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 Charakteisierung 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 verschieden 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 Gelbköperwachstums 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 gelelektrophortische Auftrennung der Schnittprodukte	51
3.3.3	Auffüllen der überhängenden Enden und Dephosphorilierung	51

3.3.4	Ligation	52
3.3.5	Transformation, Amplifikation und Plasmidisolation	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-IFNτ-IRES-EGFP-(nts) in pIRES2-EGFP	72
4.1.3	Modifizierte Konstrukte: CMV-IFNτ(HphI)-IRES-EGFP und CMV-IFNτ(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