

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen
aus dem Institut für Anatomie

Auswirkung einer postovulatorischen Alterung auf molekulare Parameter und die Entwicklungskompetenz muriner Oozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für Biologie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Debora Dankert
aus Solingen

2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. R. Grümmer
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. S. Kasimir-Bauer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:
Prof. Dr. rer. nat. M. Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung:
17.12.2015

Teile dieser Arbeit wurden wissenschaftlich publiziert:

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmer R. „*Pre- and postovulatory aging of murine oocytes affect the transcript level and poly(A) tail length of maternal effect genes.*” PLoS ONE 9(10): e108907. doi:10.1371/journal.pone.0108907

Trapphoff T, Heiligentag M, **Dankert D**, Demond H, Deutsch D, Fröhlich T, Arnold G, Grümmer R, Horsthemke B, Eichenlaub-Ritter U. „*Postovulatory aging affects dynamics of mRNA, expression and localization of maternal effect proteins and ATRX, spindle integrity and histone patterns in mouse oocytes.*“ Hum Reprod. 2016 Jan; 31(1):133-49. doi: 10.1093/humrep/dev279

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Wachstum und Reifung der Oozyte und die frühe embryonale Entwicklung.....	8
1.1.1 Der maternale Effekt.....	11
1.1.2 Zytoplasmatische Polyadenylierung und Deadenylierung.....	12
1.1.3 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen.....	13
1.1.4 Die zygotische Genomaktivierung.....	15
1.2 Die postovulatorische Alterung von Oozyten.....	17
1.2.1 Zelluläre Mechanismen bei der postovulatorischen Alterung von Oozyten.....	17
1.2.2 mRNA- und Protein-Profile.....	18
1.2.3 Epigenetische Veränderungen.....	20
1.3 Assistierte Reproduktionstechniken.....	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2. Material	24
2.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte.....	24
2.2 Substanzen, Chemikalien, Hormone.....	25
2.3 Puffer und Lösungen.....	25
2.4 Zellkultur-Medien.....	27
2.5 Kits.....	28
2.6 Enzyme.....	28
2.7 Molekulargewichtsstandard.....	28
2.8 Primer für die quantitative real-time PCR.....	29
2.9 Primer für den LM-PAT und ePAT.....	29
2.10 Antikörper.....	30
2.11 Versuchstiere.....	30
3. Methoden	31
3.1 Tierexperimentelle Methoden.....	31
3.1.1 Superovulation.....	31

3.1.2	Postovulatorische Oozyten-Alterung	31
3.1.3	Wachstum und Reifung der Oozyten in der Follikelkultur	31
3.1.4	In-vitro-Fertilisation (IVF)	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1	RNA Extraktion aus Oozyten und Ovargewebe	33
3.2.2	Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren	34
3.2.3	Quantitative real-time PCR	35
3.2.4	Poly(A) Test Assays	37
3.2.4.1	Ligation mediated Poly(A) Test (LM-PAT)	37
3.2.4.2	Extension Poly(A) Test (ePAT).....	39
3.2.5	Fraktionierung der mRNA nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes	41
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.7	DNA Extraktion aus Agarose-Gelen.....	44
3.2.8	Sanger-Sequenzierung.....	44
3.3	Immunhistochemische Methoden	45
3.3.1	Beschichten von Glasobjektträgern mit Poly-L-Lysin	45
3.3.2	H3K9me3-Fluoreszenzfärbung an Oozyten	45
3.3.3	Immunhistochemische Bestimmung der BrUTP-Inkorporation in 2-Zell-Embryonen	46
3.4	Statistik.....	47
4.	Ergebnisse.....	48
4.1	Effekt einer postovulatorischen Alterung auf die Poly(A)-Schwanzlänge der mRNA von Maternaleffektgenen	48
4.1.1	Analyse des Poly(A)-Anteils von Maternaleffektgenen in Oozyten mittels quantitativer real-time PCR.....	48
4.1.2	Quantifizierung der Poly(A)-Schwanzlänge von Maternaleffektgenen in Oozyten	52
4.1.2.1	Etablierung eines validen Poly(A) Tests	52
4.1.2.1.1	Etablierung des LM-PAT	52
4.1.2.1.2	Etablierung des ePAT	54

4.1.2.2	Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge von <i>Dnmt1</i> und <i>Zar1</i> in Oozyten	58
4.2	Fraktionierung der mRNA Transkripte nach der Länge des Poly(A)-Schwanzes	62
4.3	Einfluss einer postovulatorischen Alterung auf die H3K9 Trimethylierung	67
4.4	Auswirkung einer postovulatorischen Alterung auf die Fertilisationsrate	68
4.5	Einfluss einer postovulatorischen Alterung auf die Zona pellucida	70
4.6	Effekt einer postovulatorischen Alterung auf die Transkriptionseffizienz in 2-Zell-Embryonen	73
4.6.1	Optimierung der Antikörperbindung	73
4.6.2	Einfluss der postovulatorischen Oozytenalterung auf die Genomaktivierung in 2-Zell-Embryonen	75
5.	Diskussion	78
5.1	Das Modell der postovulatorischen Alterung	78
5.2	Dynamische Veränderungen des Poly(A)-Schwanzes in postovulatorisch gealterten Oozyten	79
5.2.1	Deadenylierung von Maternaleffektgenen nach postovulatorischer Alterung ...	79
5.2.2	Validierung der Deadenylierung durch Poly(A) Test Assays	83
5.3	Abnahme der H3K9me3 nach postovulatorischer Alterung	86
5.4	Die postovulatorische Oozyten-Alterung hat keinen Effekt auf die Effizienz der In-vitro-Fertilisation	87
5.5	Eine postovulatorische Oozyten-Alterung beeinflusst die zygotische Genomaktivierung im 2-Zell-Embryo	89
6.	Zusammenfassung	92
7.	Summary	93
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Anhang	105
9.1	Abbildungsverzeichnis	105
9.2	Tabellenverzeichnis	106
9.3	Abkürzungen	106
9.4	Publikationen, Vorträge, Poster	109
9.5	Danksagung	111

10. Lebenslauf	112
11. Eidesstattliche Erklärung	113

1. Einleitung

Die Qualität der Eizelle ist essentiell für den Befruchtungserfolg sowie für die regelgerechte Entwicklung des Embryos. Man weiß bereits, dass die Qualität von Oozyten mit dem Alter der Frau abnimmt. Aber auch innerhalb des Menstruationszyklus kann es zu Alterungsprozessen in der Oozyte kommen. Wenn beispielsweise die Oozyte nach der Ovulation nicht direkt befruchtet wird, sondern im Ovidukt verbleibt (*in vivo*), beginnt ein zeitabhängiger Qualitätsverlust, welcher postovulatorische Alterung genannt wird und u.a. zu einer Reduktion der Fertilisationsrate führt (Wilcox *et al.* 1998). Einige Arbeitsgruppen haben eine postovulatorische Alterung *in vivo* bei Frauen untersucht. Dabei wurde der Zeitpunkt der Ovulation ermittelt, indem der Urin der Frauen täglich auf die Konzentration von hCG untersucht, die Beschaffenheit des Gebärmutterhalses kontrolliert und die Körpertemperatur gemessen wurde. Dabei zeigte sich einerseits, dass nach postovulatorischer Alterung *in vivo* eine erhöhte Rate an Aborten zu verzeichnen war (Wilcox *et al.* 1998) und andererseits, dass Frauen, die bereits in einer vorherigen Schwangerschaft eine Fehlgeburt hatten, ein größeres Risiko eines weiteren Aborts nach postovulatorischer Alterung aufweisen (Gray *et al.* 1995). Auch in Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine postovulatorische Alterung *in vivo* für 10 h zu einer signifikanten Abnahme der Schwangerschaftsrate, Schwangerschaftsdauer und Wurfgröße führt. Zusätzlich wurde festgestellt, dass nach postovulatorischer Alterung und anschließend erfolgreicher Schwangerschaft Defekte bei den Nachkommen in der F1 und F2 Generation auftraten (Tarin *et al.* 1999). Eine postovulatorische Alterung *in vitro* kann während einer Behandlung im Rahmen von Assistierten Reproduktionstechniken (ART) auftreten, wenn die Fertilisation der Eizelle durch das Spermium in der Kulturschale verzögert ist. In Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine postovulatorische Alterung *in vitro* zu signifikant verringerten Fertilisationsraten führt (Lacham-Kaplan and Trounson 2008).

Dass eine postovulatorische Alterung Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte haben kann, hängt mit der speziellen Physiologie der Oozyte zusammen, die im Weiteren näher beschrieben wird.

1.1 Wachstum und Reifung der Oozyte und die frühe embryonale Entwicklung

Die Vorläufer der Oozyten aller Säugetiere sind die Oogonien. Diese entstehen während der frühen embryonalen Entwicklung aus dem Entoderm des Dottersacks und wandern anschließend in die Genitalfurche ein. Zu Beginn vermehren sich die Oogonien durch mitotische Zellteilung und erreichen bis zum 5. Fetalmonat eine Anzahl von etwa 2 Millionen

pro Ovar. Eine weitere Proliferation findet nicht mehr statt, sodass der gesamte Vorrat an Oozyten einer Frau bereits im Embryo angelegt wird. Während der restlichen fetalen und postnatalen Entwicklung bis zum Einsetzen der Geschlechtsreife gehen die meisten Oozyten zugrunde, sodass mit Einsetzen der Pubertät nur noch etwa 200.000 pro Ovar übrig bleiben. Bis zum 7. Fetalmonat durchlaufen die Oogonien die erste meiotische Reifeteilung (Meiose I) und bilden einen diploiden Chromosomensatz, wodurch die primäre Oozyte entsteht. Durch Ausbildung eines einschichtigen Epithels um die Oozyte entwickelt sich der Primordialfollikel. Die primären Oozyten arretieren in der Prophase der Meiose I (Diplotän). Dieses Ruhestadium wird als Diktyotän bezeichnet und von allen primären Oozyten bis zur Geburt erreicht. Der große Nukleus in der Prophase-I-arretierten Oozyte ist ein besonderes morphologisches Merkmal dieses Stadiums und wird *germinal vesicle* (GV) genannt. Die primäre Oozyte verbleibt in diesem Reifungsstadium bis es zur Ovulation kommt. In dieser Reifungsphase vergrößert der Follikel seinen Durchmesser von ca. 20 µm (Primordialfollikel) auf ca. 120 µm (Tertiärfollikel) und bildet eine Schicht aus Glykoproteinen, die Zona Pellucida, aus (Lüllmann-Rauch 2003).

Die reproduktive Phase der Frau liegt etwa zwischen dem 12. und 50. Lebensjahr, während dieser Zeit werden von den 200.000 Oozyten etwa 450 ovuliert. Kurz vor der Ovulation beendet die arretierte Oozyte die Meiose I durch eine Reduktionsteilung, wobei das 1. Polkörperchen ausgebildet wird. Der Chromosomensatz der Zelle wird dadurch haploid und es entsteht die sekundäre Oozyte. Mit Vollendung der Ovulation beginnt die 2. meiotische Teilung (Meiose II) und die Oozyte arretiert in der Metaphase der Meiose II. Erst durch die Fertilisation durch das Spermium kommt es zur zweiten Reduktionsteilung, wodurch in der reifen Eizelle ein haploider Chromosomensatz mit einem Chromatid vorliegt und ein 2. Polkörperchen ausgebildet wird (Lüllmann-Rauch 2003). Die Entstehung und Entwicklung der Oozyten ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Wachstum und Reifung der Oozyte

Zelle	Ereignis	Lebensphase
Urkeimzellen	Einwanderung in die Genitalleiste	Pränatalzeit
	Mitotische Vermehrung	
	Differenzierung	
Oogonien (2n,2C)	Mitotische Vermehrung	
	Beginn der Meiose I: DNA-Verdopplung	
	Ruhestadium (Diktyotän)	
Primäre Oozyte (2n,4C)	Diktyotän für 12-50 Jahre	Geburt, Kindheit
	Kurz vor der Ovulation:	Geschlechtsreife
	Beendigung der Meiose I	
	Beginn der Meiose II während Ovulation	
	Arretierung in Metaphase II	
	1. Polkörperchen (1n,2C)	
Sekundäre Oozyte (1n,2C)	Befruchtung	
	Beendigung der Meiose II	
	2. Polkörperchen (1n,1C)	
Ovum (1n,1C)	Reife Eizelle	

Die Befruchtung der Eizelle durch das Spermium erfolgt im Ovidukt. Nachdem die Spermien die Cumuluszellen der Eizelle durch das Enzym Hyaluronidase verdaut haben, fusionieren die Membranen eines Spermiums und der Oozyte miteinander und die kondensierte Erbinformation des Spermiums gelangt in die Eizelle. Die Fusion löst einen intrazellulären Kalziumeinstrom aus, wodurch es zum Polyspermieblock kommt, der die Zona Pellucida der Eizelle für weitere Spermien undurchlässig macht. Anschließend verschmelzen der männliche und weibliche Vorkern und die Mitose der Zygote wird initiiert. Es folgen weitere

Zellteilungen bis zum Stadium der Morula, welche aus einer kompakten Zellmasse aus differenzierten Blastomeren besteht. Aus der Morula entwickelt sich die Blastozyste, die eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle aufweist. Die differenzierten Zellen der Blastozyste bilden den Trophoblasten und den Embryoblasten. Der Trophoblast bildet die äußere Schicht der Blastozyste und entwickelt sich im späteren Verlauf zur Plazenta. Aus dem Embryoblast entsteht der Embryo. Etwa 4-5 Tage nach der Ovulation erreicht die Blastozyste den Uterus und nistet sich in die hormonell vorbereitete Gebärmutterschleimhaut ein (Junqueira 2002).

1.1.1 Der maternale Effekt

Das haploide Spermium, welches mit der Zona Pellucida fusioniert, ist durch Bereitstellung der DNA für den männlichen Vorkern essentiell für die Aktivierung der Eizelle. Allerdings ist die frühe embryonale Entwicklung während der ersten Zellteilungen ausschließlich von der Eizelle und ihren Organellen und Makromolekülen abhängig. Zu Beginn der Oogenese findet die Transkription des maternalen Genoms statt, stoppt aber in der Meiose I. Die meisten dieser synthetisierten Transkripte werden direkt in Proteine translatiert (Vitale *et al.* 2007). Einige akkumulieren aber auch als mRNA und befinden sich dann im Ruhezustand bis spezifische Maternaleffektgene während der Fertilisation zeitabhängig aktiviert werden. Diese durch Maternaleffektgene kodierte Komponenten sichern das Überleben der Zygote bis zur embryonalen Genomaktivierung im 2-Zell-Stadium (Sutovsky and Schatten 2000). Somit bestimmt der Genotyp der Mutter den Phänotyp des frühen Embryos. Ein Großteil der maternalen mRNA wird allerdings nach der Fertilisation abgebaut, was auch eine wesentliche Aufgabe von Maternaleffektgenen ist (Kang and Han 2011). Außerdem sind sie für die Prozessierung des männlichen Genoms und die zygotische Genomaktivierung verantwortlich (Li *et al.* 2010). Etwa 30 Maternaleffektgene und ihre Funktionen während der embryonalen Entwicklung konnten bereits in Säugetieren beschrieben werden (Acevedo and Smith 2005).

Mutationen der Maternaleffektgene führen meistens zu Entwicklungsdefekten der Zygote, die durch fehlerhafte epigenetische Reprogrammierung, Defekte von geprägten Genen und chromosomalen Aberrationen bedingt sein können. Das erste Maternaleffektgen, welches im Menschen identifiziert wurde, ist NALP7. Mutationen in diesem Gen führen zu einem Arrest während der embryonalen Entwicklung und somit zu wiederkehrenden Aborten (Murdoch *et al.* 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine homozygote Mutation des Maternaleffektgens *Nlrp2* in der Mutter zum Beckwith-Wiedemann Syndrom im Kind führt (Meyer *et al.* 2009). Manche Maternaleffektgene werden allerdings erst während der Genomaktivierung exprimiert, was die Unterscheidung zwischen maternalen und embryonalen Ursache erschwert.

Da die Transkription in der Prophase I-arretierten Oozyte weitestgehend stillgelegt ist und erst mit Aktivierung des embryonalen Genoms fortgesetzt wird, sind während dieser Zeit posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulationsmechanismen für die akkumulierten mRNA-Transkripte und Proteine der Maternaleffektgene zur Steuerung des Zellzyklus notwendig. Eine Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation ist die zytoplasmatische Deadenylierung oder Polyadenylierung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA (Kang and Han 2011).

1.1.2 Zytoplasmatische Polyadenylierung und Deadenylierung

Die Stabilität der maternalen Transkripte wird während der Oozytenreifung posttranskriptional, beispielsweise durch die Modifizierung des Poly(A)-Schwanzes, reguliert. Diese mRNAs werden durch Lagerung in einem Ribonukleoproteinkomplex vor einer Degradierung oder Translation geschützt. Wenn das Protein gebraucht wird, z.B. während der Reifung, Fertilisation oder frühen embryonalen Entwicklung, kann die entsprechende mRNA im Zytoplasma wieder polyadenyliert und translatiert werden, wobei das Protein und die mRNA anschließend degradiert werden.

Bevor es zur Synthese des Proteins kommt, durchläuft die mRNA während ihrer Fertigstellung eine Reihe von Prozessen. Die Transkription eukaryotischer mRNA beginnt im Nukleus durch Synthese der Precursor-mRNA (pre-mRNA). Anschließend wird an das 5'-Ende am C7 ein Methylguanosin angehängt, welches die mRNA vor der Degradation durch Exonukleasen schützt. Außerdem wird an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) ein Poly(A)-Schwanz mit bis zu 250 Adenosinen durch die nukleäre Poly(A)-Polymerase (PAP) angehängt. Durch das Splicing werden alle nicht kodierenden Sequenzen (Introns) entfernt und die reife mRNA ist bereit für den Transport in das Zytoplasma (Piccioni *et al.* 2005).

Die zytoplasmatische Polyadenylierung wird hauptsächlich durch die Poly(A)-Polymerase PAPD4 (Gld-2) durch Bindung an ein phosphoryliertes CPEB (engl. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) katalysiert. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch einen PAPD4 Knock-Out der Poly(A)-Schwanz in Oozyten nicht mehr verändert werden kann (Nakanishi *et al.* 2007). Außerdem wurde an humanen Fibroblasten gezeigt, dass die Poly(A)-Polymerase PAPD5 durch Bindung an CPEB1 rekrutiert wird, jedoch hauptsächlich kompensatorische Funktionen bei einem Verlust von PAPD4 besitzt (Schmid *et al.* 2009, Burns *et al.* 2011). Poly(A)-Polymerasen werden vor allem durch den spezifischen Bindungsfaktor CPEB rekrutiert, welcher in vier Isoformen vorliegt. Diese verfügen jeweils über eine Zinkfingerdomäne am C-Terminus des Proteins und zwei RNA-Erkennungs-Motiven (RRM, engl. *RNA recognition motif*). Die RRM erkennen die Sequenz des Zytoplasmatischen-Polyadenylierungselements (CPE, engl. *cytoplasmic polyadenylation element*) in der 3'-UTR der mRNA-Transkripte. Auch in *Drosophila* und *Caenorhabditis*

konnte gezeigt werden, dass das CPE-bindende Protein (CPEB, engl. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) eine Rolle in der Translation und Keimzellentwicklung spielt und diese Funktionen daher wahrscheinlich evolutionär konserviert sind (Benoit *et al.* 2008). Erst die Kombination aus PAS und anderen zytoplasmatischen Polyadenylierungssequenzen der mRNA, wie der CPE, führen zu einer spezifischen Bindung an das Transkript (Charlesworth *et al.* 2013). Die Polyadenylierung ist notwendig, damit ein Transkript aktiviert und als Protein translatiert werden kann.

Im Gegensatz dazu kann die Repression der Polyadenylierung oder die Deadenylierung ein Transkript inaktivieren oder abbauen. Dabei rekrutiert das nicht-phosphorylierte CPEB1 die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN) während PUM2 die Bindung des Translationskomplexes an die mRNA verhindert. PAPD4 ist zwar in diesem Komplex gebunden, dessen Funktion ist allerdings gehemmt oder wird durch die Deadenylase maskiert (Eckmann *et al.* 2011). Durch die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes liegt das Transkript ungeschützt im Zytoplasma und kann so durch Exonukleasen abgebaut werden.

1.1.3 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen

Im letzten Jahrzehnt konnte gezeigt werden, dass auch die Epigenetik der DNA bzw. von Histonen während der Oogenese und embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt (Abbildung 1). Zu Beginn der Keimzellentwicklung sind die hochspezialisierten Gameten vollständig demethyliert. Von dieser Demethylierung sind auch die sogenannten geprägten Gene betroffen. Dabei wird ein Gen entweder vom väterlichen oder mütterlichen Allel exprimiert (monoallelisch), weil das entsprechende andere Gen durch eine Methylierung reprimiert wird. Während der Gametogenese wird das gesamte Genom einschließlich der geprägten Gene wieder methyliert, damit die reifen Eizellen und Spermien für die Fertilisation als vollständig methylierte Zellen vorliegen. Kurz nach der Fertilisation beginnt in der Zygote die epigenetische Reprogrammierung. Dabei wird der männliche und weibliche Vorkern mit Ausnahme der geprägten Gene demethyliert. Eine Deletion dieser differentiell methylierten Regionen (DMR) führt zu einem Verlust der genomischen Prägung und kann schwere genetische Erkrankungen verursachen (Judson *et al.* 2002). Zum Zeitpunkt der Implantation der Blastozyste werden die differenzierten Zellen wieder individuell methyliert (Messerschmidt 2012).

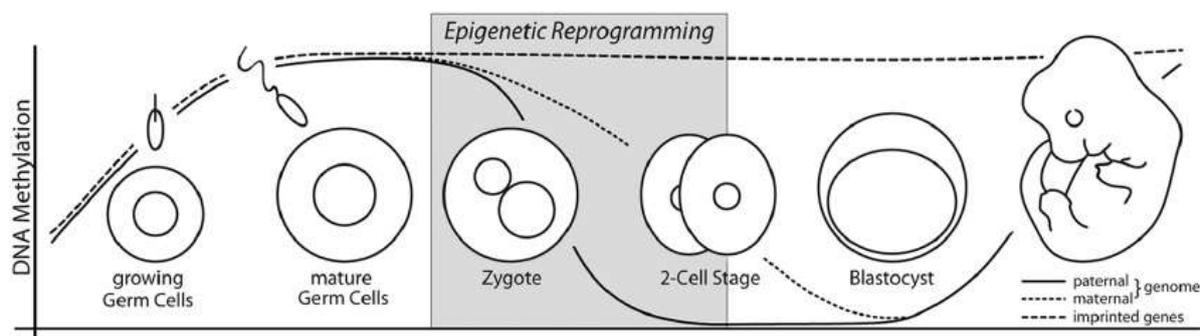


Abbildung 1: Dynamik der DNA Methylierung in Keimzellen und während der frühen Embryonalentwicklung. Das maternale und paternale Genom sowie die geprägten Gene werden während der Keimzellentwicklung methyliert. Die epigenetische Reprogrammierung beginnt nach der Fertilisation der Oozyte durch das Spermium. Dabei wird das paternale Genom aktiv demethyliert und das maternale Genom passiv während der Zellteilungen bis zur Blastozyste. Die Methylierungsmuster der geprägten Gene werden während der Reprogrammierung z.B. durch DNA Methyltransferasen geschützt (Messerschmidt 2012).

Aber nicht nur die DNA kann methyliert werden, sondern auch die endständigen Schwänze der Histone. Beide, DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, dienen als epigenetische Marker für aktives oder inaktives Chromatin. Diese Modifikationen werden durch verschiedene Enzyme und Enzymkomplexe katalysiert und regulieren die Chromatinstruktur und somit die Zugänglichkeit unterschiedlicher Faktoren zur DNA. Die Methylierung der DNA geschieht hauptsächlich an CpG Dinukleotiden und wird katalysiert durch zwei Klassen von DNA-Methyltransferasen (Cedar and Bergman 2009). DNA Methyltransferase 1 (Dnmt1) ist ein Enzym, das während der Replikation am synthetisierten DNA-Strang hemi-methylierte CpGs methyliert und somit zur Erhaltung der DNA-Methylierungsmuster während der Zellproliferation essentiell ist (Siegfried *et al.* 1999). Dnmt3a und Dnmt3b dienen zur *de novo* Methylierung und zur Bildung von neuen Methylierungsmustern während der embryonalen Entwicklung (Hsieh 1999).

Beide Klassen von DNA-Methyltransferasen interagieren mit Histon-Deacetylasen (HDACs) und können so die Transkription reprimieren (Burgers *et al.* 2002). HDACs, Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Methyltransferasen (HMT) gehören zur Gruppe der histonmodifizierenden Enzyme. Histon-Proteine können an ihrem amino-terminalen Ende an spezifischen Aminosäuren acetyliert, methyliert, phosphoryliert oder ubiquitinyliert werden. Spezifische Muster dieser Histonmodifizierungen regulieren die Genexpression durch Strukturveränderungen des Chromatins. Während der embryonalen Entwicklung bleiben einige Histonmodifikationen stabil und ändern sich nicht, beispielsweise die Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 (H3K9me), die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me) und die Phosphorylierung der Histone H4 und 2A am Serin 1 (H4/H2AS1ph). Im Gegensatz dazu gibt es einen Anstieg der Acetylierung an Histon H4 und einen Anstieg der Methylierung von Histon H3 am Arginin 17 (H3R17me) und Histon H4 am Arginin 3 (H4R3me) während der embryonalen Entwicklung (Sarmiento *et al.* 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Methylierung von H3K4 zu einer Aktivierung der Genexpression führt und die

Methylierung von H3K9 zu einer Repression (Jenuwein and Allis 2001). Die Verbindung zwischen der Histonmethylierung und der DNA-Methylierung wurde an dem Beispiel von H3K9 in embryonalen Stammzellen beschrieben (Abbildung 2). In diesen Zellen sind die CpG Inseln (CGI) von pluripotenten Genen wie *Oct4* und *Nanog* unmethyliert, die Histone H3 und H4 sind acetyliert und H3K4 ist methyliert. Mit Beginn der Differenzierung wird die Histon-Methyltransferase G9a und HDACs rekrutiert um die oben erwähnten Histonmodifikationen zu entfernen. G9a katalysiert im nächsten Schritt die Methylierung von H3K9, welche als Bindung für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) dient. Dadurch wird die Struktur des Chromatins zu Heterochromatin modifiziert. G9a rekrutiert dann DNMT3A und DNMT3B, welche die *de novo* Methylierung der darunterliegenden DNA katalysieren (Cedar and Bergman 2009).

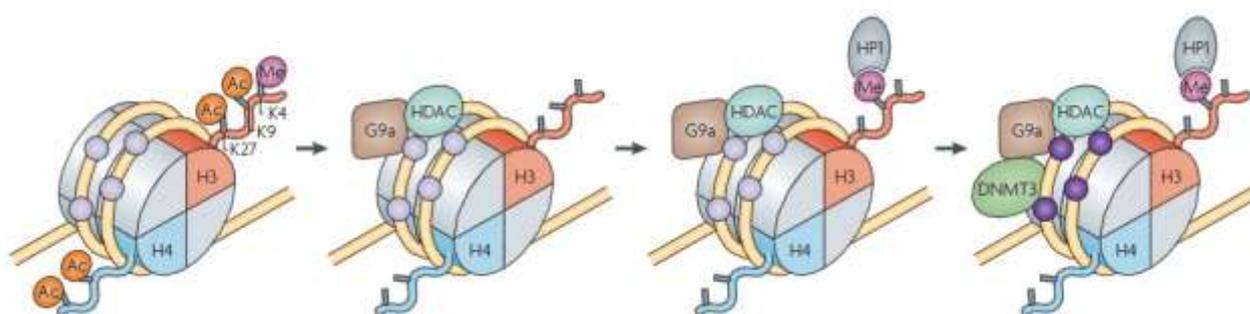


Abbildung 2: Beispiel für eine Verknüpfung zwischen Histon- und DNA-Methylierung. Die CpG Inseln auf der DNA (gelber Strang) von *Oct4/Nanog* (hell-lila/lila Punkte) sind in embryonalen Stammzellen unmethyliert. Die Histone H3 und H4 sind acetyliert und eine Methylierung befindet sich an H3K4. Mit Beginn der Differenzierung werden die Methyltransferase G9a und Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutiert, wodurch es zur Deacetylierung der lokalen Histone kommt. Außerdem wird H3K4 demethyliert. G9a katalysiert anschließend die Methylierung von H3K9. Diese Modifikation dient als Bindungsstelle für das Heterochromatin Protein (HP1), welches die Umstrukturierung zu Heterochromatin initiiert. Abschließend rekrutiert G9a die Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B, welche eine *de novo* Methylierung der DNA katalysieren (Cedar and Bergman 2009).

1.1.4 Die zygotische Genomaktivierung

Eines der wichtigsten Ereignisse nach der Fertilisation ist die maternal-embryonale-Transition. Während dieser Transition wird das embryonale Entwicklungsprogramm, welches ursprünglich durch maternal akkumulierte mRNAs und Proteine gesteuert wurde, unter die Kontrolle von zygotischen Faktoren gebracht. Dies geschieht durch die Reprogrammierung der Zygote, wodurch embryonale Gene exprimiert werden. Nach dieser sogenannten zygotischen Genomaktivierung (ZGA) werden maternale Faktoren durch embryonale ausgetauscht (Minami *et al.* 2007). In Mäusen findet bereits in der Zygote eine geringe ZGA statt, die auf die Aktivierung des paternalen Vorkerns hindeutet. Die Gene dieses Vorkerns werden eher als die des maternalen Vorkerns exprimiert, weil die vorhandenen Protamine der paternalen DNA durch Histone ersetzt werden müssen. Diese Histone sind stärker acetyliert als im weiblichen Vorkern, wodurch es zur vorzeitigen Expression im männlichen

Vorkerns kommt (Adenot *et al.* 1997). In globalen Expressionsstudien während der Präimplantation des Embryos konnte gezeigt werden, dass durch diese geringe ZGA hauptsächlich Gene für grundlegende zelluläre Mechanismen exprimiert werden (Hamatani *et al.* 2004). Außerdem werden im maternalen Vorkern und dem Nukleus des 2-Zell-Stadiums Faktoren produziert, die eine ZGA reprimieren, welche dem paternalen Vorkern allerdings fehlen (Majumder and DePamphilis 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Ausnahme des paternalen Vorkerns die Transkription bis zum 2-Zell-Stadium reprimiert wird. Dies verhindert eine unkontrollierte Expression von zygotischen Genen vor der ZGA, sodass Gene zur adäquaten Zeit in der Entwicklung aktiviert werden können.

Vom 2-Zell- bis zum 4-Zell-Stadium findet anschließend eine massive ZGA statt. Wie wichtig diese ZGA für den 2-Zell-Embryo ist, wird in einer Studie deutlich, in der durch α -Aminitin die RNA-Synthese in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung gehemmt wurde. Dabei entwickelte sich der Embryo bis zum 2-Zell-Stadium normal und arretierte anschließend. Dies zeigte, dass die RNA-Synthese während der ZGA essentiell für die Entwicklung des 4-Zell Embryos ist (Schultz 1993). Diese Erkenntnis macht außerdem deutlich, dass bis zur Bildung des 2-Zell-Embryos keine neu-synthetisierten Produkte benötigt werden und die Zelle somit die RNA und Proteine aus der Oozyte nutzt. Die Gene, die während der ZGA exprimiert werden, sind vor allem in rezeptorvermittelte Signalwege der Serin/Threonin-Kinasen, im Protein-Nukleus Import und RNA Metabolismus involviert. Zwischen dem 4-Zell- und 8-Zell-Stadium gibt es eine dritte Welle der zygotischen Genomaktivierung. Dabei werden DNA-Methyltransferasen und Gene, welche hauptsächlich in die Homöostase der extrazellulären Matrix während der Implantation involviert und an der Ausbildung der tight junctions, gap junctions und Connexine beteiligt sind, exprimiert (Hamatani *et al.* 2004).

Die zeitliche Abfolge der ZGA während der embryonalen Entwicklung muss exakt reguliert werden. Derzeit werden zwei Theorien diskutiert, die diese Regulation erklären sollen. Die erste Theorie beschreibt den Nukleus/Zytoplasma Quotienten, in dem die Menge an Material im Zellkern relativ zum Zytoplasma ansteigt und so die Transkription reprimiert wird. In dieser Theorie sind die Repressoren der Transkription maternale Faktoren. Diese müssen nach der Fertilisation im Embryo zunächst abgebaut werden, bevor die Transkription im 2-Zell-Stadium aktiviert werden kann (Newport *et al.* 1985).

Die zweite Theorie geht von einer inneren Uhr aus, wodurch die Genexpression unabhängig von der Zellteilung im Embryo aktiviert wird (Howe *et al.* 1995). Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass beispielsweise die Menge oder Aktivität eines maternalen Faktors mit der Zeit zunimmt und dadurch die zygotische Genomaktivierung gehemmt wird. Diese Theorie wird unterstützt durch die Polyadenylierung von maternalen Transkripten während der Fertilisation und die damit zusammenhängende gesteigerte Translation dieser mRNAs (Subtelny *et al.* 2014). Außerdem kodieren maternale Transkripte auch für

Transkriptionsfaktoren und Chromatin-modifizierende Enzyme, welche während der embryonalen Entwicklung rekrutiert werden.

1.2 Die postovulatorische Alterung von Oozyten

Wie in 1.1 beschrieben, durchläuft die Oozyte präzise regulierte Reifungsstadien bis zur Ovulation. Aber auch nach der Ovulation laufen in der unbefruchteten Oozyte Prozesse ab, die zu einer postovulatorischen Alterung führen und die Eizellkompetenz beeinflussen können. Das Zeitfenster für die mögliche Fertilisation variiert zwischen einzelnen Spezies und wurde für die Maus zwischen 8 – 12 h und für den Menschen < 24 h nach der Ovulation festgelegt (Austin 1974). Verbleibt die Oozyte nach der Ovulation im Ovidukt (*in vivo*) oder im Kulturmedium (*in vitro*), durchläuft sie einen Prozess der als postovulatorische Alterung bezeichnet wird. Währenddessen nimmt die Qualität und Entwicklungskompetenz der Oozyte zeitabhängig ab. Es ist bekannt, dass eine solche verzögerte Fertilisation auch zu verminderten Fertilisationsraten, Polyspermie, chromosomalen Aberrationen oder auch epigenetischen Veränderungen führen kann (Miao *et al.* 2009). Einige Mechanismen, welche während der postovulatorischen Alterung ablaufen, wurden bereits analysiert und werden im Folgenden näher erläutert.

1.2.1 Zelluläre Mechanismen bei der postovulatorischen Alterung von Oozyten

Ein Effekt, der während der postovulatorischen Alterung beschrieben wurde, ist die frühzeitige Ausschüttung von kortikalen Granula (CG, engl. *cortical granules*) unterhalb der Zellmembran, was zu einer Verhärtung der Zona Pellucida führt. Dieser Vorgang wird normalerweise im Zuge der Fertilisation initiiert um den Polyspermieblock einzuleiten. Durch dieses sogenannte „Zona-Hardening“ wird die Fertilisationsrate der unbefruchteten Oozyte stark reduziert (Ducibella 1998). Zudem verursacht eine postovulatorische Alterung eine Reduktion der Fluidität des Oolemmas, wodurch die Verschmelzung des Spermiums mit der Oozyte beeinträchtigt wird (Takahashi *et al.* 2003). Diese beiden Ereignisse des Zona-Hardening und der Sperma-Oolemma-Fusion in der postovulatorisch gealterten Oozyte beeinträchtigen hauptsächlich die erfolgreiche Befruchtung durch das Spermium.

Ein weiterer kritischer Punkt während der postovulatorischen Alterung ist die Organisation der Spindel im Oolemma, die für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte sowie für ihre korrekte Position während der meiotischen Teilungen wichtig ist. In einigen Studien in Tieren und Menschen konnte gezeigt werden, dass eine postovulatorische Alterung zu einer fehlerhaften und unvollständigen Anordnung der meiotischen Spindel führt (Eichenlaub-Ritter *et al.* 1986, Van Wissen *et al.* 1991). In parthenogenetisch aktivierten Oozyten nach postovulatorischer Alterung *in vivo* oder *in vitro* dissoziieren die Aktinfilamente von der Spindel, sodass die Chromosomen daraufhin nicht mehr in der Metaphasenplatte

vorliegen (Webb *et al.* 1986). Außerdem wurde in postovulatorisch gealterten Oozyten eine veränderte Genexpression von γ -Tubulin detektiert, was zu einer Disruption des Zentrosoms an den meiotischen Polen führt (Miao *et al.* 2009). Diese Störungen in gealterten Oozyten im Bereich der Spindel und Mikrotubuli führen dazu, dass die Chromosomen frühzeitig oder fehlerhaft getrennt werden und es zu einer Aneuploidie kommen kann.

Die postovulatorische Alterung der Oozyte nimmt auch Einfluss auf die Kalzium-Konzentration im Embryo. Nach der Befruchtung bindet Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP3) an die entsprechenden Rezeptoren auf dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) um einen Kalzium-Einstrom in die Zelle zu initiieren (Takahashi *et al.* 2000). Eine postovulatorische Alterung bewirkt eine reduzierte Ca^{2+} Oszillation während der Fertilisation im Vergleich zu nicht gealterten Oozyten, die unter anderem durch verminderte Kalzium-Vorräte im ER bedingt ist (Takahashi *et al.* 2013). Dies wiederum geschieht durch eine Reduktion von Adenosin-Triphosphat (ATP), wodurch die Aktivität der ATPase am ER gestört ist und es somit zu einer geringeren Wiederaufnahme des Kalziums aus dem Zytosol kommt (Igarashi *et al.* 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass die postovulatorische Alterung der Oozyte die Kalzium-Homöostase im Embryo stark beeinflusst und dessen weitere Entwicklung beeinträchtigen kann.

Als eine mögliche Ursache für die oben genannten zellulären Veränderungen durch die postovulatorische Alterung wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) in den Mitochondrien der Oozyte diskutiert. In der MII Oozyte entsteht ROS als ein Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung im Rahmen der Atmungskette. Zudem ist die Oozyte *in vitro* Umweltbedingungen ausgesetzt, die eine ROS-Produktion begünstigen. Dazu gehören beispielsweise die Einwirkung von Licht, das Fehlen von Antioxidantien aus dem Follikel und dem Ovidukt sowie eine erhöhte Sauerstoffkonzentration aus der Luft (Goto *et al.* 1993). Obwohl die Oozyte Antioxidantien wie Glutathion besitzt, werden diese Substanzen durch eine verlängerte postovulatorische Alterung abgebaut und stehen so der Beseitigung von ROS nicht mehr zur Verfügung (Yoshida *et al.* 1993). Aufgrund der stetig ansteigenden ROS Konzentration und der gleichzeitig sinkenden Konzentration von Antioxidantien nach postovulatorischer Alterung herrscht in der Oozyte eine Form von oxidativem Stress. Da dieses Ereignis relativ früh während der *in vitro* Alterung beginnt, wird diskutiert, ob der oxidative Stress der Auslöser des Alterns der Oozyte ist (Lord *et al.* 2013).

1.2.2 mRNA- und Protein-Profil

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, ist die Transkription während der Oozytenreifung stillgelegt und die weitere Entwicklung bis zur zygotischen Genomaktivierung ist abhängig von den akkumulierten maternalen mRNA Transkripten und Proteinen. Während der

postovulatorischen Alterung kann die Konzentration der akkumulierten mRNAs und Proteine variieren und somit die Fertilisation und Entwicklung beeinflussen. Diesen Ansatz untersuchten Forscher an postovulatorisch gealterten Oozyten aus der Regenbogenforelle. Dazu wurde eine *in vivo* Alterung von 5, 14 und 21 Tagen herbeigeführt. In diesen gealterten Oozyten wurde die mRNA Konzentration von 39 Transkripten analysiert und mit derjenigen von frisch ovulierten Eiern verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Menge einiger Transkripte (Cyclin A1 und A2, JNK1, IGF2) nach 5, 14 oder 21 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen zunahm, während die mRNA Konzentration anderer Transkripte (Tubulin β , Ferritin H und Npm2) abnahm. Diese veränderte mRNA Konzentration führte zu einer verminderten Ei-Qualität nach postovulatorischer Alterung (Aegerter *et al.* 2005). In einer weiteren Studie wurde die mRNA Konzentration von MAD2 in Maus-Oozyten nach 19 und 24 h postovulatorischer Alterung analysiert, da dieses Protein einen Kontrollpunkt während der Spindeltrennung in der Meiose darstellt. Die Resultate zeigten, dass die Konzentration an MAD2 Transkript nach Alterung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert war (Steuerwald *et al.* 2005). Weiterhin analysierte die Gruppe um Ma *et al.* die Konzentration verschiedener Proteine, u.a. von MAD2, nach 40-72 h postovulatorischer Alterung in unreifen, porcinen Oozyten. Dabei zeigte sich, dass Tubulin und CENPB keine veränderte Proteinkonzentration aufwiesen. Es wurde jedoch eine Reduktion der Proteinexpression von MAD2 und BCL2 und eine verminderte Aktivität von MAPK festgestellt. Die Autoren konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen der veränderten Proteinexpression, einer abnormalen Spindeltrennung während der Meiose II und einer gestörten embryonalen Entwicklung feststellen (Ma *et al.* 2005).

Nicht nur die Menge an mRNA von Maternaleffektgenen spielt eine wichtige Rolle, sondern auch die Länge des Poly(A)-Schwanzes, da dadurch die Translation oder Degradation der Transkripte reguliert wird. In *Xenopus tropicalis* zeigten Microarray-Untersuchungen, dass ca. 15 % der polyadenylierten mRNAs eine reduzierte Konzentration nach 3 h postovulatorischer Alterung aufweisen. Diese Abnahme der polyadenylierten mRNA konnte auf die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes zurückgeführt werden. Zusätzlich konnte auch eine Korrelation zwischen der Deadenylierung maternaler mRNA Transkripte nach postovulatorischer Alterung und einer verminderten embryonalen Entwicklungskompetenz gezeigt werden (Kosubek *et al.* 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine postovulatorische Alterung ein verändertes mRNA- oder Protein-Muster in der unbefruchteten Oozyte verursachen kann. Weiterführend konnte auch gezeigt werden, dass diese Änderungen die Fertilisation und die Entwicklungskompetenz des Embryos stark beeinflussen.

1.2.3 Epigenetische Veränderungen

Die eukaryotische DNA wird in Chromosomen verpackt, deren kleinste Einheit ein Nukleosom ist. Jeweils 146 DNA-Basenpaare sind um ein Nukleosom gewickelt. Dieses Nukleosom ist ein Oktamer, welches aus 8 Histonen besteht. Es gibt jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Diese bestehen aus globulären Zentren und zwei flexiblen endständigen Schwänzen, welche unterschiedlich modifiziert werden können (Peterson and Lanier 2004). Die Histonschwänze haben dabei unterschiedliche Aufgaben. Zum einen stabilisieren sie die Nukleosomen, sind aber auch für die Interaktion der Nukleosomen untereinander zuständig. Außerdem führen sie zur Bildung des repressiven Chromatins, welches auch Heterochromatin genannt wird (Luger *et al.* 1997). DNA- und Histonmodifikationen werden während des Oozytenwachstums etabliert und spielen wichtige Rollen während der Maturation und frühen embryonalen Entwicklung, beispielsweise im Zellzyklus, der DNA-Replikation und -Reparatur, der Aktivierung der Transkription und der Chromosomenstabilität (Kouzarides 2007). Vor allem die Histon-Acetylierung, -Phosphorylierung und -Methylierung sind während der Oozytenreifung in der ersten und zweiten Reifeteilung essentiell. Veränderungen dieser Modifikationen führen zu Chromosomenaberrationen oder zu einer verzögerten Entwicklungskompetenz der Oozyte (Gu *et al.* 2010).

So konnte bereits gezeigt werden, dass während der postovulatorischen Alterung *in vivo* und *in vitro* die Acetylierung an Lysinresten der Histone H3 und H4 in Maus-Oozyten verändert wird. Während nach 14 h postovulatorischer Alterung keine oder nur eine sehr schwache Acetylierung unterschiedlicher Lysinreste detektiert wurde, nahm diese mit fortschreitender postovulatorischer Alterung bis 19 h zu. Zusätzlich wurde nach 24 h postovulatorischer Alterung eine neue Acetylierungen an AcH3K14 detektiert (Huang *et al.* 2007). In einer weiteren Studie wurde an postovulatorisch gealterten porcinen Oozyten der Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung AcH4K12 und ROS untersucht. Hierbei zeigte sich, während der postovulatorischen Alterung im Vergleich zu den Kontrollen eine Zunahme von AcH4K12 und ROS und eine Abnahme der ATP Konzentration. Bei einer Behandlung von frisch ovulierten MII Oozyten mit H₂O₂, welches die stabilste Form von ROS darstellt, wurde ebenfalls eine gesteigerte AcH4K12 festgestellt. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Konzentration von ROS nach postovulatorischer Alterung und der veränderten AcH4K12 ermittelt werden (Cui *et al.* 2011).

Neben der Histonmethylierung wird auch die DNA-Methylierung in der Oozyte durch eine postovulatorische Alterung beeinflusst. So untersuchte die Gruppe um Sun *et al.* zwei maternal geprägte Gene, *Snrpn* und *Peg1*, nach 13, 21, und 29 h postovulatorischer Alterung *in vivo* und *in vitro*. Die Ergebnisse zeigten, dass *Snrpn* nach 13 und 21 h postovulatorischer Alterung keine Änderungen in der Methylierung aufwies und erst nach

29 h die Methylierung verlor. Bei *Peg1* konnte eine Hypermethylierung in Kontroll-Oozyten detektiert werden, welche sich auch nach 29 h postovulatorischer Alterung nicht veränderte (Liang *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Gruppe eine Abnahme der Methylierung bei *Peg1* nach 42 h postovulatorischer Alterung (Imamura *et al.* 2005).

Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass DNA- und Histon-Modifikationen während einer postovulatorischen Alterung zeitabhängig verändert werden und dies Einfluss auf die Fertilisation und embryonale Entwicklung nehmen kann.

1.3 Assistierte Reproduktionstechniken

Assistierte Reproduktionstechniken, bei denen eine Befruchtung außerhalb des Körpers der Frau (*in vitro*) erfolgt, gewinnen weltweit immer mehr an Bedeutung. Dabei gibt es viele Gründe, warum es bei einem Paar zu einem unerfüllten Kinderwunsch kommen kann. In den meisten Fällen betrifft es die verminderte Spermienqualität beim Mann oder das hohe Alter der Frau. Aber auch Fehlbildungen der Geschlechtsorgane oder hormonelle Störungen bei Männern oder Frauen können den Erfolg einer natürlichen Befruchtung verringern oder sogar verhindern. Allein im Jahr 2013 wurden in Deutschland 12.156 In-vitro-Fertilisationen (IVF) und 40.952 intrazytoplasmatische Spermieninjektionen (ICSI) durchgeführt (Deutsches-IVF-Register 2014).

Unabhängig von der Indikation der Therapie beginnt jeder Behandlungszyklus mit einer Hemmung der endogenen Hormonproduktion der Frau durch die Gabe von GnRH-Agonisten oder -Antagonisten bei gleichzeitiger Stimulation der Follikelreifung durch Follikelstimulierendes Hormon (FSH). Ist die gewünschte Anzahl an Follikeln mit adäquatem Reifungszustand erreicht, wird die Ovulation durch die Injektion von humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) ausgelöst. 36-40 Stunden später werden die Follikel durch eine Ultraschallpunktion der Eierstöcke entnommen (Albano *et al.* 1997). Bei einer IVF werden die Eizellen anschließend in einem speziellen Kulturmedium mit einer definierten Menge an beweglichen Spermien inkubiert. Bei der ICSI wird die Eizelle zunächst von den umgebenden Cumuluszellen befreit (denudiert) und ein einzelnes Spermium mithilfe eines Mikromanipulators durch die Zona pellucida und das Oolemma direkt in die Eizelle injiziert, wobei möglichst weit entfernt vom Polkörperchen angesetzt wird (Dumoulin *et al.* 2000). Nach erfolgreicher Befruchtung bildet sich 16-18 h nach der Insemination oder Injektion das Vorkernstadium aus, d.h. der männliche und weibliche Vorkern sind sichtbar aber noch nicht verschmolzen. Nach 24 h ist die erste Furchungsteilung abgeschlossen und 4-Zeller werden nach etwa 44 h erwartet. Nach 48 h wird bei schneller Furchungsteilung bereits mit den ersten 8-Zellern gerechnet. Üblicherweise werden die Embryonen 48-72 h nach Insemination in die Gebärmutter retransferiert (Herrler and Beier 1998). Ab der Follikel-Punktion beginnt die postovulatorische Alterung bis zur Fertilisation durch IVF oder ICSI, die je nach Dauer

einen negativen Einfluss auf die Qualität und damit auf die Entwicklungskompetenz der Eizelle haben kann. In einer Studie aus Korea wurden Untersuchungen an humanen MII Oozyten durchgeführt, welche nach konventioneller IVF nicht befruchtet waren. Ein oder zwei Tage später wurden diese MII Oozyten für eine weitere konventionelle IVF oder ICSI eingesetzt und sind somit 24-48 h postovulatorisch gealtert. Die Fertilisationsrate nach 24 oder 48 h verringerte sich dabei jeweils um 40 % im Vergleich zu den Kontrollen mit konventioneller IVF. Außerdem konnte nach postovulatorischer Alterung keine Schwangerschaft nach Embryotransfer nachgewiesen werden (Park *et al.* 2000).

Als relativ neue Technik hat sich in der ART die In-vitro-Maturation (IVM) von Eizellen etabliert. Dabei werden der Frau entweder Ovargewebe oder unreife Eizellen aus dem Ovar entnommen, welche dann *in vitro* nachgereift werden und anschließend für eine IVF oder ICSI verwendet werden können (Prasath *et al.* 2014). Durch diese Behandlungsmethode kann die Gabe von Gonadotropin stark reduziert werden und es kommt zu geringeren Nebenwirkungen. Weitere Indikationen für eine IVM sind das Polyzystische Ovar-Syndrom oder onkologische Erkrankungen von Mädchen, deren Behandlung zur Infertilität führen kann und die unreifen Eizellen bis zur geplanten Schwangerschaft kryokonserviert werden können (West *et al.* 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Normalerweise wird die Säuger-Oozyte direkt nach der Ovulation befruchtet. Findet die Fertilisation jedoch verzögert statt, spricht man von einer postovulatorischen Alterung. Während dieser Zeit unterliegt die Oozyte einem zeitabhängigen Qualitätsverlust, welcher vor allem in einer verringerten Fertilisations- und Implantationsrate resultiert (Miao *et al.* 2009). Zu den Ursachen für den Verlust der Entwicklungskompetenz der gealterten Oozyten zählen zum einen epigenetische Veränderung, zum anderen die Translationseffizienz der mRNA von Maternaleffektgenen, die u.a. durch Poly- oder Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA Transkripte reguliert werden kann (Weill *et al.* 2012). Als eines der wichtigsten Ereignisse während der embryonalen Entwicklung aktivieren Produkte der Maternaleffektgene auch das zygotische Genom im 2-Zell-Stadium (Li *et al.* 2010).

Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst den Effekt einer postovulatorischen *in vitro* Alterung von Maus-Oozyten auf die Poly(A)-Schwanzlänge von Maternaleffektgenen zu untersuchen. Neben einer Analyse mittels qRT-PCR mit random-hexamer und oligo(dT)-Primern sollte zudem ein Test etabliert werden, mit dem die exakte Länge des Poly(A)-Schwanzes von mRNA Transkripten bei diesen geringen zur Verfügung stehenden mRNA-Mengen bestimmt werden konnte. Um mögliche epigenetische Veränderungen durch die postovulatorische Alterung zu untersuchen, sollte der Grad der Trimethylierung am Histon H3 am Lysin 9 (H3K9me3) durch immunhistochemische Methoden bestimmt werden. Abschließend sollte die Fertilisationsrate und die zygotische Genomaktivierung des 2-Zell-Embryos nach postovulatorischer Alterung ermittelt werden. Hierzu musste zunächst die In-vitro-Fertilisation postovulatorisch gealterter Maus-Oozyten etabliert werden. Die zygotische Genomaktivierung wurde anschließend durch Inkubation der 2-Zell-Embryonen in BrUTP immunhistochemisch detektiert.

Diese Untersuchungen sollten neue Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen liefern, die zu einer verringerten Entwicklungskompetenz von postovulatorisch gealterten Oozyten führen können.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

-80°C Kühlschrank	Revco
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Biorad
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Analysenwaage 40SM-200A	Precisa
Aspirator tube assembly	Sigma
Einkanal-Pipetten	Eppendorf
Einmalspritzen (1 ml)	Terumo
Feinwaage Galaxy 400	Ohaus
Injektionskanülen (20G, 23G und 27G)	Braun
Inkubator (wasserummantelt)	Napco
Kühlzentrifuge Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Leica DM4000B Fluoreszenzmikroskop	Leica
LightCycler 480 II	Roche
Magnetrührer	Ikamag
Mikropipetten (Glaskapillaren) 50+100 µl	Blaubrand IntraMark
Mikrotiterplatten	Applied Biosystems
Nanodrop	Peqlab
Objektträger	Engelbrecht
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym
Petrischalen (35x10 mm, 60x15 mm, 100x20 mm)	Sarstedt
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer BioPhotometer	Eppendorf
Pipettenspitzen (0,5 – 10 µl)	Biozym
Pipettenspitzen (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Sezierbesteck	
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Terasaki Platte 72-Well	Greiner Bio-One
Thermocycler C1000	Biozym
Thermocycler T3000	Biometra
UV-System	Intas
Vivaspin6	Sartorius
Vortexer Genie 2	Scientific Industries

Wärmeplatte Mikroskop

Tokai Hit

Zentrifuge 5415D

Eppendorf

2.2 Substanzen, Chemikalien, Hormone

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Sigma

ATP

Life Technologies

BrUTP

Sigma

CTP

Sigma

Dabco

Sigma

DTT

Life Technologies

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Sigma

GeneRuler® 100 Bp DNA-Ladder

Thermo Scientific

GTP

Sigma

human Chorionic Gonadotropin (hCG)

Intervet

Oligo(dT) Dynabeads

Ambion

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ - P - Primer

Invitrogen

Oligo(dT)₁₆ Primer

Invitrogen

PMSF

Serva

Poly-L-Lysin Hydrobromid

Sigma

Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)

Intervet

Random-hexamer Primer

Roche

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain

Biotium

Triton X-100

AppliChem

Vectashield mit DAPI

Vector Laboratories

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Firmen Merck, Roth und Sigma in analysereiner Form bezogen.

2.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit A. bidest angesetzt.

Blockingpuffer für Fluoreszenzfärbungen:

BSA	1	% (w/v)
Milchpulver	0,2	% (w/v)
Norm goat serum	2	% (v/v)
Glycin	0,1	M (w/v)
Triton X-100	10	% (v/v)

Mit PBS auffüllen und steril filtrieren

FITC-Lösung:

Fluoresceinisothiocyanat	10	mg
C ₃ H ₇ NO	1	ml

GTC-Puffer:

C ₂ H ₆ N ₄ S	4	M
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	25	mM
C ₂ H ₆ OS	2	% (v/v)
pH	7,1	

Natriumcarbonat-Puffer:

Na ₂ CO ₃	160	mM
NaHCO ₃	333	mM
pH	9,5	

Orange G DNA Auftragspuffer (6x):

Glycerin	60	% (v/v)
EDTA	60	mM
Orange G	0,15	% (v/v)
Tris-HCL	10	mM
pH	7,6	

Paraformaldehyd 4%:

PFA	8	g
PBS	200	ml

PFA in ca. 170 ml heißem PBS (80 °C) unter dem Abzug lösen. Anschließend den pH mit NaOH auf 7,3 einstellen. Mit PBS auf 200 ml auffüllen, aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.

Phosphate Buffered Saline (PBS):

NaCl	140	mM
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	10	mM
KCl	2,7	mM
KH ₂ PO ₄	1,8	mM
pH	7,3 - 7,4	

Physiological Buffer (PB):

CH ₃ CO ₂ K	100	mM
KCl	30	mM
MgCl ₂	1	mM
Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O)	10	mM
ATP	1	mM
DTT	1	mM
PMSF	0,2	mM
RNasin	40	U/ml

Physiological Buffer (PB) mit BrUTP:

ATP	2	mM
GTP	0,4	mM
CTP	0,4	mM
BrUTP	0,4	mM
MgCl ₂	2	mM

SSC-Puffer (20x):

NaCl	3	M
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0,3	M
pH	7,3	

TBE-Puffer:

TRIS	89	mM
H ₃ BO ₃	89	mM
EDTA	2	mM

2.4 Zellkultur-Medien**α-MEM Glutamax (Invitrogen):**

Dieses Medium diente zur Reifung der Oozyten in der präantralen Follikelkultur und wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Eichenlaub-Ritter zusammengestellt und verwendet. Zu dem Medium wurde hinzugefügt: 10 mIU/ml rekombinantes Follikelstimulierendes Hormon (Merck-Serono), 5 % Kälberserum, 5 mg/ml Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit.

M2-Medium (Sigma):

Da dieses Medium mit HEPES gepuffert ist, kann es zur Inkubation und Verwendung von Oozyten außerhalb des Inkubators genutzt werden, da der pH im Medium an der Luft stabil bleibt.

M16-Medium (Sigma):

Dieses Medium ist mit Bicarbonat gepuffert und wird verwendet zur Inkubation von Oozyten im Inkubator und darf nur für kurze Zeit unter Raumbedingungen stehen, da ansonsten Schwankungen des pH-Wertes auftreten.

Research Vitro Fert (Cook Medical):

Das Medium wurde zur In-Vitro-Fertilisation der Maus-Oozyten verwendet.

2.5 Kits

Arcturus Pico Pure [®] RNA Isolation Kit	Life Technologies
GeneAmp [®] RNA PCR Core Kit	Life Technologies
HotStarTaq [®] DNA Polymerase	Qiagen
MinElute [®] Gelextraction Kit	Qiagen
QiaShredder	Qiagen
ReadyMix [®] Taq PCR Reaction Mix	Sigma Aldrich
RNeasy MinElute [®] Clean up Kit	Qiagen
Superscript [®] III Reverse Transkriptase	Life Technologies

2.6 Enzyme

Hyaluronidase	Sigma
Pronase E	Sigma
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
DNase I	Qiagen
RiboLock [®] RNase Inhibitor	Thermo Scientific
<i>Klenow</i> Fragment	New England Biolabs

2.7 Molekulargewichtsstandard

Bei der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Größenbestimmung der DNA-Fragmente durch den GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), dieser enthält Fragmente von 100-1000 bp.

2.8 Primer für die quantitative real-time PCR

Gen	Ref Seq transcript ID	Primer Sequenz (5'-3')	UPL Sonde
Brg1	NM_001174078.1	F cggttgtgagtgacgatgac R cctcactgccactctctga	15
Tet3	NM_183138.2	F gcacgccagagaagatcaa R ggacaatccacccttcagag	81
Trim28	NM_011588.3	Taqman-Assay (Mm00495594_m1)	
Zfp57	NM_001013745.2	F aacctcaagaacctgacatttg R ccctgtgcaactggagga	15
Dnmt1	NM_001199432.1	Taqman-Assay (Mm01151063)	
Nlrp2	NM_177690.3	Taqman-Assay (Mm00624616_m1)	
Nlrp5	NM_011860.2	Taqman-Assay (Mm011143609_m1)	
Nlrp14	NM_001002894.2	F gcagccacactgcaatctt R ccacaagccttactctgtgaga	78
Oct4	NM_013633.3	F cacgagtggaagcaactca R gctttcatgtcctgggactc	82
Zar1	NM_174877.3	F ctccaggacccgggtgatt R cactcggcagaactgtttga	15
Luciferase	M15077.1	F gtcttcccgcagatgacg R gtctttccgtgctccaaaac	70

2.9 Primer für den LM-PAT und ePAT

Die genspezifischen Primer wurden für die jeweiligen Transkripte mit Hilfe der Software Primer 3 und BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) generiert.

Gen	Ref-Seq transcript ID	Primer Sequenz (5'-3')
Anchor-Primer		gcgagctccgcggccgcg(dT) ₁₂
Dnmt1	NM_001199431.1	cactgtgcaggtggcaag
Gapdh_1	NM_008084.2	cccccaactgagcatctccctcacaatt
Gapdh_2		cccccaactgagcatctccctcacaatt
Hprt	NM_013556.2	catgttcagcagtggtggctgtatttcccactttc
Tet3_1	NM_183138.2	ccccttctctctccccagtggttcagtaaat
Tet3_2		cttctccccagtggttcagt
Zar1_1	NM_174877.3	ctagatggggctaataatggaatgg
Zar1_2		tcaaacagttctgccgagtggtg
Zfp57	NM_001013745.2	ggggaggggaggtcaaactgaggtctt

2.10 Antikörper

Primärantikörper

Maus anti-BrdU (1:50)	monoklonal	Roche
Kaninchen anti-H3K9me3 (1:40)	polyklonal	Epigentek

Sekundärantikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG-Tritc (1:40)	monoklonal	Epigentek
Ziege anti-Maus A488 (1:100)	monoklonal	Molecular Probes
Kaninchen anti-Maus FITC (1:100)	monoklonal	Dianova

2.11 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse im Alter von 4 bis 6 Wochen und männliche Mäuse ab der 10. Woche vom Stamm C57Bl/6J sowie C57Bl/6JxCBA/Ca Hybride verwendet. Alle Eingriffe wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Bundesrepublik Deutschland sowie des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt (LANUV, AZ 84-02.04.2011.A374). Die Versuchstiere wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit von $55\% \pm 10\%$) in einer pathogen-freien Umgebung mit reguliertem Tag-/Nachtrhythmus (12h/12h) und unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser. Verwendet wurden ausschließlich den Richtlinien entsprechende autoklavierte Käfige mit separatem Belüftungssystem.

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Superovulation

Um die Ausbeute an Oozyten zu erhöhen, wurden die Weibchen durch Hormonpräparate superovuliert. Zunächst wurde die Follikelreifung durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 10 IE PMSG (engl.: *Pregnant mare's serum gonadotropine*) stimuliert. Nach 48 h erfolgte die i.p. Injektion von 10 IE hCG (engl.: *human Chorionic Gonadotropine*), wodurch die Ovulation induziert wurde. Die Ovulation erfolgt ca. 13 h nach hCG-Gabe, dabei kommt es zur Ausbildung einer Ampulle, die als große, gut sichtbare Schlaufe im Eileiter erscheint, in welcher sich die Cumulus-Oozytenkomplexe (COC, engl.: *Cumulus-Oocyte-Complex*) befinden.

3.1.2 Postovulatorische Oozyten-Alterung

Ungefähr 15 h nach der hCG-Injektion wurden die Eileiter unter dem Binokular aus den Mäusen präpariert. Dazu wurde die Maus zunächst mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die isolierten Ovidukte der Maus wurden in einen Tropfen M2-Medium überführt, die Ampulle aufgerissen und die COCs freigesetzt. Zum Verdau der Cumuluszellen wurden die COCs ca. 3-4 min in einem Tropfen mit 10 mg/ml Hyaluronidase inkubiert, in mehreren Tropfen M2-Medium gewaschen und anschließend die Hälfte der Oozyten pro Maus bei -80 °C in Eppendorfgefäßen eingefroren (Kontrollen).

Um eine postovulatorische Alterung zu erreichen, wurde die andere Hälfte der Oozyten pro Maus nach der Isolierung in mit Mineralöl überschichtetes M16-Medium gegeben. Nach einer 12 h bzw. 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Oozyten bei -80 °C eingefroren. Je nach Versuchsansatz wurden Pools von jeweils 20 oder 200 Oozyten erstellt.

3.1.3 Wachstum und Reifung der Oozyten in der Follikelkultur

Die Reifung von Oozyten in der Follikelkultur wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Eichenlaub-Ritter von der Universität Bielefeld etabliert und durchgeführt (Trapphoff *et al.* 2010). Dazu wurden präantrale Follikel aus 12-14 Tage alten C57Bl/6JxCBA/Ca Mäusen isoliert. Die Follikel wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ in Tropfen aus α -MEM Glutamax, die mit Mineralöl überschichtet waren, inkubiert. Zu Beginn der Follikelkultur wurden 10 IU/ml Luteinisierendes Hormon (LH) hinzugefügt und alle 4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 12 nach Isolation wurden der Follikelkultur 5 ng/ml *recombinant epidermal growth factor* (rEGF, Promega) und 1,5 IU/ml rekombinantes hCG

(Merck Serono) hinzugefügt, um die Ovulation zu induzieren. 18 Stunden später, d.h. an Tag 13, konnten die MII Oozyten aus der Kultur isoliert werden. Zur Induktion einer postovulatorischen Alterung für 12 h wurden die Oozyten an Tag 13 erst nach 30 h isoliert. Unbehandelte und postovulatorisch gealterte Oozyten wurden jeweils in Pools von 18-21 Oozyten bei -80 °C in Eppendorfgläsern eingefroren und konnten anschließend für eine quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verwendet werden.

3.1.4 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Zur Befruchtung von Oozyten wurde eine In-vitro-Fertilisation (IVF) durchgeführt, bei der Oozyten und Spermien in einer Petrischale inkubiert werden, sodass es zu einer spontanen Befruchtung der Oozyte durch ein Spermium kommen kann. Dazu wurde das Protokoll aus „Manipulating The Mouse Embryo“ verwendet (Behringer *et al.* 2013).

Pro Ansatz wurden 2-5 Weibchen superovuliert und die COCs 14 h nach der hCG-Injektion entnommen (s. 3.1.1.).

Ein Tag vor der IVF wurden folgende Petrischalen vorbereitet, mit Mineralöl überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert:

- IVF: 60-mm Petrischale mit 1 x 300 µl und 4 x 100 µl Tropfen Research Vitro Fert Medium (RVF, Cook Medical)
- Spermien: 35-mm Petrischale mit 1 x 500 µl Tropfen RVF Medium

Eine Stunde vor der Isolation der COCs wurden aus den Männchen die Spermien präpariert. Dazu wurde ein mindestens 10 Wochen altes Männchen mittels zervikaler Dislokation getötet. Mit einem Bauchschnitt wurde die Cauda epididymidis und das Vas deferens präpariert und in die vorbereitete Petrischale gegeben. Mit einer spitzen Pinzette wurde das Vas deferens fixiert und mittels einer anatomischen Pinzette ausgestrichen. Zusätzlich wurde die Cauda epididymidis mit einer Schere ca. 5-mal eingeschnitten. Das Gewebe wurde anschließend aus dem Tropfen entfernt und die Spermien für eine Stunde kapazitiert.

Die isolierten COCs aus 2-5 Weibchen wurden in den 300 µl Tropfen der IVF-Petrischale gegeben und mit 5 µl der kapazitierten Spermien für 4-5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Fertilisation wurden die Zygoten nacheinander in den drei Tropfen 100 µl RVF Medium gewaschen, sodass dissoziierte Cumuluszellen und Spermien entfernt wurden. Anschließend wurden die Zygoten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im 4. RVF Tropfen inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die 2-Zell-Embryonen gezählt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Extraktion aus Oozyten und Ovargewebe

Die Gesamt-RNA von jeweils 20 oder 200 gepoolten Oozyten wurde mit dem Arcturus PicoPure[®] RNA Isolation Kit nach Herstellerangaben mit einigen Veränderungen extrahiert: Da Haushaltsgene möglicherweise durch eine postovulatorische Alterung beeinflusst werden können, wurde vor der RNA Isolierung zu jeder Probe 1 pg Luciferase-RNA/Oozyte (Promega) hinzugefügt (Thelie *et al.* 2007). Dies diente als Referenz zur Quantifizierung der PCR-Produkte. Danach wurden die Oozyten in 100 µl Extraktionspuffer für 30 min bei 42 °C inkubiert und anschließend mittels einer QiaShredder Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min homogenisiert. Währenddessen wurde die Säule zur RNA Isolierung vorbereitet, dazu wurden 250 µl Aufbereitungspuffer auf die Säule gegeben, für 5 min inkubiert und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Zu dem Durchfluss der QiaShredder-Säule, welcher die RNA enthält, wurden 100 µl 70 % Ethanol gegeben und durch Resuspendieren gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf die vorinkubierte RNA Aufreinigungssäule gegeben. Zur Bindung der RNA an die Säule wurde zunächst bei 100 x g für 2 min zentrifugiert, gefolgt von einer Zentrifugation bei 16.000 x g für 30 s. Bei dem ersten Waschschrift wurden 100 µl Waschpuffer 1 auf die Säule gegeben und bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die genomische DNA auf der Säule durch DNase I (Qiagen) verdaut. Dazu wurde 5 µl DNase I aus der Stocklösung mit 35 µl RDD Puffer versetzt, auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch die Zugabe von 40 µl Waschpuffer 1 wurde der DNase I Ansatz von der Säule entfernt und bei 8.000 x g für 15 s zentrifugiert. Danach folgte der zweite Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer 2 und Zentrifugieren bei 8.000 x g für 1 min. Dieser Waschschrift wurde mit einer Zentrifugation bei 16.000 x g für 2 min wiederholt. Um die Säule komplett vom restlichen Alkohol zu befreien, wurde sie ein weiteres Mal bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 0,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zur Elution wurden 12 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min gefolgt von 16.000 x g für 1 min.

Aus dem präparierten Ovar der Maus wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Zunächst wurden die Ovarien von einer Maus in 600 µl RLT Puffer aufgenommen und mit einem Homogenisator zerkleinert. Anschließend zentrifugierte man die homogene Flüssigkeit für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit, den Überstand pipettierte man in ein neues Eppendorfgefäß und versetzte ihn mit 600 µl 70 % Ethanol. Danach wurde das RNA-Ethanolgemisch auf eine Säule gegeben und für 15 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei der gleichen Geschwindigkeit durchgeführt. Dann wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und für 15 s

zentrifugiert. Ein neues Eppendorfgesäß wurde unter die Säule gegeben und diese zweimal mit 500 µl RPE Puffer versetzt und anschließend für 15 s zentrifugiert. Zum Trocknen der Säulen-Membran zentrifugierte man diese für 2 min. Um die RNA zu eluieren wurde ein neues Eppendorfgesäß verwendet, die Säule mit 30 µl RNasefreiem Wasser versetzt und für 1 min zentrifugiert. Die gewonnene RNA fror man direkt bei -80 °C ein.

3.2.2 Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Qualität und Quantität sehr kleiner Mengen RNA oder DNA wurde der Agilent 2100® Bioanalyser verwendet. Diese Methode dient der qualitativen und quantitativen biochemischen Analyse von RNA, DNA oder Proteinen. Dabei werden die Probenbestandteile in einem Gelsystem kleiner geschlossener Kanäle auf einem Glas- oder Kunststoff-Mikrochip durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Proben strömen durch Druck und elektrokinetische Kräfte kontrolliert durch die vorgegebenen Kanäle und werden so in ihre Bestandteile aufgetrennt. Die Moleküle werden über laserinduzierte Fluoreszenz-Farbstoffe detektiert und mittels einer Software durch Quantifizierung und Größenbestimmung über externe und interne Standards automatisch analysiert.

Zur Bestimmung der aus den Oozyten isolierten RNA-Mengen für den Poly(A)-Test (s. 3.2.4) wurde der Pico Chip 6000 von Agilent verwendet. Dazu wurde zunächst das Gel für die Kanäle im Chip vorbereitet. Von der Gel-Matrix wurden 550 µl in einen Filter gegeben und für 10 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Danach wurden 65 µl Aliquots angefertigt, welche innerhalb von 4 Wochen verwendet werden mussten. Für einen Chip wurde ein Aliquot mit 1 µl RNA Farbkonzentrat vermengt, auf einem Wirbelmixer gemischt und anschließend für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Nachdem der Mix aus RNA-Farbkonzentrat hergestellt wurde, konnte mittels einer Kanüle der Chip vorbereitet werden. Anschließend wurden die Oozyten-RNA und der RNA-Marker in die einzelnen Probengefäße des Chips pipettiert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration der PCR-Proben aus dem Poly(A)-Test Assay (s. 3.2.4) wurde der Agilent DNA 1000 Chip verwendet. Dazu wurde zunächst das Gel für die Kapillaren des Chips vorbereitet. Das DNA Farbkonzentrat wurde gemischt und zentrifugiert, anschließend wurden 25 µl des Konzentrats zu der Gelmatrix hinzugefügt und ebenfalls auf einem Wirbelmixer gemischt. Das Gemisch wurde auf eine Filter-Säule gegeben und für 15 min bei 2240 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Chip mit dem Mix aus Gel und Farbkonzentrat beladen und die DNA-Proben zusammen mit dem DNA-Marker in die einzelnen Probengefäße pipettiert.

Die Agilent 2100 Expert Software ermittelt die Menge und Qualität der RNA und DNA und stellt die Ergebnisse mittels eines Elektropherogramms und Gelbildes da.

3.2.3 Quantitative real-time PCR

Zur relativen Bestimmung der mRNA-Konzentration und des Poly(A)-Gehaltes bestimmter Transkripte wurde eine qRT-PCR mit der Universal Probe Library (UPL) von Roche und dem Taqman-Assay von Life Technology durchgeführt.

Das Prinzip der UPL beruht auf 165 verschiedenen Sonden und dazu passenden Primerpaaren. Aufgrund der Länge der Sonden von 8-9 Nukleotiden und den von der Firma Roche ausgewählten Sequenzen decken die Sonden annähernd das gesamte murine Transkriptom ab. Beim Taqman-Assay werden Sonden und Primer als Set generiert. In beiden Fällen sind die Sonden am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Durch die räumliche Nähe supprimiert der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5'-Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt, sodass die Fluoreszenz des Reporter-moleküls detektiert werden kann. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten.

Zur Bestimmung des Poly(A)-Anteils eines Transkripts wurde die Gesamt-RNA (s. 3.2.1) von jeweils drei Pools aus 20 Kontroll-Oozyten und postovulatorisch gealterten Oozyten von einer Reversen Transkriptase (MuLV reverse transcriptase, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden zur Bestimmung der Gesamt-RNA random-hexamer Primer und als Indikator des Poly(A)-Anteils oligo(dT)₁₆ Primer verwendet. Zur reversen Transkription wurde das GeneAmp RNA PCR Kit von Life Technology genutzt. Tabelle 2 zeigt die Ansätze für die reverse Transkription.

Tabelle 2: Ansatz für die reverse Transkription

Chemikalie	Volumen [μ l]	Endkonzentration
25 mM MgCl ₂ Lösung	4	5 mM
10x PCR Buffer II	2	1x
dGTP	2	1 mM
dATP	2	1 mM
dCTP	2	1 mM
dTTP	2	1 mM
RNase Inhibitor	1	1 U/ μ l
MuLV Reverse Transkriptase	1	2,5 U/ μ l
oligo(dT) ₁₆ / random Primer	1	2,5 μ M
Oozyten RNA	3	

Diese Ansätze wurden im PCR-Cycler unter den in Tabelle 3 beschriebenen Konditionen inkubiert.

Tabelle 3: PCR-Profil für die reverse Transkription

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Primer Annealing	21	10
Reverse Transkription	42	15
Inaktivierung	99	5
Abkühlen	5	5

Nachdem die Oozyten-RNA in cDNA umgeschrieben wurde, konnte diese für eine quantitative PCR mit dem LightCycler® 480 II von Roche genutzt werden. Da mit dem UPL-System nicht für alle Maternaleffektgene ein spezifisches Signal detektiert werden konnte, wurde außerdem der Taqman-Assay verwendet. Folgende Transkripte konnten mit der UPL quantifiziert werden: *Brg1*, *Tet3*, *Zfp57*, *Nlrp14*, *Oct4*, *Zar1*, *Luciferase*. Folgende Transkripte wurden mit dem Taqman-Assay amplifiziert: *Trim28*, *Dnmt1*, *Nlrp2*, *Nlrp5*. Tabelle 4 zeigt die Ansätze für die qPCR, Tabelle 5 das verwendete PCR-Profil.

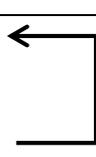
Tabelle 4: Ansatz für die qPCR für das UPL-System und den Taqman-Assay

Chemikalie	UPL-System	Taqman-Assay
LightCycler Master Mix (2x)	10 µl	10 µl
cDNA	1 µl	1 µl
Wasser	5,8	8 µl
Primer left (10 µM)	0,8 µl	
Primer right (10 µM)	0,8 µl	
UPL-Sonde (2,5 µM)	1,6 µl	
Taqman-Assay-Mix		1 µl

Tabelle 5: PCR-Profil der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	95	10 min
Denaturierung	95	10 min
Primer Annealing	60	30 s
Extension	72	1 s
Abkühlen	4	

← x 45



Die Auswertung der Kurven zur Expressionsanalyse der einzelnen Transkripte wurde mit der Software LightCycler® 480 Software release 1.5.0 von Roche durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Analyse wird unter 3.4 beschrieben.

3.2.4 Poly(A) Test Assays

Um die Länge des Poly(A)-Schwanzes eines Maternaleffektgens genau zu bestimmen und die qRT-PCR Resultate zu verifizieren, musste ein Test etabliert werden, welcher eine genaue Aussage über die Länge des Poly(A)-Schwanzes macht und zudem für geringe RNA-Mengen geeignet ist.

3.2.4.1 Ligation mediated Poly(A) Test (LM-PAT)

Zunächst wurde der LM-PAT durchgeführt (Salles and Strickland 1995). Dabei wird die Gesamt-RNA isoliert und mit oligo-p-(dT) Primern inkubiert um den Poly(A)-Schwanz anzureichern. Die phosphorylierten Primer werden anschließend bei 42 °C ligiert. Dieser Prozess generiert eine komplementäre Kopie des Poly(A)-Schwanzes mit einem Überhang am 3'-Ende. Als nächstes wird im Überschuss ein Anchor-Primer mit einer definierten Sequenzen und einem T-Stretch am 3'-Ende hinzugegeben. Dieser wird durch Reduzierung der Temperatur an das Ende des Poly(A)-Schwanzes der Transkripte ligiert. Mit dem Anchor-Primer als Template wird anschließend die mRNA mit dem gesamten Poly(A)-Schwanz in cDNA umgeschrieben (Abbildung 3). Die cDNA wird dann in einer PCR mit dem Anchor-Primer und einem genspezifischen Primer (Generierung s. 2.9) amplifiziert.

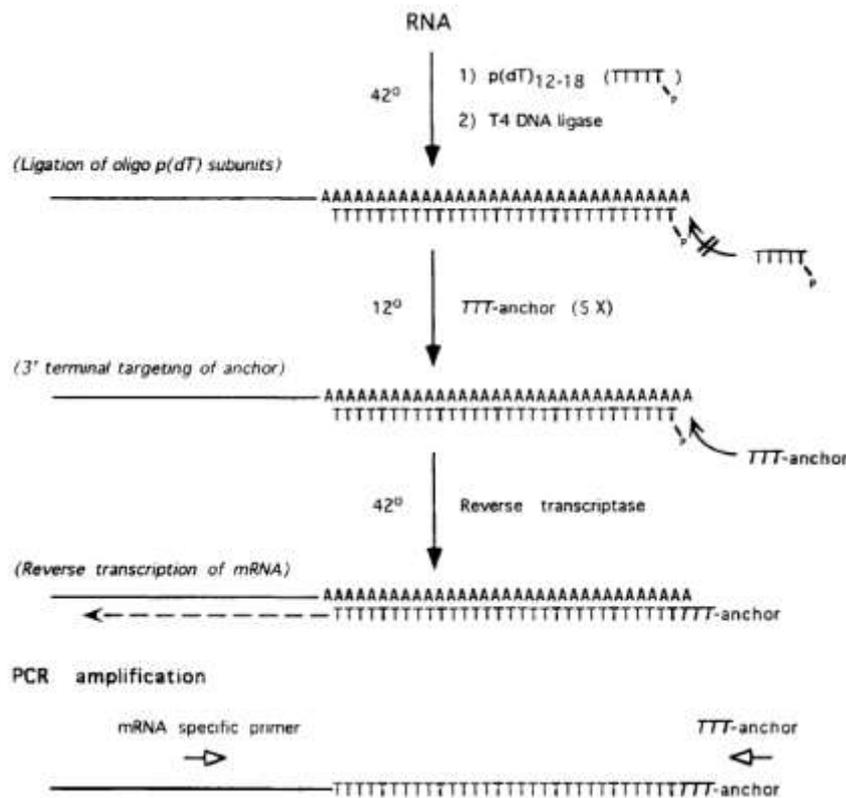


Abbildung 3: Schematische Darstellung des LM-PAT. Im ersten Schritt wird die mRNA mit phosphorylierten oligo(dT) Primern inkubiert. Diese reichern den Poly(A)-Schwanz des Transkripts an und werden anschließend ligiert. Durch Reduzierung der Temperatur bindet der zugefügte Anchor-Primer bevorzugt an das 3'-Ende des Poly(A)-Schwanzes. Dieser dient gleichzeitig als Template bei der anschließenden reversen Transkription. Durch Amplifikation während der PCR wird das spezifische Transkript mit dem gesamten Poly(A)-Schwanz vervielfältigt (Salles and Strickland 1995).

Zunächst wurde Gesamt-RNA von Pools aus 200 Oozyten oder aus Ovargewebe isoliert (s. 3.2.1). Anschließend wurden 20 ng der oligo-p-(dT)₁₂₋₁₈ Primer zu der RNA gegeben und bis zu einem Volumen von 7 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 65 °C denaturiert und danach direkt bei 42 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des verwendeten Mastermix ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Mastermix für den LM-PAT

Chemikalie	Volumen [µl]
Superscript RT Buffer (5x)	4
DTT (0,1 M)	2
each dNTP (10 mM)	1
ATP (10 mM)	1
T4 DNA Ligase (10 U/µl)	1
ad ddH ₂ O	13

Der Mastermix wurde auf 42 °C vorgewärmt, zu dem RNA-Gemisch gegeben und dieses für 30 min bei 42 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 1 µl des Anchor-Primers

(200 ng/ μ l) hinzugefügt während das Gemisch bei 42 °C belassen wurde. Anschließend wurde der Ansatz auf dem Wirbelmischer gemischt, kurz zentrifugiert und für 2 h bei 12 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Temperatur wieder auf 42 °C erhöht und nach Erreichen der Temperatur 1 μ l der Superscript III Reversen Transkriptase hinzugefügt und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Zum Schluss wurde zur Amplifikation des Transkripts eine PCR mit dem Anchor-Primer und einem genspezifischen Primer durchgeführt. Dazu wurde die HotStarTaq[®] DNA Polymerase von Qiagen verwendet. Die Zusammensetzung dieses Ansatzes ist in Tabelle 7 dargestellt, die Bedingungen der anschließenden PCR in Tabelle 8.

Tabelle 7: Ansatz für die PCR des LM-PAT

Chemikalie	Volumen [μ l]
PCR-Puffer (10 x)	2
dNTP-Mix (10 mM)	0,4
Anchor-Primer (5 μ M)	2
Genspezifischer Primer (5 μ M)	2
HotStarTaq DNA Polymerase	0,1
Probe aus LM-PAT Ansatz	2 – 10
ad ddH ₂ O	20

Tabelle 8: PCR-Profil des LM-PAT

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	93	5 min
Denaturierung	93	30 sec
Primer-Annealing	62	1 min
Extension	72	1 min
Finale Extension	72	7 min
Abkühlen	4	

← x 30

Anschließend wurden die PCR-Produkte über Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.6) detektiert.

3.2.4.2 Extension Poly(A) Test (ePAT)

Der ePAT ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge eines Transkripts (Janicke *et al.* 2012). Dabei wird im ersten Schritt ein unspezifischer Anchor-Primer zu der extrahierten Gesamt-RNA hinzugegeben. Dieser bindet mit seinem oligo(dT)-Stretch an adenylierte mRNA. Die Zugabe einer Klenow-Polymerase und dNTPs führt dazu,

dass die mRNA mit dem gebundene Anchor-Primer am 3'-Ende komplementiert wird (Abbildung 4). Bei 55 °C bindet der Anchor-Primer an die komplementäre Sequenz der mRNA und durch Zugabe einer Reversen Transkriptase kann anschließend die cDNA synthetisiert werden. Durch eine PCR mit dem Anchor-Primer und einem genspezifischen Primer (Generierung s. 2.9) entstehen abhängig von der Länge des Poly(A)-Schwanzes spezifische Fragmente unterschiedlicher Größe.

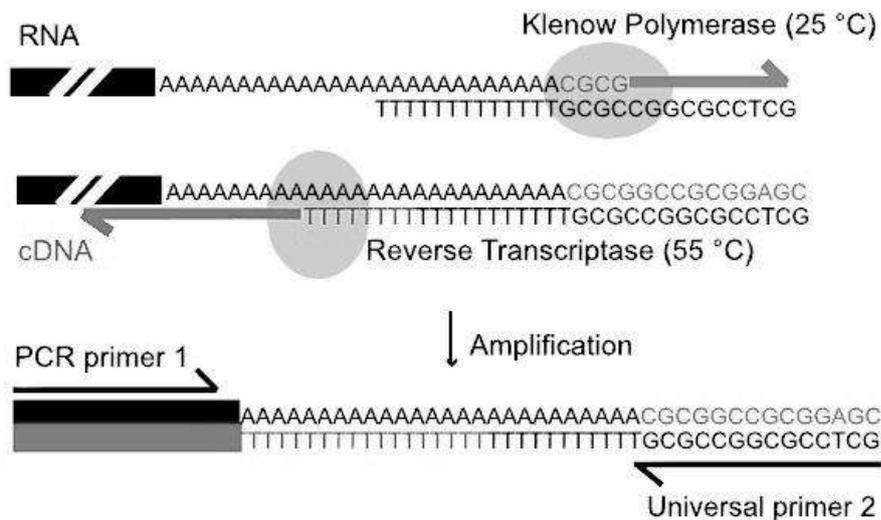


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ePAT. Im ersten Schritt wird die komplementäre Sequenz eines Anchor-Primers mit Hilfe eines Klenow-Fragments an das 3'-Ende der mRNA synthetisiert. Anschließend wird die Anchor-Sequenz der mRNA als Template genutzt und durch eine Reverse Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben. Mittels eines genspezifischen Primers und des Anchor-Primers wird durch eine PCR ein Teil des Transkripts und der gesamte Poly(A)-Schwanz amplifiziert (Janicke *et al.* 2012).

Für den ePAT wurden pro Ansatz jeweils 200 Kontroll-Oozyten und 200 postovulatorisch gealterte Oozyten gepoolt und die Gesamt-RNA extrahiert (s. 3.2.1). Anschließend wurde die RNA mit 1 µl Anchor-Primer (100 µM) auf ein Gesamtvolumen von 8 µl gebracht und für 5 min bei 80 °C inkubiert. Danach wurde der Mastermix nach Tabelle 9 zusammengestellt und zu dem Gemisch gegeben:

Tabelle 9: Ansatz des ePAT

Chemikalie	Volumen [µl]
Superscript III Puffer (5x)	4
DTT (100 mM)	1
dNTPs (10 mM)	1
RiboLock RNase Inhibitor (1 U/µl)	1
Klenowfragment (5 U/µl)	1
ad ddH ₂ O	12

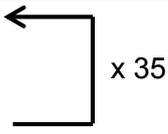
Der komplette Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 80 °C inaktiviert. Nach Erniedrigen der Temperatur auf 55 °C wurde dem Ansatz 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase hinzugefügt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 10 min bei 80 °C inaktiviert und eine PCR durchgeführt. Für die PCR wurden unterschiedliche genspezifische Primer (Generierung s. 2.9) in Kombination mit dem Anchor-Primer verwendet. Außerdem wurde auch eine Temperatur-Gradienten-PCR (55 °C – 65 °C) durchgeführt, um die optimale Schmelztemperatur der Primer zu ermitteln. Die PCR erfolgte mit dem ReadyMix® Taq PCR Reaction Mix von Sigma Aldrich (Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 10: PCR-Ansatz für ePAT

Chemikalie	Volumen [µl]
ReadyMix® Taq Puffer (2x)	10
Anchor-Primer (5 µM)	2
Genspezifischer Primer (5 µM)	2
Probe aus ePAT-Ansatz	2-10
ad ddH ₂ O	20

Tabelle 11: PCR-Profil des ePAT

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	93	5 min
Denaturierung	93	30 sec
Primer-Annealing	62	1 min
Extension	72	1 min
Finale Extension	72	7 min
Abkühlen	4	



Abschließend wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.6) oder zur genaueren Quantifizierung mit dem Agilent 1000 DNA Chip (s. 3.2.2) analysiert.

3.2.5 Fraktionierung der mRNA nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes

Um mRNA-Transkripte nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes zu separieren wurden magnetische oligo(dT)-Dynabeads verwendet (Meijer *et al.* 2007). Dabei binden polyadenylierte mRNAs an paramagnetische Beads welche mit oligo(dT)-Sequenzen verknüpft sind (Abbildung 5). Durch Waschen und Inkubation der oligo(dT)-Beads in hohen Salzkonzentrationen dissoziieren zunächst mRNAs mit kurzem Poly(A)-Schwanz und durch

Elution in Wasser mRNAs mit langen Poly(A)-Schwänzen. So kann Gesamt-mRNA in verschiedene Fraktionen, abhängig der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes, separiert werden. Diese Methode wurde für unsere Versuche, in denen nur geringe Mengen an mRNA aus Oozyten zur Verfügung standen, von Hannah Demond aus dem Institut für Humangenetik, etabliert.

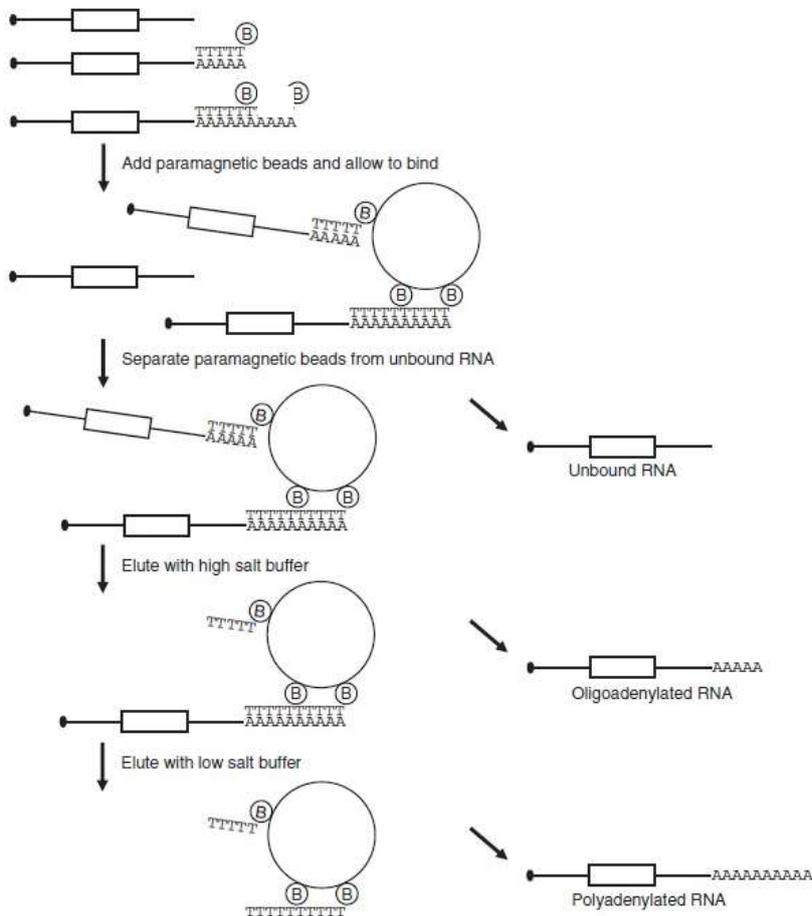


Abbildung 5: Schematische Abbildung der mRNA-Fraktionierung. Die Gesamt-RNA wird in GTC-Puffer mit paramagnetischen oligo(dT) Dynabeads inkubiert. In Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen werden zunächst mRNAs mit kurzen Poly(A)-Schwänzen und anschließend polyadenylierte mRNAs eluiert (Meijer *et al.* 2007).

Die aus den Kontroll-Oozyten und postovulatorisch gealterten Oozyten isolierte Gesamt-RNA (s. 3.2.1) wurde in 60 µl GTC-Puffer resuspendiert, auf dem Wirbelmixer gemischt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Währenddessen wurden 100 µl oligo(dT)-Dynabeads in 200 µl 0,5 x SSC-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Durch Inkubation der Beads in Eppendorfgefäßen am Magnetständer konnte der SSC-Puffer wieder entfernt werden. Diese Waschung der Beads in SSC-Puffer wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das RNA-Gemisch zu den vorbereiteten Beads gegeben, resuspendiert und für 30 min bei RT rotiert. Danach wurde durch Anlegen der Eppendorfgefäße an den Magnetständer der Überstand von den Beads separiert. Dieser Überstand wurde direkt auf Trockeneis gegeben und enthielt die ungebundene mRNA Fraktion, ohne bzw. mit sehr kurzen Poly(A)-Schwänzen. Anschließend wurden die Beads wieder dreimal in 0,5 x SSC-Puffer

gewaschen. Danach folgte nacheinander eine Inkubation der Beads in 100 µl 0,1 x; 0,075 x und 0,05 x SSC-Puffer für jeweils 5 min bei RT. Der Überstand wurde nach Bindung der Beads für 1 min auf dem Magnetständer entnommen. Diese Fraktionen enthielten die mRNAs mit mittleren Poly(A)-Schwanzlängen. Die letzte Elution erfolgte durch Inkubation der Beads für 5 min bei RT in 100 µl Wasser und Entfernung des Überstandes durch Inkubation für 1 min auf dem Magnetständer. Durch diese Elution wurden alle restlichen mRNAs von den Beads entfernt und somit stellte diese Fraktion die mRNAs mit den längsten Poly(A)-Schwänzen dar. Die Fraktionen wurden anschließend von restlichen Puffer-Rückständen gereinigt.

Die verschiedenen Fraktionen aus der mRNA-Fraktionierung (s. 3.2.5) wurden mithilfe des RNeasy MinElute® Cleanup Kit aufgereinigt. Zu dem 100 µl Eluat aus der Fraktionierung wurden 350 µl RLT Puffer gegeben und gut gemischt. Anschließend wurden 250 µl 100 % Ethanol (RNasefrei) hinzugefügt, nach wiederholtem Mischen auf die RNeasy MinElute® Säule gegeben und für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend wurden 500 µl RPE Buffer auf die Säule gegeben, für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Im nächsten Schritt wurden 500 µl 80 % Ethanol (RNasefrei) auf die Säule pipettiert und für 2 min bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde ein neues Eppendorfgefäß für die Säule genutzt und bei geöffnetem Deckel für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur Elution wurde ein reines 1,5 ml Eppendorfgefäß verwendet und 14 µl RNasefreies Wasser mittig auf die Membran der Säule pipettiert. Anschließend wurde diese 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Eluat wurde direkt auf Trockeneis gegeben um es für weitere Versuche zu verwenden.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt, indem die im neutralen pH negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Das Agarose-Gel ist aufgebaut wie eine Siebstruktur, in der kleinere Fragmente schneller zum Plus-Pol wandern als größere, sodass es zur Größenaufftrennung unterschiedlicher DNA-Produkte kommt. Die Agarosekonzentration im Gel, die anliegende Spannung und die Zeit, in der das elektrische Feld anliegt, beeinflussen die Trennschärfe der Untersuchungsmethode.

In diesem Projekt wurden 2 % Agarose-Gele verwendet, die eine Auftrennung von Fragmenten von einer Größe zwischen 100 bis 500 bp zulassen. Pro Gel wurde 1 g Agarose abgewogen und in 50 ml 0,5-fachem TBE-Puffer gelöst. Das Gemisch wurde in einem Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Lösung klar war. Um die Auftrennung der DNA-

Fragmente sichtbar zu machen, wurde zu 50 ml Agaroselösung 2,5 µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain hinzugefügt. Dieses interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Während das Gel in der Gelkammer aushärtete, wurden die Proben aus der PCR vorbereitet. Dabei wurden 20 µl Probe mit 4 µl 6-fach Orange G Ladepuffer versetzt. Dieser Puffer gewährleistet das Absinken der DNA in die Geltaschen und die Lauffront der DNA im Gel wird sichtbar gemacht. Zur Größenidentifikation der Fragmente wurde zusätzlich der GeneRuler® 100 bp DNA-Ladder aufgetragen. Das Gel lief bei 100 Volt für 1 h. Danach wurden unter UV-Licht bei 312 nm die DNA-Banden im Gel detektiert.

3.2.7 DNA Extraktion aus Agarose-Gelen

Um das amplifizierte PCR-Produkt aus dem Agarose-Gel eindeutig zu identifizieren, wurde es sequenziert. Dazu musste das Fragment zunächst aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt werden. Mit einem sterilen Skalpell wurde die spezifische DNA-Bande aus dem Agarose-Gel unter UV-Licht herausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Verwendet wurde das MinElute® Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Zu dem abgewogenem Agarose-Gelstück wurden 3 Volumen QC-Puffer hinzugefügt und für ca. 10 min bei 50 °C auf dem Thermoblock inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hat. Dabei wurde das Gemisch alle 2 - 3 min auf dem Wirbelmischer vermischt. Anschließend wurden 100 % Isopropanol hinzugefügt und das Eppendorfgefäß einige Male invertiert. Danach wurde der komplette Ansatz auf die Säule gegeben und für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 500 µl QC-Puffer auf die Säule gegeben und ebenfalls für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde anschließend ebenfalls verworfen und es wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend 1 min trocken bei 17.900 x g zentrifugiert, um alle Ethanolreste vollständig zu entfernen. Nachdem ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß unter die Säule gegeben wurde, wurden 10 µl EB-Puffer zur Elution mittig auf die Membran gegeben und die Säule für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Mit dem Photometer wurde die DNA-Konzentration des Eluats gemessen.

3.2.8 Sanger-Sequenzierung

Die aus dem Agarose-Gel extrahierte DNA wurde im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen sequenziert. Dazu wurde 10 µl der extrahierten DNA aus dem Agarose-Gel und 2 µl des genspezifischen Primers (5 pmol/µl) bei dem Sequenzierservice abgegeben.

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Konzept der DNA-Synthese mit Didesoxy-Nukleotid-Triphosphaten (ddNTPs). Dabei bindet die DNA-Polymerase an einen Primer der vor der zu sequenzierenden Region liegt und verlängert die Einzelstrang-DNA. ddNTPs

unterscheiden sich von gewöhnlichen Nucleinsäuren darin, dass die 3'-OH-Gruppe fehlt und somit beim Einbau eines ddNTPs in die wachsende DNA-Kette eine Verlängerung verhindert wird. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch unterschiedliche Farben. Die Detektion der vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs (A,C,T,G) erfolgte nach Anregung durch einen Laser. Die Fragmente wurden ihrer Größe nach in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Mithilfe der Software ApE-A plasmid editor v2.0.46 wurde die Intensität der Fluoreszenz-Signale und das Chromatogramm mit Basenabfolge analysiert.

3.3 Immunhistochemische Methoden

3.3.1 Beschichten von Glasobjektträgern mit Poly-L-Lysin

Um Oozyten oder 2-Zell-Embryonen auf Objektträgern zu fixieren, wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wird die Oberfläche der Objektträger durch die kationischen Poly-L-Lysinmoleküle positiv aufgeladen. Dies führt zu einer verbesserten Haftung der zumeist negativ geladenen, proteinreichen Schnittoberflächen der Zellen. Dazu wurde Poly-L-Lysin in ddH₂O in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Auf die Objektträger wurde mit Fahrradkleber ein Ring gebracht. Nachdem dieser getrocknet war, wurde in diesen Ring gelöstes Poly-L-Lysin gegeben. Abschließend wurde der Objektträger mit VE-H₂O gespült und konnte nach Trocknung verwendet werden.

3.3.2 H3K9me3-Fluoreszenzfärbung an Oozyten

Zur Bestimmung der H3K9 Trimethylierung in Oozyten wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dazu wurden in zwei Versuchsansätzen insgesamt 37 Kontroll-Oozyten und 63 postovulatorisch gealterte Oozyten untersucht. Zunächst wurde die Zona pellucida der Oozyten verdaut. Dazu wurden sie in 10 mg/ml Pronase, gelöst in M2-Medium, bei 37 °C für ca. 3-5 min inkubiert. Sobald die Zona pellucida eine Wellung zeigte, wurden die Oozyten in 2 Tropfen M2-Medium gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei RT in einer Terasaki-Platte durchgeführt. Eine Terasaki-Platte wird normalerweise zur Kultivierung von Einzelzellen verwendet und besitzt insgesamt 72 Vertiefungen mit einem Volumen von 11,45 µl. Aufgrund der kleinen Vertiefungen ist die Terasaki-Platte sehr gut geeignet für die Inkubation von Oozyten während einer immunhistochemischen Färbung. Die Fixierung der Oozyten erfolgte für 1 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA). Anschließend wurde die Oozyten-Membran in 0,5 % Triton X-100 für 30 min permeabilisiert. Dann erfolgten eine Inkubation von etwa 1 min und anschließend eine längere Inkubation für 30 min in Blocking-Puffer. Nachfolgend wurden die Oozyten für 1 h mit Kaninchen anti-H3K9me3 Antikörper

(1:40 in PBS) inkubiert. Anschließend erfolgten wieder eine 1 minütige und eine 30 minütige Inkubation in Blocking-Puffer. Danach wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper Ziege anti-Kaninchen Tetramethylrhodamine (Tritc, 1:40 in PBS) für 1 h inkubiert. Anschließend folgten erneut 2 Blockingschritte für etwa 1 min und die Inkubation in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 15 min. Zum Schluss wurden die Oozyten nochmal in Blocking-Puffer gewaschen und anschließend mit Dabco auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern fixiert. Die Detektion der H3K9me3- und Dapi-Fluoreszenz erfolgte mittels eines LEICA DM4000B Mikroskops. Die Auswertung wurde mit der Software Image J durchgeführt.

3.3.3 Immunhistochemische Bestimmung der BrUTP-Inkorporation in 2-Zell-Embryonen

Zur Bestimmung der Transkriptionseffizienz in 2-Zell-Embryonen wurde die Inkorporation von BrUTP durch Immunfluoreszenz gemessen (Aoki *et al.* 1997). BrUTP ist ein Nukleotidanalogen, welches vor allem von der RNA Polymerase II in naszierende RNA eingebaut wird (Jackson *et al.* 1993). In der eingebauten RNA wird es dann in BrdU umgewandelt und kann durch Immunfluoreszenz detektiert werden.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Fertilisation der Oozyten wurde für 4 h, 6 h und 8 h verzögert, die Färbung der 2-Zell-Embryonen erfolgte jeweils 24 h später.

Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Inkubationsschritte während der Färbung in einer Terasaki-Platte bei RT durchgeführt. Zunächst wurden die 2-Zell-Embryonen in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation für 1-2 min in 0,05 % Triton X-100, gelöst in Physiological Buffer (PB). Anschließend wurden die 2-Zell-Embryonen dreimal in PB gewaschen, gefolgt von einer Inkubation in PB mit BrUTP für 10 min bei 33 °C. Danach folgten drei weitere Waschschrte in PB und die Permeabilisierung der Kernmembran in 0,2 % Triton X-100. Die 2-Zell-Embryonen wurden weitere dreimal in PB gewaschen und anschließend für 30 min in 4 % PFA fixiert. Danach wurden die Zellen in 5 Schritten für insgesamt 15 min in Blocking-Puffer gewaschen. Anschließend folgte die Detektion des eingebauten BrdU mittels eines Maus anti-BrdU Antikörpers (Roche) markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Hierzu wurden die Zellen für 1 h mit dem Maus anti-BrdU Antikörper (1:50 Verdünnung in PBS) inkubiert. Zur Etablierung der Methode wurden nach der Inkubation mit dem Primärantikörper verschiedene sekundäre Antikörper verwendet. Die Sekundärantikörper Ziege anti-Maus A488 (Molecular Probes) und Kaninchen anti-Maus FITC (Dianova) wurden in einer Konzentration von 1:200 in Blocking-Puffer für 1 h bei RT verwendet. Zusätzlich wurden Negativ-Kontrollen generiert, bei denen die Inkubation mit dem Erstantikörper fehlte und somit die Spezifität des Sekundärantikörpers bestimmt werden konnte. Danach wurden die 2-Zell-Embryonen zweimal kurz in Blocking-Puffer gewaschen und mit Vectashield mit DAPI auf die

beschichteten Objektträger fixiert. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Leica DM4000B.

Um den Erstantikörper Maus anti-BrdU direkt zu detektieren wurde dieser mit FITC markiert. Dieses Derivat von Fluorescein ist geeignet für eine Kopplung an Antikörper. Zum immunhistochemischen Nachweis wird es mit blauem Licht angeregt (Absorptionsmaximum: 485 nm) und emittiert grünes Licht (Emissionsmaximum: 514 nm). Zur Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an den Maus anti-BrdU Antikörper wurden 300 µg Antikörper mit 1 ml Natriumcarbonat-Puffer versetzt und mit 10 µl FITC (10 mg/ml), gelöst in Dimethylformamid, vermischt. Dieses Gemisch wurde lichtgeschützt für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Rotierer gedreht. Anschließend wurde es auf eine Säule zur Proteinkonzentrierung (Vivaspin6, Sartorius) überführt und mit sterilem PBS auf 6 ml aufgefüllt. Der Filter wurde bei 3600 x g für ca. 5-7 min zentrifugiert bis die Lösung von 6 ml auf 400-500 µl reduziert war.

3.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der qRT-PCR Daten wurden die Ergebnisse für die Kontrollen und für die postovulatorisch gealterten Oozyten mit Hilfe des $2^{-\Delta\Delta ct}$ Wertes verglichen. Signifikanzen wurden mit dem Student's *t*-test berechnet.

Zur Auswertung der H3K9me3 wurden die fluoreszierenden Bereiche in Image J manuell markiert und die gemittelte Intensitätsstärke kalkuliert. Zur Bestimmung, ob die Daten parametrisch waren, wurde der Jarque-Bera-Test durchgeführt. Die Signifikanz zwischen Kontrollen und postovulatorisch gealterten Oozyten wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test durchgeführt.

Zur Auswertung der BrUTP Inkorporation wurden die Fluoreszenzintensitäten ebenfalls mit Image J densitometrisch quantifiziert und die gemittelte Intensitätsstärke berechnet.

Zur Berechnung der Normalverteilung der BrUTP- und IVF-Daten wurde in Sigma Plot der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet.

Die Signifikanz wurde anhand des Quantils der zu überprüfenden Unwahrscheinlichkeit festgelegt. Das Quantil, welches mit *P* angegeben wird, wurde auf einen Wert von *P* = 0,05 festgelegt, wobei dieser Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angibt. Unterschiede mit $P \leq 0,05$ wurden somit als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Effekt einer postovulatorischen Alterung auf die Poly(A)-Schwanzlänge der mRNA von Maternaleffektgenen

4.1.1 Analyse des Poly(A)-Anteils von Maternaleffektgenen in Oozyten mittels quantitativer real-time PCR

Um den Effekt einer postovulatorischen Alterung auf die Poly(A)-Schwanzlänge von maternalen Transkripten in Oozyten zu untersuchen, wurde mRNA zum einen aus Kontroll-Oozyten und zum anderen aus postovulatorisch gealterten Oozyten isoliert. Die verwendeten Mausoozyten wurden entweder *in vivo* oder in einer präantralen Follikelkultur gereift, wobei die postovulatorische Alterung in der Follikelkultur für 12 h, bei *in vivo* gereiften Oozyten für 12 h und 24 h nach Oozytenisolierung durchgeführt wurde.

Mit der mRNA aus den oben beschriebenen Oozyten wurde eine qRT-PCR durchgeführt, wobei die Reverse Transkription jeweils sowohl mit oligo(dT)₁₆ Primern als auch mit random-hexamer Primern erfolgte. Durch Umschreibung mit random-hexamer Primern konnte die Menge an mRNA eines Maternaleffektgens ermittelt werden. Das Produkt der Umschreibung mit oligo(dT)₁₆ Primern diente als Indikator für die Poly(A)-Schwanzlänge, da davon ausgegangen wurde, dass oligo(dT)₁₆ Primer bevorzugt an längere Poly(A)-Schwänze binden und so der Poly(A)-Anteil eines Transkripts bestimmt werden kann. Für dieses Experiment wurden 10 Maternaleffektgene ausgewählt, welche eine bedeutende Rolle während der embryonalen Entwicklung haben: *Brg1*, *Tet3*, *Trim28*, *Zfp57*, *Dnmt1*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Oct4*, *Zar1*. Da Haushaltsgene möglicherweise auch durch eine postovulatorische Alterung beeinflusst werden können, wurde der Probe vor der Reversen Transkription *Luciferase* mRNA zugegeben, deren cDNA als externe Referenz diente. Eine Änderung der Poly(A)-Schwanzlänge eines Maternaleffektgens konnte dann festgestellt werden, wenn sich die relative Gen-Expression der Produkte mit oligo(dT)₁₆ Primern im Vergleich zu random-hexamer Primern veränderte. Eine Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes war somit zu erkennen, wenn die relative Expressionsänderung der Gen-Produkte mit oligo(dT)₁₆ Primern geringer war als mit random-hexamer Primern. Im Gegensatz dazu erkannte man eine Polyadenylierung daran, dass die Änderung der Gen-Expression mit oligo(dT)₁₆ Primern höher war als die Gen-Expression mit random-hexamer Primern.

In Abbildung 6A sind die Expressionsänderungen der qRT-PCR von *in vivo* gereiften MII Oozyten nach 12 h postovulatorischer Alterung relativ zu den Kontroll-Oozyten dargestellt. Dabei waren keine einheitlichen Expressionsunterschiede zwischen den Genen erkennbar.

Bei 6 Genen (*Tet3*, *Trim28*, *Zfp57*, *Nlrp2*, *Nlrp14*, *Zar1*) nahm die Menge an mRNA nach postovulatorischer Alterung tendenziell ab, dies war daran erkennbar, dass im Vergleich zu Kontroll-Oozyten (gestrichelte Linie) die Gen-Expression mit random-hexamer Primern (schwarze Balken) geringer war. Vier Gene (*Brg1*, *Dnmt1*, *Nlrp5*, *Oct4*) zeigten allerdings eine Zunahme der mRNA-Menge nach Alterung, welche bei *Brg1* ($P = 0,0294$) und *Oct4* ($P = 0,0116$) signifikant im Vergleich zu den Kontrollen anstieg. Im Hinblick auf eine Modifikation des Poly(A)-Anteils zeigten sich keine signifikanten Veränderungen, erkennbar an der Gen-Expression mit oligo(dT) Primern (weiße Balken) im Vergleich zu den Kontrollen. Eine deutliche Tendenz zur Deadenylierung zeigte sich für *Nlrp5* ($P = 0,0577$) nach 12 h postovulatorischer Alterung, welche durch den Vergleich der Menge an PCR-Produkt mit random-hexamer Primern zu oligo(dT) Primern erkennbar war.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei *in vivo* gereiften MII Oozyten nach 24 h postovulatorischer Alterung eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge bei 6 der 11 untersuchten Maternaleffektgenen (*Brg1*, *Trim28*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Zar1*) (Abbildung 6 B). Der Poly(A)-Anteil nahm signifikant bei 5 Maternaleffektgenen ab (*Trim28*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Zar1*). Eine tendenzielle Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes war bei *Dnmt1* ($P = 0,0518$) und eine signifikante Deadenylierung bei *Nlrp5* ($P = 0,0467$) nach 24 h postovulatorischer Alterung zuerkennen.

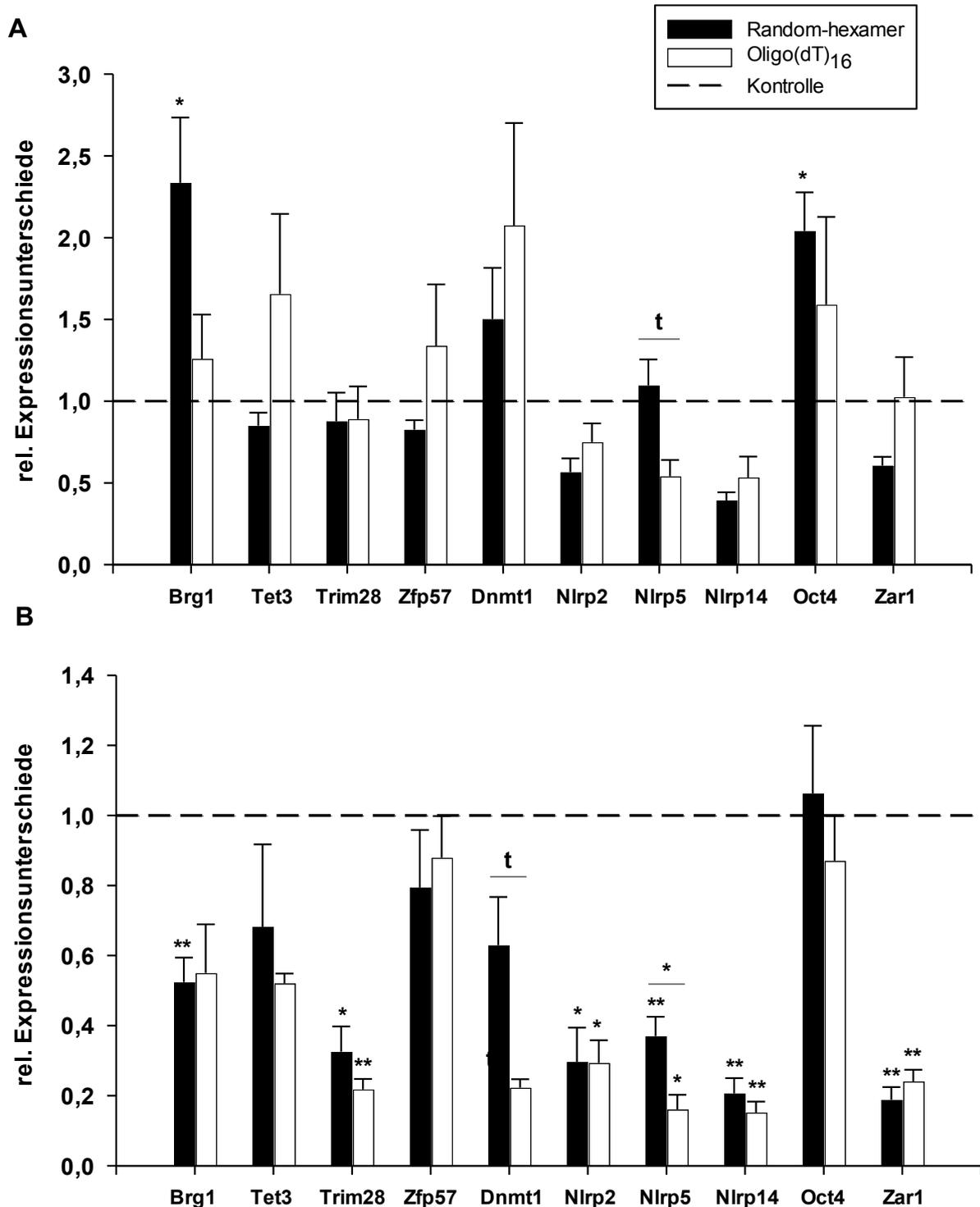


Abbildung 6: qRT-PCR von *in vivo* gereiften Oozyten nach (A) 12 h und (B) 24 h postovulatorischer Alterung. Abgebildet sind 10 verschiedene Maternaleffektgene, bei denen die Reverse Transkription der mRNA jeweils mit random-hexamer Primern (schwarze Balken) oder mit oligo(dT)₁₆ Primern (weiße Balken) erfolgte. Dargestellt sind die Expressionsunterschiede der gealterten Oozyten relativ zur Kontrolle. Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). (A) Nach 12 h postovulatorischer Alterung zeigt *Nlrp5* in Hinblick auf einen Effekt auf die Länge des Poly(A)-Schwanzes einen Trend in Richtung Deadenylierung. *Brg1* und *Oct4* zeigen eine signifikant gesteigerte mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollen. (B) Nach 24 h postovulatorischer Alterung zeigt *Dnmt1* einen Trend in Richtung Deadenylierung und *Nlrp5* eine signifikante Reduktion des Poly(A)-Schwanzes. Zudem kann eine signifikante Abnahme der mRNA bei 6 Genen (*Brg1*, *Trim28*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Zar1*) und eine Abnahme des Poly(A)-Anteils bei 5 Genen (*Trim28*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Zar1*) gezeigt werden. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, t: $p < 0,1$).

Als nächstes wurden Oozyten aus der Follikelkultur analysiert, welche an der Universität Bielefeld in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eichenlaub-Ritter generiert wurden. Bei dieser Form der Oozytenreifung wurde nur eine 12-stündige Alterung durchgeführt. Im Vergleich zu den *in vivo* gereiften Oozyten zeigte sich bei in der Follikelkultur gereiften Oozyten bereits nach 12 h postovulatorischer Alterung eine Reduktion der mRNA-Menge bei 8 von 10 Maternaleffektgenen (*Tet3*, *Trim28*, *Zfp57*, *Dnmt1*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14*, *Zar1*), die für *Nlrp2* ($P = 0,003$) und *Nlrp14* ($P = 0,015$) signifikant war. Außerdem war eine signifikante Abnahme der oligo(dT) gepimten mRNA bei *Nlrp14* ($P = 0,036$) und ein Trend der Abnahme bei *Dnmt1*, *Nlrp2* und *Nlrp5* zu erkennen. Eine Veränderung des Poly(A)-Schwanzes konnte bei *in vitro* gereiften Oozyten nach Alterung nicht festgestellt werden.

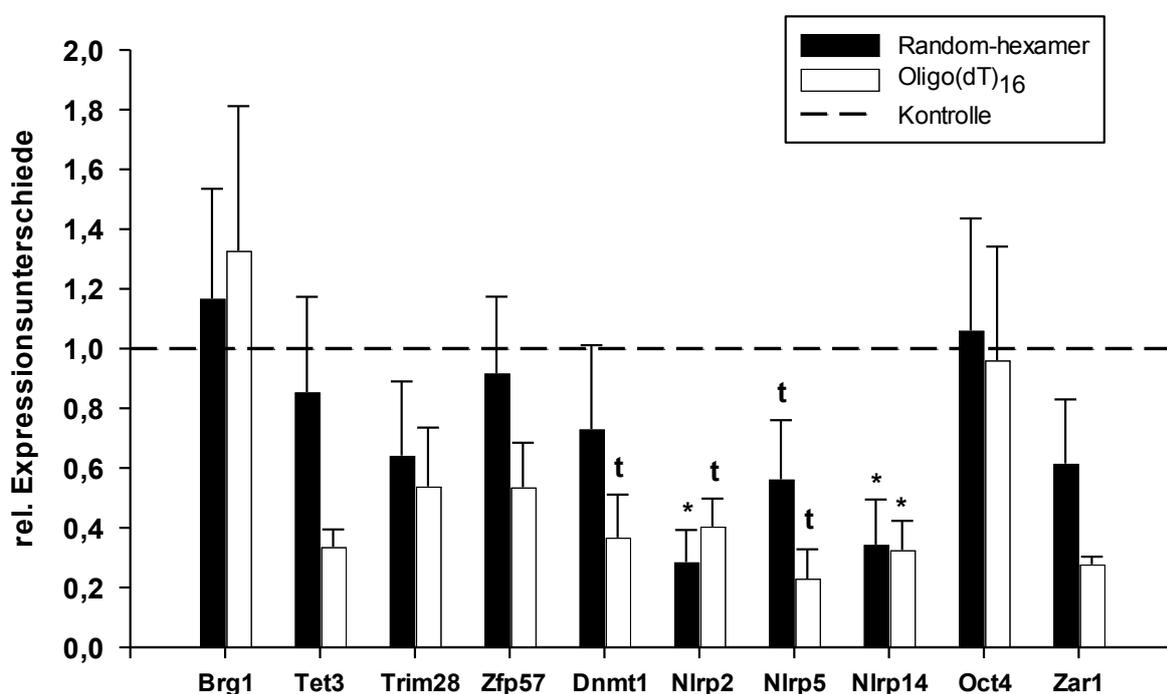


Abbildung 7: qRT-PCR von *in vitro* gereiften Oozyten nach 12 h postovulatorischer Alterung. Abgebildet sind 10 verschiedene Maternaleffektgene, bei denen die Reverse Transkription der mRNA jeweils mit random-hexamer Primern (schwarze Balken) oder mit oligo(dT)₁₆ Primern (weiße Balken) erfolgte. Dargestellt sind die Expressionsunterschiede der gealterten Oozyten relativ zur Kontrolle. Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Eine signifikante Abnahme der mRNA ist für *Nlrp2* und *Nlrp14* erkennbar und eine signifikante Abnahme des Poly(A)-Anteils für *Nlrp14*. Eine Veränderung in der Länge des Poly(A)-Schwanzes kann nicht gezeigt werden. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (* $p < 0,05$, $t < 0,1$).

Diese Untersuchungsergebnisse der qRT-PCR lassen den Schluss zu, dass Maternaleffektgene aus Oozyten, die einerseits *in vivo* und andererseits in einer Follikelkultur gereift sind, während einer postovulatorischen Alterung stark beeinflusst werden. Dabei sieht man für die meisten mRNA Transkripte eine tendenzielle Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes, wodurch die anschließende Fertilisation und embryonale Entwicklung negativ beeinflusst werden könnten. Außerdem zeigt die postovulatorische Alterung nach 12 h bei *in vitro* gereiften Oozyten einen stärkeren Effekt als bei *in vivo* gereiften Oozyten. Zudem

konnte nachgewiesen werden, dass sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* gereiften Oozyten eine starke Abnahme der Gesamtmenge an mRNA bei Maternaleffektgenen nach 12 h Alterung nachgewiesen werden konnte, welche nach 24 h Alterung einen stärkeren Effekt zeigte.

4.1.2 Quantifizierung der Poly(A)-Schwanzlänge von Maternaleffektgenen in Oozyten

4.1.2.1 Etablierung eines validen Poly(A) Tests

4.1.2.1.1 Etablierung des LM-PAT

Um die Resultate der qRT-PCR zu verifizieren, sollte eine Methode etabliert werden, mit der die Poly(A)-Schwanzlänge eines spezifischen mRNA Transkripts bestimmt werden kann. Dazu wurde zunächst der Ligation mediated Poly(A) Test von Salles and Strickland (1995) verwendet. Dabei wird im ersten Schritt der Poly(A)-Schwanz eines Transkripts mit phosphorylierten oligo(dT) Primern angereichert. Eine Ligase ligiert die Primer anschließend miteinander. Am 3'-Ende entsteht ein Überhang, an den ein universeller Adapter bindet. Während einer PCR werden durch Verwendung eines genspezifischen Primers, welcher am Transkript bindet, und eines universellen Primers, welcher am Adapter bindet, ein Teil des Transkripts und die komplette Länge des Poly(A)-Schwanzes amplifiziert. Die DNA Fragmente können dann durch Agarose-Gelelektrophorese oder einen Agilent DNA Chip analysiert werden.

Eine ausgereifte MII Oozyte aus der Maus besitzt durchschnittlich 0,5 ng RNA (Olszanska and Borgul 1993). Da die Menge an Oozyten und dadurch auch an mRNA limitiert war, wurde die Methode zunächst mit vier verschiedenen Konzentrationen Gesamt-RNA aus Ovargewebe der Maus etabliert: 1000 ng, 100 ng, 10 ng und 1 ng. Zunächst wurden die Haushaltsgene *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und *Hprt* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) getestet. In Abbildung 8 erkennt man für *Gapdh* bei 1000 ng, 100 ng und 10 ng DNA-Signale ab ca. 170 bp bis 300 bp, welches dem erwarteten Fragment von 169 bp ohne Poly(A)-Schwanz entsprechen könnte. *Hprt* zeigte DNA-Signale ab ca. 120 bp bis 300 bp, was dem erwarteten Fragment von 122 bp ohne Poly(A)-Schwanz entspricht. Die DNA-Signale in Richtung der längeren Fragmente könnten mRNA Transkripte mit längeren Poly(A)-Schwänzen sein.

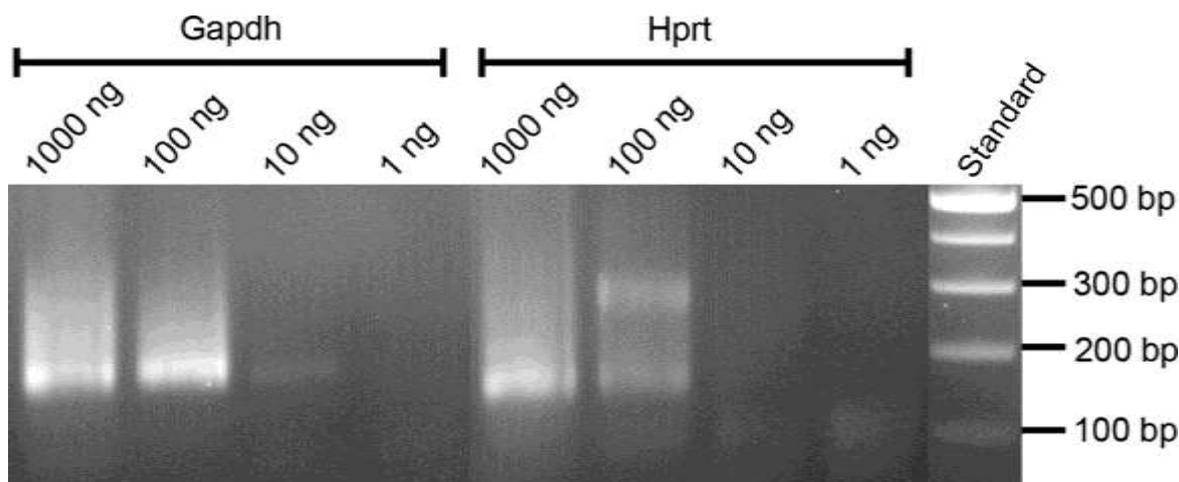


Abbildung 8: Agarose-Gel der PCR Produkte des LM-PAT von *Gapdh* und *Hprt*. Der LM-PAT wurde durchgeführt mit 1000 ng, 100 ng, 10 ng und 1 ng RNA aus Maus-Ovar. Für *Gapdh* und *Hprt* können jeweils spezifische Banden ab 169 bp und 122 bp detektiert werden, was der Größe des erwarteten Fragments entspricht.

Da diese Methode für diese beiden Haushaltsgene erfolgreich etabliert werden konnte, wurden im nächsten Schritt die Maternaleffektgene im Ovargewebe der Maus untersucht. Damit sich in den verarbeiteten Mausovarien möglichst viele gereifte Oozyten befanden und dies die Menge an Gesamt-RNA erhöhte, wurde die Maus zwei Tage vor der Gewebeentnahme und anschließender RNA-Isolierung mit PMSG stimuliert. Für den LM-PAT wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zunächst wurden Primer für folgende Maternaleffektgene generiert: *Zar1*, *Dnmt1*, *Tet3*, *Zfp57*. Die erwarteten Fragmente ohne Poly(A)-Schwanz sollten für *Zar1* bei 169 bp, für *Dnmt1* bei 103 bp, für *Tet3* bei 205 bp und für *Zfp57* bei 133 bp liegen. Auf dem Agarose-Gel sind bei *Zar1*, *Dnmt1* und *Zfp57* spezifische Banden erkennbar (Abbildung 9). Zusätzlich zu den spezifischen Banden finden sich bei allen getesteten Genen auch mehrere unspezifische Banden. Ein Grund für die unspezifischen DNA Signale könnte sein, dass diese Gene spezifisch für die Oozyte sind und die Primer daher im Ovar auch unspezifisch binden.

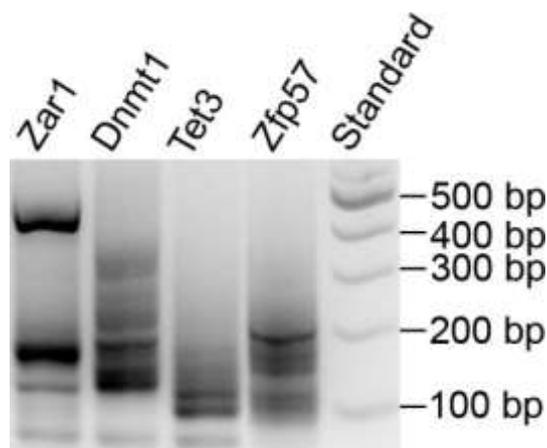


Abbildung 9: Agarose-Gel der Produkte des LM-PAT von Maternaleffektgenen. Der LM-PAT wurde durchgeführt mit 1 µg RNA aus Maus-Ovar. Es wurden Primer für die vier Maternaleffektgene *Zar1*, *Dnmt1*, *Tet3* und *Zfp57* verwendet. Die spezifischen DNA-Signale liegen für *Zar1* bei 169 bp, für *Dnmt1* bei 103 bp, für *Tet3* bei 205 bp und für *Zfp57* bei 133 bp. Es sind für alle vier untersuchten Gene zusätzlich zu den spezifischen DNA-Banden bei *Zar1*, *Dnmt1* und *Zfp57* mehrere unspezifische Banden erkennbar.

Da die Primer der vier Maternaleffektgene neben den spezifischen zusätzlich auch unspezifische Banden gezeigt hatten, wurde der LM-PAT mit 4 ng mRNA aus Maus-Oozyten getestet. Dazu wurden Primer für folgende Gene verwendet: *Zar1*, *Tet3*, *Zfp57*, *Gapdh*, *Hprt*. Auf dem Agarose-Gel waren jedoch entweder keine PCR-Produkte (*Tet3*, *Zfp57*, *Gapdh*, *Hprt*) nachweisbar oder nur unspezifische Banden (*Zar1*). Somit zeigte sich, dass die Primer der untersuchten Maternaleffektgene nicht spezifisch an ihre Transkripte gebunden hatten und der LM-PAT keine geeignete Methode zur Quantifizierung der Poly(A)-Schwanzlänge bei diesen geringen Mengen an zur Verfügung stehender mRNA darstellte. Aus diesem Grund wurde ein anderer Poly(A) Test, der ePAT, etabliert.

4.1.2.1.2 Etablierung des ePAT

Zur Etablierung eines Poly(A) Tests für mRNA aus Maus-Oozyten wurde der extension Poly(A) test von Jänicke *et al.* (2012) verwendet. Bei dieser Methode wird ein universeller Adapter an das Ende des Poly(A)-Schwanzes jeder mRNA ligiert. Ausgehend von diesem Adapter wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und durch Verwendung eines genspezifischen Primers und des Adapters das Transkript inklusive Poly(A)-Schwanz amplifiziert. Der Unterschied zum LM-PAT besteht darin, dass der Poly(A)-Schwanz nicht mit phosphorylierten oligo(dT) Primern angereichert wird. Dadurch wird die Durchführung des Protokolls kürzer und die instabile RNA wird schneller zu stabiler cDNA umgeschrieben und ist somit geeigneter für geringe Mengen mRNA (Janicke *et al.* 2012).

Zunächst wurde diese Methode mit 50 ng mRNA aus Ovargewebe stimulierter Mäuse durchgeführt. Dazu wurden folgende Primer verwendet, die Größe des Produktes ist jeweils in Klammern angegeben: *Dnmt1* (102 bp), *Gapdh_1* (181 bp), *Gapdh_2* (169 bp), *Tet3_1* (222 bp), *Tet3_2* (205 bp), *Zar1_1* (402 bp), *Zar1_2* (169 bp) und *Zfp57* (133 bp). Für

Gapdh, *Tet3* und *Zar1* wurden jeweils 2 Primer getestet. Es konnten spezifische Banden für *Dnmt1*, *Gapdh_2* und *Zar1_2* detektiert werden (Abbildung 10). *Gapdh* diente als Kontrolle, da dieses Haushaltsgen möglicherweise in einer größeren Menge in der Oozyte vorhanden ist als die Maternaleffektgene. Um die Spezifität der Produkte zu überprüfen wurde eine Gelextraktion für *Dnmt1*, *Zar1_2* und *Gapdh_2* durchgeführt und die Basenabfolge per Sanger-Sequenzierung bestimmt. Die ermittelte Sequenz der Sanger-Sequenzierung ergab für alle Gene eine 100 %ige Übereinstimmung in BLAST (von blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Daten nicht gezeigt). Daher wurden im Folgenden für alle ePAT-Versuche die drei etablierten Primer genutzt und nach den entsprechenden Gene benannt.

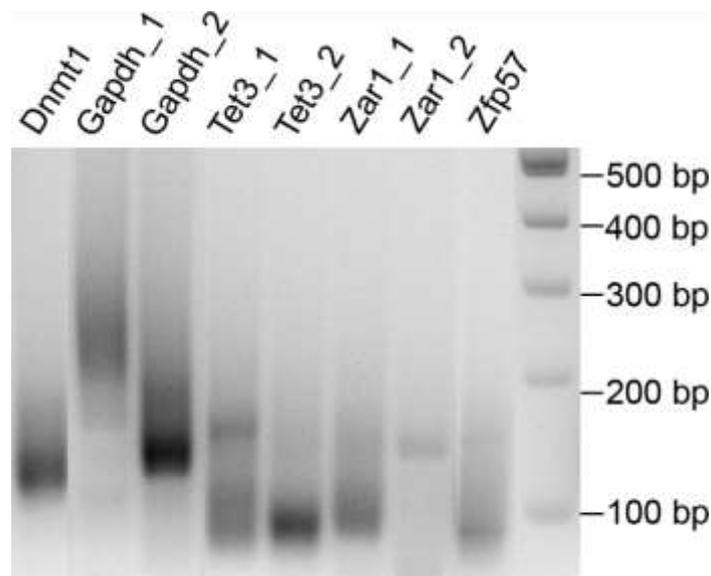


Abbildung 10: Agarose-Gel der Produkte des ePAT mit mRNA aus Ovargewebe der Maus. Der ePAT wurde durchgeführt mit 50 ng RNA aus Maus-Ovar und Primern für folgende Gene: *Dnmt1*, *Gapdh*, *Tet3*, *Zar1*, *Zfp57*. Es sind spezifische Banden für *Dnmt1*, *Gapdh_2* und *Zar1_2* bei jeweils 102 bp, 169 bp und 169 bp erkennbar.

Um die spezifischen DNA-Signale für *Zar1_2* zu verstärken, wurde für dieses Gen eine Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt um die optimale Schmelztemperatur des Primers zu ermitteln. *Dnmt1* diente als Kontrolle für die Temperatur-Gradienten-PCR. Dazu wurden folgende Temperaturen im Thermocycler programmiert: 65 °C, 64,5 °C, 63,3 °C, 61,4 °C, 59 °C, 57 °C, 56,7 °C, 55 °C. Für die PCR wurde die gleiche cDNA verwendet welche bereits im vorherigen ePAT (Abbildung 10) genutzt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass *Zar1* (Abbildung 11A) eine sehr schwache Bande bei 57 °C aufwies, welche das erwartete DNA Fragment darstellte. Bei allen anderen Temperaturen konnten keine spezifischen DNA Banden nachgewiesen werden. *Dnmt1* zeigte bei allen Temperaturen spezifische DNA Banden, wobei das stärkste Signal bei 61,4 °C detektiert werden konnte (Abbildung 11B).

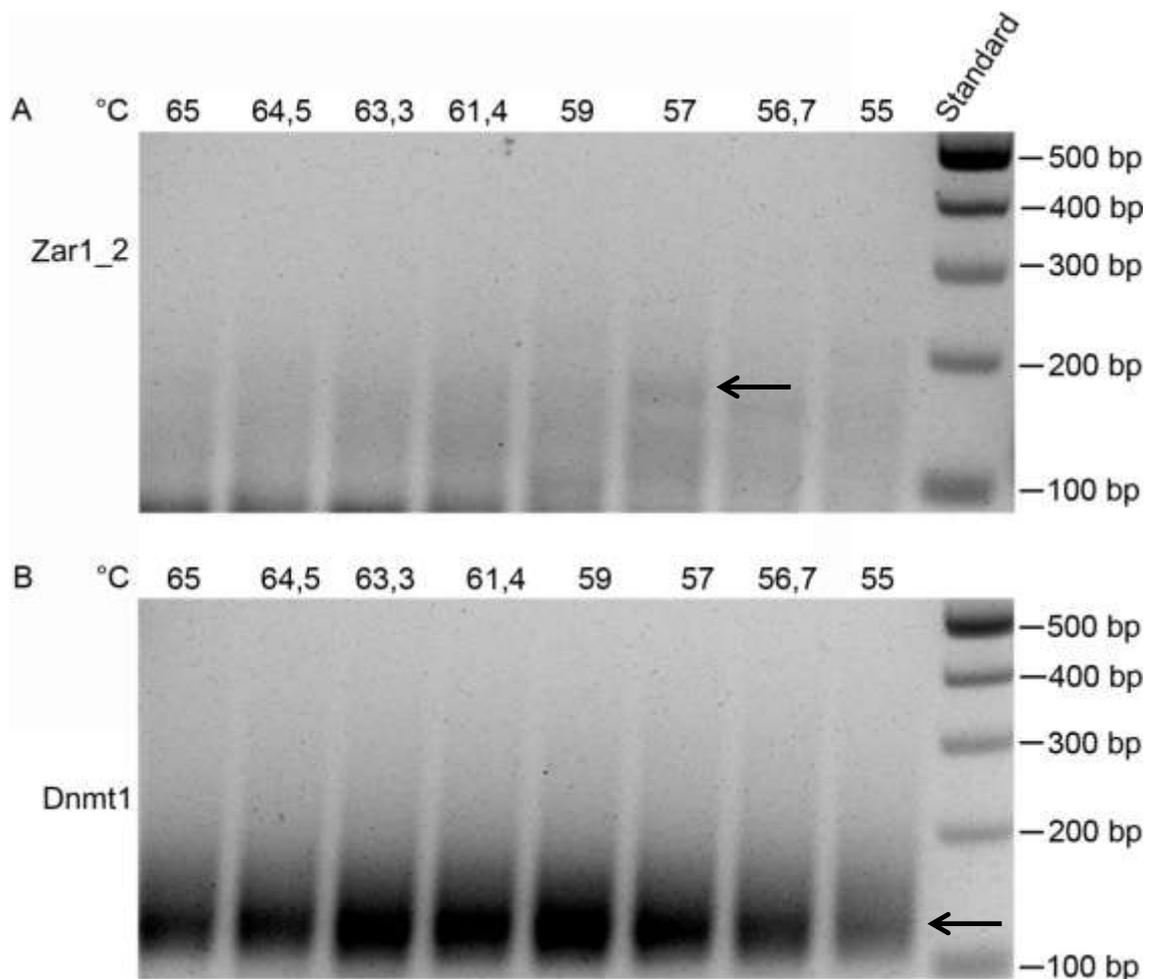


Abbildung 11: Agarose-Gel der DNA Produkte aus der Temperaturgradienten-PCR mit *Zar1* (A) und *Dnmt1* (B). Der ePAT wurde durchgeführt mit einer Temperaturgradienten-PCR zur Bestimmung der Schmelztemperatur der Primer. (A) *Zar1* zeigt eine schwache Bande bei 57 °C bei 170 bp. (B) Für *Dnmt1* erkennt man bei allen Temperaturen spezifische Banden bei etwa 110 bp.

Da der ePAT mit mRNA aus Maus-Ovar erfolgreich war, wurde anschließend ein Ansatz mit 50 ng RNA aus Maus-Oozyten durchgeführt. Es wurden wieder die Maternaleffektgene *Zar1* und *Dnmt1* und als Kontrolle *Gapdh* verwendet. Auf dem Agarose-Gel konnte ein spezifisches Signal ab 102 bp für *Dnmt1*, ab 169 bp für *Zar1* und bei 169 bp für *Gapdh* gezeigt werden (Abbildung 12). Dass diese Banden keine distinkte Größe hatten, lag daran, dass die Länge des Poly(A)-Schwanzes der amplifizierten Genprodukte unterschiedlich lang sein konnte. Somit wurde der ePAT repräsentativ für zwei Maternaleffektgene erfolgreich etabliert.

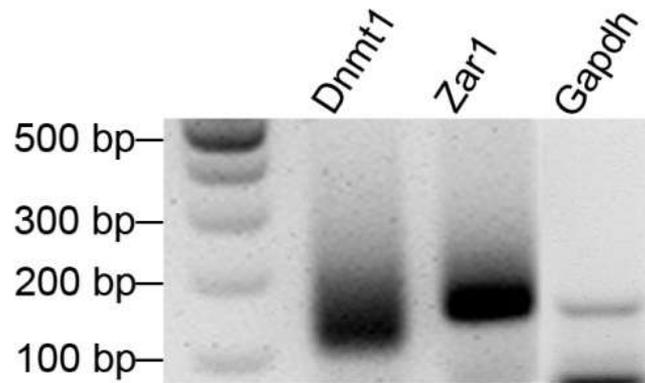


Abbildung 12: Agarose-Gel der ePAT Produkte für *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh*. Der ePAT wurde mit 50 ng RNA aus Maus-Oozyten durchgeführt. Sowohl für *Dnmt1* (102 bp) als auch für *Zar1* (169 bp) und der Kontrolle *Gapdh* (169 bp) sind spezifische Banden erkennbar.

Zusätzlich wurde eine Kontrolle durchgeführt, mit der bestätigt werden konnte, dass Veränderungen der Poly(A)-Schwanzlänge durch zelluläre Mechanismen und nicht durch Artefakte hervorgerufen wurden. Dazu wurde ein Anchor-Primer mit der gleichen Sequenz wie im ePAT verwendet, mit dem Unterschied, dass zwei variable Basen (**V**: G,A, oder C; **N**: jede) zwischen der spezifischen Sequenz und dem T-Stretch (**T**) hinzugefügt wurden. Die Primer für diese Kontrolle wurden demnach mit dem Zusatz „TVN“ betitelt. Durch diese variablen Basen bindet der Adapter an den Übergang vom mRNA Transkript zum Poly(A)-Schwanz, wodurch das Produkt eine definierte Länge von 12 Adenosinen hat, im Gegensatz zum polyadenylierten Transkript ohne exakte Länge. Abbildung 13 zeigt in den ersten drei Spuren die Gene *Dnmt1* (102 bp), *Zar1* (169 bp) und *Gapdh* (169 bp) als polyadenylierte Fragmente. In den rechten drei Spuren waren die jeweiligen TVN Kontrollen dargestellt, die für alle Gene die erwartete Fragmentlänge plus den 12 zusätzlichen Adenosinen zeigten. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das sichtbare DNA-Signal der untersuchten Transkripte in den ersten drei Spuren im Agarose-Gel durch eine zelluläre Polyadenylierung bedingt ist.

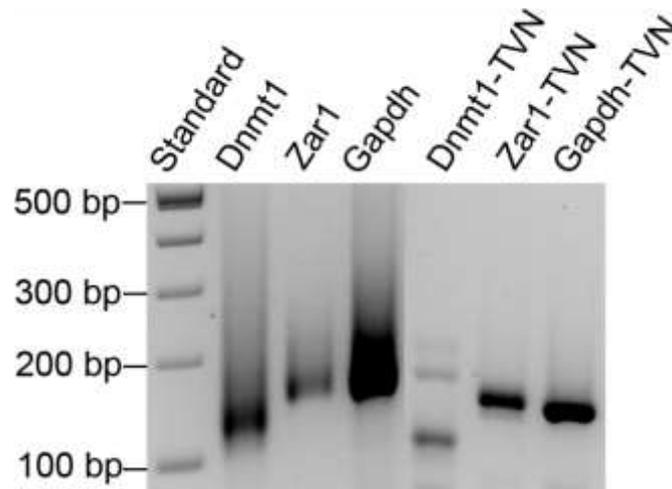


Abbildung 13: Agarose-Gel der ePAT-Produkte mit TVN-Kontrolle. Der ePAT wurde durchgeführt mit den Primern für *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh* (ersten drei Spuren). Zusätzlich wurden Primer generiert die im Übergang zwischen mRNA Transkript und Poly(A)-Schwanz binden und eine definierte Länge von 12 Adenosinen besitzen. Dadurch wurde das spezifische Transkript mit genau 12 Adenosinen amplifiziert (letzten drei Spuren) und bestätigte die zelluläre Polyadenylierung der untersuchten mRNA Transkripte. Es zeigten sich spezifische PCR Produkte für *Dnmt1* (110 bp), *Zar1* (169 bp) und *Gapdh* (169 bp) und für die jeweiligen TVN Kontrollen.

4.1.2.2 Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge von *Dnmt1* und *Zar1* in Oozyten

Um eine Veränderung der Poly(A)-Schwanzlänge nach postovulatorischer Alterung zu quantifizieren, wurden repräsentativ die beiden Maternaleffektgene *Dnmt1* und *Zar1* mit Hilfe des ePAT an Pools aus 200 Kontroll-Oozyten und 200 Oozyten, welche für 24 h postovulatorisch gealterten wurden, untersucht. Aus beiden Gruppen wurde die RNA isoliert und anschließend die Menge und Qualität der mRNA mit dem Agilent RNA Pico 6000 Chip analysiert. In der Kontrolle wurde eine mRNA-Konzentration von 1.559 pg/μl gemessen, dazu ergab die RNA Integrity Number (RIN) einen Wert von 6,9. Je höher der Wert dabei ist (max. 10) desto besser ist die Qualität der isolierten RNA. In der Probe der gealterten Oozyten wurden 762 pg/μl mRNA gemessen und eine RIN von 7,8 (Abbildung 14). Die RIN ist eine Einheit, entwickelt durch ein Software-Tool von der Firma Agilent, um die Integrität der RNA-Proben untereinander zu vergleichen.

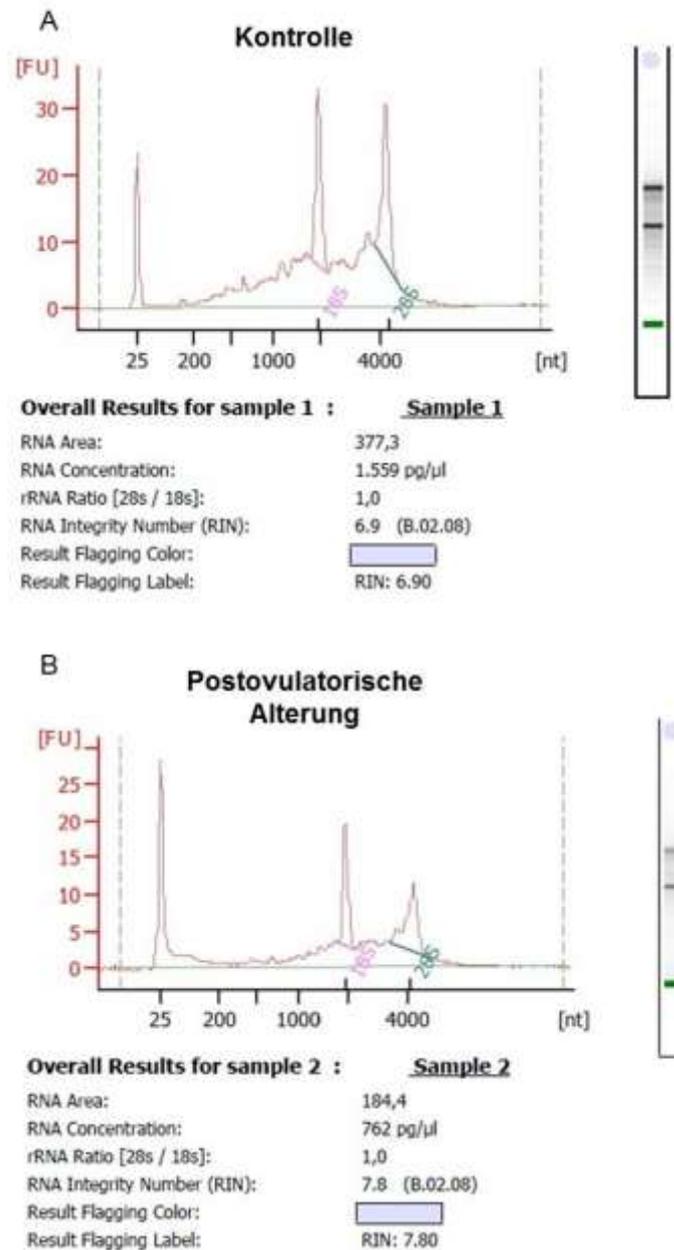


Abbildung 14: Elektropherogramm von mRNA aus (A) Kontroll-Oozyten und aus (B) 24 h postovulatorisch gealterten Oozyten. RNA wurde aus Pools von 200 Kontroll- und postovulatorisch gealterten Oozyten isoliert. Die mRNA Konzentration in den (A) Kontrollen beträgt 1559 pg/ μ l, in den (B) postovulatorisch gealterten Oozyten 762 pg/ μ l. Das Elektropherogramm zeigt die spezifischen Peaks der rRNA bei 4718 bp und 1847 bp. Die X-Achse gibt die Anzahl der Nucleinsäuren und damit die Größe der jeweiligen Produkte an, die Y-Achse die Intensität der Fluoreszenz und damit Menge an RNA Produkt.

Diese Proben wurden nun für einen ePAT in einer Konzentration von 6,8 ng RNA pro Probe verwendet (Abbildung 15). In den Kontroll-Oozyten war für *Dnmt1* ein DNA-Signal von 100 bp bis 300 bp zu erkennen, was auf die erwarteten DNA Produkte hindeutete. Das DNA-Signal erreichte eine Fragmentgröße von bis zu 300 bp, welches das Transkript mit Poly(A)-Schwänzen unterschiedlicher Länge darstellte. Nach postovulatorischer Alterung ist hingegen, ein DNA-Signal von 100 bp bis ca. 150 bp erkennbar. Die verminderte Signalstärke nach Alterung zeigte den Verlust von Gesamt-RNA an. Die Reduktion der Produktgröße deutet auf das Vorhandensein eines kürzeren oder keines Poly(A)-Schwanzes

hin. Für *Zar1* erkennt man sowohl in der Kontrolle als auch nach postovulatorischer Alterung eine Bande bei 169 bp und ein DNA-Signal bis zu einer Größe von ca. 300 bp. Dies weist einerseits auf einen hohen Anteil an PCR Produkt in einer Größe von 169 bp hin, was einem Produkt ohne Poly(A)-Schwanz entspricht und andererseits auf eine gleichmäßig verteilte Menge an Produkten mit längeren Poly(A)-Schwänzen bis zu einer Länge von ca. 130 Adenosinen.

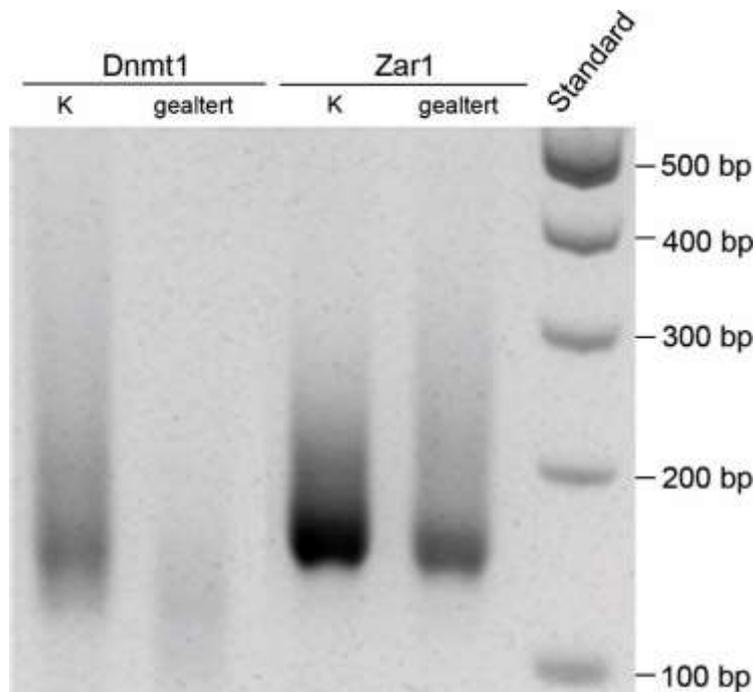


Abbildung 15: Agarose-Gel der PCR Produkte des ePAT der Maternaleffektgene *Dnmt1* und *Zar1*. Der ePAT wurde durchgeführt mit RNA aus Kontroll-Oozyten und aus postovulatorisch gealterten Oozyten. Bei *Dnmt1* ist eine Deadenylierung erkennbar, welche sich dadurch zeigt, dass die PCR Produkte nach Alterung einen Trend in Richtung kürzerer Fragmente im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Bei *Zar1* ist hingegen keine Änderung der Länge des Poly(A)-Schwanzes nach postovulatorischer Alterung erkennbar, da in den Kontrollen und nach Alterung der gleiche Trend in Richtung längere PCR Produkte aufzuweisen ist.

Um diese Veränderungen in der Poly(A)-Schwanzlänge exakt zu quantifizieren, wurden die PCR Produkte mit dem Agilent DNA 1000 Chip analysiert. Sowohl bei den Kontroll-Oozyten als auch nach postovulatorischer Alterung war bei *Dnmt1* ein Peak bei ca. 140 bp erkennbar, der das Transkript mit einem Poly(A)-Schwanz von 40 Adenosinen darstellte (Abbildung 16 A). In der Kontrolle fiel der Peak kontinuierlich in Richtung der längeren Fragmente bis auf ca. 300 bp ab. Dies deutete auf Transkripte mit einem Poly(A)-Schwanz von bis zu 200 Adenosinen hin. Nach postovulatorischer Alterung waren PCR-Produkte mit einem Poly(A)-Schwanz von etwa 80 Adenosinen erkennbar, im Gegensatz zur Kontrolle jedoch eine Verschiebung in Richtung kürzerer Fragmente unter 100 bp. Die Konzentration der *Dnmt1*-mRNA nach Alterung war unter 100 bp deutlich höher als in den Kontrollen. Dies ließ auf eine Deadenylierung der *Dnmt1* Transkripte nach postovulatorischer Alterung auf 5 bis 0 Adenosinen hin schließen. Zudem konnte eine Abnahme der *Dnmt1* mRNA Konzentration nach postovulatorischer Alterung im Vergleich zur Kontrolle von 5,17 ng/μl auf nicht

messbare Werte festgestellt werden. Dies zeigte auch die Reduktion der Fluoreszenz von 30 FU auf 10 FU nach postovulatorischer Alterung.

Bei *Zar1* erkannte man in der Kontrolle und nach Alterung einen Peak der Produktmenge bei 169 bp (Abbildung 16 B). In beiden Gruppen fiel dieser bis auf 300 bp ab. Dies deutete auf einen Poly(A)-Schwanz von bis zu 130 Adenosinen hin. Diesen Trend erkannte man in beiden Gruppen gleichmäßig, daher kann nicht von einer Deadenylierung nach postovulatorischer Alterung ausgegangen werden. Auch für *Zar1* zeigte sich eine Abnahme der mRNA Konzentration von 5,33 ng/μl auf 2 ng/μl nach postovulatorischer Alterung, erkennbar an der Reduktion der Fluoreszenz von 60 FU auf 30 FU.

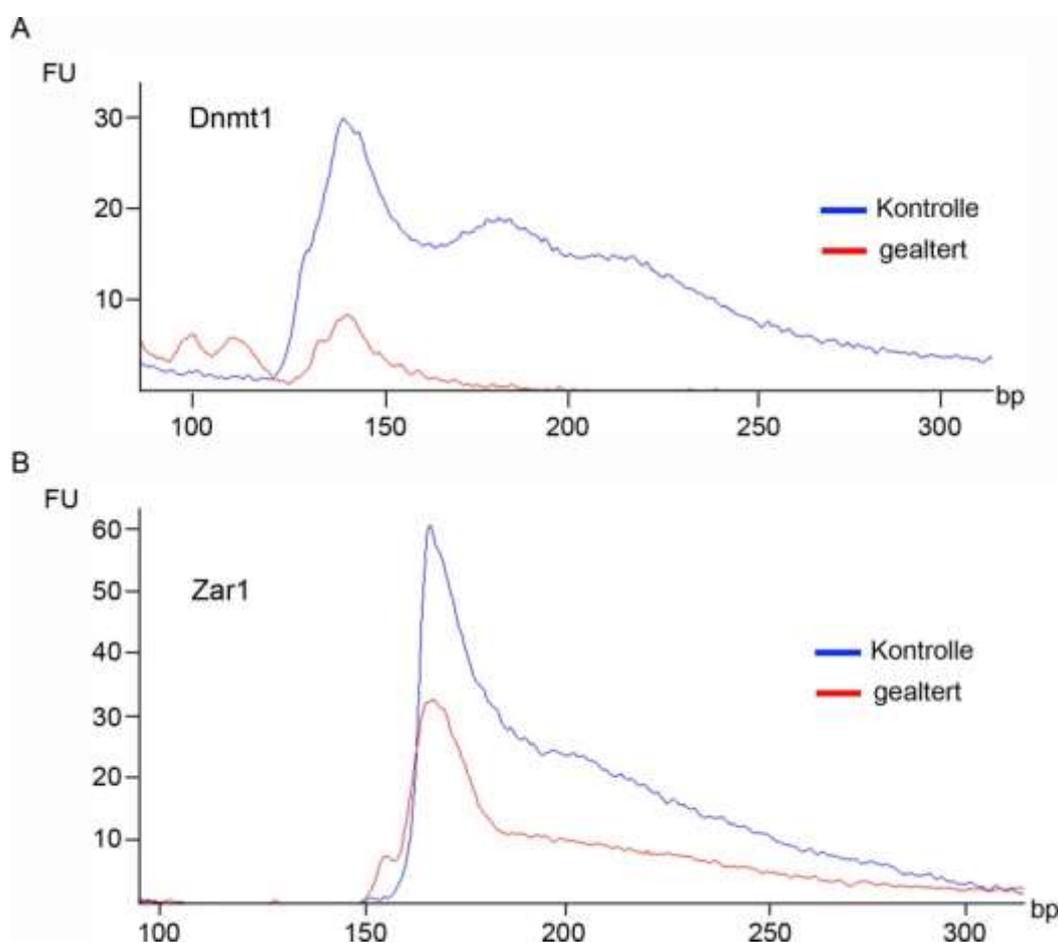


Abbildung 16: Elektropherogramm des Agilent DNA Chips für die ePAT Produkte von *Dnmt1* und *Zar1*. Der ePAT wurde durchgeführt mit RNA aus Kontroll- und postovulatorisch gealterten Oozyten. Anschließend wurden die PCR-Fragmente auf dem Agilent Chip aufgetragen. (A) Für *Dnmt1* kann eine Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes nachgewiesen werden, da in gealterten Oozyten eine Verschiebung der mRNA Transkripte in Richtung kürzerer Fragmente festzustellen ist (rote Linie) und bei den Kontroll-Oozyten in Richtung längerer Fragmente (blaue Linie). Für *Zar1* kann keine Veränderung des Poly(A)-Schwanzes nachgewiesen werden, da die Kontrollen und gealterten Oozyten eine gleichmäßige Verschiebung in Richtung längerer PCR Produkte zeigen. (FU: Fluorescence Unit)

Die Ergebnisse des ePAT bestätigen somit die ermittelten qRT-PCR Resultate aus 4.1.1, die zeigten, dass nach einer Alterung der Oozyten von 24 h nach der Oozytenisolierung bei *Dnmt1*-mRNA von einer Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes ausgegangen werden

kann, während bei *Zar1*-mRNA keine Änderung des Poly(A)-Schwanzes nach Alterung erkennbar war.

4.2 Fraktionierung der mRNA Transkripte nach der Länge des Poly(A)-Schwanzes

Um nachzuweisen mit welcher Poly(A)-Schwanzlänge ein Transkript in der Oozyte am häufigsten vorkommt, wurde die aus den Oozyten isolierte mRNA nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes fraktioniert. Hierzu wurden magnetische Beads verwendet, welche mit oligo(dT)₂₅-Nukleotiden gekoppelt waren und somit an den Poly(A)-Schwanz eines Transkripts binden konnten. Durch schrittweise Reduktion der Salzkonzentration bei den anschließenden Waschungen wurden unterschiedliche Fraktionen gebundener mRNA von den Beads eluiert. Es entstanden folgende Fraktionen:

1: ungebundene Transkripte	kein Poly(A)-Schwanz
2: Elution bei 0,075-fachem SSC	kurzer Poly(A)-Schwanz
3: Elution bei 0,05-fachem SSC	langer Poly(A)-Schwanz
4: Elution in Wasser	sehr langer Poly(A)-Schwanz

Zunächst wurde die RNA aus einem Pool von 200 Kontroll-Oozyten isoliert und 10 µl dieser mRNA für die Fraktionierung verwendet. Die Qualität und Quantität der RNA nach der Isolierung sowie nach der Fraktionierung wurden gemeinsam auf einem Agilent RNA Pico 6000 Chip analysiert. Das Elektropherogramm zeigte sowohl nach der RNA Isolierung als auch in der ungebundenen Fraktion (Fraktion 1) charakteristische Peaks der rRNA bei 1900 und 4000 bp (Abbildung 17). In der Fraktion 5 ist ein diskreter Anstieg von 4000 bp bis auf etwa 4500 bp zu erkennen, was auf eluierte mRNA mit sehr langen Poly(A)-Schwänzen hinweisen könnte. Das Elektropherogramm zu den Fraktionen 2 und 3 zeigte eine zu geringe RNA Konzentration, sodass hier keine Aussage zu der Länge des Poly(A)-Schwanzes von mRNA Transkripten gemacht werden konnte.

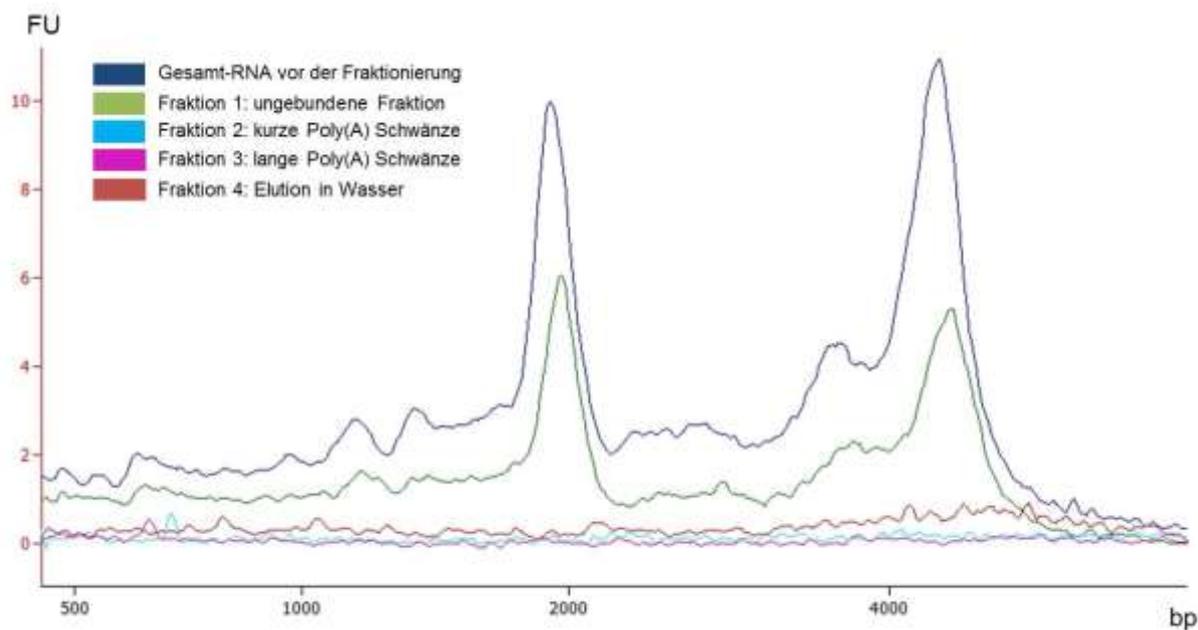


Abbildung 17: Elektropherogramm des Agilent RNA Chips der RNA Fraktionen. Es wurde RNA aus Maus-Oozyten isoliert und anschließend nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes fraktioniert. Die Abbildung zeigt die Peaks der rRNA bei 1900 bp und bei 4800 bp nach der Isolierung (blau) und von der ersten Fraktion (grün). Eine leichte Kurve ist erkennbar für Fraktion 4 (rot). In den Fraktionen 2 (türkis) und 3 (violett) konnte keine RNA gemessen werden.

Die ermittelten RNA Konzentrationen durch den Agilent Chip ergaben für die Gesamt-RNA vor der Fraktionierung 2.923 pg/ μ l, für Fraktion 1 wurde 800 pg/ μ l gemessen und in Fraktion 4 ein Wert von 143 pg/ μ l ermittelt. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass nur mRNA an die Beads gebunden hatte, da in den Fraktionen 2-4 keine rRNA Peaks erkennbar waren. Jedoch zeigte sich, dass die RNA Konzentration durch die Fraktionierung stark abnahm.

Um die Fraktionierung zu validieren und die Poly(A)-Schwanzlängen der einzelnen Fraktionen zu quantifizieren, wurde ein ePAT für *Dnmt1* und *Zar1* durchgeführt. Dazu wurden je 10 μ l RNA-Isolat aus den fünf Fraktionen für den ePAT eingesetzt und anschließend eine PCR mit den Primern für *Dnmt1* und *Zar1* durchgeführt (Primersequenzen s. 4.1.2.2). Für diese Fraktionierung wurde eine weitere Fraktion (Fraktion 3) generiert, mit der mittlere Poly(A)-Schwanzlängen von den Beads eluiert werden konnten. *Dnmt1* wies in allen Fraktionen ein DNA-Signal ab 102 bp auf, welches dem erwarteten Fragment mit unterschiedlich langen Poly(A)-Schwänzen entspricht (Abbildung 18). In den Fraktionen 1 und 3 lag die Größe der Fragmente etwa zwischen 102 und 150 bp, was auf einen Poly(A)-Schwanz von bis zu 50 Adenosinen hindeutet. Auch in Fraktion 2 und 5 wurde *Dnmt1* mit einem Poly(A)-Schwanz von etwa 50 Adenosinen detektiert, allerdings mit einem sehr viel schwächeren DNA-Signal. In Fraktion 4 erkennt man eindeutig DNA-Banden von 102 bis über 200 bp, dies weist auf Poly(A)-Schwanzlängen von über 100 Adenosinen hin. Die *Dnmt1*-mRNA liegt somit in der Oozyte hauptsächlich mit sehr kurzem oder sehr langem Poly(A)-Schwanz von etwa 100 bp vor. Für *Zar1*-mRNA konnte in allen Fraktionen eine Bande um 169 bp detektiert werden (Abbildung 18). In Fraktion 1 erkennt man keinen

Schmier, sondern eine diskrete Bande die auf das Transkript ohne Poly(A)-Schwanz hindeutet. Diese Bande ist auch in Fraktion 2 erkennbar, allerdings deutlich schwächer. Ein schwaches DNA-Signal ist in Fraktion 3 sichtbar, welches somit auf einen kurzen Poly(A)-Schwanz der *Zar1*-mRNA hinweist. In Fraktion 4 und 5 ist ein DNA-Signal von 169 bp bis ca. 200 bp erkennbar, was auf einen Poly(A)-Schwanz von ca. 30 Adenosinen hindeutet. Somit liegt die *Zar1*-mRNA in der Oozyte vor allem ohne Poly(A)-Schwanz oder mit einem Poly(A)-Schwanz von ca. 30 Adenosinen vor.

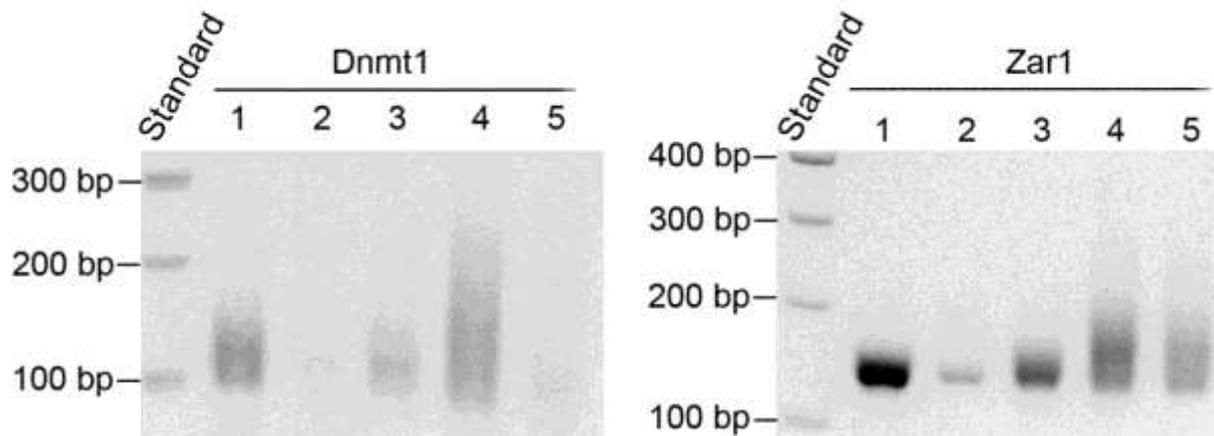


Abbildung 18: Agarose-Gel der ePAT Produkte aus den mRNA Fraktionierungen 1-5 von *Dnmt1* und *Zar1*. Es wurde RNA aus Maus-Oozyten nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes fraktioniert und anschließend mittels ePAT analysiert. Bei *Dnmt1* (links) sind DNA-Signale in allen Fraktionen ab 102 bp erkennbar. Starke DNA Banden zeigen sich in den Fraktionen 1 und 4, womit *Dnmt1*-mRNA mit sehr kurzen oder sehr langen Poly(A)-Schwänzen in der Oozyte vorliegt. *Zar1* zeigt deutliche DNA-Signale in allen 5 Fraktionen ab 169 bp, wobei in Fraktion 2 das Signal etwas schwächer ist. Somit liegt *Zar1* in der Oozyte mit unterschiedlich langen Poly(A)-Schwänzen vor.

Da die Fraktionierung in Kontroll-Oozyten erfolgreich etabliert und validiert werden konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob sich nach postovulatorischer Alterung die Transkripte in andere Fraktionen verschieben. Dazu wurden aus Pools aus 200 Kontroll- und 200 postovulatorisch gealterten Oozyten die RNA isoliert und fraktioniert. Der Agilent RNA Pico 6000 Chip ermittelte anschließend folgende Konzentrationen (Tabelle 12):

Tabelle 12: RNA Konzentrationen der mRNA Fraktionen von Kontrollen und postovulatorisch gealterten Oozyten

Probe	Fraktion	Konzentration [pg/ μ l]
Kontrolle	1	4.200
	2	48
	3	31
	4	35
	5	105
Postovulatorische Alterung	1	3.029
	2	12
	3	69
	4	76
	5	73

Anschließend wurde von diesen Fraktionen ebenfalls ein ePAT für *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh*, als Kontrolle für die Alterung, durchgeführt. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse für die drei getesteten Gene in den einzelnen mRNA Fraktionen der Kontroll-Oozyten und der postovulatorisch gealterten Oozyten dargestellt.

Bei den Kontroll-Oozyten konnte für alle untersuchten Gene in jeder mRNA Fraktion ein DNA Signal ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass *Dnmt1* ein schwaches Signal in den ersten 4 Fraktionen aufwies und in der 5. Fraktion starke DNA Signale von 110 bp bis etwa 300 bp zu erkennen waren. Dies deutet darauf hin, dass die *Dnmt1*-mRNA in Kontroll-Oozyten mit einem sehr langen Poly(A)-Schwanz vorlag. *Zar1* zeigte deutliche DNA Banden in den Fraktionen 1, 2 und 5 und schwächere Banden in den Fraktionen 3 und 4. Das DNA-Signal erstreckte sich dabei von 170 bp bis etwa 220 bp, außer in Fraktion 1 war eine diskrete Bande bei 170 bp nachzuweisen. Das bedeutet, dass die *Zar1*-mRNA in Kontroll-Oozyten mit sehr kurzen oder sehr langen Poly(A)-Schwänzen vorlag. Ebenso zeigten sich starke DNA-Signale für *Gapdh* in den Fraktionen 1, 2 und 5 und schwächere in den Fraktionen 3 und 4. Die DNA Banden erstreckten sich dabei in Fraktion 1 von 170 bp bis 180 bp, in Fraktion 2 von 180 bp bis 200 bp und in Fraktion 5 von 180 bp bis etwa 250 bp. Dies weist darauf hin, dass die *Gapdh*-mRNA in Kontroll-Oozyten einen sehr kurzen oder sehr langen Poly(A)-Schwanz aufweist.

In Oozyten nach postovulatorischer Alterung zeigte sich hingegen bei mRNA für *Dnmt1* und *Zar1* kein DNA Signal in den 5 Fraktionen. Dies könnte daran liegen, dass die beiden Transkripte nach Alterung so stark degradiert wurden, dass keine messbaren Signale mehr detektiert werden können. Für *Gapdh* konnte allerdings nach postovulatorischer Alterung eine DNA Bande in Fraktion 1 um 180 bp detektiert werden. In allen anderen Fraktionen

konnte ebenfalls kein DNA Signal ermittelt werden. Dies lässt darauf schließen, dass *Gapdh* nach Alterung deadenyliert wird und die mRNA nur noch einen sehr kurzen oder keinen Poly(A)-Schwanz aufweist.

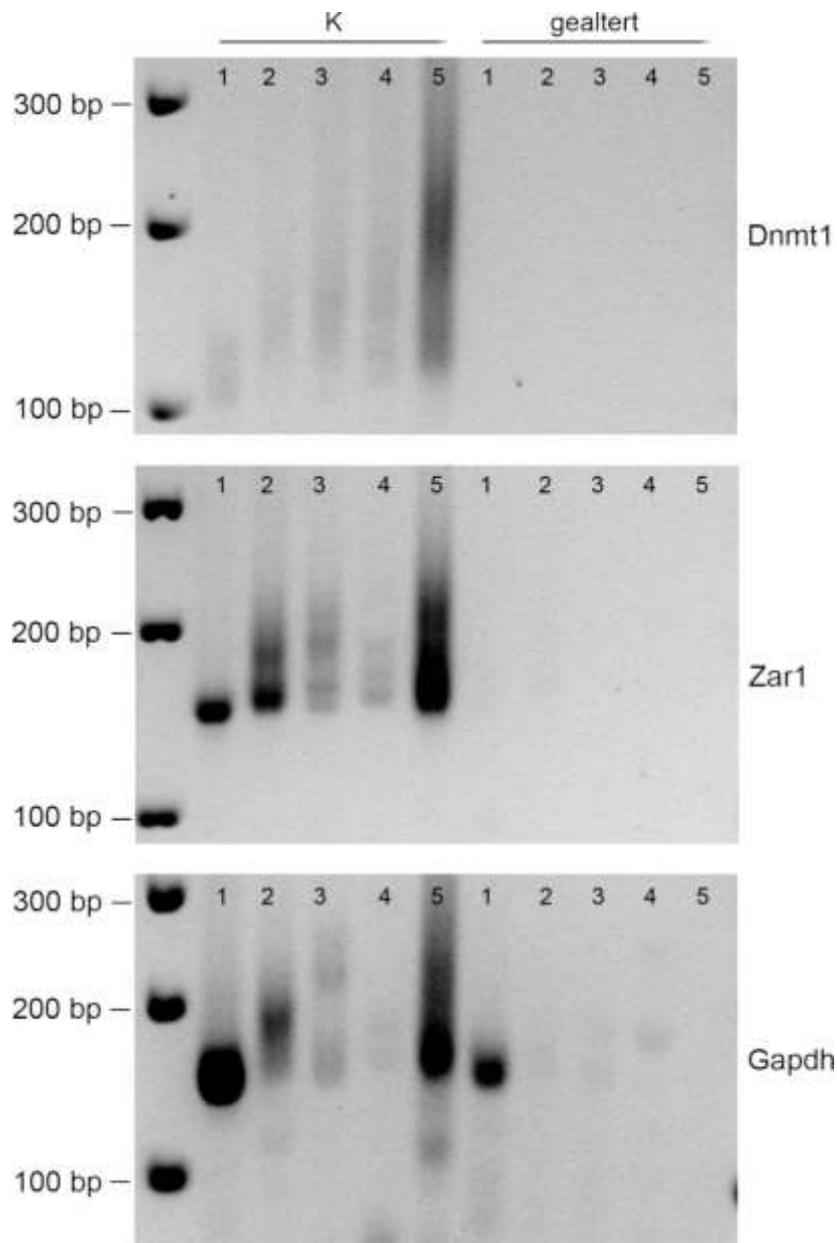


Abbildung 19: Agarose-Gel der ePAT Produkte nach mRNA Fraktionierung von Kontroll- und postovulatorisch gealterten Oozyten. RNA aus Kontroll-Oozyten und postovulatorisch gealterten Oozyten wurde nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes fraktioniert und anschließend ein ePAT mit den Primern für *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh* durchgeführt. Für *Dnmt1*-mRNA sind in den Kontroll-Oozyten schwache DNA Signale in den Fraktionen 1-4 und starke DNA Signale in Fraktion 5 von 110 bp bis etwa 300 bp nachzuweisen. *Zar1* zeigt in den Kontroll-Oozyten starke DNA Banden in den Fraktionen 1, 2 und 5 und schwächere Banden in den Fraktionen 3 und 4. Das DNA Signal erstreckt sich dabei von 170 bp bis etwa 220 bp, außer in Fraktion 1 ist ein DNA Signal bei 170 bp erkennbar. Die *Gapdh*-mRNA zeigt deutliche Signale in den Fraktionen 1, 2 und 5 und ebenfalls schwächere Signale in den Fraktionen 3 und 4. Nach postovulatorischer Alterung ist für *Dnmt1* und *Zar1* keine mRNA in den Fraktionen nachweisbar, wohingegen für *Gapdh* ein spezifisches Signal in der 1. Fraktion ausgemacht werden kann.

Die Untersuchungsergebnisse zur Fraktionierung von mRNA nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes zeigten einerseits, dass diese Methode für sehr kleine Mengen RNA nicht

geeignet war und andererseits, dass das Transkript eines Gens mit unterschiedlich langen Poly(A)-Schwänzen in der Oozyte vorliegen kann.

4.3 Einfluss einer postovulatorischen Alterung auf die H3K9 Trimethylierung

Die Trimethylierung am Histon H3 an Lysin 9 hat für die Oozyte eine besondere Bedeutung. Diese Methylierung beeinflusst sehr stark die transkriptionelle Aktivität während der Oozytenreifung durch Modifikation der Chromatinstruktur, sodass Veränderungen die embryonale Entwicklung beeinflussen können. Um diese Trimethylierung während der postovulatorischen Alterung an Oozyten analysieren zu können, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. In zwei Experimenten wurden insgesamt 37 Kontroll-Oozyten und 63 Oozyten nach 24 h postovulatorischer Alterung untersucht.

In Abbildung 20 ist in der linken Spalte die Färbung der DNA mit DAPI (A,C) zuerkennen. Die Chromosomen und somit die DNA liegen in der Metaphasenplatte vor und sind kondensiert. Dabei sind keine Unterschiede nach postovulatorischer Alterung im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar. Die rechte Spalte zeigt die Färbung für H3K9me3 (B,D). Hierbei ist nach postovulatorischer Alterung von 24 h eine starke Abnahme des Fluoreszenzsignals für die trimethylierte Form von H3K9 im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar.

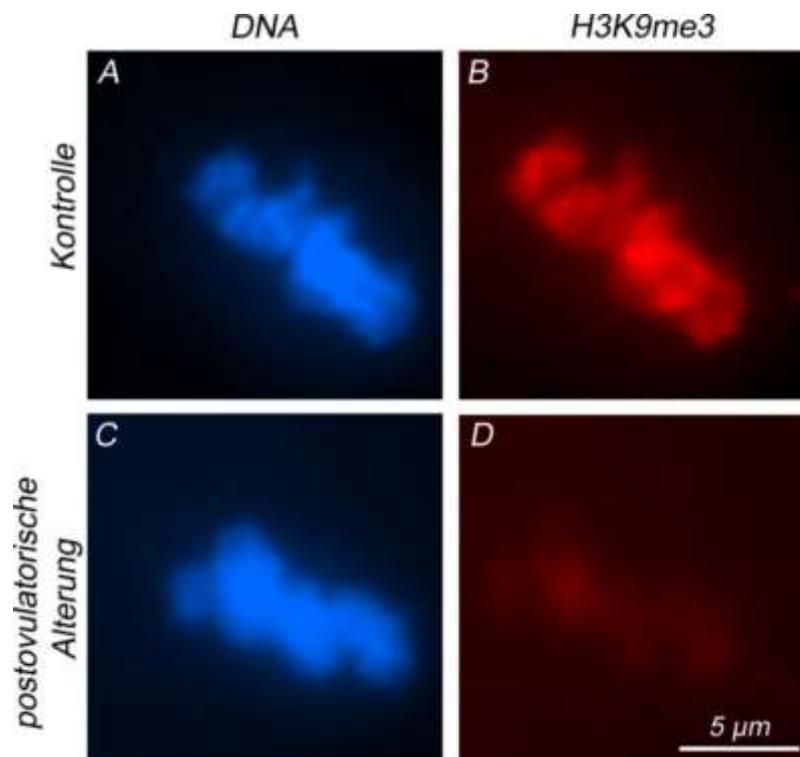


Abbildung 20: H3K9me3 Immunfluoreszenz an Oozyten. Kontroll-Oozyten (A,B) und postovulatorisch gealterte Oozyten (C,D) wurden mit DAPI (A,C) und Kaninchen anti-H3K9me3 Antikörper (B,D) gefärbt. Nach postovulatorischer Alterung ist eine Abnahme der H3K9me3 Fluoreszenz erkennbar, während die Intensität der DNA Färbung konstant bleibt.

Um diese Aufnahmen quantitativ auswerten zu können, wurde die Fluoreszenzintensität mit der Software Image J ermittelt. Im Vergleich zu den Kontrollen wurde nach postovulatorischer Alterung eine signifikante Abnahme der H3K9me3 von 100 % auf 26 % gemessen (Abbildung 21).

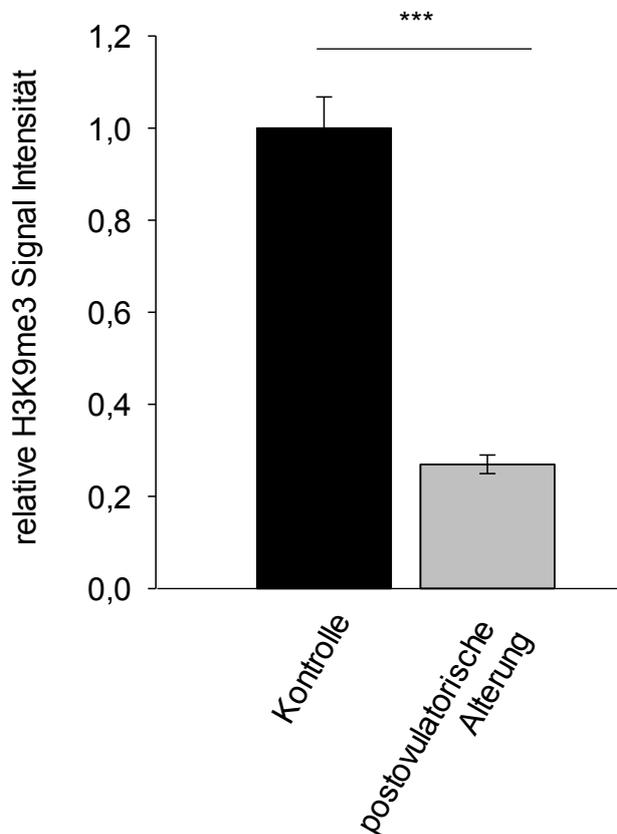


Abbildung 21: Relative Fluoreszenz-Signalintensität von H3K9me3 in Kontroll-Oozyten und nach 24 h postovulatorischer Alterung. Es ist eine signifikante Abnahme der Signalintensität für H3K9me3 von 74 % nach postovulatorischer Alterung im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardfehler (** $p < 0,001$).

4.4 Auswirkung einer postovulatorischen Alterung auf die Fertilisationsrate

Um den Einfluss einer postovulatorischen Alterung auf die Fertilisationsrate der Oozyten zu analysieren, wurde für dieses Projekt die In-vitro-Fertilisation (IVF) in unserem Labor etabliert. Dabei wurden Oozyten und Spermien aus der Maus zur Fertilisation in einer Petrischale zusammengebracht. In den zuvor durchgeführten Versuchen wurden die Oozyten aus dem Inzuchtstamm C57Bl/6J verwendet. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die Fertilisationsrate des Inzuchtstammes C57Bl/6J sehr gering ist (Byers *et al.* 2006). Daher wurde in diesem Projekt zusätzlich zu dem Inzuchtstamm C57Bl/6J (Bl6) der

Hybridstamm C57Bl/6JxCBA/Ca (Bl6/CBA) verwendet. Zunächst wurden Kombinationen von Oozyten und Spermien aus den verschiedenen Stämmen für die IVF getestet. Die prozentuale Anzahl an 2-Zell-Embryonen im Vergleich zu der Gesamtzahl an Oozyten in den verschiedenen Kombinationen aus Inzuchtstamm und Hybridstamm ist in Abbildung 22 dargestellt. Bei der Verwendung von Oozyten aus Bl6 Weibchen und Spermien aus Bl6/CBA Männchen konnte eine Fertilisationsrate von 80 % der Oozyten erreicht werden. Bei Oozyten aus Bl6/CBA und Spermien aus Bl6 gab es eine Reduktion der Fertilisationsrate auf 27 % und bei der Verwendung von Oozyten und Spermien aus Bl6 auf 13 %. Somit zeigte sich die höchste Fertilisationsrate bei der Verwendung von Oozyten aus dem Inzuchtstamm C57Bl/6J und Spermien aus dem Hybridstamm C57Bl/6JxCBA/Ca. Diese Kombination wurde daher in den folgenden Versuchen zur Analyse des Effektes einer postovulatorischen Oozytenalterung auf die Fertilisationsrate eingesetzt.

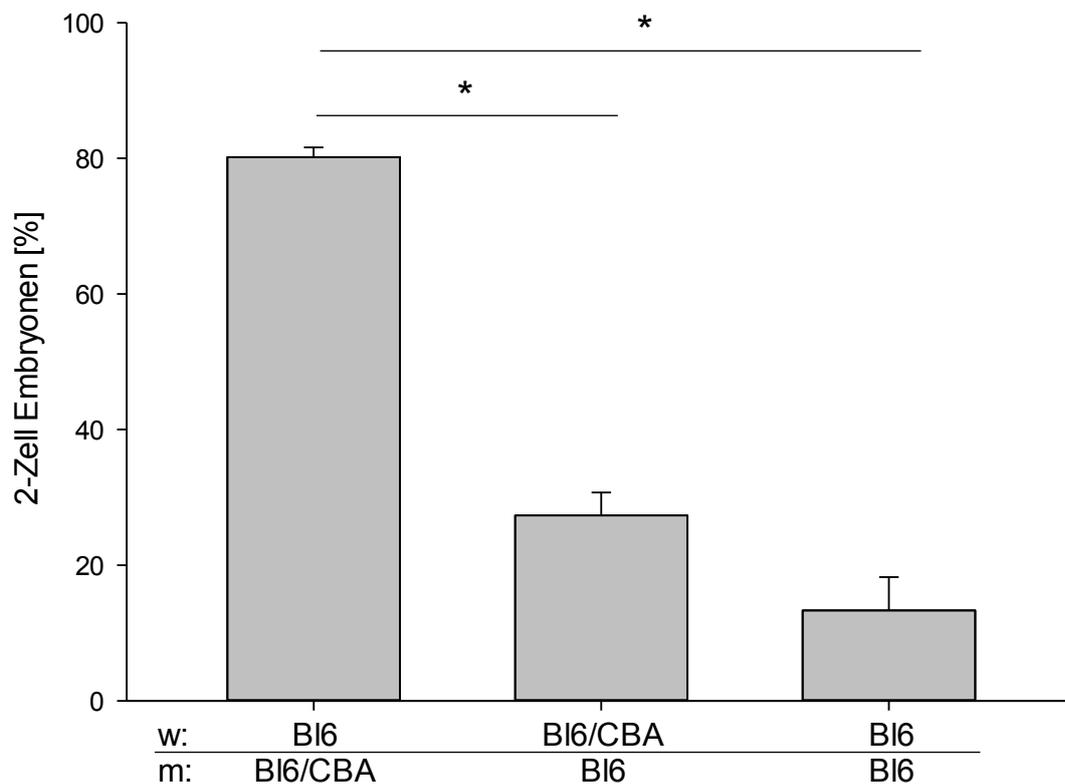


Abbildung 22: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen nach IVF mit Gameten aus verschiedenen Mausstämmen. Es wurden verschiedene Kombinationen von Oozyten (w) und Spermien (m) aus den Mausstämmen C57Bl/6J (Bl6) und C57Bl/6JxCBA/Ca (Bl6/CBA) verwendet. Dabei zeigt sich die höchste Fertilisationsrate bei Bl6 Oozyten und Bl6/CBA Spermien von 80 %, die im Vergleich zu beiden anderen Gruppen signifikant höher ist. Eine Fertilisationsrate von 27 % ist bei der Verwendung von Bl6/CBA Oozyten und Bl6 Spermien und die niedrigste Fertilisationsrate von 13 % bei der Verwendung von Bl6 Oozyten und Spermien erkennbar. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardfehler (* $p < 0,05$).

Zur Bestimmung der Fertilisationsrate nach postovulatorischer Alterung wurden die Oozyten vor der IVF 4, 6 und 8 h nach Oozytenentnahme *in vitro* gealtert. Die Kontrollen wurden unmittelbar nach der Entnahme für eine IVF verwendet. Die Oozytenisolierung erfolgte dabei

14 h nach hCG-Gabe. Marston und Chang untersuchten als eine der ersten Gruppen die verzögerte Befruchtung und stellten dabei zunächst fest, dass die Ovulation nach hCG-Gabe nach 10-14 h in der Maus abgeschlossen ist. Daher kann man sagen, dass die effektive postovulatorische Alterung in der vorliegenden Arbeit bei ungefähr 8, 10 und 12 h lag. Dieser Versuch wurde insgesamt 4-mal mit einer Gesamt-Anzahl an Oozyten von n=279 (Kontrolle), n=224 (4 h Alterung), n=197 (6 h Alterung) und n=174 (8 h Alterung) durchgeführt. Die Fertilisationsrate in den Kontrollen betrug 73 %. Nach 4 h postovulatorischer Alterung konnte eine Fertilisationsrate von 77 % ermittelt werden, nach 6 h Alterung von 65 % und nach 8 h Alterung von 78 % (Abbildung 23). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fertilisationsrate nach postovulatorischer Alterung im untersuchten Zeitraum weitestgehend konstant blieb.

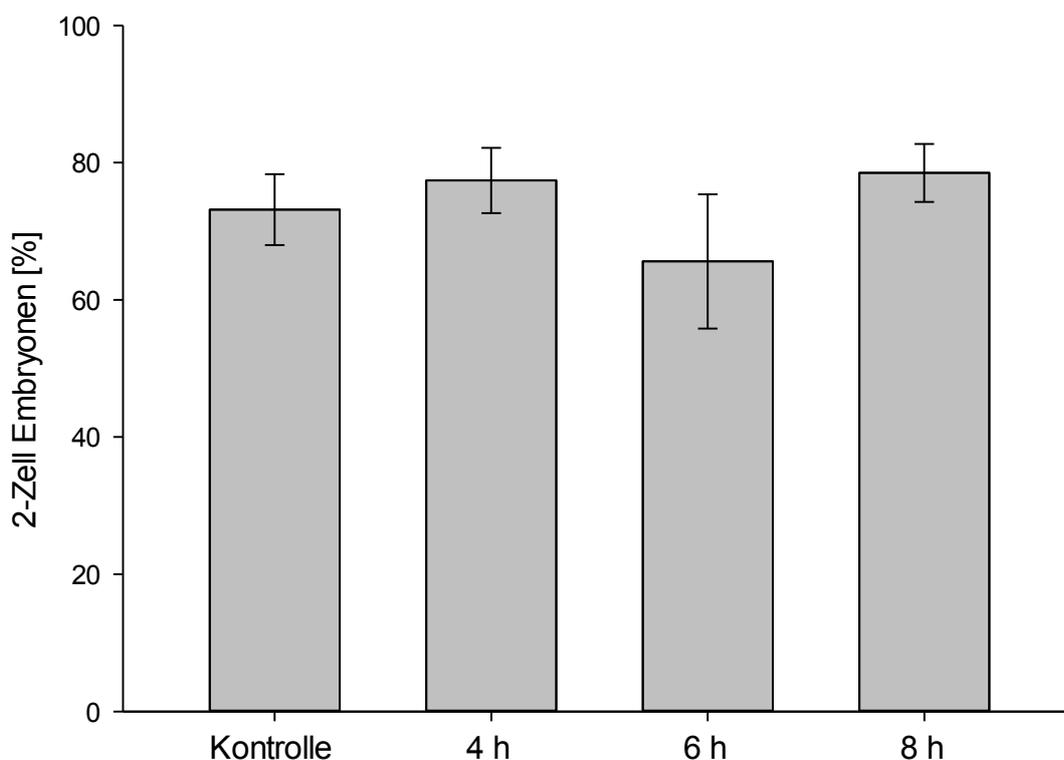


Abbildung 23: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Alterung. Die IVF wurde an Kontroll-Oozyten und nach 4, 6 und 8 h postovulatorischer Alterung durchgeführt. Für Kontroll-Oozyten konnte eine Fertilisationsrate von 73 % erreicht werden. Nach einer postovulatorischen Alterung von 4, 6 und 8 h wurde eine Fertilisationsrate von jeweils 77 %, 65 % und 78 % erreicht. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardfehler.

4.5 Einfluss einer postovulatorischen Alterung auf die Zona pellucida

Durch die postovulatorische Alterung kommt es in der Oozyte zu Veränderungen vieler zellulärer Prozesse die unter anderem auch Einfluss auf die Beschaffenheit der Zona pellucida und/oder der Oozytenmembran haben können. In dieser Arbeit konnte durch

mikroskopische Analysen festgestellt werden, dass die untersuchten 2-Zell-Embryonen in Kontrollen und nach postovulatorischer Alterung Spermien im perivitellinen Raum aufwiesen und somit also die Zona pellucida nach Alterung permeabel zu werden scheint.

Zur Analyse der Durchlässigkeit der Zona pellucida wurde zunächst gezählt ob ein, zwei oder mehrere sichtbare Spermien im perivitellinen Raum der 2-Zell-Embryonen in den einzelnen Gruppen vorhanden waren (Abbildung 24). In der Kontrolle war die Rate an Embryonen ohne sichtbares Spermium am höchsten mit 59 % und sank dann mit einem, zwei und mehr als zwei Spermien auf jeweils 19 %, 12 % und 8 %. Nach 4 h postovulatorischer Alterung war die relative Anzahl an Embryonen ohne Spermium ebenfalls bei 59 %. Die Anzahl an Embryonen mit einem, zwei oder mehr als zwei Spermien lag nach 4 h bei jeweils 30 %, 7 % und 2 %. Die Rate an 2-Zell-Embryonen ohne Spermium lag nach 6 h postovulatorischer Alterung bei 48 % und sank mit einem, zwei und mehr als zwei Spermien auf jeweils 24 %, 19 % und 8 %. Nach 8 h postovulatorischer Alterung lag die relative Anzahl an Embryonen ohne sichtbares Spermium bei jeweils 41 % und die Anzahl an Embryonen mit einem, zwei oder mehr als zwei Spermien bei jeweils 24 %, 13 % und 21 %.

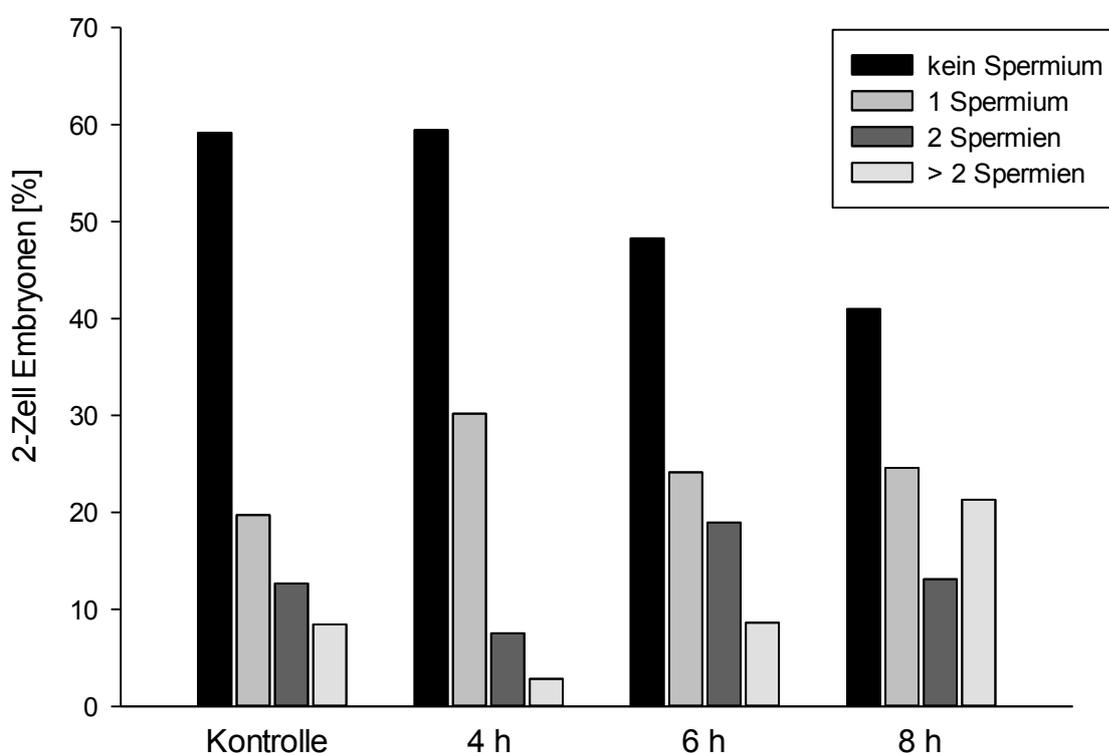


Abbildung 24: Relative Anzahl an 2-Zell-Embryonen mit der genauen Anzahl an Spermien im perivitellinen Raum in den Kontrollen und nach 4 h, 6 h und 8 h postovulatorischer Alterung. Die Kontrollen zeigen eine 2-Zell Rate von 59 % ohne Spermium. Nach postovulatorischer Alterung von 4, 6 und 8 h kann eine 2-Zell Rate ohne Spermium von jeweils 59 %, 48 % und 41 % festgestellt werden. Die 2-Zell Rate mit mehreren sichtbaren Spermien im perivitellinen Raum reduziert sich tendenziell in allen Gruppen.

Um dies genau zu quantifizieren und statistisch auszuwerten wurden in allen Gruppen die 2-Zell-Embryonen mit mindestens einem sichtbaren Spermium im perivitellinen Raum gezählt. In den Kontrollen wurden in 36 % der 2-Zell-Embryonen Spermien im perivitellinen Raum detektiert. Nach 4 h postovulatorischer Alterung stieg diese Rate auf 43 %, nach 6 h auf 55 % und nach 8 h postovulatorischer Alterung auf einen signifikanten Wert von 62 % (Abbildung 25).

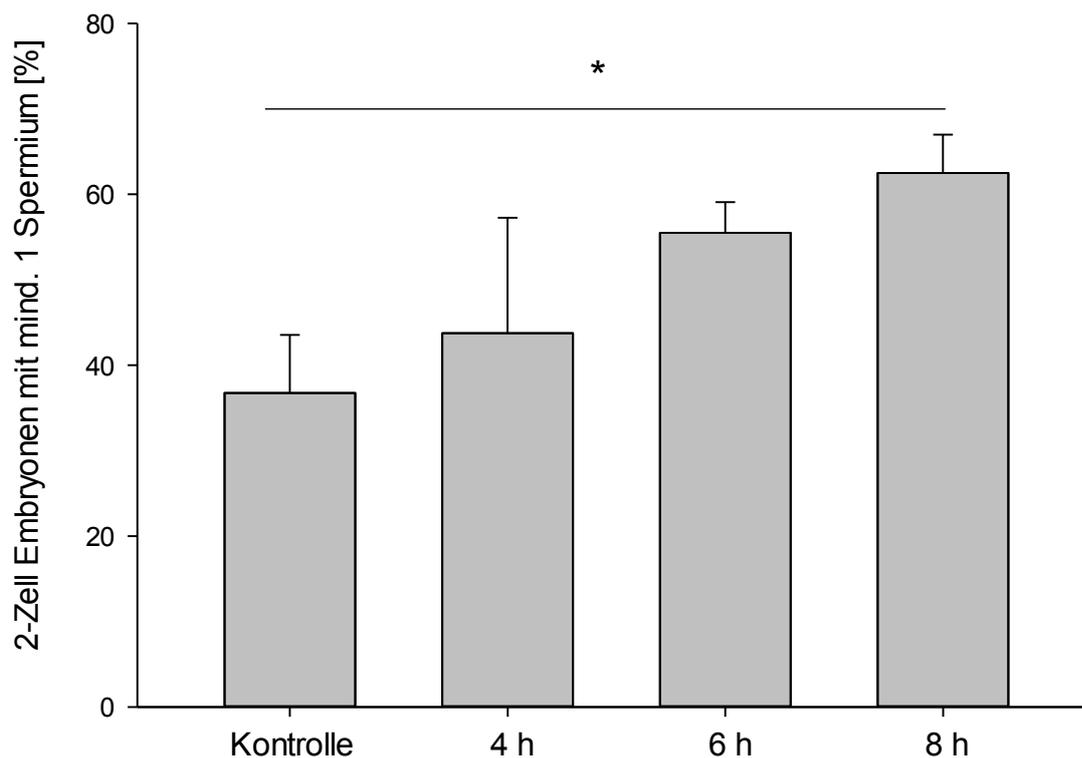


Abbildung 25: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen mit mindestens einem Spermium im perivitellinen Raum nach IVF in Kontrollen und nach 4, 6 und 8 h postovulatorischer Alterung. Es wurde in jeder Gruppe die Anzahl an 2-Zell-Embryonen mit mindestens einem sichtbaren Spermium im perivitellinen Raum bestimmt. Dabei ergibt sich für Kontrollen eine Rate von 36 % und nach postovulatorischer Alterung von 4, 6 und 8 h eine 2-Zell Rate mit sichtbarem Spermium von jeweils 43 %, 55 % und 62 %. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardfehler (* $p < 0,05$).

Anhand der zuvor gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass die Anzahl an Spermien im perivitellinen Raum von 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Alterung signifikant zunahm. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an 2-Zell-Embryonen ohne Spermium in der Kontrolle und nach 4 h postovulatorischer Alterung am höchsten und nach 8 h postovulatorischer Alterung am geringsten war. Ebenso war die Rate an Embryonen mit mehreren Spermien nach 8 h postovulatorischer Alterung am höchsten.

4.6 Effekt einer postovulatorischen Alterung auf die Transkriptionseffizienz in 2-Zell-Embryonen

4.6.1 Optimierung der Antikörperbindung

Eines der wichtigsten Ereignisse während der embryonalen Entwicklung ist die Aktivierung des zygotischen Genoms. Bis zum 2-Zell-Stadium in der Maus hängt die Entwicklung des Embryos allein von den verbliebenen mRNAs und Proteinen aus der Oozyte ab. Während des 2-Zell-Stadiums werden allmählich die maternalen Faktoren durch zygotische ausgetauscht um die Entwicklung des frühen Embryos zu gewährleisten. Ob eine postovulatorische Alterung einen Einfluss auf die zygotische Genomaktivierung hat, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Um die Transkriptionseffizienz von 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Alterung zu bestimmen, wurde der Einbau von BrUTP in naszierende RNA gemessen. BrUTP ist ein Nukleotidanalogen, welches anstelle von UTP von der DNA abhängigen RNA Polymerase II in synthetisierte RNA eingebaut wird. Dort wird BrUTP in BrdU umgewandelt und kann durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Zur Etablierung der Immunfluoreszenz wurden zwei verschiedene fluoreszierende Sekundär-Antikörper verwendet (3.3.3). Zunächst wurden diese Antikörper an einer Negativ-Kontrolle getestet, bei der keine Inkubation mit Erstantikörper erfolgte, um die Spezifität des sekundären Antikörpers zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der sekundäre Antikörper Ziege anti-Maus A488 unspezifisch an die Zona pellucida der Negativ-Kontrolle gebunden hatte (Abbildung 26 A,B), während der Kaninchen anti-Maus FITC Antikörpers ein unspezifisches Signal im Zytoplasma der Negativ-Kontrolle auslöste (Abbildung 26 C,D).

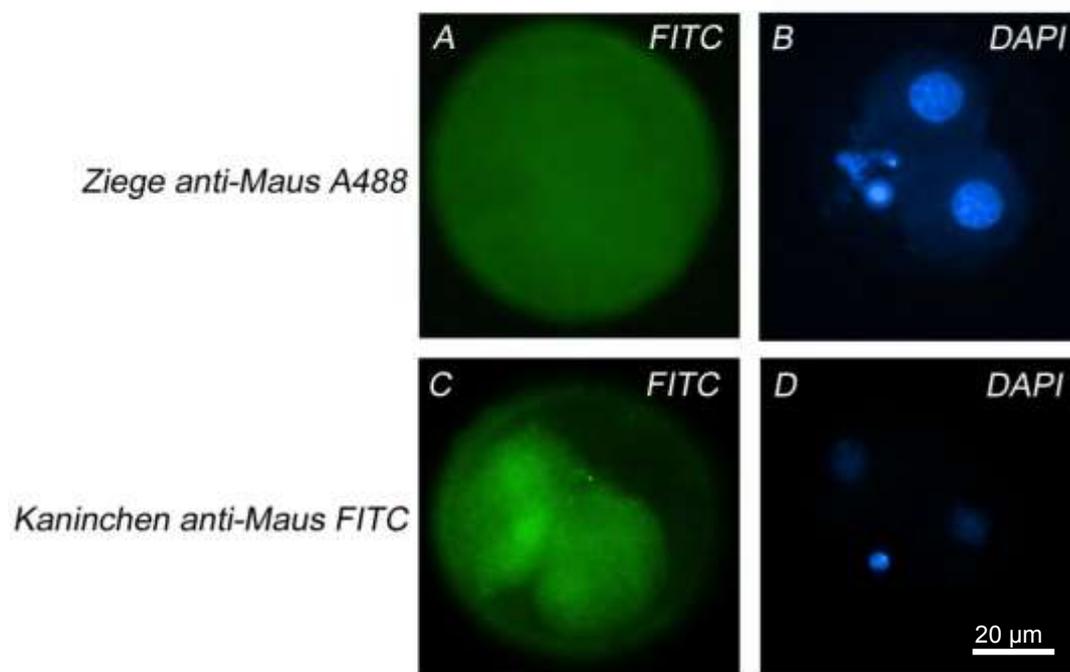


Abbildung 26: Kontrolle der Spezifität zwei verschiedener sekundärer Antikörper zur BrUTP Färbung. (A,B) Es zeigt sich, dass der Antikörper Ziege anti-Maus A488 unspezifisch an die Zona Pellucida bindet, während für DAPI ein spezifisches Signal ermittelt werden kann. (C,D) Der Kaninchen anti-Maus FITC Antikörper bindet unspezifisch an das Zytoplasma der Negativ-Kontrolle.

Da beide käuflichen Sekundär-Antikörper unspezifische Bindungen aufwiesen, wurde für diese Analysen der Erstantikörper direkt mit FITC markiert. Die Isotypenkontrolle beweist, dass der Antikörper nicht mit seinem konstanten Anteil der schweren Kette unspezifisch an die Zelle bindet, sondern nur mit dem hochspezifischen variablen Anteil. Die Isotypenkontrolle wurde mit Maus anti-human CECAM1 Antikörper durchgeführt, welcher ebenfalls mit FITC gekoppelt war. Es konnte gezeigt werden, dass die Isotypenkontrolle negativ war und der Antikörper somit nicht unspezifisch gebunden hatte (Abbildung 27 A-C). Außerdem wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden Oozyten verwendet, bei denen bekanntermaßen keine Transkription stattfindet und BrUTP somit nicht eingebaut wird. Auch hier war keine Färbung mit FITC-gekoppeltem Maus anti-BrdU Antikörper sichtbar (Abbildung 27 D-F). Als Positiv-Kontrolle wurden 2-Zell-Embryonen verwendet. Bei diesen wurden die Kerne beider Zellen spezifisch mit Maus anti-BrdU gefärbt (Abbildung 27 G-I). Hierbei zeigte sich das stärkste Signal in den Nukleoli, also in dem Bereich, in dem die Synthese der rRNA stattfindet.

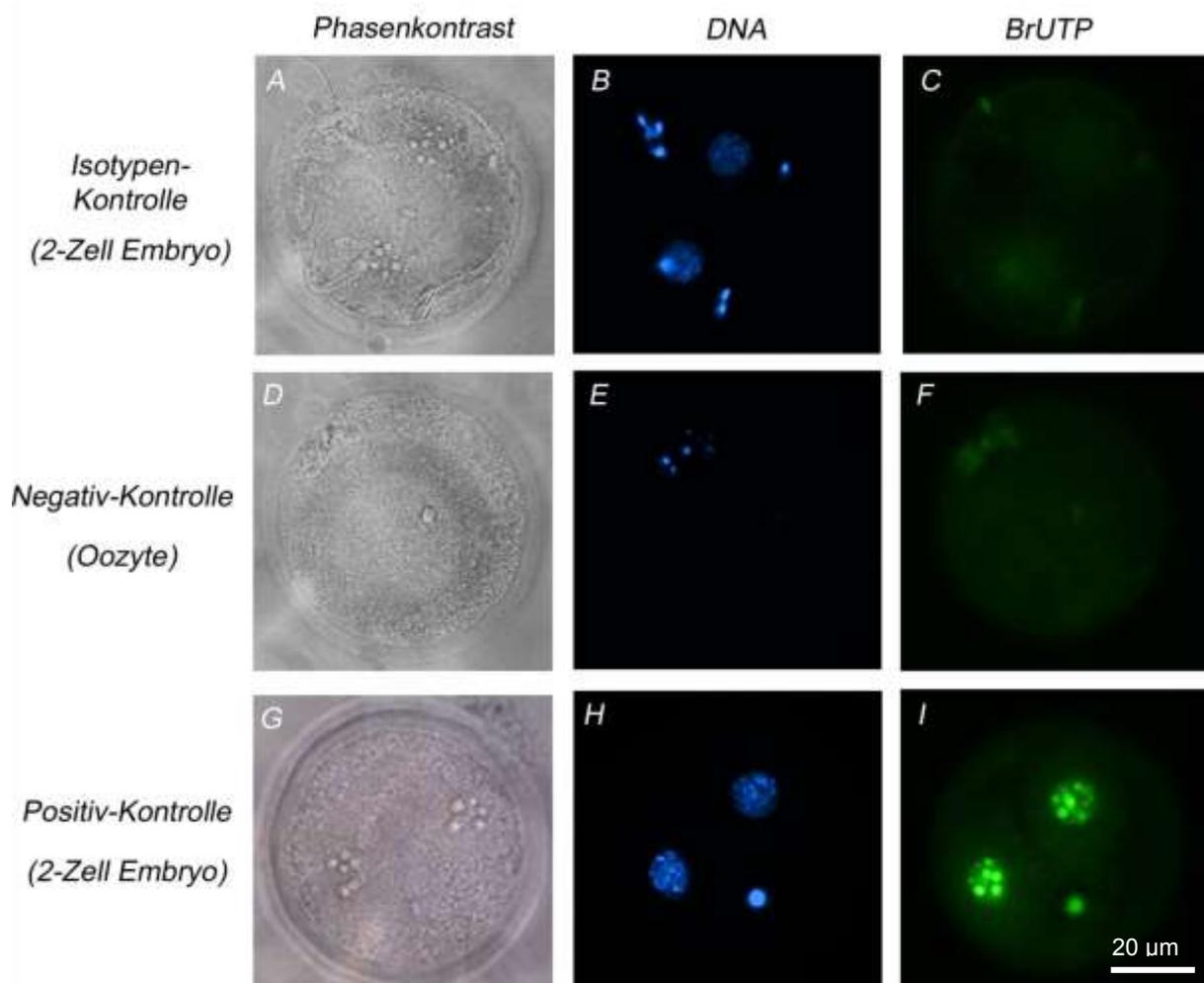


Abbildung 27: Analyse der Spezifität des FITC-gekoppelten Maus anti-BrdU Antikörpers. (A-C) Der verwendete Primärantikörper bindet nicht mit dem konstanten Anteil der schweren Kette an die Zelle, da die Bindung von Maus anti-human CEACAM1 in der Isotypenkontrolle negativ ist. (D-F) Die Negativkontrolle (Oozyten die kein BrUTP enthalten) weist kein Signal auf. (G-I) Die Positiv-Kontrolle zeigt ein spezifisches Signal in den Nukleoli der 2-Zell-Embryonen.

In allen weiteren Versuchen zur BrUTP Inkorporation wurde daher der FITC-gekoppelte Primär-Antikörper verwendet.

4.6.2 Einfluss der postovulatorischen Oozytenalterung auf die Genomaktivierung in 2-Zell-Embryonen

Um zu untersuchen, ob eine postovulatorische Oozytenalterung einen Effekt auf die zygotische Genomaktivierung in 2-Zell-Embryonen hat, wurde in drei unabhängigen Versuchen eine IVF mit Kontroll-Oozyten (n=38) sowie mit Oozyten nach 4 h (n=39), 6 h (n=47) und 8 h (n=51) postovulatorischer Alterung durchgeführt. 24 h nach der IVF wurde die BrUTP Inkorporation an 2-Zell-Embryonen durchgeführt und immunhistochemisch detektiert. Sowohl in den Kontroll-Oozyten als auch nach 4 h postovulatorischer Alterung konnte ein starkes spezifisches Signal für BrUTP detektiert werden. Die parallele Färbung der DNA mit DAPI belegt, dass die Kerne erfolgreich detektiert wurden (Abbildung 28 A-D). Eine

Reduktion der Fluoreszenzintensität von BrUTP konnte nach 6 h Alterung detektiert werden, welche sich nach 8 h postovulatorischer Alterung weiter fortsetzte (Abbildung 28 E-H).

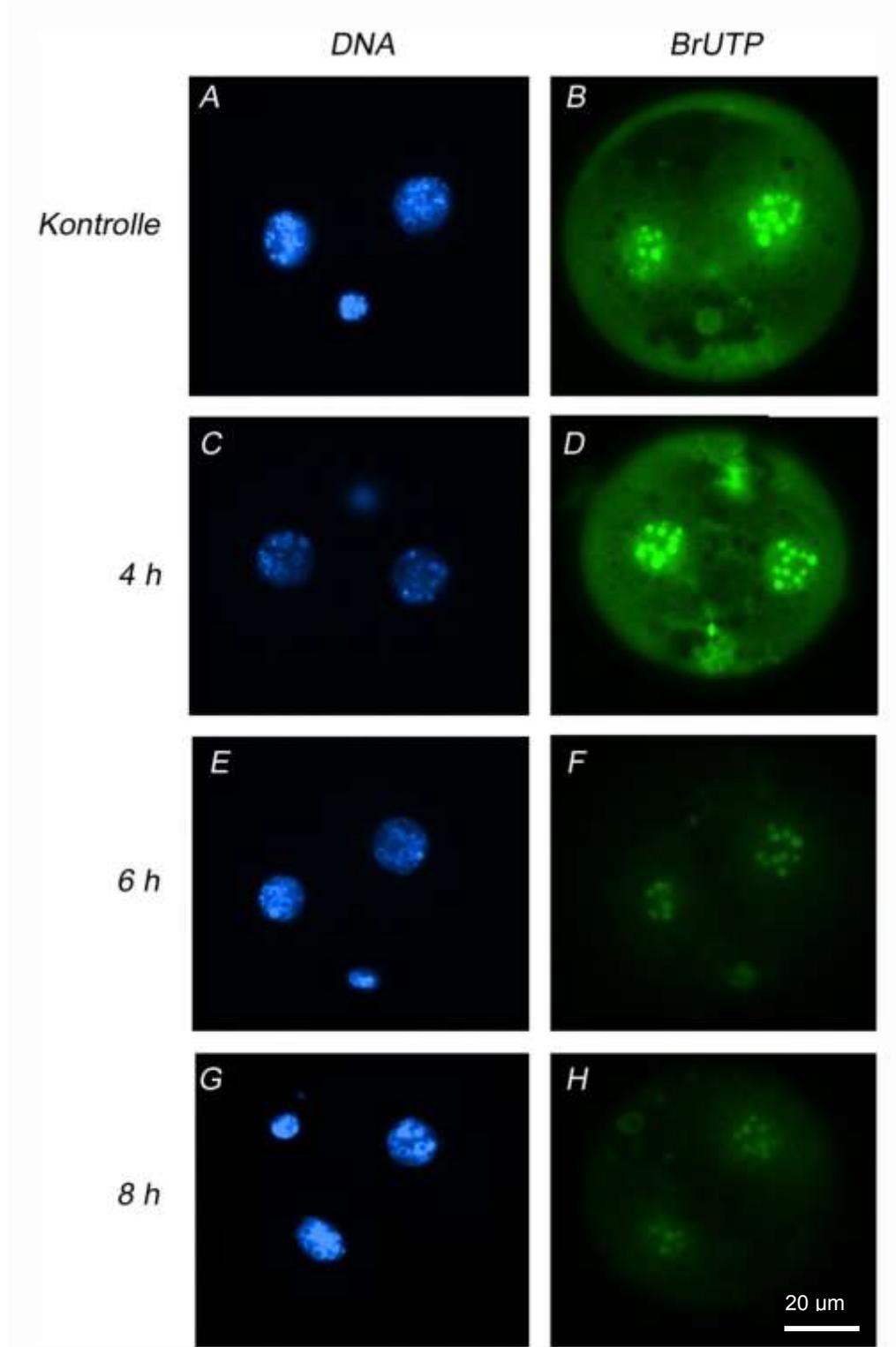


Abbildung 28: BrUTP und DNA Färbung in 2-Zell-Embryonen nach IVF mit postovulatorisch gealterten Oozyten. Bei den Kontrollen und nach 4 h postovulatorischer Alterung zeigt sich eine starke Fluoreszenzintensität für BrUTP in den Zellkernen (A-D). Nach 6 h und 8 h Alterung kann eine Reduktion dieser Fluoreszenzintensität für BrUTP ermittelt werden (E-H), während die Fluoreszenzintensität für DAPI gleich bleibt.

Die Stärke der Fluoreszenzintensität für BrUTP aller 2-Zell-Embryonen der vier Versuchsgruppen wurde mithilfe der Software Image J densitometrisch quantifiziert und statistisch mit Sigma Plot ausgewertet. Abbildung 29 zeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle nach 4 h postovulatorischer Alterung ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität für BrUTP um annähernd 40 % detektiert werden konnte. Nach 6 h und 8 h postovulatorischer Alterung wurde eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität auf jeweils 73 % und 76 % im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt.

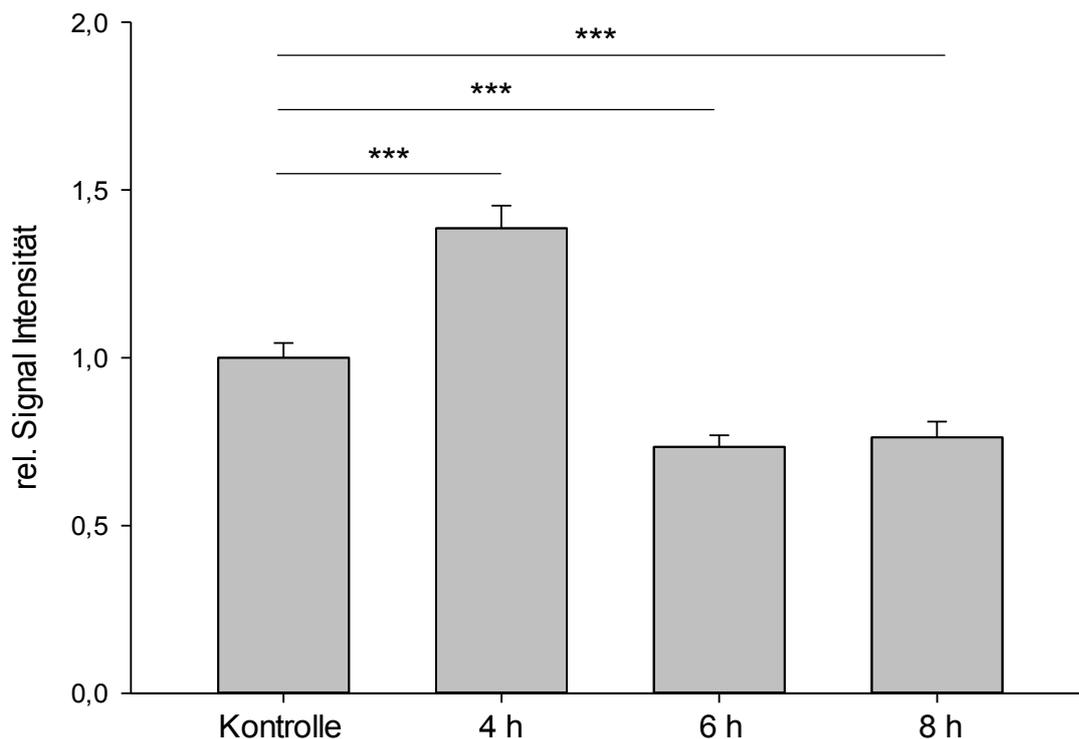


Abbildung 29: Relative Signalintensität der BrUTP Fluoreszenz nach postovulatorischer Alterung. Die relative Signalintensität der Kontrolle wird auf 1 gesetzt. Nach 4 h postovulatorischer Alterung kann eine signifikante Zunahme, nach 6 h und 8 h hingegen eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die Daten werden angezeigt als Mittelwerte \pm Standardfehler (***) $p < 0,001$.

Zusammenfassend konnte nach 4 h postovulatorischer Alterung ein Anstieg der zygotischen Genomaktivierung detektiert werden, wohingegen sich nach 6 h und 8 h eine Reduktion des Transkriptionslevels in 2-Zell-Embryonen zeigte.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer postovulatorischen Alterung auf molekulare Parameter muriner Oozyten sowie daraus resultierender 2-Zell-Embryonen zu untersuchen. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass nach 24 h postovulatorischer Alterung 6 von 10 Maternaleffektgenen in den Oozyten eine Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes aufwiesen, die an zwei repräsentativen Genen durch die erfolgreiche Etablierung eines ePAT validiert werden konnte. Außerdem wurde eine signifikante Reduktion der H3K9 Trimethylierung nach 24 h Alterung in Oozyten detektiert. Nach Etablierung der IVF konnte die Entwicklung von 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Oozyten-Alterung untersucht werden. Es zeigte sich nach Alterung keine Änderung der Fertilisationsrate, jedoch in 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Alterung ein signifikanter Anstieg an Spermien im perivitellinen Raum sowie eine zeitlich veränderte zygotische Genomaktivierung. Diese durch die postovulatorische Oozyten-Alterung veränderten Parameter können sich negativ auf die Entwicklungskompetenz der Embryonen auswirken.

5.1 Das Modell der postovulatorischen Alterung

In der vorliegenden Arbeit wurde die postovulatorische Alterung von Maus-Oozyten *in vitro*, d.h. in einer Kulturschale durchgeführt. Diese Form der Alterung kann im Rahmen assistierter Reproduktionstechniken auftreten. Allerdings kann die postovulatorische Alterung auch *in vivo* vorkommen. Bei der *in vivo* Befruchtung sind die Spermien im Idealfall bereits vor der Ovulation im Ovidukt, sodass die Oozyte nach der Ovulation direkt befruchtet werden kann. Gelangen die Spermien jedoch erst nach der Ovulation in den Eileiter, kann die Eizelle im Ovidukt bis zur Befruchtung durch das Spermium altern. In einer Studie mit *in vitro* und *in vivo* gealterten Maus-Oozyten wurde bereits gezeigt, dass nach 24 h *in vitro* Alterung signifikant mehr fragmentierte Oozyten aufzufinden waren als in den Kontrollen oder nach 24 h *in vivo* Alterung (Longo 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurden in allen Experimenten mit Ausnahme bei den IVF Versuchen die Cumuluszellen der Oozyten komplett entfernt. Daher treffen die ermittelten Befunde eher auf Oozyten für eine ICSI als für eine IVF zu, da nur diese denudiert werden. Longo und Kollegen konnten zudem zeigen, dass nach 24 h Alterung auch die Cumuluszellen erhebliche Veränderungen im Zytoplasma und auch im Zellkern aufwiesen, und dass nach einer *in vivo* Alterung signifikant weniger Cumuluszellen an der Oozyte assoziiert waren, als nach einer *in vitro* Alterung. Zudem wurde in einer anderen Studie die postovulatorische Alterung an Oozyten mit und ohne Cumuluszellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Cumuluszellen die Alterung der Oozyte durch sezernieren von bestimmten Faktoren beschleunigen (Miao *et al.* 2005). Da die Interaktion zwischen

Cumuluszellen und Oozyte wichtig für den Aminosäuretransport und die Sterol-Biosynthese ist, kann die An- oder Abwesenheit von Cumuluszellen die postovulatorische Alterung und die Qualität der Oozyte ebenfalls beeinflussen (Su *et al.* 2008).

5.2 Dynamische Veränderungen des Poly(A)-Schwanzes in postovulatorisch gealterten Oozyten

5.2.1 Deadenylierung von Maternaleffektgenen nach postovulatorischer Alterung

Die mRNA maternaler Effektgene ist essentiell für die Entwicklung der Oozyte und des frühen Embryos. Ein Mechanismus, um die mRNA in der Oozyte zu stabilisieren und aktivieren ist die Polyadenylierung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach 24 h postovulatorischer Alterung 6 von 11 Maternaleffektgenen eine Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes zeigten, was zu einer Degradierung der mRNA führen könnte.

Bereits im Jahr 1983 konnte die Gruppe um Bachvarova in der Maus zeigen, dass die wachsende Oozyte schon vor der Ovulation eine Reduktion an polyadenylierter und gespeicherter mRNA von 19 % auf 10 % zeigt (De Leon *et al.* 1983). Dass dies allerdings auf die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes zurückzuführen ist, wies man erst einige Jahre später nach. Dazu wurden die drei Haushaltsgene *Aktin*, *Hprt* und α -*Tubulin* während der meiotischen Reifung und der frühen embryonalen Entwicklung analysiert. Durch Bindung der mRNA an Poly(U) Sepharose konnten die einzelnen Transkripte nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes aufgetrennt werden. Dabei zeigte sich, dass eine graduelle Deadenylierung von *Aktin* und α -*Tubulin* während der Maturation stattfindet und sich im Embryo fortsetzt. Im Gegensatz dazu wird das Transkript von *Hprt* während der Oozytenreifung polyadenyliert und erst im frühen Embryo deadenyliert (Paynton *et al.* 1988). Diese Deadenylierung von maternalen Transkripten in der Oozyte setzt sich auch nach der Ovulation bis zur Fertilisation fort. So konnte bereits in *Xenopus tropicalis* gezeigt werden, dass durch eine postovulatorische Alterung bestimmte maternale Transkripte deadenyliert werden und dass diese Deadenylierung mit der Entwicklungskompetenz der Froschlarven korreliert (Kosubek *et al.* 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der Poly(A)-Schwanzlänge in *in vivo* und *in vitro* gereiften Maus-Oozyten nach postovulatorischer Alterung untersucht. Nach 12 h postovulatorischer Alterung *in vivo* gereifter Oozyten konnte eine Deadenylierung von *Nlrp5* detektiert werden, welche sich nach 24 h Alterung weiter fortsetzte. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass das *Nlrp5* Transkript während der Oogenese angereichert und im Zuge der Ovulation und Fertilisation abgebaut wird, wohingegen das Nlrp5 Protein bis zum 2-Zell-Embryo detektierbar ist (Tong *et al.* 2000). *Nlrp5* ist ein essentieller Faktor des

subkortikalen maternalen Komplexes (SCMC, engl. *subcortical maternal complex*) welcher an der Plasmamembran der Oozyte lokalisiert und unerlässlich für die Entwicklung zum 2-Zell-Embryo ist (Li *et al.* 2008a). *Nlrp5* ist außerdem an der mitochondrialen Aktivität, der Lokalisation des ER und der Kalzium Homöostase beteiligt (Fernandes *et al.* 2012, Kim *et al.* 2014). Interessanterweise konnte eine Reduktion der *Nlrp5* Expression in chronologisch gealterten Oozyten nachgewiesen werden, was auch eine Rolle bei der verminderten Fertilität im fortgeschrittenem Alter spielen könnte (Hamatani *et al.* 2004). Eine Tendenz in Richtung Deadenylierung zeigten zudem 5 weitere Gene (*Tet3*, *Trim28*, *Dnmt1*, *Nlrp14*, *Oct4*) in *in vivo* gereiften Oozyten nach 24 h postovulatorischer Alterung. *Tet3* ist an der Demethylierung der DNA während der embryonalen Entwicklung beteiligt, wobei es die Oxidation von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) im paternalen zygotischen Genom katalysiert. Ein konditionierter Knock-Out von *Tet3* in Oozyten verhindert die Demethylierung des paternalen Genoms und führt damit zu einer veränderten Genexpression von z.B. *Oct4*, sowie zu einer Beeinträchtigung der weiteren embryonalen Entwicklung (Gu *et al.* 2011). Eine weitere Studie zeigte, dass die Expression der *Tet3*-mRNA in chronologisch gealterten Maus-Oozyten drastisch zunimmt und somit auch die Demethylierung in Oozyten alter Mäuse stärker fortgeschritten ist (Qian *et al.* 2015). *Trim28* kodiert für ein Gerüstprotein, welches mit ZFP57 interagiert und ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der DNA Methylierung für geprägte Gene während der frühen Entwicklung vor der Implantation des Embryos hat. Des Weiteren stellt SETDB1 eine katalytische Untereinheit von TRIM28 dar, die die Methylierung von H3K9me3 an geprägten Genen initiiert (Messerschmidt *et al.* 2012). Dieser Zusammenhang ist insofern interessant, da in der vorliegenden Arbeit eine postovulatorische Oozyten-Alterung zu einer Reduktion von H3K9me3 geführt hat, und die Deadenylierung von *Trim28* eine Ursache dafür sein könnte. *Dnmt1* wird durch PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) und NP95 (engl. *nuclear protein 95*) rekrutiert. NP95 bindet an hemimethylierte DNA und dort spezifisch an den parentalen methylierten Strang, um *Dnmt1* zur Methylierung an den neusynthetisierten Strang zu orientieren (Arita *et al.* 2008). *Dnmt1* ist zuständig für die Erhaltung der DNA Methylierung an geprägten Genen während der Reprogrammierung des Embryos (Hirasawa *et al.* 2008). Interessanterweise konnte in einer Studie eine Demethylierung von *Snprn* nach 29 h postovulatorischer Alterung von *in vivo* und *in vitro* gereiften Oozyten gezeigt werden (Liang *et al.* 2008). Hierbei handelt es sich um ein geprägtes Gen, das nur vom paternalen Allel exprimiert wird, d.h. die DNA Methylierung für das mütterliche Allel wird während der Reprogrammierung durch *Dnmt1* geschützt. Die Demethylierung von *Snprn* könnte somit auf die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes von *Dnmt1* zurückgeführt werden, indem das Transkript nach Alterung nicht mehr aktiviert werden kann. Die genaue Funktion von *Nlrp14* ist bisher noch nicht bekannt. Allerdings führt ein Knock-Out in Oozyten zu einem Arrest im

2-Zell-Stadium, was daraufhin deutet, dass dieses Maternaleffektgen wichtig in der frühen embryonalen Entwicklung ist (Tian *et al.* 2009). Oct4 ist ein Transkriptionsfaktor welcher ausschließlich in pluripotenten Zellen exprimiert wird und eine große Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung hat. Das maternale Oct4 Transkript ist in der Oozyte und bis zum 2-Zell-Stadium detektierbar und wird anschließend abgebaut (Foygel *et al.* 2008).

Eine 12-stündige postovulatorische Alterung von *in vitro* gereiften Oozyten zeigte in der vorliegenden Arbeit einen ähnlichen Effekt auf die Deadenylierung von Maternaleffektgenen wie eine 24-stündige Alterung von *in vivo* gereiften Oozyten. Auch hier konnte bei 6 von 10 Genen (*Tet3*, *Trim28*, *Zfp57*, *Dnmt1*, *Nlrp5*, *Zar1*) ein Trend zur Deadenylierung von maternalen Effektgenen gezeigt werden. Dies sind teilweise die gleichen Gene (*Tet3*, *Trim28*, *Dnmt1*, *Nlrp14*, *Oct4*) die auch nach 24 h postovulatorischer Alterung *in vivo* gereifter Oozyten eine Deadenylierung aufweisen. Eine Deadenylierung von *Zfp57* und *Zar1* zeigte sich allerdings nur bei der Alterung nach *in vitro* Reifung. *Zfp57* ist an der Erhaltung der DNA Methylierung von geprägten Genen beteiligt. Dabei haben das maternale und zygotische *Zfp57* nur in Kombination einen Einfluss auf die DNA Methylierung des paternalen und maternalen Genoms während der Reprogrammierung im frühen Embryo (Li *et al.* 2008b). Messerschmidt *et al.* (2012) konnten außerdem eine Interaktion zwischen TRIM28 und ZFP57 feststellen. Dabei zeigte sich, dass beide Proteine an differentiell methylierte Regionen von *H19*, *Snrpn* und *Peg3* binden und so die Methylierung dieser geprägten Gene während der Reprogrammierung erhalten. *Zar1* ist ein oozytenspezifischer Transkriptionsfaktor, dessen Verlust in Knock-Out Mäusen einem Arrest der embryonalen Entwicklung bereits in der Zygote führt (Wu *et al.* 2003). In einer Studie mit bovinen Oozyten konnte eine Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes für *Zar1* während der *in vivo* und *in vitro* Reifung gezeigt werden. Allerdings zeigte sich keine Veränderung nach der Fertilisation in der frühen embryonalen Entwicklung (Thelie *et al.* 2007).

Nach 24 h postovulatorischer Alterung von *in vivo* gereiften Oozyten konnte außerdem eine Abnahme der mRNA-Konzentration bei 6 von 11 Genen festgestellt werden, dazu gehörten *Brg1*, *Trim28*, *Nlrp2*, *Nlrp5*, *Nlrp14* und *Zar1*. Diese Degradierung von mRNA Transkripten nach 24 h *in vivo* Alterung wurde bereits zuvor beschrieben (Steuerwald *et al.* 2005). Ein Knock-Out von *Nlrp2* in Oozyten führt zu einem Arrest im 2-Zell-Stadium, was darauf hin deutet, dass dieses maternale Effektgen wichtig in der frühen embryonalen Entwicklung ist (Tian *et al.* 2009). Die *Nlrp2* mRNA Konzentration ist in der Oozyte und der Zygote sehr hoch, wird dann im 2-Zell-Embryo drastisch reduziert und ist im weiteren embryonalen Verlauf nicht mehr detektierbar. Das Protein hingegen ist in allen Stadien der Oozytenreifung und im Embryo in gleicher Konzentration nachweisbar (Peng *et al.* 2012). Möglicherweise können zu geringe Mengen der *Nlrp2*, *Nlrp5* und *Nlrp14* mRNA auch zu Fehlern im

genomischen Imprinting führen, da dies bei Mutationen für NLRP2 und NLRP7 im Menschen bereits festgestellt werden konnte (Murdoch *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2009).

Zudem konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg der mRNA-Menge von *Brg1* und *Oct4* in *in vivo* gereiften Oozyten nach 12 h postovulatorischer Alterung nachgewiesen werden. *Brg1* kodiert für die katalytische Untereinheit eines Komplexes, welcher an der Chromatin Remodellierung während der zygotischen Genomaktivierung (ZGA) beteiligt ist. Die Deletion von *Brg1* in Oozyten führt dazu, dass während des ZGA eine große Anzahl von Genen nicht exprimiert wird (Bultman *et al.* 2006). Eine Überexpression von *Brg1* in porcinen Oozyten zeigt eine gestörte Expression entwicklungsrelevanter Gene und eine Beeinträchtigung der embryonalen Entwicklung (Magnani and Cabot 2009). Eine Zunahme der mRNA-Konzentration während einer postovulatorischen Alterung ist schwer erklärbar, da die Transkription in der ruhenden MII Oozyte stillgelegt ist. Die Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete gesteigerte Transkriptmenge muss daher in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Der Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gereiften Oozyten zeigte in Bezug auf die Deadenylierung von Maternaleffektgenen einen konkordanten Effekt, wobei eine postovulatorische Alterung bei Oozyten aus der Follikelkultur schneller zu einer Deadenylierung führte als bei Oozyten die *in vivo* im Ovar herangereift waren. Auch die Gruppe um Thélie *et al.* (2007) konnte keine signifikanten Unterschiede in der Expression von maternalen Effektgenen nach *in vivo* und *in vitro* Reifung boviner Oozyten feststellen. Die schnellere Reduktion des Poly(A)-Schwanzes in *in vitro* gereiften Oozyten könnte auf eine verminderte Qualität der Eizellen nach der Follikelkultur im Vergleich zu *in vivo* gereiften Oozyten hindeuten. So konnten Rizos *et al.* zeigen, dass *in vitro* gereifte Oozyten im Vergleich zu *in vivo* gereiften Oozyten eine signifikant reduzierte Blastozystenrate nach IVF zeigten und die Blastozysten nach der Follikelkultur eine verminderte Qualität aufwiesen (Rizos *et al.* 2002).

Der Poly(A)-Schwanz von mRNA Transkripten ist essentiell für den Export aus dem Nukleus, zur Stabilisierung der RNA und Translation des Proteins. Bereits in Krallenfröschen, Zebrafischen und Mäusen konnte während der Oozytenreifung und frühen embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden, dass die Polyadenylierung mit einer Aktivierung der Translation und die Deadenylierung mit einer Repression der Translation assoziiert werden kann (Wada *et al.* 2012). In unreifen bovinen Oozyten haben Forscher die mRNA in Gruppen mit kurzen Poly(A)-Schwänzen (20-25 Adenosin) und langen Poly(A)-Schwänzen (>250 Adenosin) untersucht. Durch transkriptom-weite Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Gene mit kurzen Poly(A)-Schwänzen für sofortige Prozesse die wichtig für den Zellzyklus (Translation oder Proteintransport) sind kodieren. Im Gegensatz hierzu kodieren mRNAs mit langen Poly(A)-Schwänzen für Mechanismen die essentiell für die embryonale

Entwicklung, wie z.B. Chromatin Remodellierung, Transkription und posttranskriptionale Proteinmodifikationen, sind (Gohin *et al.* 2014). In einer weiteren Studie wurden die Poly(A)-Schwanzlängen in unterschiedlichen Zelltypen miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass ausschließlich in der Oozyte und frühen embryonalen Entwicklung bis zur Blastozyste die Länge des Poly(A)-Schwanzes mit einer gesteigerten Translationseffizienz korreliert. In ausdifferenzierten Zelltypen konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (Subtelny *et al.* 2014). Somit spielt die Länge des Poly(A)-Schwanzes eine wesentliche Rolle während der Entwicklung zur reifen Oozyte und nach der Fertilisation in der frühen Embryonalentwicklung. Eine Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes von Maternaleffektgenen nach postovulatorischer Alterung, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, kann somit die adäquate Entwicklung des Embryos beeinflussen.

5.2.2 Validierung der Deadenylierung durch Poly(A) Test Assays

In dieser Arbeit wurde die RNA aus Maus-Oozyten mit random-hexamer Primern (mRNA) und oligo(dT) Primern (Indikator für Poly(A)-Anteil) umgeschrieben. Dadurch konnte anschließend in einer qRT-PCR die Deadenylierung von Maternaleffektgenen durch den Vergleich von gesamter mRNA mit Poly(A)-mRNA gezeigt werden. Um nachzuweisen, dass es sich hierbei um eine valide Methode zur Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge handelt, wurde für zwei repräsentative Maternaleffektgene ein Poly(A) Test etabliert, mit dem die exakte Poly(A)-Schwanzlänge von mRNA Transkripten bestimmt werden konnte. Diese Poly(A) Tests wurden bereits zuvor mit mRNA aus Maus-Oozyten durchgeführt (Traverso *et al.* 2005), in der vorliegenden Arbeit jedoch zum ersten Mal mit sehr geringen Mengen RNA (6 ng). Daher musste dieser Test erstmals für sehr geringe Mengen RNA etabliert werden. Dazu wurde zunächst der Ligation-mediated Poly(A) Test (LM-PAT) von Salles and Strickland (1995) verwendet, der erfolgreich mit RNA aus Maus-Ovar für Haushaltsgene und Maternaleffektgene etabliert werden konnte. Bei den Maternaleffektgenen zeigten sich jedoch neben den spezifischen Banden mehrere unspezifische Banden auf dem Agarose-Gel. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die oozytenspezifischen Primer im Ovar unspezifisch an andere Transkripte binden. Bei der Verwendung von RNA aus Maus-Oozyten waren jedoch keine Banden für die untersuchten Maternaleffektgene erkennbar. Dies könnte daran liegen, dass das Transkript der 10 ausgewählten Maternaleffektgene in einer zu geringen Konzentration in der Oozyte vorlag, um mit diesem Test nachgewiesen zu werden. Außerdem konnte die Gruppe um Gohin *et al.* (2014) zeigen, dass bei einer Inkubation bei 42 °C, wie sie auch hier in dem benutzten Protokoll verwendet wurde, 80 % der polyadenylierten mRNA degradiert wurde. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der LM-PAT eine geringe Sensitivität der PCR-Produkte anzeigt und das Protokoll eine Tendenz zu Transkripten mit kurzen Poly(A)-Schwänzen hat (Janicke *et al.* 2012).

Da sich der LM-PAT für die Quantifizierung der Poly(A)-Schwanzlänge der mRNA von Maternaleffektgenen aus Maus-Oozyten als nicht geeignet erwies, wurde der extension Poly(A) Test von Jänicke *et al.* (2012) verwendet. Dieser Test unterscheidet sich darin, dass der Poly(A)-Schwanz nicht mit oligo(dT) Primern angereichert wird und das Protokoll erheblich kürzer ist, sodass die instabile RNA schneller in cDNA umgeschrieben werden kann. Dieser Test wurde erfolgreich für die Gene *Dnmt1*, *Zar1* und das Haushaltsgen *Gapdh* etabliert. Zunächst konnte bestätigt werden, dass nach postovulatorischer Alterung die Konzentration an Gesamt-RNA stark reduziert war. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen, die zeigten, dass mit Beendigung der Transkription in der Oozyte die Konzentration an maternaler mRNA während der Oogenese und Reifung graduell abnimmt (Bachvarova *et al.* 1985) und sich dies auch während der postovulatorischen Alterung fortsetzt (Kosubek *et al.* 2010). Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA Transkripte vor allem durch eine Deadenylierung degradiert werden. In dem durchgeführten ePAT konnte nach Alterung eine Abnahme der mRNA Konzentration nachgewiesen werden obwohl für die Kontrolle und nach Alterung die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde. Dies könnte daran liegen, dass die Bindung des Adapters nur dann erfolgt, wenn ein Poly(A)-Schwanz vorhanden ist. Somit lagen bei den gealterten Oozyten vermutlich die meisten Transkripte ohne Poly(A)-Schwanz vor und konnten im ePAT nicht detektiert werden. Eine Deadenylierung kann dazu dienen die mRNA in einen Ruhezustand zu bringen, um sie zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder zu aktivieren, oder um das Transkript abzubauen. Bisher wurden drei unterschiedliche Proteinkomplexe für die Deadenylierung der mRNA identifiziert. Aus Hefe und *Xenopus* konnte der Ccr4-Pop2-Not-Komplex mit multiplen Deadenylasen beschrieben werden, wobei Ccr4 die Einheit mit der dominantesten katalytischen Aktivität aufweist (Denis and Chen 2003). Dieses Enzym wird inhibiert durch das Poly(A)-Bindungsprotein Pab1p auf dem Poly(A)-Schwanz, wobei die 5'-Cap-Struktur der mRNA keinen Einfluss auf den Komplex hat (Tucker *et al.* 2002). Ein weiterer Deadenylase-Komplex aus Eukaryonten ist PAN, welcher aus den Enzymen Pan2p und Pan3p besteht. Die Funktion dieser Enzyme ist nicht die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes zur Degradierung des Transkripts, sondern die initiale Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes von ca. 250 Nukleotiden auf physiologische 50-70 Nukleotide (Brown and Sachs 1998). Der dritte und wichtigste Komplex vor allem in Säugetierzellen ist PARN. Dieses Enzym ist eine poly(A)-spezifische 3'-5' Exoribonuklease, welche mit der 5'-Cap-Struktur interagiert und Poly(A)-Schwänze eukaryotischer mRNA abbaut (Virtanen *et al.* 2013). Die Deadenylierung des Transkripts führt anschließend zur Entfernung der schützenden Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Die Beseitigung dieser Struktur wird durch die Enzyme Dcp1p und Dcp2p katalysiert. Dieser Komplex wurde erstmals in Hefe und im Menschen beschrieben und zeigte, dass Dcp2p als katalytische Untereinheit das einzige Enzym in der

Zelle ist, welches die 5'-Cap-Struktur entfernt (Dunckley and Parker 1999). Allerdings kann der Poly(A)-Schwanz auch selbst eine Entfernung der 5'-Cap-Struktur verhindern, wobei speziell Pab1b diesen Prozess inhibiert. Dies geschieht durch die Bindung von Pab1b an das 5'-Ende des Translationsinitiationskomplexes, wodurch die mRNA stabilisiert und die Bindung von Dcp1p und Dcp2p inhibiert wird (Wilusz *et al.* 2001). Die Hydrolyse der Cap-Struktur durch Dcp1p-Dcp2p setzt ein Methylguanosin am C7 frei und hinterlässt ein 5'-Monophosphat an der mRNA. Durch dieses Substrat wird die Exonuklease Xrn1 rekrutiert, welche die mRNA abbaut (Stevens and Maupin 1987).

Um zu ermitteln mit welcher Poly(A)-Schwanzlänge die Transkripte *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh* hauptsächlich in der Oozyte vorliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA nach der Länge ihres Poly(A)-Schwanzes mit magnetischen oligo(dT) Beads fraktioniert. Dadurch hätte eine Verschiebung der Transkripte von *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh* nach postovulatorischer Alterung in Fraktionen mit kürzeren oder längeren Poly(A)-Schwanzlängen ermittelt werden können. Die Bindung der mRNA an die magnetischen oligo(dT) Beads verlief erfolgreich, da im Elektropherogramm des Agilent Chips in den einzelnen Fraktionen keine Peaks der rRNA detektiert wurden. Anschließend wurde von den Fraktionierungen ein ePAT mit *Dnmt1* und *Zar1* durchgeführt. *Dnmt1* lag in den Kontroll-Oozyten hauptsächlich mit sehr kurzem oder sehr langem Poly(A)-Schwanz vor. Dies könnte darauf hindeuten, dass *Dnmt1* zu diesem Zeitpunkt im Hinblick auf seine Funktion der Aufrechterhaltung der Methylierung der geprägten Gene während der Reprogrammierung ab dem 2-Zell-Stadium polyadenyliert und rekrutiert wird. Dies bestätigt auch eine Studie, die eine höhere Proteinexpression von DNMT1 in reifen MII Oozyten als in wachsenden Oozyten oder direkt nach der Fertilisation zeigte (Ratnam *et al.* 2002). Im Gegensatz hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *Zar1* vor allem ohne Poly(A)-Schwanz in Kontroll-Oozyten vorliegt. *Zar1* wird nach der Ovulation eventuell bereits deadenyliert und degradiert, da genug Protein für die Fertilisation vorliegt. Tatsächlich wird ZAR1 hauptsächlich während der Transition von MI zu MII exprimiert und ist im 2-Zell-Embryo kaum noch detektierbar (Wu *et al.* 2003).

Der ePAT mit mRNA von *Dnmt1*, *Zar1* und *Gapdh*, die nach postovulatorischer Alterung durch Fraktionierung separiert wurde, brachte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Resultate. Dies könnte daran liegen, dass bei der Durchführung der Fraktionierung eine erhebliche Menge RNA verloren ging. Die Messung der RNA Konzentration vor der Durchführung der Fraktionierung schloss die Gesamt-RNA ein, also rRNA, tRNA und mRNA. Die mRNA macht allerdings nur ungefähr 1-2 % der gesamten RNA aus. Da die Fraktionierung auf der Bindung der oligo(dT) Beads an polyadenylierte mRNA basiert, kann auch nur mRNA gebunden werden, was den Verlust der Gesamt-RNA während der Fraktionierung begründet. Dass bei der mRNA-Fraktionierung nach postovulatorischer

Alterung keine PCR-Fragmente erkennbar waren, lag daran, dass zusätzlich zum RNA Verlust während der Fraktionierung auch noch die Reduktion der mRNA nach postovulatorischer Alterung hinzukam und somit der ePAT offensichtlich nicht sensitiv genug für derart geringe Mengen RNA war.

5.3 Abnahme der H3K9me3 nach postovulatorischer Alterung

In dieser Arbeit wurde die Trimethylierung am Histon H3 am Lysin 9 (H3K9me3) in MII Oozyten untersucht. Dabei konnte durch immunhistochemische Methoden festgestellt werden, dass die H3K9me3 in 24 h postovulatorisch gealterten Oozyten eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen zeigte.

Bereits vorher untersuchten einige Gruppen die H3K9me3 während der Oogenese und zeigten, dass sich diese Modifikation erst im GV-Stadium der reifenden Oozyten etabliert und an Tag 15 nach der Geburt signifikant detektierbar ist. Außerdem konnte H3K9me3 im Kern an Heterochromatin in der GV-Oozyte lokalisiert werden (Kageyama *et al.* 2007). Eine andere Gruppe detektierte in frisch ovulierten MII Oozyten die H3K9me3 Modifikation an den Chromosomen in der Metaphasenplatte (Sarmiento *et al.* 2004). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit in MII Oozyten gezeigt werden.

Die Methylierung des Histon H3 am Lysin 9 wird durch sogenannte Histonmethyltransferasen (HMTs) katalysiert. Eine der ersten in der Maus und im Menschen beschriebenen HMT ist die SUV39H1, welche mit einer Domäne an das Heterochromatinprotein 1 (HP1) bindet und die SET-Domäne die katalytisch aktive Untereinheit darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass SUV39H1 spezifisch am Histon H3K9 methyliert (Rea *et al.* 2000). Kurz danach wurde in Mäusen durch Knock-Out Versuche die annähernd sequenzidentische HMT SUV39H2 identifiziert. Dieses Enzym wird hauptsächlich im Hoden exprimiert, wobei eine Akkumulation auf beiden Geschlechts-Chromosomen festzustellen war. Daher geht man davon aus, dass SUV39H2 eine Rolle während der ersten meiotischen Inaktivierung des Chromatins und bei der genomischen Prägung der paternalen DNA spielt (O'Carroll *et al.* 2000). Eine weitere HMT ist G9a, welche spezifisch an den Lysinresten 9 und 27 am Histon H3 bindet und ebenfalls durch die evolutionär konservierte SET-Domäne die Methylierung katalysiert (Tachibana *et al.* 2001). SETDB1 ist eine der wichtigsten HMTs für die Methylierung von H3K9 und hat außerdem Einfluss auf die Erhaltung der Pluripotenz von Stammzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die H3K9me3 durch SETDB1 für die Expression verschiedener Gene und Retroelemente verantwortlich ist (Karimi *et al.* 2011). Das SETDB1 Protein wird nach der Fertilisation im späten Pronukleus-Stadium translatiert. Dabei weist der männliche Pronukleus eine höhere Expression als der weibliche Nukleus auf. Das *setdb1* Transkript wird während der embryonalen Entwicklung transkribiert, allerdings zeigt sich in ausdifferenzierten Zellen eine Repression der Transkription (Cho *et al.* 2012).

Die Demethylierung von H3K9me3 wird hauptsächlich durch die Histondemethylase JMJD2 katalysiert. Die Überexpression von *jmjd2 in vivo* führt zur Delokalisation von HP1 und zu einer reduzierten Bildung von Heterochromatin, wohingegen die Inhibition von *jmjd2* die Zellproliferation reduziert (Cloos *et al.* 2006). Die Transkription von *jmjd2*-mRNA findet nur vom 2-Zell- bis zum 8-Zell-Stadium statt (Wang *et al.* 2010). Geht man davon aus, dass die Oozyte durch die postovulatorische Alterung Prozesse durchläuft, die normalerweise erst nach der Fertilisation auftreten, zeigt die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Reduktion der H3K9me3 eine Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen verminderten Proteinexpression von SETDB1 in der Zygote und der erhöhten Transkription von *jmjd2* im 2-Zell-Stadium. SETDB1 ist eine katalytische Untereinheit des Enzyms TRIM28 (Messerschmidt *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Transkription von *Trim28* während der postovulatorischen Alterung signifikant abnimmt. Dies erklärt auch die verminderte Intensität von H3K9me3 nach postovulatorischer Alterung. Eine andere Studie untersuchte die Histonmethylierung in GV-Oozyten von chronologisch gealterten (11 Monate) und jungen (2 Monate) murinen Weibchen. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die Modifizierung von H3K9me3, H3K36me2, H3K76me2 und H4K20me2 in Oozyten von alten Weibchen signifikant reduziert wurde (Manosalva and Gonzalez 2010), was eine Ursache der verminderten Fertilität im fortschreitenden Alter sein könnte.

Die H3K9me3 steht für die Repression der Genexpression durch Stabilisierung und Veränderung des Chromatins zu Heterochromatin. Im Gegensatz dazu aktiviert die Acetylierung die Transkription. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine postovulatorische Alterung in MII Oozyten von mindestens 10 h zu einer gesteigerten Acetylierung an H3K14, H3K8 und H4K12 führt, während die Acetylierung von H3K9, H4K5 und H4K16 keine Veränderung zeigt (Lee *et al.* 2014). Diese gegensätzlichen Veränderungen der Histonmodifikationen zur Aktivierung und Repression des Chromatins während einer postovulatorischen Alterung könnten die Genexpression nach der Fertilisation und somit auch die embryonale Entwicklung beeinflussen.

5.4 Die postovulatorische Oozyten-Alterung hat keinen Effekt auf die Effizienz der In-vitro-Fertilisation

Um zu überprüfen ob eine postovulatorische Alterung die Fertilisationseffizienz der Oozyten beeinflusst, wurden die Oozyten mittels IVF befruchtet. Da in den zuvor durchgeführten Versuchen Oozyten aus dem Inzuchtstamm C57Bl/6J verwendet wurden, wurde eine Fertilisation mittels IVF mit den Keimzellen dieses Mausstammes durchgeführt. Da sich jedoch zeigte, dass die Fertilisations-Effizienz dieses Inzuchtstammes sehr gering war, wurden zusätzlich verschiedene Kombinationen aus Spermien und Oozyten des

Hybridstammes C57Bl/6JxCBA/Ca getestet. Es zeigte sich, dass eine hohe Fertilisationsrate von 80 % bei einer Kombination von Oozyten aus C57Bl/6J und Spermien aus C57Bl/6JxCBA/Ca erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche diese Kombination verwendet.

Die Gruppe um Byers *et al.* untersuchte in einer umfangreichen Studie die Wurfgröße nach IVF aus 10 Inzuchtstämmen. Dabei konnte eine Fertilisationsrate von 66 % bei C57Bl/6J und von 49 % bei CH3 Mäusen, welche aus der gleichen Kreuzung wie CBA/Ca Mäuse stammen, erreicht werden (Byers *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit lag die Fertilisationsrate von C57Bl/6J Mäusen bei durchschnittlich 13 % und von CBA/Ca Mäusen bei 54 %. Die Differenz in der Fertilisationsrate bei dem Inzuchtstamm C57Bl/6J könnte auf die Variationen des Stammes in unterschiedlichen Laboren zurückgeführt werden.

Nachdem die IVF in der vorliegenden Arbeit erfolgreich mit den oben genannten Mausstämmen etabliert werden konnte, wurde die Fertilisationsrate nach postovulatorischer Alterung bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied in der relativen Anzahl an 2-Zell-Embryonen zu den Kontrollen. Somit hatte die postovulatorische Alterung von bis zu 22 h nach Induktion der Ovulation keinen Effekt auf die Fertilisationsrate. Im Gegensatz hierzu ermittelten Marston und Chang eine Reduktion der relativen Anzahl an 2-Zell-Embryonen im Vergleich zu Kontrollen im Zeitraum von 21-25 h nach hCG-Gabe (Marston and Chang 1964). Allerdings wurde in der Studie die postovulatorische Alterung *in vivo* und nicht *in vitro* durchgeführt, wodurch dieser Unterschied begründet sein könnte. Die Gruppe um Lacham-Kaplan und Trounson untersuchte in Mäusen die Fertilisationsrate nach postovulatorischer Oozyten-Alterung *in vitro* für 13 und 24 h nach Oozytenisolierung. Hierbei sank die Rate an 2-Zell-Embryonen nach 13 h Alterung im Vergleich zu den Kontrollen um 14 % (nach IVF) bzw. 31 % (nach ICSI). Nach 24 h postovulatorischer Alterung und anschließender Insemination konnte keine Fertilisationsrate bestimmt werden, da die Oozyten entweder degradierten oder parthenogenetisch aktiviert wurden (Lacham-Kaplan and Trounson 2008). Diese reduzierte Fertilisationsrate konnte in der vorliegenden Arbeit nach 8 h postovulatorischer Oozyten-Alterung noch nicht detektiert werden.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit nach IVF in den 2-Zell-Embryonen ein oder mehrere Spermien im perivitellinen Raum detektiert, wobei deren Rate in den aus nach 8 h gealterten Oozyten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höher war. Der Polyspermieblock der Zona pellucida der ein solches Eindringen von weiteren Spermien nach der Befruchtung verhindern soll, wird durch den Kalziumeinstrom initiiert, welcher durch das Spermium ausgelöst wird und die graduelle Ausschüttung von kortikalen Granula (CG, engl. *cortical granules*) aus der Oozytenmembran in den perivitellinen Raum einschließt. Schon während der Oozytenreifung und auch nach der Ovulation kommt es zu einer Exozytose von CGs in der MII Oocyte, was zu einer Veränderung in der elektronischen

Dichte der Zona pellucida führt. Diese vorzeitige Ausschüttung und dadurch veränderte Beschaffenheit der Zona pellucida kann eine Vorbereitung auf den Polyspermieblock nach der Fertilisation sein (Okada *et al.* 1993). Eine postovulatorische Alterung kann daher aufgrund des stetigen Ausstoßes der CGs die Struktur der Zona pellucida beeinflussen. In einer Studie mit Maus-Oozyten wurde die Beschaffenheit der Zona pellucida nach *in vitro* und *in vivo* Alterung verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach 3 h *in vitro* Alterung 10 % mehr Oozyten eine degradierte Zona pellucida aufwiesen als nach 3 h *in vivo* Alterung. Allerdings wurde dieser Effekt nach 6 h Alterung wieder aufgehoben (Nogues *et al.* 1988). Außerdem führt eine postovulatorische Alterung zu einem abnormalen CG-Muster in der MII Oozyte. In frisch ovulierten MII Oozyten lokalisieren CGs weit entfernt von den Chromosomen, sodass ein CG-freier Raum im Zytoplasma entsteht. Im Gegensatz dazu verteilen sich CGs in gealterten Oozyten entweder direkt über den Chromosomen oder bilden einen Ring um den Zellkern (Ducibella *et al.* 1990). Zudem ist nach 16 und 22 h postovulatorischer Alterung die CG-Dichte in Maus-Oozyten in der Metaphase II höher als in der Anaphase II. Somit kommt es zu einer erhöhten CG-Ausschüttung in der sich entwickelnden Oozyte nach postovulatorischer Alterung im Vergleich zu den Kontrollen. Die Exozytose der CGs kann auch in einen direkten Zusammenhang mit der Konfiguration der Zona pellucida gebracht werden. So erhöht sich die Veränderung der Zona pellucida-Proteine zeitabhängig in postovulatorisch gealterten Oozyten (Xu *et al.* 1997). Die hier beschriebenen Veränderungen der Zona pellucida nach postovulatorischer Alterung könnten ein Grund für das Vermehrte Vorkommen von Spermien im perivitellinen Raum von 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Oozyten-Alterung sein.

5.5 Eine postovulatorische Oozyten-Alterung beeinflusst die zygotische Genomaktivierung im 2-Zell-Embryo

Die Transkription in der Oozyte wird während der Oogenese gestoppt und beginnt erst wieder nach der Fertilisation ab dem 2-Zell-Stadium. Diese zygotische Genomaktivierung, durch die maternale durch zygotische Komponenten ausgetauscht werden, ist eines der wichtigsten Ereignisse während der embryonalen Entwicklung. Die Gruppe um Richard Schultz untersuchte sehr intensiv die zygotische Genomaktivierung in Maus-Embryonen. Dabei konnten sie zunächst feststellen, dass eine sehr schwache Transkription des embryonalen Genoms 1-2 h nach Eintritt der Zygote in die S-Phase detektierbar und im männlichen Pronukleus viermal höher als im weiblichen ist. Nach der ersten Zellteilung steigt die zygotische Genomaktivierung in der S-Phase des 2-Zellers im Vergleich zur S-Phase der Zygote um 80 %. Somit beginnt die Aktivierung des zygotischen Genoms in der Maus im frühen 2-Zell-Embryo (Aoki *et al.* 1997). Im Vergleich dazu wird das humane zygotische Genom erst im 4- bis 8-Zell-Stadium aktiviert (Braude *et al.* 1988).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des zygotischen Genoms von einer postovulatorischen Oozyten-Alterung beeinflusst wird. Dazu musste das immunhistochemische Protokoll zunächst etabliert werden. Der Nachweis der Transkription beruht dabei auf dem Prinzip, dass BrUTP in naszierende RNA eingebaut wird und anschließend durch Verwendung von Antikörpern gegen BrdU nachgewiesen werden kann. Da durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper gegen BrdU in der vorliegenden Arbeit keine spezifische Bindung erfolgte, wurde der Erstantikörper mit dem Fluorophor FITC markiert um diesen direkt detektieren zu können. Hierdurch konnte ein spezifisches Signal in den Nukleoli der Zellkerne der 2-Zell-Embryonen detektiert werden. In den Nukleoli findet die Synthese der rRNA statt, welche bereits im 2-Zell-Stadium transkribiert wird (Knowland and Graham 1972). Mittels Verwendung der Methode der BrUTP Inkorporation zum Nachweis der Transkription in somatische Zellen konnten Wansink *et al.* (1993) kein Signal in den Nukleoli detektieren, sondern ausschließlich im Nukleus. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Zugänglichkeit der Nukleoli durch die verwendeten biotinmarkierten Zweitantikörper nicht erreicht werden konnte. Durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten fluoreszenzmarkierten Erstantikörper könnte der Unterschied in der Lokalisation der Transkription erklärt werden. Weiterhin wurde in der Gruppe um Wansink *et al.* gezeigt, dass BrUTP hauptsächlich von der RNA Polymerase II eingebaut wird, welche sich ausschließlich im Nukleus befindet und mRNA transkribiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription von rRNA, welche durch die RNA Polymerase I synthetisiert wird, in den Nukleoli detektiert. Wansink *et al.* konnten allerdings auch einen Einbau von BrUTP in naszierende rRNA nachweisen und zeigten somit, dass die RNA Polymerase I zu 30 % BrUTP als Substrat verwendet. Dieses Signal wurde verstärkt, wenn die Aktivität der RNA Polymerase II durch α -Aminitin inhibiert wurde (Wansink *et al.* 1993).

Nachdem die Inkorporation und Detektion von BrUTP in 2-Zell-Embryonen in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert werden konnte, wurde sie zur Untersuchung der zygotischen Genomaktivierung nach postovulatorischer Alterung eingesetzt. Dazu wurden die MII Oozyten nach der Oozytenisolierung für 4, 6 und 8 h *in vitro* gealtert, bevor die Fertilisation durchgeführt wurde. Jeweils 24 h nach der Befruchtung wurden die 2-Zell-Embryonen mit BrUTP inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die zygotische Genomaktivierung in 2-Zell-Embryonen aus 4 h gealterten Oozyten im Vergleich zu Kontroll-Oozyten signifikant erhöht und in solchen aus 6 und 8 h gealterten Oozyten erniedrigt war. Diese erhöhte Transkription des zygotischen Genoms nach 4 h Alterung könnte dadurch erklärt werden, dass diese gealterten Oozyten für eine Fertilisation reifer und geeigneter waren, als die nicht gealterten Kontroll-Oozyten. Möglicherweise ist diese gesteigerte Transkription aber auch damit zu begründen, dass das embryonale Genom bereits vorzeitig aktiviert wurde. Bei der Regulation der Aktivierung des embryonalen Genoms spielen viele

unterschiedliche Faktoren eine Rolle. Dazu gehört z.B. auch die Reprogrammierung der Histone und DNA nach der Fertilisation (Messerschmidt 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine postovulatorische Alterung zu einer Demethylierung von H3K9me3 führt. Dieser vorzeitige Beginn der Reprogrammierung vor der Fertilisation könnte ein Grund dafür sein, dass die zygotische Genomaktivierung nach einer verzögerten Befruchtung ebenfalls eher beginnt. Bei der vorzeitigen Aktivierung der Oozyte läuft ein Entwicklungsprogramm unabhängig von den Zellteilungen nach der Fertilisation in der Oozyte ab. So könnten nach 4 h zusätzlicher Alterung maternale Gene aktiviert werden, welche normalerweise erst während der Fertilisation rekrutiert werden und das zygotische Genom früher aktivieren (Hamatani *et al.* 2004). Diese Theorie wurde auch auf Translationsebene für die Rekrutierung von maternalen Proteinen in der Oozyte diskutiert (Wang and Latham 1997). Auch die Gruppe um Richard Schultz konnte in MII Oozyten 16-22 h nach hCG-Gabe feststellen, dass nach postovulatorischer Alterung der Zellzyklus aktiviert und kortikale Granula ausgeschüttet werden. Beides sind Ereignisse die normalerweise erst nach der Fertilisation stattfinden. Dies bestätigt die Theorie der vorzeitigen Aktivierung der postovulatorisch gealterten Oozyte (Xu *et al.* 1997).

Nach 6 und 8 h Alterung der gewonnenen Oozyten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Verzögerung der zygotischen Genomaktivierung gezeigt werden. Wenn man von der Theorie der Programmierung der Oozyte oder vorzeitigen Aktivierung ausgeht, müsste die Transkription zu diesen Zeitpunkten weiter zunehmen, da die erste Welle der ZGA in diesem Stadium noch nicht abgeschlossen ist. Die verzögerte Aktivierung des zygotischen Genoms nach einer verlängerten postovulatorischen Alterung deutet darauf hin, dass die Qualität der Oozyte während der Alterung abnahm und die normale Entwicklung daher nicht adäquat verlief.

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass eine postovulatorische Alterung zu deutlichen molekularen Veränderungen in der Oozyte sowie auch in den daraus resultierenden Embryonen führt, die die Entwicklung des frühen Embryos oder auch die weitere postnatale Entwicklung beeinträchtigen können.

6. Zusammenfassung

Die postovulatorische Alterung wird durch eine verzögerte Fertilisation nach der Ovulation hervorgerufen und führt zu einem zeitabhängigen Qualitätsverlust der Oozyte. Dieser macht sich durch eine verringerte Fertilisations- und Implantationsrate, ausgelöst durch verschiedene veränderte zelluläre Prozesse, bemerkbar (Miao *et al.* 2009). Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Parameter der postovulatorisch gealterten Oozyte sowie daraus resultierender 2-Zell-Embryonen weitergehend zu analysieren.

Zunächst wurde durch qRT-PCR der Poly(A)-Anteil von 11 Maternaleffektgenen nach postovulatorischer Alterung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach 24 h Alterung der Poly(A)-Schwanz von 6 maternalen Effektgenen im Vergleich zu Kontroll-Oozyten signifikant verkürzt war. Um diese Reduktion zu validieren und quantifizieren, wurde ein extension Poly(A) Test etabliert welcher die exakte Länge des Poly(A)-Schwanzes eines Transkripts misst. Dieser Test wurde repräsentativ für die Gene *Dnmt1* und *Zar1* durchgeführt. Dabei konnte für *Dnmt1* eine Deadenylierung und für *Zar1* keine Änderung der Länge des Poly(A)-Schwanzes nach 24 h postovulatorischer Alterung nachgewiesen werden. Diese Versuchsergebnisse bestätigten die Resultate der qRT-PCR und zeigten zudem, dass eine postovulatorische Alterung Einfluss auf die Poly(A)-Schwanzlänge von Maternaleffektgenen hat. Außerdem wurde durch immunhistologische Methoden eine signifikante Abnahme der Trimethylierung am H3K9 nach postovulatorischer Alterung ermittelt.

Um zu untersuchen, ob die postovulatorische Alterung auch einen Effekt auf die frühe embryonale Entwicklung hat, wurden IVF Studien mit gealterten Oozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass nach 4, 6 und 8 h postovulatorischer Alterung keine Veränderungen in der relativen Anzahl an 2-Zell-Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden konnten. Allerdings wurde durch mikroskopische Analysen festgestellt, dass die Anzahl an 2-Zell-Embryonen mit sichtbaren Spermien im perivitellinen Raum nach 8 h postovulatorischer Alterung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht war. Dies deutet auf eine veränderte Struktur der Zona pellucida nach postovulatorischer Alterung hin. Die Analyse der zygotische Genomaktivierung (ZGA) in 2-Zell-Embryonen zeigte, dass eine postovulatorische Alterung von 4 h zu einer vorzeitigen ZGA führte, während nach 6 und 8 h Alterung eine signifikant verzögerte ZGA auftrat.

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass eine postovulatorische Alterung von Oozyten zu deutlichen molekularen Veränderungen in der Oozyte sowie auch in den daraus resultierenden Embryonen führt. Dies könnte schwerwiegende Folgen für die weitere Entwicklung des Embryos haben.

7. Summary

Postovulatory aging occurs if fertilization of the ovulated oocyte is delayed. During this delay, unfertilized oocytes undergo a time-dependent deterioration in quality, which results in lower fertilization- and implantation rates. The molecular mechanisms causing this decrease in oocyte competence comprises cell degradation including oxidative stress, chromosome anomalies and epigenetic changes (Miao *et al.* 2009). The aim of this study was to analyze molecular parameters of postovulatory aged oocytes and effects on their development to 2-cell embryos.

For this, the poly(A)-content of 11 maternal-effect genes was investigated after postovulatory aging by qRT-PCR. Shortening of the poly(A)-tail was observed for 6 maternal-effect genes after 24 h postovulatory aging compared to controls. In order to validate this reduction, an extension poly(A) test was established to measure the exact lengths of the poly(A)-tails of the two representative maternal-effect genes *Dnmt1* and *Zar1*. A reduction of poly(A)-tail length was observed for *Dnmt1* whereas no changes in poly(A)-tail length for *Zar1* were seen after 24 h postovulatory aging. This confirmed the qRT-PCR results and proved that postovulatory oocyte aging may affect the poly(A)-tail length of maternal-effect genes. Additionally, a significant reduction of trimethylation of histon H3(Lysin 9) was observed in postovulatory aged oocytes.

To investigate possible effects of postovulatory oocyte aging on their development to the 2-cell embryos after fertilization, IVF studies were conducted. No differences in the relative amount of 2-cell embryos were shown after 4, 6 or 8 hours postovulatory oocyte aging compared to control oocytes. However, a significant increase of sperms in the perivitelline space of 2-cell embryos after 8 hours postovulatory aging was observed, which indicated an altered structure of the zona pellucida after postovulatory aging.

Analysis of zygotic genome activation (ZGA) was examined in 2-cell embryos after fertilization of postovulatory aged oocytes. After 4 hours postovulatory aging an increase in ZGA was observed in the resulting 2-cell embryo, whereas after 6 and 8 hours postovulatory aging ZGA significantly decreased in the 2-cell embryos.

In summary, it was shown that postovulatory aging strongly affects molecular parameters in the oocyte and the resulting 2-cell embryo and could have major implications of further development of the embryo.

8. Literaturverzeichnis

- Acevedo, N., Smith, G.D., 2005. Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. *Front Biosci* 10, 2335-45.
- Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J.P., Thompson, E.M., 1997. Differential h4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124 (22), 4615-25.
- Aegerter, S., Jalabert, B., Bobe, J., 2005. Large scale real-time pcr analysis of mrna abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev* 72 (3), 377-85.
- Albano, C., Smitz, J., Camus, M., Riethmuller-Winzen, H., Van Steirteghem, A., Devroey, P., 1997. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist cetorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 67 (5), 917-22.
- Aoki, F., Worrad, D.M., Schultz, R.M., 1997. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181 (2), 296-307.
- Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., Shirakawa, M., 2008. Recognition of hemimethylated DNA by the sra protein Uhrf1 by a base-flipping mechanism. *Nature* 455 (7214), 818-21.
- Austin, C.R., 1974. Principles of fertilization. *Proc R Soc Med* 67 (9), 925-7.
- Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., Paynton, B.V., 1985. Changes in total rna, polyadenylated rna, and actin mrna during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 108 (2), 325-31.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Vintersten Nagy, K., Nagy, A., 2013. Manipulating the mouse embryo. In: Press, C. ed. *Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual*. Inglis, John, New York, pp. 604-608.
- Benoit, P., Papin, C., Kwak, J.E., Wickens, M., Simonelig, M., 2008. Pap- and gld-2-type poly(a) polymerases are required sequentially in cytoplasmic polyadenylation and oogenesis in drosophila. *Development* 135 (11), 1969-79.
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S., 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332 (6163), 459-61.
- Brown, C.E., Sachs, A.B., 1998. Poly(a) tail length control in *saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol* 18 (11), 6548-59.

- Bultman, S.J., Gebuhr, T.C., Pan, H., Svoboda, P., Schultz, R.M., Magnuson, T., 2006. Maternal *brg1* regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 20 (13), 1744-54.
- Burgers, W.A., Fuks, F., Kouzarides, T., 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 18 (6), 275-7.
- Burns, D.M., D'ambrogio, A., Nottrott, S., Richter, J.D., 2011. Cpeb and two poly(a) polymerases control mir-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature* 473 (7345), 105-8.
- Byers, S.L., Payson, S.J., Taft, R.A., 2006. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 65 (9), 1716-26.
- Cedar, H., Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10 (5), 295-304.
- Charlesworth, A., Meijer, H.A., De Moor, C.H., 2013. Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4 (4), 437-61.
- Cho, S., Park, J.S., Kwon, S., Kang, Y.K., 2012. Dynamics of *setdb1* expression in early mouse development. *Gene Expr Patterns* 12 (5-6), 213-8.
- Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., Helin, K., 2006. The putative oncogene *gasc1* demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* 442 (7100), 307-11.
- Cui, M.S., Wang, X.L., Tang, D.W., Zhang, J., Liu, Y., Zeng, S.M., 2011. Acetylation of H4K12 in porcine oocytes during in vitro aging: Potential role of ooplasmic reactive oxygen species. *Theriogenology* 75 (4), 638-46.
- De Leon, V., Johnson, A., Bachvarova, R., 1983. Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly(a) + rna in mouse oocytes. *Dev Biol* 98 (2), 400-8.
- Denis, C.L., Chen, J., 2003. The ccr4-not complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73, 221-50.
- Deutsches-Ivf-Register, 2014. *Journal für reproduktionsmedizin und endokrinologie*. Krause & Pachernegg GmbH.
- Ducibella, T., 1998. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology* 49 (1), 53-65.
- Ducibella, T., Duffy, P., Reindollar, R., Su, B., 1990. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol Reprod* 43 (5), 870-6.
- Dumoulin, J.C., Coonen, E., Bras, M., Van Wissen, L.C., Ignoul-Vanvuchelen, R., Bergers-Jansen, J.M., Derhaag, J.G., Geraedts, J.P., Evers, J.L., 2000. Comparison of in-vitro

- development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15 (2), 402-9.
- Dunckley, T., Parker, R., 1999. The dcp2 protein is required for mrna decapping in *saccharomyces cerevisiae* and contains a functional mutt motif. *EMBO J* 18 (19), 5411-22.
- Eckmann, C.R., Rammelt, C., Wahle, E., 2011. Control of poly(a) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2 (3), 348-61.
- Eichenlaub-Ritter, U., Chandley, A.C., Gosden, R.G., 1986. Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: An immunofluorescence study. *Chromosoma* 94 (5), 337-45.
- Fernandes, R., Tsuda, C., Perumalsamy, A.L., Naranian, T., Chong, J., Acton, B.M., Tong, Z.B., Nelson, L.M., Jurisicova, A., 2012. Nlrp5 mediates mitochondrial function in mouse oocytes and embryos. *Biol Reprod* 86 (5), 138, 1-10.
- Foygel, K., Choi, B., Jun, S., Leong, D.E., Lee, A., Wong, C.C., Zuo, E., Eckart, M., Reijo Pera, R.A., Wong, W.H., Yao, M.W., 2008. A novel and critical role for oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS One* 3 (12), e4109.
- Gohin, M., Fournier, E., Dufort, I., Sirard, M.A., 2014. Discovery, identification and sequence analysis of rnas selected for very short or long poly a tail in immature bovine oocytes. *Mol Hum Reprod* 20 (2), 127-38.
- Goto, Y., Noda, Y., Mori, T., Nakano, M., 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 15 (1), 69-75.
- Gray, R.H., Simpson, J.L., Kambic, R.T., Queenan, J.T., Mena, P., Perez, A., Barbato, M., 1995. Timing of conception and the risk of spontaneous abortion among pregnancies occurring during the use of natural family planning. *Am J Obstet Gynecol* 172 (5), 1567-72.
- Gu, L., Wang, Q., Sun, Q.Y., 2010. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle* 9 (10), 1942-50.
- Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S.G., Iqbal, K., Shi, Y.G., Deng, Z., Szabo, P.E., Pfeifer, G.P., Li, J., Xu, G.L., 2011. The role of tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477 (7366), 606-10.
- Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S., 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6 (1), 117-31.

- Herrler, A., Beier, H.M., 1998. Die beurteilung der eizellreifung und frühen embryonalentwicklung bei der assistierten reproduktion. *Reproduktionsmedizin* 14 (2), 131-142.
- Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., Sasaki, H., 2008. Maternal and zygotic dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 22 (12), 1607-16.
- Hsieh, C.L., 1999. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, dnmt3a and dnmt3b. *Mol Cell Biol* 19 (12), 8211-8.
- Huang, J.C., Yan, L.Y., Lei, Z.L., Miao, Y.L., Shi, L.H., Yang, J.W., Wang, Q., Ouyang, Y.C., Sun, Q.Y., Chen, D.Y., 2007. Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. *Biol Reprod* 77 (4), 666-70.
- Igarashi, H., Knott, J.G., Schultz, R.M., Williams, C.J., 2007. Alterations of plcbeta1 in mouse eggs change calcium oscillatory behavior following fertilization. *Dev Biol* 312 (1), 321-30.
- Imamura, T., Kerjean, A., Heams, T., Kupiec, J.J., Thenevin, C., Paldi, A., 2005. Dynamic cpg and non-cpg methylation of the peg1/mest gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J Biol Chem* 280 (20), 20171-5.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., Cook, P.R., 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12 (3), 1059-65.
- Janicke, A., Vancuylenberg, J., Boag, P.R., Traven, A., Beilharz, T.H., 2012. Epat: A simple method to tag adenylated rna to measure poly(a)-tail length and other 3' rna applications. *RNA* 18 (6), 1289-95.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293 (5532), 1074-80.
- Judson, H., Hayward, B.E., Sheridan, E., Bonthron, D.T., 2002. A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 416 (6880), 539-42.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 2002. Histologie. In: Guannabara Koogan, S.A. ed. *Histologie*. Springer, Berlin, pp. 410-411.
- Kageyama, S., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., Aoki, F., 2007. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 133 (1), 85-94.
- Kang, M.K., Han, S.J., 2011. Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB Rep* 44 (3), 147-57.
- Karimi, M.M., Goyal, P., Maksakova, I.A., Bilenky, M., Leung, D., Tang, J.X., Shinkai, Y., Mager, D.L., Jones, S., Hirst, M., Lorincz, M.C., 2011. DNA methylation and setdb1/h3k9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mescs. *Cell Stem Cell* 8 (6), 676-87.

- Kim, B., Zhang, X., Kan, R., Cohen, R., Mukai, C., Travis, A.J., Coonrod, S.A., 2014. The role of mater in endoplasmic reticulum distribution and calcium homeostasis in mouse oocytes. *Dev Biol* 386 (2), 331-9.
- Knowland, J., Graham, C., 1972. Rna synthesis at the two-cell stage of mouse development. *J Embryol Exp Morphol* 27 (1), 167-76.
- Kosubek, A., Klein-Hitpass, L., Rademacher, K., Horsthemke, B., Ryffel, G.U., 2010. Aging of xenopus tropicalis eggs leads to deadenylation of a specific set of maternal mRNAs and loss of developmental potential. *PLoS One* 5 (10), e13532.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128 (4), 693-705.
- Lacham-Kaplan, O., Trounson, A., 2008. Reduced developmental competence of immature, in-vitro matured and postovulatory aged mouse oocytes following ivf and icsi. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 58.
- Lee, A.R., Ha, L.T., Kishigami, S., Hosoi, Y., 2014. Abnormal lysine acetylation with postovulatory oocyte aging. *Reprod Med Biol* 13 (2), 81-86.
- Li, L., Baibakov, B., Dean, J., 2008a. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Dev Cell* 15 (3), 416-25.
- Li, L., Zheng, P., Dean, J., 2010. Maternal control of early mouse development. *Development* 137 (6), 859-70.
- Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., Ferguson-Smith, A.C., 2008b. A maternal-zygotic effect gene, *zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 15 (4), 547-57.
- Liang, X.W., Zhu, J.Q., Miao, Y.L., Liu, J.H., Wei, L., Lu, S.S., Hou, Y., Schatten, H., Lu, K.H., Sun, Q.Y., 2008. Loss of methylation imprint of *snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 371 (1), 16-21.
- Longo, F.J., 1980. Aging of mouse eggs in vivo and in vitro. *Gamete Research* 3 (4), 379-393.
- Lord, T., Nixon, B., Jones, K.T., Aitken, R.J., 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biol Reprod* 88 (3), 67.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389 (6648), 251-60.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. *Histologie*. Thieme, Stuttgart.
- Ma, W., Zhang, D., Hou, Y., Li, Y.H., Sun, Q.Y., Sun, X.F., Wang, W.H., 2005. Reduced expression of *mad2*, *bcl2*, and map kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biol Reprod* 72 (2), 373-83.

- Magnani, L., Cabot, R.A., 2009. Manipulation of *smarca2* and *smarca4* transcript levels in porcine embryos differentially alters development and expression of *smarca1*, *sox2*, *nanog*, and *eif1*. *Reproduction* 137 (1), 23-33.
- Majumder, S., Depamphilis, M.L., 1995. A unique role for enhancers is revealed during early mouse development. *Bioessays* 17 (10), 879-89.
- Manosalva, I., Gonzalez, A., 2010. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology* 74 (9), 1539-47.
- Marston, J.H., Chang, M.C., 1964. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J Exp Zool* 155, 237-51.
- Meijer, H.A., Bushell, M., Hill, K., Gant, T.W., Willis, A.E., Jones, P., De Moor, C.H., 2007. A novel method for poly(a) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(a) tail in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35 (19), e132.
- Messerschmidt, D.M., 2012. Should I stay or should I go: Protection and maintenance of DNA methylation at imprinted genes. *Epigenetics* 7 (9), 969-75.
- Messerschmidt, D.M., De Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A., Knowles, B.B., 2012. *Trim28* is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science* 335 (6075), 1499-502.
- Meyer, E., Lim, D., Pasha, S., Tee, L.J., Rahman, F., Yates, J.R., Woods, C.G., Reik, W., Maher, E.R., 2009. Germline mutation in *nlrp2* (*nalp2*) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann syndrome). *PLoS Genet* 5 (3), e1000423.
- Miao, Y.L., Kikuchi, K., Sun, Q.Y., Schatten, H., 2009. Oocyte aging: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 15 (5), 573-85.
- Miao, Y.L., Liu, X.Y., Qiao, T.W., Miao, D.Q., Luo, M.J., Tan, J.H., 2005. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* 73 (5), 1025-31.
- Minami, N., Suzuki, T., Tsukamoto, S., 2007. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 53 (4), 707-15.
- Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., Bagga, R., Kircheisen, R., Ao, A., Ratti, B., Hanash, S., Rouleau, G.A., Slim, R., 2006. Mutations in *nalp7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 38 (3), 300-2.
- Nakanishi, T., Kumagai, S., Kimura, M., Watanabe, H., Sakurai, T., Kimura, M., Kashiwabara, S., Baba, T., 2007. Disruption of mouse poly(a) polymerase *mgld-2* does not alter polyadenylation status in oocytes and somatic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364 (1), 14-9.

- Newport, J., Spann, T., Kanki, J., Forbes, D., 1985. The role of mitotic factors in regulating the timing of the midblastula transition in xenopus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 651-6.
- Nogues, C., Ponsa, M., Vidal, F., Boada, M., Egozcue, J., 1988. Effects of aging on the zona pellucida surface of mouse oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 5 (4), 225-9.
- O'carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D., Jenuwein, T., 2000. Isolation and characterization of *suv39h2*, a second histone h3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 20 (24), 9423-33.
- Okada, A., Inomata, K., Nagae, T., 1993. Spontaneous cortical granule release and alteration of zona pellucida properties during and after meiotic maturation of mouse oocytes. *Anat Rec* 237 (4), 518-26.
- Olszanska, B., Borgul, A., 1993. Maternal rna content in oocytes of several mammalian and avian species. *J Exp Zool* 265 (3), 317-20.
- Park, K.S., Song, H.B., Chun, S.S., 2000. Late fertilization of unfertilized human oocytes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles: Conventional insemination versus icsi. *J Assist Reprod Genet* 17 (8), 419-24.
- Paynton, B.V., Rempel, R., Bachvarova, R., 1988. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mrnas during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 129 (2), 304-14.
- Peng, H., Chang, B., Lu, C., Su, J., Wu, Y., Lv, P., Wang, Y., Liu, J., Zhang, B., Quan, F., Guo, Z., Zhang, Y., 2012. *Nlrp2*, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS One* 7 (1), e30344.
- Peterson, C.L., Laniel, M.A., 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14 (14), R546-51.
- Piccioni, F., Zappavigna, V., Verrotti, A.C., 2005. Translational regulation during oogenesis and early development: The cap-poly(a) tail relationship. *C R Biol* 328 (10-11), 863-81.
- Prasath, E.B., Chan, M.L., Wong, W.H., Lim, C.J., Tharmalingam, M.D., Hendricks, M., Loh, S.F., Chia, Y.N., 2014. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod* 29 (2), 276-8.
- Qian, Y., Tu, J., Tang, N.L., Kong, G.W., Chung, J.P., Chan, W.Y., Lee, T.L., 2015. Dynamic changes of DNA epigenetic marks in mouse oocytes during natural and accelerated aging. *Int J Biochem Cell Biol*.

- Ratnam, S., Mertineit, C., Ding, F., Howell, C.Y., Clarke, H.J., Bestor, T.H., Chaillet, J.R., Trasler, J.M., 2002. Dynamics of dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245 (2), 304-14.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone h3 methyltransferases. *Nature* 406 (6796), 593-9.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. 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* 61 (2), 234-48.
- Salles, F.J., Strickland, S., 1995. Rapid and sensitive analysis of mrna polyadenylation states by pcr. *PCR Methods Appl* 4 (6), 317-21.
- Sarmiento, O.F., Digilio, L.C., Wang, Y., Perlin, J., Herr, J.C., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2004. Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J Cell Sci* 117 (Pt 19), 4449-59.
- Schmid, M., Kuchler, B., Eckmann, C.R., 2009. Two conserved regulatory cytoplasmic poly(a) polymerases, gld-4 and gld-2, regulate meiotic progression in *c. Elegans*. *Genes Dev* 23 (7), 824-36.
- Schultz, R.M., 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15 (8), 531-8.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B.Z., Cedar, H., 1999. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 22 (2), 203-6.
- Steuerwald, N.M., Steuerwald, M.D., Mailhes, J.B., 2005. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased mad2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Reprod* 11 (9), 623-30.
- Stevens, A., Maupin, M.K., 1987. A 5'----3' exoribonuclease of *saccharomyces cerevisiae*: Size and novel substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* 252 (2), 339-47.
- Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: Bmp15 and gdf9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135 (1), 111-21.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H., Bartel, D.P., 2014. Poly(a)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* 508 (7494), 66-71.
- Sutovsky, P., Schatten, G., 2000. Paternal contributions to the mammalian zygote: Fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 195, 1-65.

- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., Shinkai, Y., 2001. Set domain-containing protein, g9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone h3. *J Biol Chem* 276 (27), 25309-17.
- Takahashi, T., Igarashi, H., Amita, M., Hara, S., Matsuo, K., Kurachi, H., 2013. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *J Obstet Gynaecol Res* 39 (10), 1431-9.
- Takahashi, T., Saito, H., Hiroi, M., Doi, K., Takahashi, E., 2000. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 55 (3), 299-306.
- Takahashi, T., Takahashi, E., Igarashi, H., Tezuka, N., Kurachi, H., 2003. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev* 66 (2), 143-52.
- Tarin, J.J., Perez-Albala, S., Aguilar, A., Minarro, J., Hermenegildo, C., Cano, A., 1999. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: A two-generational study. *Biol Reprod* 61 (5), 1347-55.
- Thelie, A., Papillier, P., Pennetier, S., Perreau, C., Traverso, J.M., Uzbekova, S., Mermillod, P., Joly, C., Humblot, P., Dalbies-Tran, R., 2007. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol* 7, 125.
- Tian, X., Pascal, G., Monget, P., 2009. Evolution and functional divergence of nlrp genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 9, 202.
- Tong, Z.B., Gold, L., Pfeifer, K.E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C.A., Dean, J., Nelson, L.M., 2000. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 26 (3), 267-8.
- Trapphoff, T., El Hajj, N., Zechner, U., Haaf, T., Eichenlaub-Ritter, U., 2010. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum Reprod* 25 (12), 3025-42.
- Traverso, J.M., Donnay, I., Lequarre, A.S., 2005. Effects of polyadenylation inhibition on meiosis progression in relation to the polyadenylation status of cyclins a2 and b1 during in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 71 (1), 107-14.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., Parker, R., 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a ccr4p/pop2p/notp mrna deadenylase complex in *saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21 (6), 1427-36.
- Van Wissen, B., Bomsel-Helmreich, O., Debey, P., Eisenberg, C., Vautier, D., Pennehouat, G., 1991. Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after gnrrha treatment: An analysis of individual oocytes. *Hum Reprod* 6 (6), 879-84.

- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., Nissbeck, M., 2013. Poly(a)-specific ribonuclease (parn): An allosterically regulated, processive and mrna cap-interacting deadenylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48 (2), 192-209.
- Vitale, A.M., Calvert, M.E., Mallavarapu, M., Yurttas, P., Perlin, J., Herr, J., Coonrod, S., 2007. Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 74 (5), 608-16.
- Wada, T., Hara, M., Taneda, T., Qingfu, C., Takata, R., Moro, K., Takeda, K., Kishimoto, T., Handa, H., 2012. Antisense morpholino targeting just upstream from a poly(a) tail junction of maternal mrna removes the tail and inhibits translation. *Nucleic Acids Res* 40 (22), e173.
- Wang, J., Zhang, M., Zhang, Y., Kou, Z., Han, Z., Chen, D.Y., Sun, Q.Y., Gao, S., 2010. The histone demethylase *jmjd2c* is stage-specifically expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic development. *Biol Reprod* 82 (1), 105-11.
- Wang, Q., Latham, K.E., 1997. Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Mol Reprod Dev* 47 (3), 265-70.
- Wansink, D.G., Schul, W., Van Der Kraan, I., Van Steensel, B., Van Driel, R., De Jong, L., 1993. Fluorescent labeling of nascent rna reveals transcription by rna polymerase ii in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol* 122 (2), 283-93.
- Webb, M., Howlett, S.K., Maro, B., 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 95, 131-45.
- Weill, L., Belloc, E., Bava, F.A., Mendez, R., 2012. Translational control by changes in poly(a) tail length: Recycling mrnas. *Nat Struct Mol Biol* 19 (6), 577-85.
- West, E.R., Zelinski, M.B., Kondapalli, L.A., Gracia, C., Chang, J., Coutifaris, C., Critser, J., Stouffer, R.L., Shea, L.D., Woodruff, T.K., 2009. Preserving female fertility following cancer treatment: Current options and future possibilities. *Pediatr Blood Cancer* 53 (2), 289-95.
- Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., Baird, D.D., 1998. Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Hum Reprod* 13 (2), 394-7.
- Wilusz, C.J., Gao, M., Jones, C.L., Wilusz, J., Peltz, S.W., 2001. Poly(a)-binding proteins regulate both mrna deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *RNA* 7 (10), 1416-24.
- Wu, X., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., Bai, Y., Fitzpatrick, S.L., Matzuk, M.M., 2003. Zygote arrest 1 (*zar1*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 33 (2), 187-91.
- Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G.S., Schultz, R.M., Ducibella, T., 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: Time-dependent effects on m-phase exit, cortical granule

exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biol Reprod* 57 (4), 743-50.

Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V.G., 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 49 (1), 89-94.

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dynamik der DNA Methylierung in Keimzellen und während der frühen Embryonalentwicklung.....	14
Abbildung 2: Beispiel für eine Verknüpfung zwischen Histon- und DNA-Methylierung.....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung des LM-PAT.....	38
Abbildung 4: Schematische Darstellung des ePAT.....	40
Abbildung 5: Schematische Abbildung der mRNA-Fraktionierung.....	42
Abbildung 6: qRT-PCR von <i>in vivo</i> gereiften Oozyten nach (A) 12 h und (B) 24 h postovulatorischer Alterung.....	50
Abbildung 7: qRT-PCR von <i>in vitro</i> gereiften Oozyten nach 12 h postovulatorischer Alterung.....	51
Abbildung 8: Agarose-Gel der PCR Produkte des LM-PAT von <i>Gapdh</i> und <i>Hprt</i>	53
Abbildung 9: Agarose-Gel der Produkte des LM-PAT von Maternaleffektgenen.....	54
Abbildung 10: Agarose-Gel der Produkte des ePAT mit mRNA aus Ovargewebe der Maus.....	55
Abbildung 11: Agarose-Gel der DNA Produkte aus der Temperaturgradienten-PCR mit <i>Zar1</i> (A) und <i>Dnmt1</i> (B).....	56
Abbildung 12: Agarose-Gel der ePAT Produkte für <i>Dnmt1</i> und <i>Zar1</i>	57
Abbildung 13: Agarose-Gel der ePAT-Produkte mit TVN-Kontrolle.....	58
Abbildung 14: Elektropherogramm von mRNA aus Kontroll-Oozyten und aus 24 h postovulatorisch gealterten Oozyten.....	59
Abbildung 15: Agarose-Gel der PCR Produkte des ePAT der Maternaleffektgene <i>Dnmt1</i> und <i>Zar1</i>	60
Abbildung 16: Elektropherogramm des Agilent DNA Chips für die ePAT Produkte von <i>Dnmt1</i> und <i>Zar1</i>	61
Abbildung 17: Elektropherogramm des Agilent RNA Chips der RNA Fraktionen.....	63
Abbildung 18: Agarose-Gel der ePAT Produkte aus den mRNA Fraktionierungen 1-5 von <i>Dnmt1</i> und <i>Zar1</i>	64
Abbildung 19: Agarose-Gel der ePAT Produkte nach mRNA Fraktionierung von Kontroll- und postovulatorisch gealterten Oozyten.....	66
Abbildung 20: H3K9me3 Immunfluoreszenz an Oozyten.....	67
Abbildung 21: Relative Fluoreszenz-Signalintensität von H3K9me3 in Kontroll-Oozyten und nach 24 h postovulatorischer Alterung.....	68
Abbildung 22: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen nach IVF mit Gameten aus verschiedenen Mausstämmen.....	69

Abbildung 23: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen nach postovulatorischer Alterung.	70
Abbildung 24: Relative Anzahl an 2-Zell-Embryonen mit der genauen Anzahl an Spermien im perivitellinen Raum in den Kontrollen und nach 4 h, 6 h und 8 h postovulatorischer Alterung.	71
Abbildung 25: Relative Anzahl der 2-Zell-Embryonen mit mindestens einem Spermium im perivitellinen Raum nach IVF in Kontrollen und nach 4, 6 und 8 h postovulatorischer Alterung.....	72
Abbildung 26: Kontrolle der Spezifität zwei verschiedener sekundärer Antikörper zur BrUTP Färbung.....	74
Abbildung 27: Analyse der Spezifität des FITC-gekoppelten Maus anti-BrdU Antikörpers. ...	75
Abbildung 28: BrUTP und DNA Färbung in 2-Zell-Embryonen nach IVF mit postovulatorisch gealterten Oozyten.	76
Abbildung 29: Relative Signalintensität der BrUTP Fluoreszenz nach postovulatorischer Alterung.....	77

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wachstum und Reifung der Oocyte.....	10
Tabelle 2: Ansatz für die reverse Transkription.....	35
Tabelle 3: PCR-Profil für die reverse Transkription.....	36
Tabelle 4: Ansatz für die qPCR für das UPL-System und den Taqman-Assay	36
Tabelle 5: PCR-Profil der qPCR	36
Tabelle 6: Mastermix für den LM-PAT	38
Tabelle 7: Ansatz für die PCR des LM-PAT.....	39
Tabelle 8: PCR-Profil des LM-PAT	39
Tabelle 9: Ansatz des ePAT	40
Tabelle 10: PCR-Ansatz für ePAT	41
Tabelle 11: PCR-Profil des ePAT	41
Tabelle 12: RNA Konzentrationen der mRNA Fraktionen von Kontrollen und postovulatorisch gealterten Oozyten	65

9.3 Abkürzungen

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
ART	Assistierte Reproduktionstechniken
ATP	Adenosintriphosphat
Bl6	Inzuchtstamm C57Bl/6J

BI6/CBA	Hybridstamm C57Bl/6JxCBA/Ca
bp	<i>basepair</i>
BrUTP	5-Bromouridin-5'-Triphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CG	<i>cortical granules</i>
CGI	CpG Inseln
COC	Cumulus-Oocyte-Complex
CPE	<i>cytoplasmic polyadenylation element</i>
CPEB	<i>Cytoplasmic polyadenylation element binding protein</i>
CPSF	<i>Cleavage and polyadenylation specificity complex</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTPs	Dedesoxyribonukleosidtriphosphat
DMR	differentiell methylierte Regionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ePAT	extension Poly(A) Test
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
GV	<i>germinal vesical</i>
H3K9me3	Trimethylierung am Histon H3 am Lysin 9
HAT	Histon-Acetyltransferase
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
HDAC	Histon-Deacetylase
HMT	Histon-Methyltransferasen
HP1	Heterochromatin Protein 1
i.p.	intraperitoneal
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektionen
IE	internationale Einheit
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
LM-PAT	Ligation mediated Poly(A) Test

MII	Metaphase II
mRNA	messenger RNA
NP95	<i>nuclear protein 95</i>
PAP	Poly(A)-Polymerase
PARN	Poly(A)-spezifische Ribonuklease
PAS	Poly(A)-Signal
PB	<i>Physiological Buffer</i>
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
pre-mRNA	Precursor-mRNA
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
rEGF	<i>recombinant epidermal growth factor</i>
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RVF	Research Vitro Fert Medium
SSC	Saline sodium citrate
UPL	Universal Probe Library
ZGA	zygotische Genomaktivierung

9.4 Publikationen, Vorträge, Poster

Teile der Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden folgendermaßen veröffentlicht:

Publikationen:

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmner R. „*Pre- and postovulatory aging of murine oocytes affect the transcript level and poly(A) tail length of maternal effect genes.*” PLoS ONE 9(10): e108907. doi:10.1371/journal.pone.0108907

Trapphoff T, Heiligentag M, **Dankert D**, Demond H, Deutsch D, Fröhlich T, Arnold G, Grümmner R, Horsthemke B, Eichenlaub-Ritter U. „*Postovulatory aging affects dynamics of mRNA, expression and localization of maternal effect proteins and ATRX, spindle integrity and histone patterns in mouse oocytes.*“ eingereicht bei Human Reproduction (HUMREP-15-089)

Vorträge:

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmner R. „*Effekt der postovulatorischen Alterung von Maus-Oozyten auf die Poly(A) Schwanzlänge maternaler Effektgene.*“ 13. Arbeitskreis Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmner R. „*Poly(A) tail length of maternal-effect gene mRNAs in oocytes is influenced by postovulatory aging.*” 30th Annual meeting of Eshre

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmner R. „*Loss of H3K9 trimethylation after pre- and postovulatory aging in in vivo- and in vitro-grown oocytes.*” 13. Forschungstag der medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmer R. „*Abnahme der H3K9 Trimethylierung nach prä- und postovulatorischer Alterung in in vivo und in vitro gereiften Oozyten.*“ 14. Arbeitskreis Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin

Poster:

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmer R. “*Poly(A) content of maternal-effect gene mRNAs in murine oocytes is influenced by postovulatory aging.*” 7th International Conference On The Female Reproductive Tract

Demond H, **Dankert D**, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Grümmer R, Horsthemke B. “*Transcript level and Poly(A) content of maternal effect genes, spindle constitution and epigenetic histone modifications are influenced by pre- and postovulatory ageing in mouse metaphase II oocytes.*” 5. Dachverband Reproduktionsbiologie und –medizin (DVR)-Kongress

Dankert D, Demond H, Trapphoff T, Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U, Horsthemke B, Grümmer R. “*Poly(A) tail length of maternal-effect gene mRNAs in murine oocytes is influenced by postovulatory aging.*” Gesellschaft für Humangenetik (GfH)-Jahrestagung 2014

Demond H, **Dankert D**, Trapphoff T, Heiligentag M., Eichenlaub-Ritter U, Grümmer R, Horsthemke B. „*Preovulatory aging of murine oocytes affects transcript levels and poly(A) tail length of maternal effect genes.*“ 30th Annual meeting of Eshre

Dankert D, Demond H, Horsthemke B, Grümmer R. “*Impact of postovulatory oocyte aging on initiation of genome activation in murine 2-cell embryos.*” 31th Annual meeting of Eshre

9.5 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Grümmer und Herrn Prof. Horsthemke für die Überlassung des sehr interessanten Themas, den umfangreichen wissenschaftlichen Austausch sowie die Möglichkeit an zwei Instituten zu arbeiten und sich ein großes, neues Themenfeld zu erschließen. Außerdem danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit eigene Ideen einzubringen sowie für die Möglichkeit an zahlreichen wissenschaftlichen und weiterbildenden Kongressen und Workshops teilzunehmen, Kooperationspartner kennenzulernen und meine Ergebnisse zu präsentieren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Grümmer für die überaus warmherzige und kompetente Betreuung bedanken. Darüber hinaus danke ich ihr für jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und unermüdliche Motivation während der letzten vier Jahre. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit viel Freude abschließen konnte.

Für den Zusammenhalt während des Projektes und die Freundschaft in den letzten drei Jahren möchte ich ganz besonders Hannah Demond danken. Auch die unkomplizierte Zusammenarbeit, das gegenseitige Vertrauen und Aushelfen und die Gespräche haben mir während dieser Zeit viel Kraft gegeben.

Mein besonderer Dank gilt allen Kollegen und Kolleginnen aus dem Institut für Anatomie. Vor allem möchte ich Herrn Prof. Wennemuth für die Möglichkeit danken, dass ich meine Arbeit an seinem Institut fertigstellen konnte. Ein ganz großer Dank geht auch an Theresa Fahnenbruck, die einen Teil dieses Projektes mit äußerster Sorgfalt und viel Fleiß bearbeitet und mich auch sonst häufig im Labor unterstützt hat. Für die besonders lustige und unterhaltsame Atmosphäre in unserem Büro möchte ich vor allem Janine Dreesen, Jennifer Thomczik und Oliver Halfmann danken.

Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Eichenlaub-Ritter mit Tom Trapphoff und Martyna Heiligentag aus Bielefeld danke ich ganz herzlich für die wertvolle und unkomplizierte Kooperation und die dadurch entstandenen interessanten Diskussionen und gegenseitigen Hilfestellungen im Labor.

Zudem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die unentwegte moralische Unterstützung während der gesamten Zeit und im Besonderen Sarah Weidner und Jarek Szczyrba u.a. für das Korrigieren der Doktorarbeit. Eure Unterstützung hat dazu beigetragen, dass ich diese Zeit mit viel Freude und Kraft erlebt habe.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Auswirkung einer postovulatorischen Alterung auf molekulare Parameter und die Entwicklungskompetenz muriner Oozyten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Debora Dankert befürworte.

Essen, den _____

Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/ Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
--	---

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in