Kidder G. M., Watson A. J.** Cell polarity and development of the first epithelium *Bioessays.* 1990 Feb;12(2):67-73
- Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells *Nature.* 1997 Feb 27;385(6619):810-3
- Wilson D. S., Nock S.** Functional protein microarrays *Curr Opin Chem Biol.* 2002 Feb;6(1):81-5
- Wilson K. S., Noller H. F.** Molecular movement inside the translational engine *Cell.* 1998 Feb 6;92(3):337-49

**Wrenzycki C.** Experimentelle Untersuchungen zur Expression des Gap junction-Gens Connexin43 in vivo und in vitro produzierten präimplantatorischen Rinderembryonen mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 1995 Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

**Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H.** Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA *Mol Reprod Dev.* 1999 May;53(1):8-18.

**Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H.** Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA *J Reprod Fertil.* 1998 Mar;112(2):387-98

**Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H.** Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo *J Reprod Fertil.* 1996 Sep;108(1):17-24

**Wrenzycki C., Lucas-Hahn A., Herrmann D., Lemme E., Korsawe K., Niemann H.** In Vitro Production and Nuclear Transfer Affect Dosage Compensation of the X-Linked Gene Transcripts G6PD, PGK, and Xist in Preimplantation Bovine Embryos *Biol Reprod.* 2002 Jan;66(1):127-34

**Wrenzycki C., Wells D., Herrmann D., Miller A., Oliver J., Tervit R., Niemann H.** Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts *Biol Reprod.* 2001 Jul;65(1):309-17

**Xu J., Cheung T. M., Chan S. T., Ho P. C., Yeung W. S.** Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cocultured mouse embryos *Fertil Steril.* 2000 Dec;74(6):1215-9

**Xu J., Cheung T., Chan S. T., Ho P., Yeung W. S.** The incidence of cytoplasmic fragmentation in mouse embryos in vitro is not affected by inhibition of caspase activity *Fertil Steril.* 2001 May;75(5):986-91

**Xu X. R., Huang J., Xu Z. G., Qian B. Z., Zhu Z. D., Yan Q., Cai T., Zhang X., Xiao H. S., Qu J., Liu F., Huang Q. H., Cheng Z. H., Li N. G., Du J. J., Hu W., Shen K. T., Lu G., Fu G., Zhong M., Xu S. H., Gu W. Y., Huang W., Zhao X. T., Hu G. X., Gu J. R., Chen Z., Han Z. G.** Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26):15089-94

**Yan H., Dobbie Z., Gruber S. B., Markowitz S., Romans K., Giardiello F. M., Kinzler K. W., Vogelstein B.** Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):25-6

**Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Lin D. M., Peng V., Ngai J., Speed T. P.** Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation *Nucleic Acids Res.* 2002 Feb 15;30(4):e15

- Yano N., Habib N. A., Fadden K. J., Yamashita H., Mitry R., Jauregui H., Kane A., Endoh M., Rifai A.** Profiling the adult human liver transcriptome: analysis by cDNA array hybridisation *J Hepatol.* 2001 Aug;35(2):178-86
- Yeung K. Y., Ruzzo W. L.** Principal component analysis for clustering gene expression data *Bioinformatics.* 2001 Sep;17(9):763-74
- Young L. E., Sinclair K. D., Wilmut I.** Large offspring syndrome in cattle and sheep *Rev Reprod.* 1998 Sep;3(3):155-63
- Yovich J. L., Stanger J. D., Yovich J. M., Tuvik A. I.** Quality of embryos from in-vitro fertilisation *Lancet.* 1984 Feb 25;1(8374):457
- Zakhartchenko V., Mueller S., Alberio R., Scherthaner W., Stojkovic M., Wenigerkind H., Wanke R., Lassnig C., Mueller M., Wolf E., Brem G.** Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts *Mol Reprod Dev.* 2001 Nov;60(3):362-9
- Zhang M. Q.** Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists *Genome Res.* 1999 Aug;9(8):681-8
- Zhao N., Hashida H., Takahashi N., Misumi Y., Sakaki Y.** High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression *ene.* 1995 Apr 24;156(2):207-13
- Zheng P., Wang H., Bavister B. D., Ji W.** Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development *Hum Reprod.* 2001 Feb;16(2):300-5
- Zhou Y., Abagyan R.** Match-Only Integral Distribution (MOID) Algorithm for high-density oligonucleotide array analysis *BMC Bioinformatics.* 2002;3(1):3
- Zhu Y. Y., Machleder E. M., Chenchik A., Li R., Siebert P. D.** Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction *Biotechniques.* 2001 Apr;30(4):892-7
- Zimmermann J. W., Schultz R. M.** Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 7;91(12):5456-60
- Zimmermann U., Urnovitz H. B.** Principles of electrofusion and electropermeabilization *Methods Enzymol.* 1987;151:194-221
- Ziomek C. A., Johnson M. H.** Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction *Cell.* 1980 Oct;21(3):935-42
- Zou G. M., Reznikoff-Etievant M. F., Leon A., Verge V., Hirsch F., Milliez J.** Fas-mediated apoptosis of mouse embryo stem cells: its role during embryonic development *Am J Reprod Immunol.* 2000 Apr;43(4):240-8

## 8 Anhang

### 8.1 Nukleotidsequenzen der als Standard verwendeten Proben

#### 8.1.1 PGCS-lo

5'CCGCGGGAATTCGATT3'

#### 8.1.2 PGCS-up

5'CGGCCGCAATTCAGT3'

#### 8.1.3 pBR322

Es wurde der geschlossene Vektor verwendet.

Sequenz (Sutcliffe, J.G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 (8), 3737-3741):

TTCTCATGTT	TGACAGCTTA	TCATCGATAA	GCTTTAATGC	GGTAGTTTAT	CACAGTTAAA	TTGCTAACGC
AGTCAGGCAC	CGTGTATGAA	ATCTAACAAT	GCGCTCATCG	TCATCCTCGG	CACCGTCACC	CTGGATGCTG
TAGGCATAGG	CTTGGTTATG	CCGGTACTGC	CGGGCCTCTT	GCGGGATATC	GTCCATTCCG	ACAGCATCGC
CAGTCACTAT	GGCGTGCTGC	TAGCGCTATA	TGCGTTGATG	CAATTTCTAT	GCGCACCCGT	TCTCGGAGCA
CTGTCCGACC	GCTTTGGCCG	CCGCCAGTC	CTGCTCGCTT	CGCTACTTGG	AGCCACTATC	GACTACGCGA
TCATGGCGAC	CACACCGTC	CTGTGGATCC	TCTACGCCGG	ACGCATCGTG	GCCGGCATCA	CCGGCGCCAC
AGGTGCGGTT	GCTGGCGCCT	ATATCGCCGA	CATCACCGAT	GGGAAGATC	GGGCTCGCCA	CTTCGGGCTC
ATGAGCGCTT	GTTTCGGCGT	GGGTATGGTG	GCAGGCCCCG	TGGCCGGGGG	ACTGTTGGGC	GCCATCTCCT
TGCATGCACC	ATTCCTTGCG	GCGGCGGTGC	TCAACGGCCT	CAACCTACTA	CTGGGCTGCT	TCCTAATGCA
GGAGTCGCAT	AAGGGAGAGC	GTCGACCGAT	GCCCTTGAGA	GCCTTCAACC	CAGTCAGCTC	CTTCCGGTGG
GCGCGGGGC	ATGACTATCG	TCGCCGCACT	TATGACTGTC	TTCTTTATCA	TGCAACTCGT	AGGACAGGTG
CCGGCAGCGC	TCTGGGTCAT	TTTCGGCGAG	GACCGTTTTT	GCTGGAGCGC	GACGATGATC	GGCCTGTCCG
TTGCGGTATT	CGGAATCTTG	CACGCCCTCG	CTCAAGCCTT	CGTCACTGGT	CCCGCCACCA	AACGTTTCGG
CGAGAAGCAG	GCCATTATCG	CCGGCATGGC	GGCCGACGCG	CTGGGCTACG	TCTTGCTGGC	GTTCGCGACG
CGAGGCTGGA	TGGCCTTCCC	CATTATGATT	CTTCTCGCTT	CCGGCGGCAT	CGGGATGCC	GCGTTGCAGG
CCATGCTGTC	CAGGCAGGTA	GATGACGACC	ATCAGGGACA	GCTTCAAGGA	TCGCTCGCGG	CTCTTACCAG
CCTAACTTCG	ATCACTGGAC	CGCTGATCGT	CACGGCGATT	TATGCCGCCT	CGGCGAGCAC	ATGGAACGGG
TTGGCATGGA	TTGTAGGCGC	CGCCCTATAC	CTTGTCTGCC	TCCCCGCGTT	GCGTCCGCGT	GCATGGAGCC
GGGCCACCTC	GACCTGAATG	GAAGCCGGCG	GCACCTCGCT	AACGGATTCA	CCACTCCAAG	AATTGGAGCC
AATCAATTCT	TGCGGAGAAC	TGTGAATGCG	CAAACCAACC	CTTGGCAGAA	CATATCCATC	GCGTCCGCCA
TCTCCAGCAG	CCGCACGCGG	CGCATCTCGG	GCAGCGTTGG	GTCCTGGCCA	CGGGTGCACA	TGATCGTGCT
CCTGTCGTTG	AGGACCCGGC	TAGGCTGGCG	GGGTTCGCTT	ACTGGTTAGC	AGAATGAATC	ACCGATACGC
GAGCGAACGT	GAAGCGACTG	CTGCTGCAAA	ACGTCTGCGA	CCTGAGCAAC	AACATGAATG	GTCTTCGGTT
TCCGTGTTTC	GTAAAGTCTG	GAAACGCGGA	AGTCAGCGCC	CTGCACCATT	ATGTTCCGGA	TCTGCATCGC
AGGATGCTGC	TGGCTACCCT	GTGGAACACC	TACATCTGTA	TTAACGAAGC	GCTGGCATTG	ACCCTGAGTG
ATTTTCTCT	GGTCCCGCCG	CATCCATACC	GCCAGTTGTT	TACCCTCACA	ACGTTCCAGT	AACCGGGCAT
GTTTCATCATC	AGTAACCCGT	ATCGTGAGCA	TCTCTCTCG	TTTCATCGGT	ATCATTACCC	CCATGAACAG
AAATCCCCT	TACACGGAGG	CATCAGTGAC	CAAACAGGAA	AAAACCGCCC	TTAACATGGC	CCGCTTTATC
AGAAGCCAGA	CATTAACGCT	TCTGGAGAAA	CTCAACGAGC	TGGACGCGGA	TGAACAGGCA	GACATCTGTG
AATCGCTTCA	CGACCACGCT	GATGAGCTTT	ACCGCAGCTG	CCTCGCGCGT	TTCGGTGATG	ACGGTGAAAA
CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	CTGTAAGCGG	ATGCCGGGAG	CAGACAAGCC
CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	TGTTGGCGGG	TGTCGGGGCG	CAGCCATGAC	CCAGTCACGT	AGCGATAGCG
GAGTGTATAC	TGGCTTAACT	ATGCGGCATC	AGAGCAGATT	GTAAGTGTAG	TGCACCATAT	GCGGTGTGAA
ATACCGCACA	GATGCGTAAAG	GAGAAAATAC	CGCATCAGGC	GCTCTTCCGC	TTCCTCGCTC	ACTGACTCGC
TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA
ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAAGG	CAGCAAAAAG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC
GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA
GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC
TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	GTCCGCTTTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAT
AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG	TAGGTCGTTT	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC

CCGTTACAGCC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATCG	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA	GACACGACTT
ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC
TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG
TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA	ACAAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTTT
TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	C'TTTGATCTT	TTCTACGGGG
TCTGACGCTC	AGTGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA
CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA
CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTTCATC	CATAGTTGCC
TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG	CCCCAGTGCT	GCAATGATAC
CGCGAGACCC	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG	CCGAGCGCAG
AAGTGGTCTT	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT
TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGTTGTT	GCCATTGCTG	CAGGCATCGT	GGTGTACGC	TCGTCGTTTG
GTATGGCTTC	ATTCAGCTCC	GGTCCCAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCATGT	TGTGCAAAAA
AGCGGTTAGC	TCCTTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAAGT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATATC	ACTCATGGTT
ATGGCAGCAC	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCTGTGACT	GGTGAGTACT
CAACCAAGTC	ATTTCAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA	CACGGGATAA
TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAAACCTCTCA
AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCG	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT
TTACTTTTAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAAACAGGAAG	GCAAAAATGCC	GCAAAAAAGG	GAATAAGGGC
GACACGGAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTTTCAA	TATTATTGAA	GCATTTATCA	GGGTTATTGT
CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAAATAGG	GGTTCCGCGC	ACATTTCCCC
GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAACC	TATAAAAAATA	GGCGTATCAC
GAGGCCCTTT	CGTCTTCAAG	AA				

### 8.1.4 pGEMT easy

Es wurde der geschlossene Vektor verwendet. Sequenz (laut Manual des Herstellers):

GGGCGAATTG	GGCCCCGACGT	CGCATGCTCC	CGGCCGCCAT	GGCGCCGCG	GGAATTCGAT	ATCACTAGTG
AATTCGCGGC	CGCCTGCAGG	TCGACCATAT	GGGAGAGCTC	CCAACGCGTT	GGATGCATAG	CTTGAGTATT
CTATAGTGTC	ACCTAAATAG	CTTGGCGTAA	TCATGGTCAT	AGCTGTTTCC	TGTGTGAAAT	TGTTATCCGC
TCACAATTCC	ACACAACATA	CGAGCCGGAA	GCATAAAGTG	TAAAGCCTGG	GGTGCCTAAT	GAGTGAGCTA
ACTCACATTA	ATTGCGTTGC	GCTCACTGCC	CGCTTTCCAG	TCGGGAAACC	TGTCGTGCCA	GCTGCATTAA
TGAATCGGCC	AACGCGCGGG	GAGAGGCGGT	TTGCGTATTG	GGCGCTCTTC	CGCTTCCTCG	CTCACTGACT
CGCTGCGCTC	GGTCGTTCCG	CTGCGGCGAG	CGGTATCAGC	TCACTCAAAG	GCGGTAATAC	GGTTATCCAC
AGAATCAGGG	GATAACGCAG	GAAAGAACAT	GTGAGCAAAA	GGCCAGCAAA	AGGCCAGGAA	CCGTAAAAAG
GCCGCGTTGC	TGGCGTTTTT	CCATAGGCTC	CGCCCCCTG	ACGAGCATCA	CAAAAATCGA	CGCTCAAGTC
AGAGGTGGCG	AAACCCGACA	GGACTATAAA	GATACCAGGC	GTTTCCCCCT	GGAAGCTCCC	TCGTGCGCTC
TCCTGTTCCG	ACCCTGCCGC	TTACCGGATA	CCTGTCCGCC	TTTCTCCCTT	CGGGAAGCGT	GGCGCTTTCT
CATAGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTCG	GTGTAGGTCG	TTCGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC
CCCCGTTCA	GCCCCAGCGC	TGCGCCTTAT	CCGGTAACATA	TCGTCTTGAG	TCCAACCCGG	TAAGACACGA
CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTGGTAA	CAGGATTAGC	AGAGCGAGGT	ATGTAGGCGG	TGCTACAGAG
TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA	CTACGGCTAC	ACTAGAAGAA	CAGTATTTGG	TATCTGCGCT	CTGCTGAAGC
CAGTTACCTT	CGGAAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCCGG	CAAAACAACC	ACCGTGGTA	GCGGTGGTTT
TTTTGTTTGC	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG	AAAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG
GGGTCTGACG	CTCAGTGGAA	CGAAAACCTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA	AAAAGGATCT
TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAAATGAA	GTTTTAAATC	AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC
TGACAGTTAC	CAATGCTTAA	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTGCTTC	ATCCATAGTT
GCCTGACTCC	CCGTCGTGTA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA
TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG	ATTTATCAGC	AATAAACCCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG
CAGAAAGTGGT	CCTGCAACTT	TATCCGCCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC	TAGAGTAAAGT
AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGCCATTG	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCTG
TTGGTATGGC	TTCAATTCAGC	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTCAGA	AGTAAGTTGG	CCGCAGTGTT	ATCACTCATG
GTATATGGCAG	CACTGCATAA	TTCTCTTACT	GTCATGCCAT	CCGTAAGATG	CTTTTCTGTG	ACTGGTGAGT
ACTCAACCAA	GTCAATCTGA	GAATAGTGTA	TGCGGCGACC	GAGTTGCTCT	TGCCCCGCGT	CAATACGGGA
TAATACCGCG	CCACATAGCA	GAACTTTTAA	AGTGCTCATC	ATTGGAAAAAC	GTCTTCCGGG	GCGAAAACTC
TCAAGGATCT	TACCCTGTGT	GAGATCCAGT	TCGATGTAAC	CCACTCGTGC	ACCCAAGTGA	CTTTCAGCAT
CTTTTACTTT	TACCAGCGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGCAAAAAT	GCCGCAAAAA	AGGGAATAAG
GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT	CTTCTTTTTT	CAATATTATT	GAAGCATTTA	TCAGGGTTAT

TGTCTCATGA	GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCCG	CGCACATTC
CCCGAAAAGT	GCCACCTGAT	GCGGTGTGAA	ATACCGCACA	GATGCGTAAG	GAGAAAATAC	CGCATCAGGA
AATTGTAAGC	GTTAATATTT	TGTTAAAAAT	CGCGTTAAAT	TTTTGTAAAA	TCAGCTCATT	TTTTAACCAA
TAGGCCGAAA	TCGGCAAAAT	CCCTTATAAA	TCAAAAAGAA	AGACCGAGAT	AGGGTTGAGT	GTTGTTCCAG
TTTGGAACAA	GAGTCCACTA	TTAAAGAACG	TGGACTCCAA	CGTCAAAGGG	CGAAAAACCG	TCTATCAGGG
CGATGGCCCA	CTACGTGAAC	CATCACCCTA	ATCAAGTTTT	TTGGGGTTCGA	GGTGCCGTAA	AGCACTAAAT
CGGAACCCTA	AAGGGAGCCC	CCGATTTAGA	GCTTGACGGG	GAAAGCCGGC	GAACGTGGCG	AGAAAGGAAG
GGAAGAAAGC	GAAAGGAGCG	GGCGCTAGGG	CGCTGGCAAG	TGTAGCGGTC	ACGCTGCGCG	TAACCACCAC
ACCCGCCGCG	CTTAATGCGC	CGCTACAGGG	CGCGTCCATT	CGCCATTTCAG	GCTGCGCAAC	TGTTGGGAAG
GGCGATCGGT	GCGGGCCTCT	TCGCTATTAC	GCCAGCTGGC	GAAAGGGGGA	TGTGCTGCAA	GGCGATTAAG
TTGGGTAAAC	CCAGGGTTTT	CCCAGTCACG	ACGTTGTAAA	ACGACGGCCA	GTGAATTGTA	ATACGACTCA
CTATA						

### 8.1.5 Globin

Es wurde ein PCR-Produkt verwendet.

Sequenz (Cheng,J.F., Raid,L. and Hardison,R.C. Isolation and nucleotide sequence of the rabbit globin gene cluster psi zeta-alpha 1-psi alpha. Absence of a pair of alpha-globin genes evolving in concert 1986 J. Biol. Chem. 261 (2), 839-848):

GCAGCCACGG	TGGCGAGTAT	GGCGCCGAGG	CCGTGGAGAG	GTGAGGACCC	CCGCCCCGCC	CCGCCCCGCC
CGAGCCCGCC	GGCGCCGCGC	CCCGCTCACG	GCCTCCTGTC	CCCGCAGGAT	GTTCTTGGGC	TTCCCCACCA
CCAAGACCTA	CTTCCCCCAC	TTCGACTTCA	CCCACGGCTC	TGAGCAGATC	AAAGCCACG	GCAAGAAGGT
GTCCGAAGCC	CTGACCAAGG	CCGTGGGCCA	CCTGGACGAC	CTGCCCGGCG	CCCTGTCTAC	TCTCAGCGAC
CTGCACGCGC	ACAAGCTGCG	GGTGGACCCG	GTGAATTTCA	AGGTGAGCCC	GC	

### 8.1.6 pBKS

Es wurde der geschlossene Vektor verwendet. Sequenz (Short,J.M., Fernandez,J.M., Sorge,J.A. and Huse,W.D.: Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties Nucleic Acids Res. 1988 16 (15), 7583-7600):

CTAAATTGTA	AGCGTTAATA	TTTTGTAAAA	ATTCGCGTTA	AATTTTTGTT	AAATCAGCTC	ATTTTTTAA
CCAATAGGCC	GAAATCGGCA	AAATCCCTTA	TAAATCAAAA	GAATAGACCG	AGATAGGGTT	GAGTGTGTG
CCAGTTTGGA	ACAAGAGTCC	ACTATTAAAG	AACGTGGACT	CCAACGTCAA	AGGGCGAAAA	ACCGTCTATC
AGGGCGATGG	CCCCTACGTT	GAACCATCAC	CCTAATCAAG	TTTTTTGGGG	TCGAGGTGCC	GTAAAGCACT
AAATCGGAAC	CCTAAAGGGA	GCCCCGATTT	TAGAGCTTGA	CGGGGAAAGC	CGGCGAACGT	GGCGAGAAAG
GAAGGGAAGA	AAGCGAAAGG	AGCGGGCGCT	AGGGCGCTGG	CAAGTGTAGC	GGTACGCTG	CGCGTAACCA
CCACACCCGC	CGCGCTTAAT	GCGCCGCTAC	AGGGCGCGTC	CCATTTCGCA	TTCAGGCTGC	GCAACTGTTG
GGAAGGGCGA	TCGGTGCGGG	CCTCTTCGCT	ATTACGCCAG	CTGGCGAAAG	GGGGATGTGC	TGCAAGGCGA
TTAAGTTGGG	TAACGCCAGG	GTTTTCCCAG	TCACGACGTT	GTAAAACGAC	GGCCAGTGAG	CGCGCGTAAT
ACGACTCACT	ATAGGGCGAA	TTGGAGCTCC	ACCGCGGTGG	CGGCCGCTCT	AGAACTAGTG	GATCCCCCGG
GCTGCAGGAA	TTGCATATCA	AGCTTATCGA	TACCGTCGAC	CTCGAGGGGG	GGCCCCGTAC	CCAGCTTTTG
TTCCCTTTAG	TGAGGGTTAA	TTGCGCGCTT	GGCGTAATCA	TGGTCATAGC	TGTTTCCTGT	GTGAAATTGT
TATCCGCTCA	CAATTCACA	CAACATACGA	GCCGGAAGCA	TAAAGTGTA	AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG
TGAGCTAACT	CACATTAATT	GCGTTGCGCT	CACTGCCCGC	TTTCCAGTCG	GGAAACCTGT	CGTGCCAGCT
GCATTAATGA	ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	AGGCGGTTTT	CGTATTGGGC	GCTCTCCGCG	TTCTCGCTC
ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT
TATCCACAGA	ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAGGC	CAGCAAAGG	CCAGGAACCG
TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC
TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCTGGA	AGCTCCCTCG
TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGATACCTT	GTCCGCCTTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC
GCTTTCTCAT	AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG	TAGGTGCTTC	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG
CACGAACCCC	CCGTTACAGC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATCG	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA
GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC
TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG
CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA	ACAAACCACC	GCTGGTAGCG

GTGGTFTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT
TTCTACGGGG	TCTGACGCTC	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA
AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA
CTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTCATC
CATAGTTGCC	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG	CCCCAGTGCT
GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG
CCGAGCGCAG	AAGTGGTCCT	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT	CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG
AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG	CAACGTTGTT	GCCATTGCTA	CAGGCATCGT	GGTGTACACG
TCGTTCGTTT	GTATGGCTTC	ATTCAGCTCC	GGTTCCCAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT
TGTGCAAAAA	AGCGGTTAGC	TCCTTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAAGT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATATC
ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCTGTGACT
GGTGAGTACT	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA
TACGGGATAA	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG
AAAACCTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCC	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT
TCAGCATCTT	TTACTTTCAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAAGG
GAATAAGGGC	GACACGAAAA	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCTTTTTCAA	TATTATTGAA	GCATTTATCA
GGGTATTGT	CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AACAAATAGG	GGTTCCGCGC
ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	AC				

### 8.1.7 18S rRNA

Es wurde ein PCR-Amplicon verwendet

Sequenz:

AGAGGGAGCC	TGAGAAACGG	CTACCACATC	CAAGGAAGGC	AGCAGGCGCG	CAAATTACCC	ACTCCCGACC
CGGGGAGGTA	GTGACGAAAA	ATAACAATAC	AGGACTCTTT	CGAGGCCCTG	TAATTGGAAT	GAGTCCACTT
TAAATCCTTT	AACGAGGATC	CATTGGAGGG	CAAGTCTGGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATTC	CAGCTCCAAT
AGCGTATATT	AAAGTTGCTG	CAGTTAAAAA	GCTCGTAGTT	GGATCTTGGG	AGCGGGCGGG	CGGTCCGCCG
CGAGGCGAGT	CACCGCCCGT	CCCCGCCCT	TGCCTCTCGG	CGCCCCCTCG	ATGCTCTTAG	CTGAGTGTCC
CGCGGGGCC	GAAGCGTTTA	CTTTGAAAAA	ATTAGAGTGT	TCAAAGCAGG	CCCGAGC	

## **8.2 Erklärung der Abkürzungen und Gen-Nomenklatur**

∞	d.h. bis zur weiteren Verwendung
'	Minute(n)
"	Sekunde(n)
18S	18S-rRNA
A	Adenin
Abb	Abbildung
afp	Alpha fetoprotein
apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
apc	Adenomatous polyposis coli protein
aRNA	Amplified ribonucleic acid
atm	Mouse homolog of the ataxia-telangiectasia gene
AV	Average
β-actin	beta-Actin
β-cat	beta-Catenin
bad	Bcl-associated death promoter
bax	Bcl2-associated X protein
bcl2	B-Cell lymphoma protein 2
bclx	B-Cell lymphoma protein x
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
c/ebp	CCAAT/Enhancer core binding protein
casp 2	Caspase 2
casp 3	Caspase 3
casp 8	Caspase 8
casp 11	Caspase 11
cdc2	Cell division cycle protein 2
cdc 6	Cell division cycle protein 6
cdc 25a	Cell division cycle protein 25a
cdk 2	Cyclin dependent kinase 2
cdk 4	Cyclin dependent kinase 4
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
c-jun	C-jun protein
ck-ea	Cytokeratin endo A
ck-endoa	Cytokeratin endo A
c-fos	C-fos protein
c-myc	Cellular myelocytomatosis protein
cx43	Connexin 43
col	Collagen
cyc B	Cyclin B
cyc C	Cyclin C
cyc D1	Cyclin D1
cyc D2	Cyclin D2
cyc E	Cyclin E
cyp	Cytochrome P-450
daxx	Death domain associated protein xx
dbp	D-box binding protein
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat



DOP	Degenerated oligonucleotide primer
e2f5	E2F5 transcription factor
e-cad	E-cadherin
ECS	Estrous cow serum
egf	Epidermal growth factor
erbA	Erb-A thyroid hormone receptor
fas-ag	Fas(CD95)-Antigen
fas-lig	Fas(CD95)-Ligand
c-fos	Cellular fos protein
fgfr2IIIb	Fibroblast growth factor receptor 2, splice variant IIIb
fgfr2IIIc	Fibroblast growth factor receptor, splice variant IIIc
fibro	Fibronectin
G	Guanin
gadd	Growth arrest and DNA-damage inducible protein
gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
h	Stunde
ICM	Inner cell mass
IVC	In vitro culture
IVF	In vitro Fertilisation
IVP	In vitro Produktion
IVT	In vitro Transkription
kbp	Kilobasenpaare
ket	siehe p63
mad	Mitotic arrest deficient homolog
max	Max protein
mdm	Mouse double minute protein
min	Minute
mnt	Max binding protein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mxi	Max-interacting protein
myb	Myeloblastosis protein
c-myc	C-myc transcription factor
l-myc	L-myc transcription factor
NT	Nuclear Transfer
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
otc	Ornithine transcarbamylase
p15	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p19	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (ARF)
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cip1)
p42	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 6
p63	Cytoskeleton associated protein 4
p53	Tumor protein p53
p73	Tumor Protein p73
p107	Tumor suppressor p107
pBKS	Plasmidvektor Bluescript KS
pBR322	Plasmidvektor BR322
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pepck	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pgcs lo	pGem T easy Cloning Site lower Primer

pgcs up	pGem T easy Cloning Site upper Primer
pGemT	Plasmidvektor pGem T easy
rasH	RasH protein
rasK	RasK protein
rb	Retinoblastoma protein
rip	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standard Deviation
sdh	Succinat-dehydrogenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOF	Synthetic Oviduct Fluid
T	Thymin
t-ag	T-Antigen
TALP	Tyrode, Albumin, Laktat, Pyruvat
Taq	Termophilus aquaticus
tat	Tyrosine aminotransferase
TCM	Tissue Culture Medium
tdo	Tryptophan-2,3-dioxygenase
tef-1	TEA domain family member 1
tf-II	Transcription factor II
telo I	Telomerase, clone I
teloll	Telomerase, clone II
telo III	Telomerase, clone III
tgf- $\beta$	Transforming growth factor beta
tgf $\beta$ r	Transforming growth factor beta receptor
tf	Transferrin
ubi	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
vim I	Vimentin, clone I
vim II	Vimentin, clone II
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise

Die Namen von Genen wurden entsprechend der Human Gene Nomenclature ([www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature)) verwendet. Generell wurden Bezeichnungen von Genen klein geschrieben, während Bezeichnungen von Proteinen groß geschrieben wurden.

### 8.3 Publikationsliste

#### Veröffentlichungen:

**Tobias Brambrink, Philipp Wabnitz, Roman Halter, Rainer Klocke, Joe Carnwath, Wilfried Kues, Christine Wrenzycki, Dieter Paul, and Heiner Niemann** Application of cDNA arrays to monitor mRNA profiles in single preimplantation mouse embryos *Biotechniques* (2002) (akzeptiert)

**Tobias Brambrink, Andrea Lucas-Hahn, Erika Lemme, Doris Herrmann Christine Wrenzycki and Heiner Niemann** Effects of different protein supplementation of in vitro culture media on cDNA-array gene expression patterns in bovine embryos (Manuskript in Vorbereitung)

**H. Niemann, C. Wrenzycki, A. Lucas-Hahn, T. Brambrink, W.A. Kues, and J.W. Carnwath** Gene expression patterns in bovine in vitro produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development *Cloning and Stem Cells* **4** (1), 23-32, (2002) (im Druck)

#### “Peer reviewed“ Abstracts:

**T. Brambrink, P. Wabnitz, R. Halter, A. Lucas-Hahn, W.A. Kues, J.W. Carnwath, C. Wrenzycki, D. Paul, and H. Niemann** Expression profiling of single preimplantation embryos using cDNA-array-technology *Theriogenology* **57** (1), 633, (2002)

**S. Klocke-Schueler, T. Brambrink, T. Reich, E. Lemme, A. Lucas-Hahn, W.A. Kues, and H. Niemann** Factors affecting nuclear transfer using fetal fibroblasts and in vivo or in vitro matured porcine oocytes *Theriogenology* **55** (1), 275, (2001)

## 8.4 Lebenslauf

**Tobias Brambrink**, geboren am 3. 4.1974 in Gütersloh, Diplom-Biologe, ledig

### **Schule**

1980-1984: Altstadtschule Gütersloh

1984-1993: Evangelisch Stiftisches Gymnasium Gütersloh

1993: Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### **Studium**

11/1993-4/1998: Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1995: Vordiplomprüfungen

1997: Diplomprüfungen

Hauptfach: Biotechnologie

Nebenfächer: Zell-und Entwicklungsbiologie und

Biochemie

Von Juli 1997 bis April 1998 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Thema "Charakterisierung neuer Verfahren zur Immobilisierung von Zellen in Alginatmatrizen" bei Prof. Dr. U. Zimmermann.

Seit Juni 1998 Promotion in der Abteilung Biotechnologie am Institut für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig bei Prof. Dr. H. Niemann. Die durch die Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg betreute Arbeit mit dem Thema "Entwicklung und Evaluierung eines Verfahrens zur Genexpressionsanalyse bei individuellen präimplantatorischen Säugerembryonen über die cDNA-Array-Technologie" wurde im Rahmen des Teilprojektes B15 des Sonderforschungsbereiches 265 der DFG angefertigt.

Mariensee, im Mai 2002

Mariensee, 2. Mai 2002

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel "Entwicklung und Evaluierung eines Verfahrens zur Genexpressionsanalyse bei individuellen präimplantatorischen Säugerembryonen über die cDNA-Array-Technologie" selbständig verfasst habe. Die benutzten Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen und Hilfsmittel, insbesondere Dritter in Anspruch genommen: Die bovinen Embryonen wurden freundlicherweise von K. G. Hader, K. Korsawe, E. Lemme und Dr. A. Lucas-Hahn (FAL, Mariensee) produziert und zur Verfügung gestellt. Dr. Wabnitz (Ingenium AG, Martinsried) stellte freundlicherweise einen Teil der verwendeten cDNA-Array-Proben zur Verfügung.

Ich habe die Dissertation an der folgenden wissenschaftlichen Institution angefertigt: Institut für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig.

Die Dissertation lag bisher nicht, auch nicht in ähnlicher Form, in einem anderen Prüfungsverfahren vor.

Ich versichere, die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht zu haben.

.....

T. Brambrink

## Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Niemann für das Vertrauen in das Projekt, die Unterstützung bei dessen Durchführung, das ständige Interesse am Fortgang der Arbeiten und die stets konstruktive Kritik.

Prof. Dr. G. Krohne danke ich herzlich für die Übernahme des Zweit-Gutachtens.

Dem Leiter des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee Prof. Dr. sc. agr. Dr. habil. Dr. h. c. F. Ellendorf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dr. P. Wabnitz gilt mein Dank für die Bereitstellung der cDNA-Sonden.

Dr. A. Lucas-Hahn, E. Lemme, K. Korsawe und K. G. Haderler danke ich für die Bereitstellung der bovinen Embryonen.

Bei Prof. Dr. D. Paul bedanke ich mich herzlich für die vielen aufschlußreichen Gespräche.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee für eine gute und produktive Zusammenarbeit.

Dr. C. Wrenzycki und D. Herrmann danke ich u. a. für die Einarbeitung in die RT-PCR-Technik und die Kompromissbereitschaft bei der Embryonenverteilung.

Ich danke H. H. Döpke und D. Bunke für die kreative Lösung zahlreicher Probleme.

Special thanks to Dr. J. Carnwath for great communications and his endless brain-food supply.

Ich bedanke mich bei Dr. S. Klocke, Dr. A. Lucas-Hahn und E. Lemme für die gute Zusammenarbeit während der heißen Phase des Schweine-Klonens (Nächstes Mal klappt's bestimmt!).

Last but not least danke ich meinen Eltern, ohne die ich -schon rein biologisch- diese Dissertation nicht hätte anfertigen können, für ihre Unterstützung.