



Jan Hendrik Schneider (Autor)
**Tau-Interferon Überexpression in präimplantativen
Rinderembryonen mittels Transfer eines IFN
exprimierenden Plasmides**



Arbeiten aus dem
Institut für Tierzuchtwissenschaft
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Jan Hendrik Schneider

Tau-Interferon Überexpression in präimplantativen
Rinderembryonen mittels Transfer eines IFN- τ
exprimierenden Plasmides

Heft: 125

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2952>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abstract	III
Abkürzungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIV
Abbildungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Maternale Erkennung der Trächtigkeit	3
2.1.1 Trächtigkeitsverluste	3
2.1.2 Embryonales Signal	4
2.1.2.1 Identifikation des embryonalen Signals	5
2.1.2.2 Wirkungsweise von IFN- τ	5
2.1.2.3 Stärke des embryonalen Signals	12
2.1.2.4 Exogene Verstärkung des embryonalen Signals und die Auswirkungen auf die Trächtigkeit bei Rindern	14
2.1.3 Molekulargenetische Charakterisierung von IFN- τ	16
2.1.4 Expression von IFN- τ	18
2.1.4.1 Steuerung der IFN- τ -Expression	19
2.1.4.2 IFN- τ -Expression bei verschiedenen erzeugten Blastozysten	20
2.2 Weitere mögliche antiluteolytische Vorgehensweisen zur Verminderung der Trächtigkeitsverluste	22
2.2.1 Vergrößerung des prä-ovulatorischen Follikels, um einen größeren CL zu erzeugen	24
2.2.2 Erhöhung des Gelbkörperwachstums in den ersten Tagen der Trächtigkeit	25
2.2.3 Erhöhung des Plateaus in der Progesteronproduktion	26
2.2.4 Die Auswirkungen einer Progesteronergänzung auf das Trächtigkeitsergebnis	27

2.2.5	Verminderung des Einflusses eines dominanten Follikels während der kritischen Phase	29
2.2.6	Verminderung des luteolytischen Signals seitens des Endometriums	29
2.3	Transgenesis	30
2.3.1	Mikroinjektion von DNA	31
2.3.1.1	Versuche mit Mikroinjektion eines GFP Konstruktes	32
2.3.2	Spermienvermittelter Gentransfer	33
2.3.2.1	DNA-Bindung	34
2.3.2.2	DNA Übergang in die Spermienzelle	35
2.3.2.3	DNA-Integration	36
2.3.2.4	Möglichkeiten der Effizienzsteigerung bei SMGT	37
2.3.2.5	Weitere Versuche des SMGT beim Rind	39
3	Material und Methoden	42
3.1	Übersicht über die Versuche	42
3.1.1	Erstellung der Konstrukte	43
3.1.2	Transfektion in der Zellkultur	43
3.1.3	Erzeugung transient transgener boviner Blastozysten, die IFN- τ überexprimieren	43
3.1.3.1	Mikroinjektion	43
3.1.3.2	Spermienvermittelter Gentransfer (SMGT)	44
3.1.4	Neomycin Steigerungsversuch	44
3.2	Material	45
3.2.1	Chemikalien, biologische Materialien, Kits und andere Materialien	45
3.2.2	Reagenzien und Medien	46
3.2.3	Benutzte Software	49
3.2.4	Geräte	49
3.3	Erstellung der Konstrukte	50
3.3.1	Übersicht über die Konstrukte	50
3.3.2	Restriktionsverdau der Plasmide und gelelektrophoretische Auftrennung der Schnittprodukte	51
3.3.3	Auffüllen der überhängenden Enden und Dephosphorylierung	51

3.3.4	Ligation	52
3.3.5	Transformation, Amplifikation und Plasmidisolierung	52
3.3.6	PCR zur Ligationskontrolle	53
3.3.7	Sequenzierung	53
3.4	Zellkultur	54
3.4.1	Medium	54
3.4.2	Primärkultur	54
3.4.3	Subkultivierung	55
3.4.4	Transfektion	55
3.5	In vitro Produktion boviner Embryonen	56
3.5.1	Medien	56
3.5.1.1	Sammelmedium für KOKs und Maturationsmedium	56
3.5.1.2	Fertilisationsmedium	57
3.5.1.3	Kapazitationsmedium	57
3.5.1.4	Kulturmedium	57
3.5.2	Gewinnung der Ovarien	58
3.5.3	Gewinnung der Oozyten	59
3.5.4	In vitro Maturation (IVM)	59
3.5.5	In vitro Fertilisation (IVF)	60
3.5.6	In vitro Kultur (IVC)	61
3.6	Mikroinjektion von Zygoten	61
3.6.1	Herstellung von Mikroinstrumenten für die Mikroinjektion	61
3.6.2	Mikroinjektion des Genkonstruktes	62
3.7	Spermieninkubation mit DNA	63
3.7.1	Inkubation mit Liposomen und DNA	63
3.7.2	Spermieninkubation mit FuGene und DNA	64
3.8	Beobachtung der Expression	65
3.9	Einfrieren von Embryonen zur Untersuchung durch PCR	66
3.10	Untersuchung der Konstruktmenge und Genexpression durch PCR	66
3.10.1	Design der Primer	66
3.10.2	Extraktion der DNA	67
3.10.3	Quantitative real time PCR	67
3.10.4	RNA Extraktion mit Dynabeads	68

3.10.5	Quantitative real time RT-PCR	68
3.10.6	Reverse Transkription und PCR für β -Actin als internen Standard	69
3.10.6.1	Reverse Transkription	69
3.10.6.2	Real time PCR für β -actin	69
3.11	Statistische Auswertung	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Übersicht über die verwendeten Konstrukte	71
4.1.1	EGFP-N1	71
4.1.2	Zuerst erstellte Konstrukte: CMV-IFN τ -IRES-EGFP-(nts) in pIRES2-EGFP	72
4.1.3	Modifizierte Konstrukte: CMV-IFN τ (HphI)-IRES-EGFP und CMV- IFN τ (HphI)-IRES-EGFP-nts	74
4.2	Expression in der Zellkultur	76
4.2.1	Transfektion mit den zuerst erstellten Konstrukten	76
4.2.2	Expression der modifizierten Konstrukte	76
4.3	Erzeugung transient transgener boviner Blastozysten, die IFN- τ überexprimieren	77
4.3.1	Mikroinjektion	77
4.3.1.1	Entwicklung der Embryonen	77
4.3.1.2	Beobachtung der Fluoreszenz bei mikroinjizierten Embryonen	78
4.3.1.3	Messung des DNA-Abbaus während der Entwicklung von mikroinjizierten Embryonen	80
4.3.1.4	Expression von IFN- τ bei mikroinjizierten Embryonen	81
4.3.2	Versuche über spermienvermittelten Gentransfer	82
4.3.2.1	Messung der DNA-Bindung an Spermien mittels quantitativer real time PCR	82
4.3.2.2	Messung der Konstruktmenge in Embryonen aus spermienvermitteltem Gentransfer	84
4.3.2.3	Entwicklung der Embryonen	85

4.3.2.4	Beobachtung der Fluoreszenz bei Embryonen aus spermienvermittelten Gentransfer	86
4.3.2.5	IFN- τ -Expression bei Embryonen aus spermienvermitteltem Gentransfer	87
4.4	Neomycin Steigerungsversuch	88
5	Diskussion	89
5.1	Erstellung der Vektoren	89
5.2	Zellkultur	90
5.3	Erzeugung transgener Embryonen, die IFN- τ überexprimieren	91
5.3.1	Mikroinjektion der Konstrukte	91
5.3.1.1	Entwicklung der Embryonen	91
5.3.1.2	Expression der Konstrukte	92
5.3.2	Spermienvermittelter Gentransfer	95
5.3.2.1	DNA Bindung an die Spermien	95
5.3.2.2	DNA-Übergang in die Eizelle	96
5.3.2.3	Entwicklung der Embryonen	97
5.3.2.4	Expression der Konstrukte im SMGT	97
5.3.3	G418 Steigerungsversuch	99
5.4	Bedeutung der Ergebnisse	100
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis	108
8	Anhang	125