

**Aus dem Institut für Reproduktionsmedizin
der Tierärztlichen Hochschule Hannover**

**Experimentelle Untersuchungen
zur Expression von Genen im Eileiter vom
Schwein (*Sus scrofa* f.d.)**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Anja Seefeldt
aus Buchholz i. d. N.**

Hannover 2000

Angefertigt im Rahmen des Aufbaustudiums
an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. B. Meinecke

1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. B. Meinecke

2. Gutachter:

Prof. Dr. H. Niemann

Tag der mündlichen Prüfung:

30.05.2000

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literaturübersicht	11
2.1	Embryologie des Eileiters	11
2.2	Morphologie des Eileiters	11
2.3	Aufgaben des Eileiters	12
2.4	Sekretionsleistung des Eileiters	12
2.5	Genexpression	14
2.5.1	Aufbau der DNA	14
2.5.2	Aufbau der RNA	15
2.5.3	Transkription	16
2.5.4	Differentielle Genexpression	17
2.6	Differential Display	18
2.6.1	Technik des Differential Display	21
2.6.1.1	RNA-Gewinnung	21
2.6.1.2	Reverse Transkription	22
2.6.1.3	RT-PCR	23
2.6.2	Überprüfung der Genfragmente	24
2.6.3	Probleme des Differential Display	25
2.6.4	Sensitivität des Differential Display	28
2.6.5	Weitere Methoden	29
2.7	Wachstumsfaktor-System	30
2.7.1	Insulin-like-growth-factor	30
2.7.1.1	Entdeckung	30
2.7.1.2	Struktur und allgemeine Wirkung	30
2.7.1.3	Vorkommen und Wirkungen im Genitaltrakt	33
2.7.2	Epidermal-growth-factor	35
2.7.1.2	Struktur und allgemeine Wirkung	35
2.7.1.3	Vorkommen und Wirkungen im Genitaltrakt	36

3	Material und Methoden	39
3.1	Allgemeine Maßnahmen	39
3.2	Tiermaterial	39
3.3	Chemikalien und sonstige Hilfsmittel	40
3.4	Geräte	41
3.5	Gewinnung des Materials	42
3.6	Isolation der RNA	42
3.6.1	RNeasy Mini Kit/Quiagen	42
3.6.2	Herkömmliche Phenol-Chloroform-Extraktion	43
3.6.3	PeqGOLD RNAPURE/Peqlab	44
3.7	Konzentration und Reinheit der RNA	44
3.8	Verdau der DNA	45
3.9	Überprüfung der RNA-Integrität	45
3.10	Reverse Transkription	46
3.11	Amplifikation	47
3.12	Elektrophorese	48
3.12.1	Selbstgegossene Gele	48
3.12.2	Fertiggele	49
3.13	Isolation der Differentiellen Banden	50
3.14	Reamplifikation	51
3.15	Kontrolle auf Isolation von nur einer cDNA-Sorte pro differentieller Bande	51
3.16	Aufreinigung der PCR-Produkte	52
3.17	Ligation	52
3.18	Klonierung	53
3.19	PCR und Elektrophorese	53
3.20	Midi-Präp	54
3.21	Kontrolle auf Insert-Einbau	55
3.22	Sequenzierung	55
3.23	Untersuchung auf Wachstumsfaktoren	56
3.23.1	Reverse Transkription	56

3.23.2	Amplifikation	56
3.23.3	Elektrophorese	58
3.23.4	Sequenzierung	58
3.24	Statistische Auswertung	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Vergleich der verschiedenen Methoden zur RNA-Isolierung	59
4.2	Erster Versuchsteil: Differentielle Banden	61
4.3	Zweiter Versuchsteil: Differentielle Banden	63
4.4	Wachstumsfaktoren	65
4.4.1	IGF-1	65
4.4.2	IGFBP-2	66
4.4.3	EGF-precursor	66
5	Diskussion	69
5.1	Vergleich von drei Methoden der RNA-Isolierung	70
5.2	Wiederholbarkeit der differentiellen Banden	71
5.3	Schwierigkeiten bei der Sequenzierung der differentiellen Banden	73
5.4	Auftreten von differentiellen Banden innerhalb einer Gruppe	73
5.4.1	Genetische Variabilität	73
5.4.2	Inhomogenität der Proben hinsichtlich verschiedener Zellarten	74
5.4.3	Gruppenhomogenität	75
5.5	Wachstumsfaktoren	76
6	Zusammenfassung	79
6.1	Summary	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Anhang	105
8.1	Abkürzungen	105
8.2	Zusammensetzung von Lösungen und Puffern	108
8.3	Sequenzen der Wachstumsfaktoren/-bindungsproteine	110
	Danksagungen	

1 Einleitung

Die Eileiterschleimhaut ist im Rahmen des Zyklusgeschehens ständigen Veränderungen unterworfen. Dies gilt nicht nur für die Morphologie, sondern auch für die Bildung von Stoffwechselprodukten und deren Sekretion in das Eileiterlumen (IRITANI et al. 1974, WU et al. 1976, MASTROIANNI und GO 1979, MURRAY 1996).

Um überhaupt die Befruchtung der Eizelle zu ermöglichen und anschließend den Beginn der Entwicklung des Konzeptus unterstützen zu können, sind eine Vielzahl von Stoffen, wie Signalpeptide, Nährstoffe, Wachstumsfaktoren u.s.w. nötig (XIA et al. 1996, BUHI et al. 1997).. Viele davon gelangen nicht als Transsudat aus dem Serum in den Eileiter, sondern werden von dessen Schleimhautzellen synthetisiert und sezerniert. Dies bedeutet, daß in diesen Zellen zyklusabhängig die entsprechenden Gene aktiviert und deaktiviert werden müssen.

Mit den diversen Wachstumsfaktoren sind bereits einige Proteine bekannt, die den mitogenen Effekt der Sexualsteroiden an die Zellen des Reproduktionstraktes und der Früchte vermitteln (LIU et al. 1989). Es bestehen aber noch Differenzen darüber, wann die einzelnen Wachstumsfaktoren bei den verschiedenen Spezies produziert werden und welchen genauen biologischen Stellenwert sie besitzen.

Bisher wurden in der Regel Einzelgene oder eine Gruppe von Genen untersucht, deren Expression in Eileiterzellen während verschiedener Zyklusphasen oder bei trächtigen bzw. nicht-trächtigen Tieren analysiert wurden. Mit der Technik des Differential Display (LIANG und PARDEE 1992) kann auch die messengerRNA unbekannter Gene, die zyklusabhängig exprimiert werden, analysiert werden.

Da die In-vitro-Produktion von Schweineembryonen nach wie vor nur unbefriedigende Ergebnisse aufweist, erscheint es wünschenswert, weitere Informationen über die zyklusabhängig vom Eileiter produzierten Proteine zu erhalten, um diese möglicherweise als Mediumszusätze bei der In-vitro-Produktion zu verwenden.

Ziel dieser Arbeit ist es, bei präpuberalen, östrischen und interöstrischen Schweinen zyklusabhängige Unterschiede im Vorhandensein von messengerRNA als Ausdruck der Genexpression mit Hilfe des Differential Display darzustellen. Außerdem soll das Vorhandensein der messengerRNA vom Insulin-like-growth-factor-1, Insulin-like-growth-factor-binding-protein-2 und Epidermal-growth-factor-precursor in diesen Phasen mittels herkömmlicher RT-PCR überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Embryologie des Eileiters

Während der Embryonalentwicklung werden anfangs sowohl der Wolff'sche Gang, als auch der Müller'sche Gang angelegt. Dieser wird zunächst aus einer Rinne des Zölomepithels gebildet, ist also mesodermaler Herkunft. Im kranialen Bereich liegt er lateral des Wolff'schen Ganges, überkreuzt ihn weiter kaudal und befindet sich somit im hinteren Bereich medial. Im kranialen Teil verkleben die Ränder der Rinne und bilden so einen nach vorne, zur Bauchhöhle offenen Gang. Im kaudalen Bereich liegt der spätere Müller'sche Gang zuerst als solider Epithelstrang vor. Dieser kanalisiert dann und beide Seiten verschmelzen danach sowohl mit der Dorsalwand des Sinus urogenitalis, als auch, tierartlich verschieden weit, miteinander. Im weiblichen Geschlecht wird der kraniale Teil des Müller'schen Ganges zum Eileiter, der kaudale zu Uterus und Vagina.

2.2 Morphologie des Eileiters

Der Eileiter ist in die Abschnitte Infundibulum, Ampulle und Isthmus gegliedert. Das trichterförmige Infundibulum geht in die relativ weitleumige Ampulle über. Daran schließt sich der enge Isthmus an. Die dazwischenliegende ampullo-isthmische Verbindung wird von keiner speziellen anatomischen Struktur gebildet, hat aber die wichtige Funktion des Zurückhaltens der Oocyten bis zur Befruchtung (HALBERT et al. 1988). Die Wand des Eileiters besteht aus Schleimhaut, Muskulatur (außen Längs-, innen Ringmuskulatur) und Serosa. Die Mukosa bildet je nach Eileiter-Abschnitt eine unterschiedlich große Anzahl von Längsfalten aus. Die Schleimhaut wird aus cilientragenden Zellen und Drüsenzellen aufgebaut. FREDERICKS (1986) beschrieb zudem sogenannte „Peg-Cells“. Dabei könnte es sich um erschöpfte Drüsenzellen handeln. Das Mengenverhältnis der Zellarten zueinander variiert je nach Abschnitt des Eileiters (kaudal sind mehr Drüsen-Zellen vorhanden) und Zeitpunkt des Zyklus. Die Länge der Zilien ist im Ovulationszeitraum maximal.

2.3 Aufgaben des Eileiters

Nach der Paarung werden die Spermien im kaudalen Bereich des Eileiters bis zum Ovulationszeitpunkt gespeichert. Sie schmiegen sich dabei dicht an die Schleimhautfalten an. In wie weit der Eileiter die Kapazitation der Spermien beeinflusst, ist derzeit noch nicht geklärt. Die freigesetzten Oozyten werden vom Infundibulum aufgefangen und in Richtung Uterus transportiert. Dies wird durch einen verstärkten Zilienschlag unterstützt, so daß die Oozyten nach kurzer Zeit den Bereich des Überganges von Ampulle in den Isthmus erreichen (HUNTER 1974), wo auch die Befruchtung stattfindet. Beim Schwein dauert die Wanderung des Konzeptus durch den Eileiter zwei Tage. In dieser Zeit sorgt das Ovidukt durch eine entsprechende Sekretion für ein optimales Milieu zur Weiterentwicklung. Dies geschieht nicht nur durch die Bereitstellung von Nährstoffen und Puffersubstanzen, sondern auch durch die Sezernierung von bestimmten Proteinen, die die Genexpression im Embryo aktivieren und durch andere, die eine Immunreaktion des mütterlichen Organismus auf das Fremdprotein unterdrücken (OLIPHANT 1986).

2.4 Sekretionsleistung des Eileiters

Das Eileitersekret enthält u.a. Mineralstoffe, Glucose, Lactat und diverse Proteine. ROBERTS und Mitarbeiter (1975) stellten fest, daß die Proteinkonzentration in der Eileiterflüssigkeit geringer ist als im Serum und zogen daraus den Schluß, daß die Flüssigkeit durch aktive Sekretion ins Lumen gelangt.

Außerdem wurde beobachtet, daß sich sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung des Sekretes während des Brunstzyklus verändert (IRITANI et al. 1974). Zusätzlich wurde festgestellt, daß im Sekret auch Substanzen vorhanden waren, die nicht im Serum vorkommen (BUHI et al. 1989). Daraus wurde geschlossen, daß diese Bestandteile von den Schleimhautzellen sezerniert werden. Solche spezifischen Proteine, z.B. β -Glycoproteine, werden teilweise in Abhängigkeit von der Phase des Zyklus gebildet (MASTROIANNI et al. 1970; BRACKETT u. MASTROIANNI 1974). Beispiele für solche Proteine zeigt Tabelle 1. NIEDER und MACON (1987) stellten bei der Maus weitere Modifikationen in der Sekretzusammensetzung fest, je nachdem, ob Embryonen

vorhanden waren oder nicht. Untersuchungen von equinen Eileiterepithelkulturen alleine und in Co-Kultur mit Spermien wiesen Unterschiede in der Proteinsynthese nach (THOMAS et al. 1995). BUHI und Mitarbeiter (1989) fanden bei Vergleichen von Zellkulturen von gedeckten und nicht gedeckten Schweinen allerdings keine Unterschiede.

Tab. 1: Beispiele von Proteinen, die nur in speziellen Zeiträumen im Eileiter nachgewiesen wurden

untersuchte Art	nachgewiesenes Protein	nachgewiesener Zeitraum	Quelle
Schwein	335000-, 115000-, 85000-Mr-Glycoprotein	Proöstrus und Östrus	BUHI et al. 1989
Schwein	60000-, 20000-Mr-Glycoprotein	Diöstrus	BUHI et al. 1989
Schwein	100000-, 75000-, 85000-Mr-Östrus-assoziierte Proteine	Östrus	BUHI et al. 1990
Rind	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases	postovulatorisch	SATOH et al. 1994
Schwein	97-kDa-Protein	Östrus	WOLLENHAUPT et al. 1995
Schwein	Estrogen-dependent-oviductal secretory glycoprotein	Pro- bis Metöstrus	BUHI et al. 1996
Schwein	97000-, 33000-Mr-Protein	nach Estradiol-Behandlung	XIA et al. 1996
Rind	18 kDa-acidic fibroblast growth factor	Östrus	GABLER et al. 1997
Rind	16 kDa- und 18 kDa-basic fibroblast growth factor	Proöstrus	GABLER et al. 1997
Schwein	Tissue inhibitor of Metalloproteinases-1	postovulatorisch	BUHI et al. 1997
Schwein	Plasminogen-activator-inhibitor-1	präimplantative Phase	KOUBA et al. 2000

2.5 Genexpression

In Säugerzellen sind ca. 140.000 Gene vorhanden. Da in praktisch jeder Zelle die Ausstattung mit DNA gleich ist, müssen für eine unterschiedliche Funktion der Zellen verschiedene Gene aktiviert werden, im Normalfall zu jedem Zeitpunkt ca. 15.000. Bei den meisten davon handelt es sich um sogenannte „housekeeping-genes“, die in allen Zellen zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion nötig sind. Nicht nur für Entwicklung und Differenzierung (CAPECCHI 1994), sondern auch bei Alterungsprozessen und dem programmierten Zelltod liegen spezifische Aktivierungsmuster vor.

2.5.1 Aufbau der DNA

Der Zellkern nimmt ca. 10 % des Volumens der Zelle ein. Durch eine Doppelmembran, die durch Poren unterbrochen ist und mit dem Endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht, wird sein Inhalt vom Zytoplasma abgetrennt. Dieses ermöglicht es bei den Eukaryonten, im Gegensatz zur Situation bei den Prokaryonten, eine posttranskriptionelle Veränderung der RNA vorzunehmen. Hierdurch kann die Zelle effektiver arbeiten (ALBERTS et al. 1990).

Der Zellkern enthält das Chromatin und die sogenannte Kern-Matrix. Diese besteht aus speziellen Proteinen und soll an der Transkription und Replikation beteiligt sein. Genauer ist allerdings noch nicht bekannt.

Das Chromatin besteht aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen (u.a. RNA-Polymerasen). Bei den Histonen handelt es sich um Proteine aus vielen kleinen, positiv geladenen Aminosäuren, die eine feste Bindung an die DNA bewirken. Sie haben eine globuläre zentrale Domäne, einen flexiblen aminoterminalen Arm und oft auch einen carboxyterminalen Arm. Die Histone bilden ein Oktamer aus verschiedenen Bausteinen (H2A, H2B, H3, H4). Das Histon-Oktamer wird jeweils von zwei Windungen DNA umwickelt und bildet so das sogenannte Nukleosom (ISENBERG 1979, SMITH 1991). Zwischen den Nukleosomen befindet sich ein Stück gerade DNA, die Linker-DNA genannt wird (ARENTS und MOUDRIANAKIS 1993). Sie ist durchschnittlich zwischen 1 und 80 bp lang. Nach WU und Mitarbeitern (1986) wird die Bindungsaffinität der Histone zur DNA

durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung modifiziert, was für die Durchführung der Reamplifikation wichtig ist.

In transkriptionsaktiven Bereichen liegt das Chromatin in einer wenig kondensierten Form vor, die als Euchromatin bezeichnet wird. Daneben gibt es noch das sogenannte Heterochromatin (BROWN 1966). Es macht ca. 5-10% des gesamten Chromatins aus. Man kann zwischen konstitutivem und fakultativem Heterochromatin unterscheiden. Das konstitutive ist besonders häufig in den zentromernahen, repetitiven Bereichen, die als Satelliten-DNA bezeichnet werden, vorhanden. Dagegen wird das bei vielen Tierarten inaktivierte zweite X-Chromosom als fakultatives Heterochromatin bezeichnet.

2.5.2 Aufbau der RNA

Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA als Einzelstrang vor. Durch entsprechendes Falten werden als Tertiärstruktur Schleifen ausgebildet. Anstatt von Thymin wird in der RNA Uracil eingebaut, das sich wie Thymin mit Adenin paaren kann. Am 5'-Ende befindet sich eine sogenannte Cap-Struktur, die die sofortige Degradation der RNA verhindert. Am 3'-Ende ist bei praktisch allen eukaryotischen mRNAs ein sogenannter Poly(A)-Schwanz vorhanden, der aus fast genau 250 Adenyl-Resten besteht. Er beschleunigt den Translationsbeginn und bestimmt die mRNA-Stabilität (KELLER 1995; WAHLE und KELLER 1996).

Messenger-RNA ohne Poly(A)-Schwanz wird vermutlich schnell abgebaut und würde bei Bestehenbleiben eine schlechte Matrize für die Translation abgeben (COLGAN et al. 1996).

Im Gegensatz zur zytoplasmatischen mRNA enthält die gerade transkribierte mRNA noch sogenannte Introns. Dies sind nicht codierende Bereiche von stark variierender Länge. Im Rahmen des Genspleißens werden diese Bereiche entfernt (CHAMBON 1981), so daß letztendlich die reife mRNA nur noch aus den codierenden Exons besteht.

2.5.3 Transkription

Zunächst bindet die RNA-Polymerase an den Promotor. Hierbei handelt es sich um eine spezielle DNA-Sequenz, zu der die RNA-Polymerase eine sehr starke Affinität hat. Er kann bestimmen, welcher DNA-Strang transkribiert wird, weil die Polymerase nur vom 5'-Ende in 3'-Richtung arbeiten kann. Stromaufwärts bei -25 (d.h. 25 Nukleotide oberhalb von der Startstelle der Transkription aus gerechnet) liegt die sogenannte TATA-Box und bei -35 eine weitere konservierte Sequenz. Je weniger Mutationen an diesen Stellen vorkommen, desto besser funktioniert der Promotor. Sogenannte Transkriptionsfaktoren, die unabhängig von der Polymerase an die DNA binden, sind bei Eukaryonten zur Erkennung des Promotors nötig (BROWN 1984).

Nach der Bindung des Promotors werden die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt. Um dabei ein Verdrillen zu verhindern, wird ein Strang kurzzeitig geöffnet.

Es kommen drei verschiedene Klassen von Polymerasen, d.h. Enzymen, die die RNA synthetisieren, in der Eukaryonten-Zelle vor. Klasse I synthetisiert ribosomale RNA (rRNA), Klasse II synthetisiert mRNA und kleine RNAs (diese bilden im Kern mit Proteinen sogenannte „small nuclear ribonucleoproteins“ und vermitteln unter anderem das Spleißen der RNA) und Klasse III synthetisiert eine Reihe sehr kleiner stabiler RNAs. Die RNA-Polymerase II besitzt mehrere Transkriptionseinheiten (NEVINS 1983).

Nach dem Öffnen des DNA-Stranges kann die Polymerase an diesem entlangwandern. Dabei synthetisiert die Polymerase über die Terminationssequenz hinaus und fällt erst später ab. Zunächst wird dabei ein DNA-RNA-Hybrid gebildet. Dann wird der RNA-Strang abgelöst und die beiden komplementären DNA-Stränge können wieder untereinander Bindungen ausbilden. Danach wird vom 3'-Ende der mRNA, an der Stelle, an der die Termination vorgesehen ist, ein nicht-kodierendes Fragment abgespalten und direkt im Anschluß daran mittels Polyadenylierung der Poly(A)-Schwanz angehängt. Als Hinweis für die Abspaltungsstelle liegt die Sequenz AAUAAA vor und stromabwärts der Spaltungsstelle entweder ein Poly-U-Stück oder eine G- und U-reiche Sequenz (WAHLE und KELLER 1996). Der entfernte Strang wird aufgrund der fehlenden Cap-Struktur rasch abgebaut.

Um das RNA-Molekül vor einem sofortigen Abbau zu schützen, wird schon während der Transkription, und zwar nachdem ca. 30 Nucleotide aneinandergehängt wurden, am 5'-Ende des neuen RNA-Stranges eine sogenannte Cap-Struktur angehängt. Diese besteht aus einem 7-Methyl-guanosinrest und Triphosphat. Die Verknüpfung kann mit einer Methylierung weiterer Nucleotide verbunden sein (SHUMAN und MOSS, 1990).

Nach Ausschleusung der mRNA aus dem Kern können weitere, als RNA-Editing bezeichnete Prozesse ablaufen (SCOTT 1995). Hierbei wird die mRNA durch Insertion, Deletion oder Substitution von Nucleotiden weiter verändert.

2.5.4 Differentielle Genexpression

Früher wurde vermutet, daß während der Differenzierung irreversibel genetische Informationen verloren gehen würden. Dies wurde aber dadurch widerlegt, daß nach Injektion der DNA aus Darmzellen von Fröschen in enukleierte Eizellen sich vollständige Kaulquappen entwickelten. (GURDON 1962). In letzter Zeit ist der Beweis dafür, daß aus etablierten Zelllinien und differenzierten Zellen („Dolly“) nach ihrer Klonierung sogar intakte adulte Tiere entstehen können (CAMPBELL et al. 1996, WILMUT et al. 1997).

Tatsächlich erfolgt die Regulation der Genexpression hauptsächlich über die Kontrolle der Transkription: In der Zelle sind Gen-Regulatorproteine vorhanden, die an spezifische DNA-Sequenzen binden. Diese können sowohl in der Nähe des Promotors, als auch weit von diesem entfernt liegen (DAVISON et al. 1983, WASYLYK 1988) und durch eine entsprechende Schleifenbildung der DNA einen Einfluß auf den Promotor ausüben. Man unterscheidet außerdem noch zwischen DNA-Sequenzen, die die Aktivität vom gleichen oder von direkt benachbarten Genen beeinflussen (cis-acting), und Genen, die ein Produkt hervorbringen, das die Expression eines Gens, das woanders im Genom liegt, beeinflußt (trans-acting). Repressorproteine binden oft so, daß sie den Promotor teilweise verdecken, so daß die Polymerase nicht binden kann. Hingegen verbessern Aktivatorproteine die Bindungsfähigkeit der Polymerase an den Promotor. Die Regulatorproteine (=Operon) können z.B. durch vorhandenes Substrat einen

Konformationswechsel durchmachen, der ihre Affinität zur DNA erhöht oder erniedrigt.

In den Zellen liegen die Transkriptionsfaktoren während der meisten Zeit gebunden vor. Wenn die Zelle von einem Signal erreicht wird (z.B. durch Bindung eines Hormons an einen Rezeptor) wird der entsprechende Transkriptionsfaktor freigesetzt und kann mit hoher Spezifität im Promotor oder Enhancer binden.

Die verschiedenen RNA-Polymerase II-Startstellen sind unterschiedlich effektiv, so daß die entsprechenden Gene m.o.w. häufig transkribiert werden (HASTIE und BISHOP 1976, LEWIN 1980).

Die cis-acting DNA besteht aus kurzen (10-12bp) Erkennungssequenzen, die mit spezifischen Transkriptionsfaktoren interagieren können (MANIATIS et al. 1987).

Somit kann die Zelle mit ihrer Genexpression sowohl auf externe (z.B. Substratabweichungen oder Bindung von Liganden an Rezeptoren) als auf interne Veränderungen reagieren, ohne daß an den differenzierten Zellen Genomveränderungen auftreten müssen.

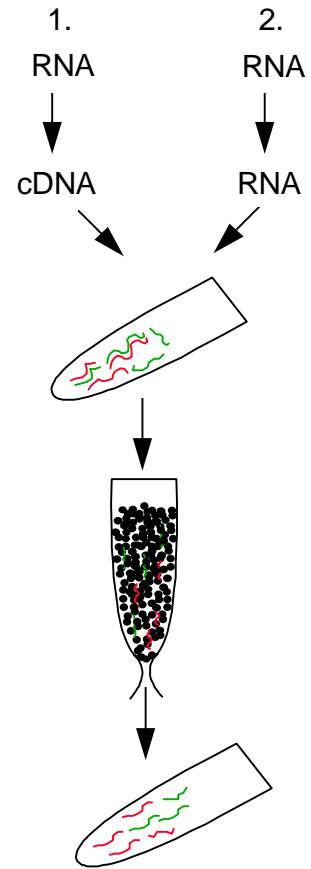
2.6 Differential Display

Höhere Organismen enthalten etwa 140.000 verschiedene Gene. Etwa 15.000 werden davon jeweils in der Zelle exprimiert. Um Unterschiede in der Genexpression von Zellen festzustellen, wurde zunächst die subtraktive Hybridisierung verwendet. Hierbei wird von einer Probe die mRNA, von der anderen die cDNA (nach reverser Transkription der mRNA) der zu untersuchenden Zellen in einem Gefäß zusammengebracht. Von den mRNAs, die in beiden Zellen vorhanden sind, hybridisiert die entsprechende mRNA mit der jeweiligen cDNA. Der nicht-hybridisierende Rest entspricht der mRNA, die nur von einer Zelle exprimiert wurde. Nachteile dieser Methode sind der Zeitaufwand und die Tatsache, daß immer nur zwei Proben miteinander verglichen werden können. Abbildung 1 verdeutlicht die Methode der subtraktiven Hybridisierung und die Unterschiede zum Differential Display. 1992 veröffentlichten LIANG und PARDEE die Beschreibung einer Methode, die sie „Differential Display“ nannten. Hierbei wird die isolierte mRNA mittels eines 3'-Anker-

Primers transkribiert. Die Primer haben alle ein 5'-Ende, das aus elf Thymidin-Resten besteht und somit an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden kann. Am 3'-Ende sind an der vorletzten Stelle die Nucleotide Adenin, Cytosin oder Guanin vorhanden. Als letzte Base kann außer diesen drei Nucleotiden auch Thymin vorkommen. Als 5'-Primer wird in der DDRT-PCR ein Zufallsprimer (Decamer) verwendet. Er bindet in unterschiedlicher Entfernung vom 3'-Primer, so daß die unterschiedlich langen cDNA-Stücke elektrophoretisch aufgetrennt werden können.

Idealerweise bindet der 5'-Primer in einer Entfernung von bis zu 500 bp, weil diese Größen auf dem Gel am besten aufgetrennt werden können. Die normale Länge einer gesamten mRNA beträgt durchschnittlich 1,2 kb.

Subtraktive Hybridisierung



Differential Display

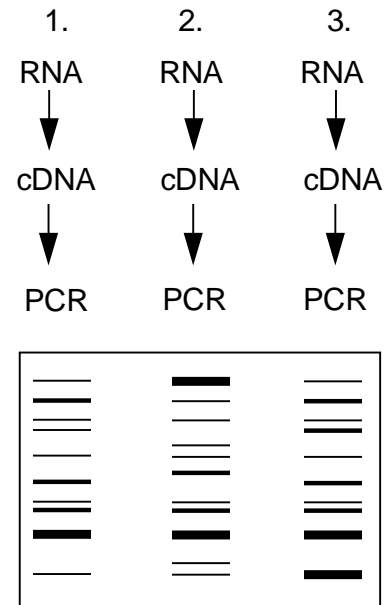


Abb. 1: Vergleich der Methoden "subtraktive Hybridisierung" und "Differential Display"

2.6.1 Technik des Differential Display

2.6.1.1 RNA-Gewinnung

Die Gesamt-RNA einer Zelle stellt sich als ein Gemisch aus mRNA, rRNA und tRNA dar. Nur die für das Differential Display benötigte mRNA zeichnet sich durch einen Poly(A)-Schwanz aus. Da die Downstream-Primer mit ihrem Poly(T)-Ende entsprechend konstruiert sind, spielt es keine Rolle, ob Gesamt-RNA oder selektiv mRNA aus dem Probenmaterial isoliert wird (LIANG u. PARDEE 1992; LIANG et al. 1993).

Vorteile der Gewinnung von Gesamt-RNA sind die größere Menge (mRNA macht nur einen Anteil von 5-10% an der Gesamt-RNA aus) und die Möglichkeit, die Integrität der isolierten RNA mittels Gelelektrophorese anhand der Schärfe der 18 S- und 28S-rRNA-Banden zu überprüfen.

Die Schwierigkeit der RNA-Isolierung liegt darin, daß die RNA sofort nach der Zerstörung der Zellmembran von den ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen abgebaut wird. Um dies zu verhindern, muß zum einen die Kontamination der Proben mit Ribonukleasen durch geeignete Maßnahmen verhindert werden, zum anderen die Aktivität der in der Probe vorhandenen Ribonukleasen unterbunden werden. Dies wird i.d.R. durch Guanidinium Chlorid (COX 1968) oder Guanidinium Thiocyanat (CHIRGWIN et al. 1979), die proteindenaturierend wirken, bewerkstelligt.

Die RNA wird entweder durch Fällung (Methode nach CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1986), durch Bindung an Säulen (z.B. QIAGEN/RNeasy Mini KitTM) oder durch Bindung an, mit Antikörpern beschichtete, magnetische Kugeln (DynabeadTM) isoliert.

Die Kontamination mit genomischer DNA würde in der RT-PCR zu deren Vermehrung führen und in der Elektrophorese falsche Banden erzeugen. Deshalb muß die DNA vor der Reversen Transkription mittels DNasen zerstört werden.

2.6.1.2 Reverse Transkription

Zunächst war nur bekannt, daß die Transkription von der DNA zur RNA stattfinden kann. Erst später wurden Viren entdeckt, die den umgekehrten Weg beschreiten. Diese Reaktion wurde Reverse Transkription genannt.

Am Anfang muß eine einsträngige Nukleinsäure vorliegen (bei der DNA durch Trennung des Doppelstranges). Daran hybridisiert ein Oligonukleotid, der Primer. Beim Differential Display wird hierfür ein relativ wenig Basen umfassendes Stück verwendet, das am 5'-terminalen Ende elf mal Thymin aufweist. Daran anschließend folgen zwei spezifische Basen. LIANG und PARDEE (1992) verwendeten zunächst Primer, bei denen an der vorletzten Stelle Adenin, Guanin oder Cytosin vorhanden waren (ein weiteres Thymin würde nur den Poly(T)-Teil verlängern) und am 3'-Ende alle vier Basen. Durch die entsprechenden Kombinationen kamen sie somit auf zwölf verschiedene Primer. In weiteren Untersuchungen (LIANG et al. 1993) beschrieben sie die Verwendung von nur noch vier, sogenannten degenerierten Oligo-(dT)-Primern, bei denen die zweite Base vom 3'-Ende an gerechnet unbestimmt ist, also ein Gemisch der drei Nucleotide Adenin, Guanin und Cytosin darstellt. Somit wurden dann Primer eingesetzt, die sich nur noch in der Base am 3'-terminalen Ende unterscheiden. Nach Feststellung der Autoren sind bei der Verwendung der degenerierten Primer nicht mehr Banden sichtbar als bei Verwendung von jeweils einem Original-Primer. Daraus schlossen sie, daß auch bei den nicht-degenerierten Primern Fehlverknüpfungen auftreten. Der Vorteil ist, daß die Verwendung von degenerierten Primern zu einer deutlichen Reduzierung der nötigen RT-Ansätze führt.

Die Reverse Transkriptase besteht aus zwei Aktivitäten, nämlich einer DNA-Polymerase und der Ribonuklease H, die den RNA-Strang eines DNA-RNA-Hybrids zu 5'-phosphoryl Oligomeren von 2-30 Nucleotiden bilden kann (BERGER et al. 1983). Die Reverse Transkriptase katalysiert die Reaktion, in der die freien Nucleotide (Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP), Desoxy-Thymintriphosphat (dTTP), Desoxy-Cytosintriphosphat (dCTP) und Desoxy-Guanosintriphosphat (dGTP)) mit ihrer 5'-Phosphatgruppe an die 3'-Hydroxylgruppe des vorhergehenden Nucleotids in Form einer Esterbindung angehängt werden. Die Basen sind immer komplementär zum RNA-Strang.

2.6.1.3 RT-PCR

Beim Differential Display wird die herkömmliche RT-PCR modifiziert verwendet. Das Template besteht aus der mittels der reversen Transkription hergestellten cDNA. Das Problem hierbei ist, daß von den aktiven Genen die mRNA in stark variierender Kopienzahl vorliegt. Die meisten mRNAs treten in weniger als 15 Kopien in einer Zelle auf (LUCE und BURROWS 1998). Unter den Bedingungen des Differential Display wird die cDNA, die in großer Menge vorhanden ist, bevorzugt amplifiziert. Oft beruhen aber Unterschiede in der Genexpression zweier Zellarten auf einer unterschiedlichen Expression von mRNA, die nur in wenigen Kopien in der Zelle vorkommt. Zudem macht die „Massen-mRNA“ nur einen kleinen Prozentsatz der gesamten mRNA aus (BERTIOLI et al. 1995). Somit kann nur die Gesamtmenge an eingesetzter cDNA optimiert werden, nicht diejenige für das einzelne Gen.

Als Downstream-Primer wird der schon in der Reversen Transkription verwendete Oligo-(dT)-Primer eingesetzt. Im Gegensatz zur herkömmlichen RT-PCR, die einen spezifischen Upstream-Primer verwendet, und somit ein Produkt von konstanter Länge synthetisiert wird, wird bei der PCR des Differential Display ein sogenannter Zufallsprimer eingesetzt. Da er möglichst unspezifisch hybridisieren soll, umfaßt er nur wenige Basen. Die kritische Mindestlänge sind hierbei neun Nukleotide. Dabei werden dann 20 bis 30 detektierbare Banden erzeugt. Bei einem Dekamer sind es 50 bis 100 (LIANG und PARDEE 1992), weshalb diese i.d.R. beim Differential Display Verwendung finden. Bei kürzeren Primern ist die Hybridisierung zwischen Primer und Template nicht ausreichend stabil (BAUER et al. 1993).

Bei der Verwendung der Autoradiographie zur Detektion der elektrophoretisch erzeugten Banden wird radioaktiv markiertes dATP in Konkurrenz zu unmarkiertem dATP eingesetzt. Um den Einbau von ³⁵S-dATP zu fördern, wird eine suboptimale Menge an dNTP verwendet. Außerdem wird dadurch die Spezifität der Amplifikation erhöht (LIANG u. PARDEE 1992).

Die Elongationszeit ist vergleichsweise kurz (30 sec.), um die Synthese von kurzen Produkten im Bereich von 100 bis 500 bp zu forcieren, die gut auf dem Sequenziergel aufgetrennt werden können.

Als Kontrolle muß auf jeden Fall eine Negativ-Kontrolle mitgeführt werden. Dabei wird in der PCR die cDNA durch Wasser ersetzt. Außerdem sollte der vollständige Verdau von genomischer DNA vor der reversen Transkription überprüft werden. Dazu wird ein PCR-Ansatz ohne vorherige reverse Transkription gemacht.

Die Verifikation der Produkte, die mit spezifischen Primern amplifiziert werden, kann durch Digestion mit Restriktionsenzymen (NATHANS und SMITH 1975), im Southern Blot (SOUTHERN 1975) oder mittels Sequenzierung (SANGER 1981) erfolgen. Im Differentiell Display ist dies nicht möglich, weil keine speziellen Produkte amplifiziert werden.

2.6.2 Überprüfung der Genfragmente

Schon in der Erstbeschreibung der Methode schlagen LIANG und PARDEE (1992) die Überprüfung der isolierten cDNA-Fragmente mittels Northern Blot vor.

Oft gibt es im Northern Blot allerdings keine Signale. Dies wird auf diverse Ursachen zurückgeführt: RNA-Konzentrationen unterhalb der Northern-Blot-Nachweisgrenze und Transkripte, die kürzer als 200 bp sind (LIANG et al. 1993), mehrere überlappende cDNA-Stücke in einer Bande (LI et al. 1994) oder die Isolierung eines Fragmentes, das im Bereich eines Introns liegt (LUCE u. BURROWS 1998).

Nach SCHULTE (1994) liegt die Nachweisgrenze des Northern Blots bei 10-20 µg Gesamt-RNA. Dies hebt den Vorteil des geringen Bedarfs im Differential Display wieder auf und ist bei vielen Geweben nicht zu realisieren. Daher wurden weitere Methoden beschrieben, die deutlich geringere RNA-Mengen benötigen:

WATSON und FLEMING (1994) beschrieben eine Methode der spezifischen RT-PCR. Sie setzten Oligo(dT)-Primer und Cap-Finder-Primer (die an die Cap-Struktur binden) ein und deckten somit die gesamte RNA ab. Anschließend wurde in der PCR mit einem Primerpaar, das spezifisch für die Sequenz des isolierten cDNA-Fragmentes ist, amplifiziert.

ROSS und Mitarbeiter (1997) versahen die gesamte cDNA mit Adaptermolekülen und amplifizierten diese. Mit den Produkten wurde anschließend ein Southern Blot durchgeführt. Der Vorteil ist hierbei, daß nur sehr geringe Mengen an RNA benötigt werden.

2.6.3 Probleme des Differential Display

Einer der Nachteile des Differential Display ist, daß die DDRT-PCR nicht quantitativ ist. Eine scheinbar differentielle Bande (d.h. auf dem Gel bei einer Probe gut, in den anderen Spuren nicht sichtbar) bedeutet nicht, daß nur dort die mRNA exprimiert wird, denn schon bei einem fünffachen Konzentrationsunterschied tritt dieses Phänomen auf (BAUER et al. 1994). Dies wird dadurch forciert, daß die Polymerase cDNA, die in großen Mengen vorkommt, bevorzugt amplifiziert, so daß es dadurch zu scheinbaren Unterschieden in der Expression kommen kann. Im Gegensatz dazu werden tatsächliche Unterschiede in der Genexpression zweier Zellarten häufig nicht sichtbar, wenn die entsprechende mRNA nur in wenigen Kopien in der Zelle vorkommt und nicht genug amplifiziert wird, um eine Bande zu erzeugen (BERTIOLI et al. 1995).

Die falsch positiven Banden stellten den Hauptgrund für die Modifikation des ursprünglichen Differential Display-Protokolls dar. Inzwischen sind eine Unzahl von Verbesserungen veröffentlicht worden, die oft aber neue Schwierigkeiten im Gefolge haben. Im Folgenden sollen beispielhaft Modifikationen des ursprünglichen Protokolls dargestellt werden:

1) verwendete RNA:

Um eine Isolation von Introns als differentielle mRNA auszuschließen, verwendeten SOMPAYRAC und Mitarbeiter (1995) bevorzugt zytoplasmatische RNA. Auch LUCE und BURROWS (1998) ziehen zytoplasmatische RNA vor.

Die Verwendung von ausschließlicher Poly(A)-RNA hat sich nicht bewährt, weil es durch eine Verschleppung von Oligo-(dT)-Fragmenten zu einer starken Hintergrundschwärzung kommt (LIANG et al. 1995).

2) Reverse Transkription:

Die Verwendung von den Original-3'-Primern wurde schnell durch degenerierte Primer ersetzt. Diese unterscheiden sich nur durch die endständige Base. Während LIANG und Mitarbeiter (1993) angeben, daß die Zahl der Banden bei den Originalprimern und den degenerierten Primern in etwa gleich ist, berichtet SOMMER (1994) von einer reduzierten Komplexität der Banden auf dem Gel.

3) PCR:

BERTIOLI und Mitarbeiter (1995) schlagen vor, die Konkurrenz zwischen den cDNA-Kopien durch einfachere Templates und längere, d.h. effizientere und spezifischere, Primer zu verringern, um so die Bevorzugung der „Massen“-RNA zu verringern.

LINSKENS und Mitarbeiter (1995) vermuteten, daß das häufig unterschiedliche Bandenmuster von wiederholten Gelen an der großen Zahl von Zyklen mit einer niedrigen Annealing-Temperatur, die somit wenig stringent sind, liegt. Deshalb benutzten sie Primer aus 22 Nukleotiden. Nur in den ersten Zyklen wurde eine niedrige Annealing-Temperatur von 41 °C verwendet, anschließend wurde die Annealing-Temperatur auf 60 °C erhöht. Damit konnte die Reproduzierbarkeit deutlich erhöht werden.

Zufällig ausgewählte 5'-Primer zeigen die Neigung, die 3'-untranslatierte Region zu bevorzugen. Dies kann dadurch verbessert werden, indem ausgewählte Primer mit einem A/T-Gehalt von 60-80 % verwendet werden, deren geringere Affinität durch die größere Länge von 12-14 Basenpaaren ausgeglichen wird (GRAF et al. 1997).

Um die Anzahl der notigen Ansätze zu reduzieren, indem mehr Banden detektierbar gemacht werden, verwendeten GUIMARAES und Mitarbeiter (1995) eine höhere 5'Primer-Konzentration (d.h. 30 µM), eine Annealing-Temperatur von 32°C, einen Kaltstart und 40 Zyklen.

Bei der Verwendung von ³⁵S-dATP kann es durch radioaktive Dämpfe durch die Erhitzung zu einer Kontamination des Thermo-Cyclers kommen. Bei der Verwendung von α-³²P-dCTP soll dies nicht der Fall sein (TRENTMANN et al. 1995).

4) Elektrophorese:

AN und Mitarbeiter (1995) benutzten statt radioaktiv markierter Nukleotiden die Chemilumineszenz, die sich in anderen Bereichen als sensitiv herausgestellt hat. Beim Differential Display können 100-200 Banden auf dem Gel festgestellt werden, was etwa der radioaktiven Markierung entspricht.

5) Isolation der differentiellen Banden und deren Charakterisierung:

Beim herkömmlichen Differential Display müssen die isolierten differentiellen Banden zweimal reamplifiziert werden. Die Sequenz wird danach in einem Vektor vermehrt und nach der Präparation sequenziert. Bei der Reamplifikation tritt durchschnittlich ein falscher Baseneinbau pro 200 bis 300 Nukleotiden auf, so daß sich die Fehler mit der Zahl der Zyklen der PCR summieren. Auch bei den anschließenden Schritten kann es zu Änderungen der ursprünglichen Sequenz kommen oder eine Kontamination stattfinden. Deshalb wäre eine direkte Sequenzierung der Produkte nach der Reamplifizierung der differentiellen Banden sehr wünschenswert. WANG und FEUERSTEIN (1995) hielten dies so für nicht möglich, weil die Primer zu kurz sind. Durch eine Verlängerung der ursprünglichen Primer um neun Basen (5'-Primer) bzw. um acht Basen (3'-Primer) jeweils am 5'-Ende (EcoRI Site für den 5'-Primer und BamHI Site am 3'-Primer) bei der Reamplifikation konnten sie direkt sequenzieren. Sie geben an, daß jegliche Sequenz zur Verlängerung verwendbar ist. Die Annealing-Temperatur betrug bei der Reamplifikation 42 °C.

Demgegenüber sequenzierten BUESS und Mitarbeiter (1997) direkt nach der Reamplifikation, die mit den kurzen Differential-Display-Upstreamprimern durchgeführt wurde. Die Sequenzierreaktion wurde dafür folgendermaßen modifiziert: 96°C für 30 sec., 40°C für 15 sec. und 60°C für 4 min. mit insgesamt 25 Zyklen.

Eine andere Methode der direkten Sequenzierung von differentiellen Banden verwendeten REEVES und Mitarbeiter (1995): Die extrahierte cDNA wird in ein PCRfragment cloning vector pCRTMIITM (Invitrogen) ligiert und danach mit einem poly(dT)Primer und einem T7 Promotor Primer reamplifiziert. Die cDNA konnte anschließend direkt sequenziert werden.

Die eluierten differentiellen Banden stellen oft nicht nur eine Sorte cDNA dar, sondern vielfach handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen cDNAs, die aber die gleiche Größe aufweisen. Dies könnte ein Grund für das Auftreten von falsch-positiven Banden sein. SMITH und Mitarbeiter (1997) beschreiben ein Verfahren, mit dem sie die einzelnen Bestandteile der Banden schnell identifizieren können. Dabei wird bei der PCR zunächst mittels entsprechender Primer cDNA hergestellt, die am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert ist. Die aus dem Gel extrahierte cDNA wird mit den gleichen Primern reamplifiziert und anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut. Die heterogenen fluoreszenzmarkierten 3'-Enden werden danach elektrophoretisch aufgetrennt, wobei jede cDNA

nach dem Verdau eine andere Größe (=Länge) besitzt. Somit ist dann die Anzahl der zu analysierenden verschiedenen Kolonien bekannt, wenn die cDNA kloniert wird.

Beim Differential Display entsteht, bedingt durch die Primer, ein Produkt, das nur die maximal ersten 300 Basen am 3'-Ende repräsentiert. Dies ist beim Vergleich mit Sequenzen in der Genbank zu beachten. Es handelt sich dabei i.d.R. um die 3'-untranslatierte Region, so daß die Sequenzen der differentiellen Banden oft nicht in der Genbank registriert sind. Außerdem variieren die Sequenzen stark von Organismus zu Organismus. Deshalb analysierten SOMPAYRAC und Mitarbeiter (1995) schrittweise die gesamte Länge der entsprechenden mRNA.

2.6.4 Sensitivität des Differential Display

Bei der Erstbeschreibung der Methode des Differential Display gingen die Autoren von einer großen Sensitivität aus. Ihnen gelang der Nachweis eines Thyminkinase-cDNA-Fragmentes bei der Maus, das in nur 30 Kopien pro Zelle vorliegt (LIANG u. PARDEE 1992).

Später kam es zu Zweifeln an der hohen Sensitivität, als bei definierten Transkripten, deren Expression in einem biologischen System bekannt war, die erwarteten differentiellen Banden nicht auftraten. Dieses Problem spielte besonders bei cDNA, die nur in wenigen Kopien vorlag, eine Rolle. BERTIOLI und Mitarbeiter (1995) konnten bei Untersuchungen an Pflanzen trotz teilweise großer morphologischer Unterschiede keine differentiellen Banden feststellen. In anderen Experimenten konnten nur dann differentielle Banden nachgewiesen werden, wenn es sich um mRNA-Arten handelte, die in mittlerer bis hoher Kopienzahl vorlag.

Durch die Summe von kleinen Fehlern bei der Amplifikation entstehen oft falsch positive differentielle Banden. Dadurch sind differentielle Banden bei Wiederholungen mit 20-40% Wahrscheinlichkeit nicht reproduzierbar (BAUER et al. 1994). SUN und Mitarbeiter (1994) geben den Prozentsatz von falsch-positiven differentiellen Banden mit mehr als 70% an. Dagegen sollen Banden, die bei einer Wiederholung reproduzierbar waren, mit 90 % Wahrscheinlichkeit auch bei weiteren Kontrollen auftreten (BAUER et al. 1994). Die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven differentiellen Banden kann außerdem dadurch verringert werden, daß jede Probe im Doppelansatz

aufgetragen wird (SOMPAYRAC et al. 1995, LUCE u. BURROWS 1998).

Nach LI und Mitarbeitern (1994) kann die Tatsache, daß es sich oft nicht um eine einzelne cDNA-Bande handelt, sondern aus mehreren überlappenden, die Ursache dafür sein, daß differentielle Banden häufig im Northern Blot nicht wiedergefunden werden. Entweder ist dann gar kein Signal vorhanden oder es ist in den verglichenen Proben nicht unterschiedlich.

Die Wahrscheinlichkeit, daß mit Hilfe des Differential Display ein neues Gen entdeckt wird, ist gering. In den meisten Fällen handelt es sich um Gene, die keinen Einfluß auf den Unterschied zwischen den untersuchten Zellen haben.

2.6.5 Weitere Methoden

Bei der (Re-)Kontamination der Proben mit genomischer DNA wird diese wie die cDNA amplifiziert und verursacht dann bei der Elektrophorese Banden. Im Gegensatz zum Differential Display ist die sogenannte RAP-PCR (RNA-arbitrarily primed PCR) unempfindlich gegenüber einer Kontamination mit genomischer DNA. Es entsteht nur ein Hintergrund-Grauschleier (WELSH et al. 1992). Die Methode dient hauptsächlich zum Mapping von Genen mit unbekannter Sequenz (WILLIAMS et al. 1990). Das Prinzip besteht darin, daß zwei Zufallsprimer verwendet werden, die aus jeweils 20 Basen bestehen. Im ersten Zyklus wird mit einer niedrigen Temperatur von 37-42 °C ein wenig stringentes Annealing vorgenommen. Die restlichen Zyklen haben eine Annealing-Temperatur von > 50 °C, so daß es hoch-stringent ist (BUCHNER u. MCKENZIE 1995).

Auf der Basis der subtraktiven Hybridisierung beruht die Representational Difference Analysis (RDA) von cDNA. Dies hat den Nachteil, daß nur zwei Proben miteinander verglichen werden können. Demgegenüber ist die RDA-cDNA im Gegensatz zum Differential Display schnell, sehr sensitiv und unempfindlich gegenüber falsch positiven Ergebnissen (HUBANK u. SCHATZ 1994).

2.7 Wachstumsfaktor-System

2.7.1 Insulin-like-growth-factor

2.7.1.1 Entdeckung

Die Somatomedine wurden entdeckt, als man feststellte, daß die Gabe von Wachstumshormon (=Somatotropin) bei In-vitro-Kulturen von Muskelzellen und Chondrozyten keinen Effekt erzeugte. Dies stand im Gegensatz zu Ergebnissen bei hypophysektomierten Ratten, bei denen die Substitution von Somatotropin normales Wachstum bewirkte. Daraus schloß man, daß Somatotropin seine Wirkung über Mediatoren ausüben mußte, die zunächst Somatomedine genannt wurden (SALMON u. DAUGHADAY 1957). Sie wurden später in Insulin-like-growth-factor umbenannt, weil sie außerdem Insulin-ähnliche Wirkungen haben, aber nicht durch Antikörper gegen Insulin gehemmt werden können (FROESCH et al. 1963).

2.7.1.2 Struktur und allgemeine Wirkung

IGF-1 ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Protein. Das porcine IGF-1 ist nach TAVAKKOL und Mitarbeitern (1988) identisch mit dem humanen IGF-1.

IGF-2 ist aus 67 Aminosäuren aufgebaut. Das IGF-2 von Schweinen gleicht dem humanen bis auf eine Aminosäure (FRANCIS et al. 1989).

Beide sind in vier Domänen aufgeteilt. Domäne A und B sind jeweils mit den entsprechenden von Insulin gleich. Die Domäne C entspricht dem verbindenden Peptid des Pro-Insulins und Domäne D hat keine Entsprechung im Insulin (Abb. 2).

Der IGF-Rezeptor bindet sowohl IGF-1 als auch IGF-2, wobei die Affinität für letzteren aber geringer ist. IGF-2 kann außerdem an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor binden, der damit auch an manchen IGF-2-Wirkungen beteiligt ist. Der IGF-Rezeptor gehört zur Gruppe von Rezeptoren mit Thyrosin-spezifischen Proteinkinasen. Das heißt nach Bindung eines Liganden wird die terminale Phosphatgruppe vom ATP auf die Hydroxylgruppe eines Thyrosinrestes eines spezifischen Proteins übertragen.

Zuerst wurde bei Mäusen entdeckt, daß die Expression des IGF-2 dem „Imprinting“ unterliegt (DE CHIARA et al. 1991). Es kommt nur zur Aktivierung des Allels, das vom Vater stammt. Beim IGF-2-Rezeptor wird dagegen das mütterliche Allel exprimiert (BARLOW et al. 1991). Das Imprinting muß aber nicht sämtliche Gewebe gleichermaßen betreffen. Bei der Maus fehlt es in der Leptomeninx und im Plexus chorioideus, so daß das mütterliche und väterliche Gen aktiviert wird (DE CHIARA et al. 1991). Auch in bestimmten Tumoren funktioniert das Imprinting des IGF-2 nicht (OGAWA et al. 1993, FEINBERG 1993).

In Flüssigkeiten sind die IGFs an sogenannte IGF-binding-proteins (IGFBP) gebunden (BAXTER und MARTIN 1989). Insgesamt sind sechs verschiedene Bindungsproteine identifiziert worden (IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 und IGFBP-6). Sie können anhand der verschiedenen Molekülgröße unterschieden werden und bestehen jeweils aus mehreren Untereinheiten. IGFBP-3 bis -6 liegen glykosyliert vor. Alle können prinzipiell sowohl IGF-1 als auch IGF-2 binden, haben aber unterschiedliche Affinitäten zu beiden Proteinen.

IGFBP-2 wurde zuerst in BRL-3A-Zellen isoliert (MOTTOLA et al. 1986). MONDSCHHEIN und Mitarbeiter (1990) identifizierten in Granulosazellen von Schweinen mittels Antikörpern eine Bande von 34 kDa als IGFBP-2. Es ist nicht Somatotropin-abhängig. Das IGFBP-2 des Rindes hat eine höhere Affinität zu IGF-2 als zu IGF-1 (BOURNIER et al. 1992).

IGFBPs sollen:

- ein Plasma-Reservoir darstellen, wodurch die Halbwertszeit von IGF-1 und IGF-2 verlängert wird (ZAPF et al. 1986)
- den Organismus vor der Insulin-Wirkung von freiem IGF schützen (ZAPF et al. 1986)
- den Transport durchs Endothel ermöglichen (BAR et al. 1990)

- die IGF-Wirkung an der Zelle modulieren (CLEMMONS et al. 1986; RITVOS et al. 1988; DEMELLOW und BAXTER 1988; BLUM et al. 1989). Beispielsweise erhöhen IGFBPs die Wirkung bezüglich DNA-Synthese von IGF-1 auf Fibroblasten (ELGIN et al. 1987).

2.7.1.3 Vorkommen und Wirkungen im Genitaltrakt

a) Ovar

Beim Schwein ist die IGFBP-2-Konzentration in kleinen Ovarfollikeln höher als in großen (MONDSCHHEIN et al. 1991). Es ergeben sich aber keine Schwankungen im mRNA-Gehalt während des Zyklusverlaufs (SAMARAS et al. 1991).

IGF-1 und Insulin stimulieren die Produktion von IGFBP-2 und -3 im Ovar, was durch IGF-2 nicht der Fall ist (GRIMES und HAMMOND 1992).

IGFBPs hemmen am Ovar die FSH-Wirkung (UI et al. 1989).

b) Eileiter

Bei Schweinen wurde mittels Katheterisierung die Eileiterflüssigkeit gesammelt. Bei den Tieren war im Östrus der IGF-1 und -2-Gehalt erhöht. Dies galt auch für die Serumgehalte im Östrus (WISEMANN et al. 1992).

c) Uterus

Östrogen regt die Produktion von IGF-1 stark an. SIMMEN und Mitarbeiter (1990) applizierten präpuberalen Schweinen Östrogen. Kurz danach konnte im Uterus eine erhöhte IGF-1-Konzentration festgestellt werden. Es kommt auch bei trächtigen Schweinen um den Tag 12 herum zu einer Anreicherung von IGF-1 in der Uterusflüssigkeit, weil zu dieser Zeit der Embryo mit einer massiven Östrogen-Produktion beginnt (GEISERT et al. 1982). Auch SAHLIN und Mitarbeiter (1990) stellten eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes durch Östrogen im Uterus fest.

SIMMEN und Mitarbeiter (1990) erhielten bei ovariectomierten Schweinen nach Progesteron-Applikation einen, im Vergleich zur Kontrolle, erhöhten Wert an IGF-1, der aber niedriger war, als derjenige nach Östrogengabe. LETCHER und Mitarbeiter (1989) stellten bei trächtigen Schweinen ab Tag 8 einen Gehalt von ca. 20 ng IGF-1/ g Uterusgewebe fest. Die entsprechende mRNA stieg bei diesen Tieren bis Tag 12 an. Bei zyklischen Schweinen lag die IGF-1-Konzentration zwischen 15 und 20 ng/g Uterusgewebe. SIMMEN und Mitarbeiter (1992) untersuchten an jedem Zyklustag drei Schweine hinsichtlich IGF-1-spezifischer mRNA im Uterus. Am Tag 0 war der Gehalt am geringsten und stieg dann bei zyklischen und trächtigen Tieren gleichermaßen bis Tag 12 an. Nach diesem Maximum sanken die Werte in beiden Gruppen wieder ab. Die mRNA-Konzentration lag bei den trächtigen Tieren immer über derjenigen der zyklischen.

Im Uterus von ovariectomierten Schweinen ist nach Progesterongabe sehr viel mRNA des IGFBP-2 nachzuweisen (SIMMEN et al. 1990). Dagegen zeigte sich bei intakten zyklischen Schweinen ein anderes Bild. Bei täglichen Untersuchungen während des Zyklus stellen SIMMEN und Mitarbeiter (1992) fest, daß der IGFBP-2-Gehalt im Östrus am höchsten war. Er fiel dann stark bis zum Tag 10 ab, um dann wieder zum nächsten Östrus hin anzusteigen. Auch trächtige Schweine zeigten diesen Verlauf, wobei sich der IGFBP-2-mRNA-Gehalt ab Tag 12 sehr stark erhöhte und deutlich über dem der zyklischen Schweine lag.

Der Gehalt von IGF und der entsprechenden mRNA muß nicht immer übereinstimmen. Beispielsweise wurde in Untersuchungen bei Kühen zwar ein Anstieg im Gehalt von IGF-1 und -2 im Endometrium vom Pro- bis Metöstrus gefunden, aber keinen Anstieg von entsprechender mRNA, so daß die Erhöhung durch einen Übertritt vom Serum zustande gekommen sein muß (GEISERT et al. 1991).

Relaxin bewirkt am Genitaltrakt Wachstum. Bei den Granulosazellen wird dies durch IGF-1 vermittelt. Im Uterus bewirkt eine Relaxin-Gabe keine Zunahme von IGF-1- oder -2-mRNA. Aber die Menge an IGFBP-2 und -3 in der Uterusflüssigkeit steigt an. Auch eine vermehrte Bindung von IGF-1 an den Rezeptor findet nicht statt (OHLETH et al. 1997).

Bei Schafen ist in der Uterusflüssigkeit bei zyklischen Tieren mehr IGF-1 vorhanden als bei trächtigen. IGF-2 ist bei zyklischen und trächtigen Tieren gleich viel vorhanden, mit einem Maximum an Tag 14 (KO et al. 1991).

d) Früchte

Bei Schweinen wurde IGF-1 und -2 als wichtig für die Entwicklung des Fötus gefunden (SIMMEN et al. 1990). Über den IGF-Rezeptor auf den Trophodermzellen kann er das IGF binden (CORPS et al. 1990). Außerdem exprimieren Schweineembryonen an den Tagen 12 bis 16 geringe Mengen an IGF-1-spezifischer mRNA (LETCHER et al. 1989).

Schweineembryonen reagieren *in vitro* auf eine IGF-1-Gabe mit einer Erhöhung der Aromatase-Aktivität (HÖFIG et al. 1991).

KO und Mitarbeiter (1991) beobachteten, daß IGF-1 und IGF-2-Applikation (beides zusammen) bei 13 Tage alten Schafembryonen zu einer Sekretion von Trophoblast-Protein-1 führt, das beim Schaf zur Erkennung der Trächtigkeit wichtig ist.

2.7.2 Epidermal-growth-factor

2.7.2.1 Struktur und allgemeine Wirkung

Der EGF-precursor besteht aus 1200 Aminosäuren. Daraus entsteht das EGF, das 53 Aminosäuren umfaßt. Der Rest des Precursors besteht aus mehreren Elementen, die z.T. über die Spezies hinweg hoch konserviert sind (JORGENSEN et al. 1998). Daraus kann man schließen, daß sie selbst auch eine biologische Funktion haben. Außerdem enthält der EGF-precursor u.a. eine Sequenz, die charakteristisch für ein Membranprotein ist. MROCKOWSKI und Mitarbeiter (1989) konnten nachweisen, daß der EGF-precursor daher tatsächlich als Membranprotein existieren kann.

EGF-Rezeptor: Nach der Bindung von EGF an den extrazellulären Teil des Rezeptors wird im intrazellulären Bereich die Aktivität der Tyrosin-Kinase erhöht.

Neben dem EGF bindet auch der Transforming-growth-factor (TGF- α) an den EGF-Rezeptor. Das

TGF- α stellt ein strukturelles und funktionelles Homolog zum EGF dar. Hinsichtlich der Funktionen und Wirkungsstärke in verschiedenen Geweben gibt es aber Unterschiede zwischen EGF und TGF- α . Daher kommen beide Wachstumsfaktoren z.B. im Eileitergewebe während der einzelnen Zyklusphasen in einem variierenden Verhältnis vor (LEI u. RAO 1992).

Das EGF kann zum einen direkt auf Gene, die die Zellproliferationen kontrollieren, einwirken. Dies geschieht innerhalb von kurzer Zeit und bedarf keiner Proteinsynthese. Zum anderen wirkt es indirekt auf Gene, die selbst vom Wachstumsstatus der Zelle reguliert werden. Dies beansprucht mehrere Stunden und ist an eine spezielle Proteinsynthese gebunden. Neben der Zellproliferation (COHEN u. CARPENTER 1979) und erhöhten DNA-Synthese (HOLLENBERG u. CUATRECASAS 1973) konnte auch festgestellt werden, daß das EGF auf Gene Einfluß nimmt, die kein Wachstum bewirken. SCHONBRUNN und Mitarbeiter (1980) wiesen dies zuerst an der erhöhten Prolaktinsynthese von Hypophysentumor-Zellkulturen nach. Später konnten auch EGF-Wirkungen bei der Steroid- und Prostaglandin-Synthese festgestellt werden (JONES et al. 1982; MITCHELL 1987).

2.7.2.2 Vorkommen und Wirkungen im Genitaltrakt

a) Ovar

Mittels RT-PCR konnte EGF-mRNA in Schweineoozyten nachgewiesen werden, in Kumulus-, Granulosa- und Thekazellen war sie nur ganz wenig vorhanden. Bei der EGF-Rezeptor-mRNA verhielt es sich genau umgekehrt (SINGH et al. 1995).

b) Eileiter

Nach TIEMANN und HANSEN (1995) stimuliert EGF das Wachstum und die DNA-Synthese von Eileiterzellen.

KENNEDY und Mitarbeiter (1994) untersuchten mittels RT-PCR das Vorkommen von mRNA von EGF-Rezeptoren und EGF im Eileiter. Sowohl für den Rezeptor als auch für das EGF konnten

Banden zu allen untersuchten Zeitpunkten bei zyklischen (Tag 4, 13, 15 und 20) und trächtigen (Tag 10, 12, 14, 18 und 22) Schweinen festgestellt werden.

WOLLENHAUPT und Mitarbeiter (1997) untersuchten mittels Histochemie Eileiter und Endometrium von Schweinen auf das Vorhandensein von EGF-Rezeptoren. An Tag 1 des Zyklus wurden im Eileiter Konzentrationen von 22,4 fmol/ mg Protein, am 6. Tag 11,0 fmol/ mg Protein und am 12. Tag 16,0 fmol/ mg Protein gemessen. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Außerdem wiesen sie nach, daß der EGF-Rezeptor besonders am apikalen Ende der Eileiterepithelzellen lokalisiert ist. Dies gelang auch SWANCHARA und Mitarbeitern (1995) mittels Fluoreszenz-Assays. Sie untersuchten am Tag 2 des Zyklus gedeckte (=trächtige) und ungedeckte (=zyklische) Schweine. Im Eileiter konnten sie sowohl in der Ampulle als auch im Isthmus EGF nachweisen (13,91 bzw. 12,53 ng EGF/ml bei zyklischen bzw. trächtigen Schweinen in der Ampulle, 16,21 bzw. 14,27 ng EGF/ mg im Isthmus). Wie aus den Daten ersichtlich ist, unterschieden sich auch jeweils die Gehalte bei zyklischen und trächtigen Tieren kaum.

WOLLENHAUPT und Mitarbeiter (1999) untersuchten bei trächtigen Schweinen das Vorkommen des EGF-Rezeptors im Eileiter. Dabei wurden an Tag 1 sehr hohe Proteinkonzentrationen gemessen (42,6 fmol/mg Protein). Sie fielen bis zum Tag 12 deutlich ab (6. Tag: 21,6 fmol/mg Protein; 12.Tag 17,1 fmol/mg Protein). Hinsichtlich EGF-mRNA wurden am Tag 1 relativ niedrige Werte gemessen. Sie waren an Tag 6 und 12 bei zyklischen und an Tag 6 bei trächtigen Schweinen höher.

c) Uterus

WOLLENHAUPT und Mitarbeiter (1999) stellen bei trächtigen Schweinen vom Tag 1 zu Tag 6 zunächst eine Erhöhung der EGF-Rezeptor-Proteinkonzentration fest (von 14,7 fmol/mg Protein auf 29,0 fmol/mg Protein). Bis Tag 12 kam es dann zu einem leichten Absinken auf 27,5 fmol/mg Protein.

EGF erhöht die Proliferation von Zellen des Endometriums beim Menschen (HAINING et al. 1991).

Die EGF-Rezeptor-Dichte an den Stromazellen wird bei Zellkulturen von humanem Endometrium durch die Zugabe von Östrogen und Progesteron gefördert. Bei den Drüsenzellen konnte nur dann eine Erhöhung der Rezeptordichte bewirkt werden, wenn Östrogen und Progesteron zusammen appliziert wurden. Die Affinität des Rezeptors für EGF wurde nicht verändert (WATSON et al. 1996).

Nach GARDNER und Mitarbeitern (1987) kann die Zugabe von EGF eine Erhöhung der Uteruskontraktionen in vitro bewirken.

d) Früchte:

EGF hat einen mitogenen Effekt auf ektodermale und mesodermale Zellen (GOSPODAROWICZ 1981; GROVE u. PRATT 1984).

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Maßnahmen

Um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu verhindern, wurden in allen Schritten sterile Einmalhandschuhe benutzt. Die Gefäße und Gebrauchsgegenstände wurden vor der Benutzung bei 121°C autoklaviert.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Proben während des Pipettierens auf Eis gelagert.

3.2 Tiermaterial

Die Proben für den ersten Teil der Versuche wurden von Schlachtschweinen gewonnen. Das gleiche gilt für die Proben von fünf präpuberalen Tieren im zweiten Teil der Versuche. Es handelte sich hierbei um Hybrid-Schweine der Rassen Deutsches Edelschwein x Deutsche Landrasse mit einem Gewicht von ca. 100 kg Körpergewicht. Die Zyklusstadien der Tiere (präpuberal, Östrus, Blütegelbkörper) wurden anhand des Ovarbefundes diagnostiziert.

Im zweiten Teil des Versuchs wurden die Proben aus dem Östrus und der Gelbkörperphase von jeweils fünf peripuberalen Schweinen gewonnen. Den Tieren wurde 800 I.E. PMSG, sowie nach 48 Stunden 500 I.E. hHG injiziert. Die Sauen wurden zwei (Östrus) bzw. zehn Tage (Blütegelbkörper) später geschlachtet.

Die Anzahlen der untersuchten Tiere zeigt Tabelle 2.

Tab.2: Anzahl der verwendeten Tiere (=Proben) pro Zyklusstadium

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere
<i>Erster Teil der Versuche</i>	
präpuberal	1
Östrus	1
Blütegelbkörper	1
<i>Zweiter Teil der Versuche</i>	
präpuberal	5
Östrus	5
Blütegelbkörper	5

3.3 Chemikalien und sonstige Hilfsmittel

Es wurden folgende Chemikalien und Kits verwendet:

[alpha-³⁵s]dATP >1000 Ci/mmol; ICN, Meckenheim

Acrylamid; Sigma, Deisenhofen

Agarose electrophoresis grade; Life-Technologies, Karlsruhe

Ammoniumpersulfat reinst; AppliChem, Darmstadt

Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg

Borsäure pro analysi; Merck, Darmstadt

Bromphenolblau; Sigma, Deisenhofen

Chloroform pro analysi; AppliChem, Darmstadt

Deoxynucleoside Triphosphate Set; Boehringer, Mannheim

Desoxyribonuclease I, Amplification Grade; Life-Technologies, Karlsruhe

Dimethylformamid; Sigma, Deisenhofen

DNA Clean Kit; Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg

EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat; AppliChem, Darmstadt

Essigsäure 100 %; Merck, Darmstadt

Ethanol 96% reinst; Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid; Sigma, Deisenhofen

Formaldehyd 37%; AppliChem, Gatersleben

Formamid, Sigma, Deisenhofen

Glycerol; Serva, Heidelberg

Glycogen; Boehringer, Mannheim

Guanidinium-Thiocyanat research grade; Serva, Heidelberg

IPTG; Sigma, Deisenberg

Isoamylalkohol; AppliChem, Darmstadt

Isopropanol pro analysi wasserfrei; AppliChem, Darmstadt

3-Morpholinopropansulfonsäure Gehalt >99%; Merck, Darmstadt

N- Lauroylsarcosine Sodium Salt; Sigma, Deisenhofen

Natrium Chlorid pro analysi; Merck, Darmstadt

Natrium Hydroxid-Plätzchen pro analysi; AppliChem, Darmstadt
Natrium-Acetat-Trihydrat pro analysi; AppliChem, Darmstadt
Nucleobond AXTM; Machery-Nagel, Düren
peqGold RNAPURETM; Peqlab, Erlangen
Phenol wassergesättigt, stabilisiert; AppliChem, Darmstadt
Phosphorsäure 85% pro analysi; Merck, Darmstadt
Primer; Pharmacia, Freiburg
QIAshredderTM; Qiagen, Hilden
RNeasy Mini KitTM; Qiagen, Hilden
β-Mercaptoethanol; Sigma, Deisenhofen
Stop Solution; Amersham, Braunschweig
SuperscriptTM II RNase H Reverse Transkriptase; Life-Technologies, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase rekombinant; Life-Technologies, Karlsruhe
TEMED; Serva, Heidelberg
tri-Natrium-Citrat-2-hydrat pro analysi; Merck, Darmstadt
TRIS pro analysi; Roth, Karlsruhe
Urea 98 %; Sigma, Deisenhofen
X-Gal; AppliChem, Darmstadt

Weiterhin wurden verwendet:

Qualitative Filter Paper; Whatman, Schleicher & Schüll
Biomax MR; Kodak, Stuttgart

3.4 Geräte

Folgende Geräte fanden Verwendung:

Tischautoklav EK; Tuttnauer, Fa. Systec, Wetzlar
Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus; Life-Technologies, Karlsruhe
UNO-Thermoblock; Biometra, Göttingen

CON-1000 und CON-JET; Fröbel, Lindau

Hybaid Omni-Gene; MWG-Biotech

Ultra-Turrax T 25; Janke & Kunkel

Biofuge fresco; Heraeus, Hanau

Labofuge GL; Heraeus, Hanau

UV-Visible Spectrophotometer; Pharmacia, Freiberg

Thermocycler; Landgraf, Langenhagen

The Unleakable Horizontal Minigel System; AGS, Heidelberg

3.5 Gewinnung des Materials

Die Probenentnahme wurde durchschnittlich 30 min. nach dem Entbluten durchgeführt. Bis zur Präparation, die durchschnittlich 60 min. nach der Tötung erfolgte, wurden die vollständig entnommenen Eileiter auf Eis gelagert. Danach wurden die Eileiter mit einer Schere der Länge nach aufgeschnitten. Mit der Rückseite einer Skalpellklinge wurde die Schleimhaut aus dem Bereich der Eileiterampulle abgeschabt und sofort in eine denaturierende Lösung verbracht. Die Geschabsel der beiden Ampullen eines Tieres wurden dabei zu einer Probe vereinigt.

3.6 Isolation der RNA

Bei der Isolation der RNA wurden verschiedene Methoden miteinander hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der RNA verglichen.

3.6.1 RNeasy Mini KitTM/ Qiagen

Das Schleimhautgeschabsel wurde in 600 µl RLT-Puffer (der vorher nach Anweisung mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde) verbracht und auf den QIAshedderTM gegeben. Die Säule wurde für 2 min. mit 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat für 3 min. mit 12000 x g

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem gleichgroßen Volumen von 70 %igem Ethanol durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Hiervon wurden 700 µl abgenommen und auf die RNeasy-Säule gegeben und für 15 sec. mit 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde 700 µl RW1-Puffer als Waschschrift auf die Säule pipettiert und für 15 sec. mit 12000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und 500 µl RPE-Puffer (der vorher nach Anweisung mit Ethanol versetzt wurde) auf die Säule gegeben. Nach einem 15 sec. langen Zentrifugationsschritt mit 12000 x g wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und anschließend für 2 min. mit 12000 x g zentrifugiert. Dieses dient der Trocknung der Säule. Abschließend wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und 50 µl Wasser daraufpipettiert, wonach eine Zentrifugation über 1 min. mit 12000 x g zur Elution der RNA folgte.

3.5.2 Herkömmliche Phenol-Chloroform-Extraktion

Ein Teil der Proben wurde nach der Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion behandelt (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1986), die leicht modifiziert zur Anwendung kam. Das Schleimhautgeschabsel wurde auf Eis in 0,9 ml einer Lösung aus 50 g Guanidinium-Thiocyanat, 2,64 ml 1 M Natrium-Citrat, 0,528 g Sarcosyl, 64,76 ml Aqua dest. und 720 ml β-Mercaptoethanol gebracht und anschließend mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Der Stab wurde vor Gebrauch autoklaviert und zwischen den Proben mit Aqua dest., 1 M NaOH-Lösung und dann wieder mit Aqua dest. gereinigt. Den Proben wurde anschließend 90 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4,5) zugesetzt und mit 8000 x g bei 4°C für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugengefäße überführt. Für die anschließende Extraktion wurde eine Lösung aus 25 Teilen wassergesättigtem Phenol, 24 Teilen Chloroform und 1 Teil Isoamylalkohol hergestellt. Von dieser Lösung wurde 9/10 Volumen und 1/10 Volumen Chloroform zum Überstand gegeben und nach Mischen der Phasen mit 10000 x g bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase in ein neues Zentrifugengefäß überführt und dieser Schritt wiederholt. Danach wurde zweimal der jeweilige Überstand mit je 1 Volumen Chloroform zur Entfernung der Phenolreste versetzt und nach Zentrifugation mit 10000 x g bei 4°C für 10 min. der Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt. Anschließend wurde 1 Volumen Isopropanol hinzugefügt und zur Präzipitation 60 min. auf Eis stehen gelassen. Daraufhin wurde mit 12000 x g bei 4°C für 10 min.

zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet kurz getrocknet, in 100 µl Aqua dest. aufgelöst und bei -20°C gelagert.

3.5.3 PeqGOLD RNAPURE™/Peqlab

Das Schleimhautgeschässel wurde in 0,9 ml peqGOLD RNAPure™ verbraucht. Die Homogenisation erfolgte wie oben beschrieben mit dem Ultra-Turrax. Nachdem die Proben für 5 min. bei 20°C stehen gelassen wurden, wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Nach weiterem Stehenlassen für 5 min. bei 20°C wurden die Proben für 5 min. mit 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die wäßrige oberste Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 900 µl Isopropanol hinzupipettiert. Die Proben wurden für 10 min. bei 20°C stehengelassen und danach für 10 min. bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Hiernach wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet, in 100 µl Aqua dest. aufgelöst und bei -70°C eingefroren.

3.7 Konzentration und Reinheit der RNA

Von der RNA-Lösung wurden 7 µl abgenommen und mit 693 µl Aqua dest. gemischt. In einem Spektrophotometer wurde die Absorption der Lösung bei 260 und 280 nm Wellenlänge in einer Quarzküvette gemessen. Die RNA-Konzentration wurde nach der Formel

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 44,19 = \text{RNA } \mu\text{g/ml (FARELL 1993)}$$

A_{260} = Absorption bei 260 nm Wellenlänge in optischer Dichte (OD)

44,19 = Extinktionskoeffizient der RNA

berechnet.

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurde der Quotient aus A_{260}/A_{280} berechnet, der zwischen 1,7 und 2 liegen soll.

3.8 Verdau der DNA

Da ein Vorhandensein von DNA-Kontaminationen in der Probe nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ein Verdau mittels DNase vorgenommen. Pro 1 mg RNA wurden 1 μ l 10x DNase I Reaction Puffer, 1 μ l DNase I verwendet und jeweils mit Aqua dest. auf 10 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden für 15 min bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym nach Zugabe von 1 μ l EDTA (25 mM) bei 65°C für 10 min inaktiviert.

3.9 Überprüfung der RNA-Integrität

Zur Herstellung des Gels wurden 1,2 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, 10 ml 10xFA-Gel-Puffer zugegeben und auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Der Kolben wurde erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach wurden 1,8 ml Formaldehyd und 1 μ l Ethidiumbromid hinzupipettiert und durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde der Kolben für 15 min. in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurde das Gel in einen horizontalen Flachbettgelträger (12x14 cm) gegossen.

10 μ l Probenlösung wurde mit 2 μ l 10x FA-Gel Puffer und 5 μ l Formaldehyd gemischt und 5 min bei 65°C denaturiert. Nach der Kondensation auf Eis wurden die Proben kurz zentrifugiert. Nach Hinzufügen von 2 μ l 5x RNA-Auftragspuffer wurden die Proben in die Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit 70 V für ca. eine Stunde durchgeführt.

Unter UV-Licht konnten danach die Banden dargestellt werden. Als intakt wurde die RNA bewertet, wenn die 18S- und die 28S-RNA-Banden klar sichtbar waren und die 28S-RNA-Bande eine höhere Intensität aufwies.

3.10 Reverse Transkription

Die Zentrifugation erfolgte jeweils bei 4°C. Alle Proben wurden im Doppelansatz angefertigt.

Nach dem DNA-Verdau wurde die Menge an Lösung, die 200 ng RNA entsprach, in ein Eppendorff-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde 1 µl eines der in Abbildung 3 aufgeführten Oligo(dT)-Primers (20 µM) hinzugefügt und auf 9 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde 10 min bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören. Nach der Kondensation auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurden 2 µl dNTP (250mM), 4 µl RT-Puffer und 2 µl dTT hinzupipettiert und die Lösung gevortext. Anschließend wurde 3 min bei 20°C inkubiert und 2 I.E. Superskript hinzugefügt. Eine Durchmischung erfolgte durch Auf-und Abpipettieren. Es schloß sich eine Inkubation von 8 min bei 20°C an. Danach wurden die Proben für 1 Std. bei 37°C gehalten und anschließend das Enzym zerstört, indem auf 95 °C für 5 min erhitzt wurde. Nach der Kondensation auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurden je 10 µl Aqua dest. hinzugefügt und die Proben bei -20°C eingefroren.

T ₁₂ NA	5`TTTTTTTTTTTTTTAA3` 5`TTTTTTTTTTTTTTCA3` 5`TTTTTTTTTTTTTTGA3`
T ₁₂ NC	5`TTTTTTTTTTTTTTCC3` 5`TTTTTTTTTTTTTTAC3` 5`TTTTTTTTTTTTTTGC3`
T ₁₂ NG	5`TTTTTTTTTTTTTTGG3` 5`TTTTTTTTTTTTTTAG3` 5`TTTTTTTTTTTTTTTCG3`

Abb.3: Verwendete Oligo(dT)-Primer

T= Thymin, A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin

N= Thymin, Adenin, Cytosin oder Guanin

3.11 Amplifikation

Vorab wurde zur Verringerung der Pipettierfehler ein sogenanntes Premix hergestellt:

160 μ l 25 μ M dNTP
1025 μ l Aqua bidest.
200 μ l 10x PCR-Puffer
50 μ l 50 mM MgCl₂
90 μ l ω -1

Pro Gel wurde jeweils ein Zufallsprimer (Tab. 3) benutzt.

Der Ansatz wurde folgendermaßen hergestellt:

Probenlösung	1	μ l
Oligo-dT- Primer (20 μ M)	2	μ l
(jeweils der gleiche wie bei der RT)		
Zufallsprimer (20 μ M)	1	μ l
Premix	15,25	μ l
Taq-Polymerase	0,5	μ l
[S ³⁵]dATP	0,2	μ l

Die Proben wurden im Thermocycler nach folgendem Programm amplifiziert:

1 x	3 min. 94 °C	einmalige Denaturierung
40 x	} 30 sec. 94 °C 2 min. 40 °C 30 sec. 72 °C	Denaturierung
		Annealing
		Elongation
1 x	5 min. 72 °C	einmalige Elongation

danach Kühlung bei 4 °C

Tab.3: Bei der Amplifikation und Reamplifikation verwendete Zufallsprimer

T= Thymin, A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin

Bezeichnung des Primers	Sequenz
Axel	5` GCTCTTTGTC 3`
B	5`GGTACTAAGG 3`
Babsi	5`GATCAAGTCC 3`
Edith	5`CAAGATAGGC 3`
Gesa	5`CTTTCTACCC 3`
Lutz	5`TTTTGGCTCC 3`
Moni	5`CGTAAGAGTA 3`
Sophie	5`TACAACGAGG 3`
Wolf	5`GGAACCAATC 3`

3.12 Elektrophorese

Hierbei wurde die Reproduzierbarkeit der Banden jeweils in selbstgegossenen Gelen und käuflichen Fertiggelen miteinander verglichen.

3.12.1 Selbstgegossene Gele

Die PCR-Produkte wurden in ein sechsprozentiges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Zunächst wurden zwei Glasplatten mit Spülmittel gewaschen. Danach wurden sie mit 70%igem Ethanol entfettet, das mit Wasser abgewaschen wurde. Nun wurden die Platten mit 0,1 M NaOH-Lösung gespült, wiederum mit Wasser abgewaschen und getrocknet. Die größere Glasplatte wurde hiernach horizontal gelagert und zweimal mit RepelSilan abgerieben und anschließend poliert. Die kleine Platte wurde mit 70%igem Ethanol abgerieben und mit dieser Seite auf die große Platte gelegt, auf der seitlich zwei Spacer plaziert wurden.

Für das Gel wurde 42 g Harnstoff in 10 ml 10xTBE-Puffer, 14,5 ml Acrylamid-Stammlösung und

60 ml Aqua dest. aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Mittels Sterilfiltration wurde es in eine Plastikflasche gefüllt und in dieser durch eine Wasserstrahlpumpe entgast. Anschließend wurden 500 µl APS (0,1 g APS in 1 ml Aqua dest. gelöst) und 100 µl TEMED hinzugefügt und durch Schwenken vermischt. Die beiden Glasplatten wurden aneinandergelockert und das Gel auf die überstehende untere Platte gegossen. Durch leichtes Anheben dieser Seite wurde die Verteilung des Gels beschleunigt. Am Ende wurden Luftblasen entfernt und der Kamm eingesetzt.

Nach 1,5 Std. wurden die Klammern entfernt und die Glasplatten in die Elektrophoresekammer (Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus) eingesetzt. Nach dem Einfüllen des Laufpuffers (100 ml 10x TBE-Puffer und 900 ml Aqua dest.) wurde der Kamm gezogen. Die Geltaschen wurden mittels Pipette mit Laufpuffer gespült, um Harnstoffreste zu entfernen. Dann wurde in jede Tasche 3 µl Stop Solution gefüllt und für 45 min. ein Vorlauf gemacht (1500 mV, 60 mA), um die gleichmäßige Polymerisation zu überprüfen.

Die Proben wurden zwischenzeitlich auf 5 µl mittels Vakuumzentrifuge eingedampft. Dann wurde 3 µl Stop Solution hinzupipettiert und für 5 min. bei 95°C erhitzt. Die Kondensation erfolgte danach auf Eis.

Die Proben wurden dann in die Geltaschen eingebracht. Außerdem wurde in die beiden flankierenden leeren Geltaschen 3 µl Stop Solution eingefüllt, um ein ungleichmäßiges Laufen zu verhindern. Es lief kein Längenstandard mit. Die Länge der später isolierten cDNA-Stücke der differentiellen Banden wurde später im Agarosegel bestimmt (s. 3.15). Die Geräteeinstellungen entsprachen denen des Vorlaufs.

Nach einer Laufdauer von ca. einer Stunde wurde die große Glasplatte vorsichtig entfernt. Ein Stück Whattman-Papier wurde auf das Gel gelegt und mit diesem von der kleinen Platte abgezogen. Nach dem vollständigen Trocknen des Gels wurde ein Röntgenfilm für 24-48 Stunden aufgelegt.

3.12.2 Fertiggele

Bei den Fertiggele (CastAway Precast Sequencing GelsTM) handelte es sich um sechsprozentige Polyacrylamidgele. Nach der Entnahme aus der Verpackung wurden die Glasplatten abgetrocknet und in der Elektrophoresekammer (CastAway Sequencing DeviceTM) fixiert. Als Laufpuffer diente

ein Gemisch aus 450 ml Aqua dest. und 50 ml 10x TBE-Puffer. Die Geltasche wurde mittels einer Pipette gespült und anschließend ein Haifischzahnkamm eingesetzt. Die Proben wurden wie oben beschrieben eingedampft, mit Stop-Solution versetzt und für 5 min. auf 95°C erhitzt. Vor dem Einbringen der Proben in die Geltaschen wurden diese zum Kondensieren auf Eis gebracht. Es lief kein Längenstandard mit. Die Länge der später isolierten cDNA-Stücke der differentiellen Banden wurde später im Agarosegel bestimmt (s. 3.15). Nach der Laufdauer von ca. einer Stunde wurde die größere Glasplatte entfernt. Die kleinere Glasplatte wurde für 10 min. in eine Fixierlösung aus 5% Methanol, 5% Essigsäure und 90 % Aqua dest. gelegt. Anschließend wurde die Glasplatte für 10 min. in Aqua dest. gelegt. Danach erfolgte die Trocknung des Gels im Geltrockner (CastAway Gel Dryer™) und das anschließende Auflegen des Röntgenfilms für 24-48 Stunden.

3.13 Isolation der differentiellen Banden

Die differentiellen Banden wurden mittels einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß verbracht. Es wurden jeweils 100 µl Ampuwa hinzupipettiert. Daraufhin wurde eine Stunde bei 20°C inkubiert und anschließend die cDNA für 15 min. in kochendem Wasser aus dem Gel herausgelöst. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C für 2 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden danach 10 µl sterile 3 M Na-Acetat-Lösung (pH6), 5 µl Glycogen (10 mg/ml) und 450 µl kaltes (4°C), 96%iges Ethanol hinzugefügt und für 30 min. bei -70°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde für 10 min. bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das verbliebene Pellet wurde mit 500 µl 85%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Entfernen des Ethanols wurde das Pellet in 10 µl Ampuwa gelöst und bei -20°C eingefroren.

3.14 Reamplifikation

Zur Verringerung von Pipettierfehlern wurde wiederum ein Premix hergestellt:

160 μ l 250 μ M dNTP

650 μ l Aqua bidest.

200 μ l 10x PCR-Puffer

50 μ l 50 mM MgCl₂

90 μ l ω -1

Bei der Reamplifikations-PCR wurden 5 μ l des Templates der differentiellen Bande, 2 μ l des gleichen degenerierten Primers wie bei der vorangegangenen PCR und 13 μ l des Mastermix (bestehend aus 1 μ l Zufallsprimer, 11,5 μ l Premix und 0,5 μ l Taq-Polymerase) zusammenpipettiert. Das PCR-Programm entsprach demjenigen der DDRT-PCR.

In einem zweiten Reamplifikationsschritt wurden von dem neuen Template wieder 5 μ l pro Probe genommen. Pro Probe wurden drei Ansätze gemacht. Sonst wurde genauso verfahren wie im ersten Reamplifikationsschritt.

3.15 Kontrolle auf Isolation von nur einer cDNA-Sorte pro differentieller Bande

Zur Kontrolle, ob bei der Elution der Bande aus dem Gel nur eine Sorte cDNA isoliert wurde, wurden 10 μ l des Templates in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurde 1 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, 80 ml 1xTAE-Puffer zugegeben und beides erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach wurden 2 μ l Ethidiumbromid hinzupipettiert und durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde das Gel gegossen.

10 μ l des Templates wurden mit 4 μ l 6x Agaroseauftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Außerdem lief ein Längenstandard mit. Die Elektrophorese wurde mit 70 V für ca. eine Stunde durchgeführt. Unter UV-Licht konnten danach die Banden dargestellt werden.

Es wurden nur solche Proben weiterverwendet, in denen nur eine deutliche Bande sichtbar war.

3.16 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung wurde der DNAClean™ Kit verwendet.

Die restlichen 50 µl des Templates wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 100 µl der Lösung 1 vermischt. Dann wurden pro mg DNA 1 ml Silica-Lösung, die vorher gevortext wurde, hinzugefügt. Anschließend wurde bei 20°C für 5 min. inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Silica durch Zentrifugation für 30 sec. bei 12000 x g sedimentiert und das Pellet zweimal mit 400 µl Lösung 2 gewaschen. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet ca. 10 min. bei 37°C getrocknet. Hiernach wurde es mit 20 µl 0,1x TE-Puffer resuspendiert und für 10 min. bei 37°C inkubiert, um die DNA zu eluieren. Dabei wurde 2-3 mal gevortext. Hiernach wurde die Probe für 1 min. zentrifugiert und der Überstand daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.17 Ligation

Für die Ligation wurde das Produkt pGEM^R-T Vector System benutzt.

Die Menge an eingesetzter cDNA soll idealerweise 3:1 von Insert zu Vektor betragen. Sie wurde nach der Formel

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{Größe (kb) des Insert}}{\text{Größe (kb) des Vektors}} \times \frac{3}{1} = \text{ng des Inserts}$$

berechnet.

In ein Reaktionsgefäß wurden folgende Substanzen pipettiert:

T4 DNA Ligase 10X Puffer	1 µl
pGEM ^R -T Vektor	1 µl (=50 ng)
PCR Produkt	x µl (entsprechend oberer Formel)
T4 DNA Ligase	1 µl (=3 Weiss units)
Aqua dest. ad	10 µl

Mittels Auf- und Abpipettieren wurden die Bestandteile gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.18 Klonierung

Zunächst wurde das LB-Medium hergestellt. Dazu wurden 10 g Casein, 5 g Hefe und 10 g NaCl in einen Kolben vorgelegt und auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt. Nach Durchmischen der Lösung wurde das Medium autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten wurde 1 ml Ampicillin (= 100 µg/ml) hinzugefügt. Pro Platte wurde ca. 5 ml Medium verwendet.

Zunächst wurde auf den Platten 40 ml X-Gal (50 mg/ ml DMF) und 40 ml IPTG (200 mM) ausgespatelt. Anschließend wurden 2 µl der Ligation und 50 µl kompetente Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, vorsichtig gemischt und für 20 min. auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 45-50 sec. in ein 42°C warmes Wasserbad gebracht und danach wieder für 2 min. auf Eis gestellt. Danach wurde 900 µl LB-Medium hinzugegeben und die Reaktionsgefäße für 1,5 Std. bei 37°C mit 150 rpm in einem Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurden jeweils 100 µl und 400 µl Lösung pro Probe auf je zwei Platten ausgespatelt. Die Platten wurden daraufhin ca. 16 Std. bei 37°C bebrütet.

Am nächsten Tag wurden von den Platten jeder Probe sämtliche weißen Kolonien gepickt, d.h. mittels sterilem Zahnstocher Koloniematerial aufgenommen und auf eine neue Platte (LB-Medium + Ampicillin) als ein Strich ausgeimpft. Diese Platten wurden wiederum für 16-20 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.19 PCR und Elektrophorese

Um zu kontrollieren, ob das Insert in den weißen Kolonien tatsächlich enthalten ist, wurde eine PCR durchgeführt und anschließend das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt, wie unter 3.9 beschrieben wurde.

Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10x Puffer	3,0 µl
10 mM dNTP	0,6 µl
25 mM MgCl ₂	1,8 µl
5 mM Primer Mix (M13R+ M13F 1:1)	2,0 µl
Aqua bidest.	21,4 µl
cDNA	1,0 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Als Abschluß wurden jeweils ein Tropfen Mineralöl hineinpipettiert, um ein Verdampfen der Lösung zu verhindern.

Das PCR -Programm lief folgendermaßen:

45 x	}	90 sec. 92 °C
		30 sec. 56 °C
		90 sec. 72°C
1 x		10 min. 72 °C

danach Kühlung bei 4 °C

3.20 Midi-Präp

Die Plasmide wurden mit Hilfe des Nucleobond AX20TM präpariert.

Glasröhrchen mit Deckel wurden mit 4 ml LB-Medium gefüllt. Hinzu wurde 4 µl Ampicillin (= 100 µl/ml) pipettiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde ein Klon (dessen Inserteinbau positiv war) aufgenommen und in das LB-Medium verbracht. Nach Abflammen des Röhrchens vor dem Verschließen wurde es in einem Schüttelinkubator in Schräglage bei 37°C und ca. 215 rpm. über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Zahnstocher entfernt und je 2 ml des Mediums in ein Reaktionsgefäß

überführt und bei 4°C für 5 min mit 12000 x g zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde der Überstand abgossen und das Pellet in je 200 µl S1-Puffer resuspendiert. Die beiden Hälften einer Probe wurden danach wieder vereinigt. Danach wurden 400 µl S2-Puffer dazupipettiert. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Ansatz für 5 min. bei 20°C stengelassen. Anschließend wurden 400 µl S3-Puffer zugesetzt und durch vorsichtiges Schwenken untergemischt. Die Suspension wurde 5 min. auf Eis gelagert und danach für 15 min. bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert.

Währenddessen wurden die Nukleobond-Säulen mit dem Puffer N2 äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde die Lösung unter sorgfältiger Vermeidung des Ansaugens des weißen Präzipitats auf die Säule gegeben. Sobald die Flüssigkeit durch die Säule gelaufen war, wurde diese mit jeweils 1 ml des Puffers N3 gewaschen. Anschließend wurde ein Reaktionsgefäß unter die Säule gestellt und die DNA mittels Puffer N5 aus der Säule eluiert. Dem Eluat wurden 600 µl Isopropanol dazugegeben und für 60 min. bei 20°C präzipitiert. Die Lösung wurde hiernach für 30 min. bei 4°C mit 12500 x g zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in 100 µl Aqua dest. gelöst und bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung des Plasmidgehaltes wurden 10 µl der Lösung mit 90 µl Aqua dest. gemischt und in einem Spektrophotometer bei der Wellenlänge von 280 nm gemessen.

3.21 Kontrolle auf Insert-Einbau

Sicherheitshalber wurde die Lösung nochmals auf das Vorhandensein des Inserts überprüft, wobei genauso verfahren wurde, wie unter 3.19 beschrieben. Hierbei wurde 1 µl der Lösung eingesetzt.

3.22 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden jeweils 3 mg Plasmid in einem Reaktionsgefäß an die Firma SeqLab geschickt. Die Sequenz wurde mit einer Datenbank verglichen.

3.23 Untersuchung auf Wachstumsfaktoren

3.23.1 Reverse Transkription

Die Konzentration der RNA, die bereits für das Differential Display verwendet wurde, wurde erneut bestimmt, wie unter 3.7 beschrieben.

Der Ansatz für die Reverse Transkription wurde wie in 3.9 beschrieben durchgeführt. Es wurden aber pro Ansatz 500 ng RNA eingesetzt. Der spezifische Oligo(dT)-Primer des Differential Display-Ansatzes wurde durch 1 µl eines unspezifischen Oligo (dT)-Primers (10 µM) ersetzt.

3.23.2 Amplifikation

Der PCR-Ansatz wurde mit jeweils einem der in Tabelle 4 aufgeführten Primerpaare (im Internet mit dem Program „Primer-3“ ausgesucht) wie folgt durchgeführt:

10X PCR Puffer		2 µl
MgCl ₂		0,6 µl
dNTP		0,4 µl
Primer	je	0,5 µl
cDNA		1 µl
TaqPolymerase		0,2 µl
Aqua dest.		14,8 µl

Um Pipettierfehler zu verringern, wurden sämtliche Komponenten mit Ausnahme der cDNA vorab zusammenpipettiert und dann jeweils 19 µl der Lösung in die entsprechenden Eppendorff-Gefäße gegeben.

Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen zu verhindern.

Tab. 4: In der PCR verwendete Primer

T= Thymin, A= Adenin, C= Cystin, G= Guanodin

Wachstumsfaktor	Primerbezeichnung	Position des Primers	Sequenz	Quellenangabe
porciner Insulin-like-growth-factor 1	IGF1 I-a	156-176	TTA TTT CAA CAA GCC CAC AGG	TAVAKKOL et al. 1988
	IGF1 I-b	536-516	GGA ATG CCC ATC TTT TGA AAT	
	IGF1 II-a	36-56	TCT CTT CTA CTT GGC CCT GTG	AccNr. M31175
	IGF1 II-b	443-423	CAG TGG CAT GTC ATT CTT CAC	
porcines Insulin-like-growth-factor binding protein 2	IGFbp2 a	955-975	ACC CCG AGT GTC ATC TCT TCT	BADINGA et al. 1999
	IGFbp2 b	1355-1334	AAG AGA CAC AGG GGT TCA AAA A	
porciner Epidermal-growth-factor precursor	EGF I-a	1116-1136	TGG AAC TGC TCA GTG TTT GTG	JOERGENSEN et al. 1998
	EGF I-b	1516-1496	CAC CTT CGG TAT TGA TGC ACT	
	EGF II-a	138-158	AAC ATG TAG CGG CTG TTC ATC	AccNr. AF053364
	EGF II-b	539-519	TTA CGG CCA ATC CAG TCT ATG	

Die cDNA wurde nach folgendem Programm im Thermocycler (Landgraf) amplifiziert:

1x 94°C 240 sec
 35 x { 94°C 50 sec
 { 60°C 60 sec
 { 72°C 60 sec
 1x 72°C 600 sec

anschließend Kühlung bei 4°C

3.23.3 Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein 1,2 prozentiges Agarose-Gel (bestehend aus 0,6 g Agarose, 50 ml 1x TPE-Puffer und 2 µl Ethidiumbromid) in einen Flachbettgelelektrophoreseträger (AGS) gegossen. Als Pufferlösung wurden 400 ml 1x TPE-Puffer verwendet.

10 µl des jeweiligen PCR-Templates wurde mit 2 µl 6x Agaroseauftragspuffer vermischt und damit die Taschen des Gels beladen.

Die Elektrophorese wurde bei 60 V für ca. 30-45 min. durchgeführt.

Anschließend wurden die entstandenen Banden im UV-Licht beurteilt.

3.23.4 Sequenzierung

Um stichprobenartig die Spezifität der detektierten Banden zu überprüfen, wurden 5 Proben zur Sequenzierung an die Firma GATC geschickt.

3.24 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Vergleichs der verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden erfolgte durch das Statistikprogramm SAS^R am Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Mit Hilfe des Wilcoxon-Testes wurde untersucht, ob die Reinheit und die Gesamtmenge an isolierter RNA zwischen den drei Methoden signifikante Unterschiede aufwies.

Beim Differential Display und bei den Untersuchungen zu den Wachstumsfaktoren wurde aufgrund des kleinen Stichprobenumfanges auf eine statistische Auswertung verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der verschiedenen Methoden zur RNA-Isolierung

Bei der RNA-Isolierung wurden drei verschiedene Methoden miteinander hinsichtlich der Menge an isolierter RNA und deren Reinheit miteinander verglichen: der RNeasy Mini KitTM von QIAGEN (Bindung der RNA an Säulen), die herkömmliche Phenol-Chloroform-Extraktion (Fällung der RNA mittels Isopropanol) und das GoldPeq RNA-PureTM von Peqlab (Prinzip wie bei der Phenol-Chloroform-Extraktion). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Beim RNeasy Mini KitTM wurden trotz verschiedener Methoden der Homogenisation nur geringe Mengen (Median 2,43 µg pro Probe) an RNA isoliert.

Bei der herkömmlichen Phenol-Chloroform-Extraktion schwankte die Menge an isolierter RNA trotz identischer Verfahrensweise erheblich. Sie reichte von 2,65 µg bis 36,69 µg pro Probe. Dies war in allen Gruppen von Tieren zu beobachten.

Bei der Verwendung des GoldPeq RNA-PureTM konnten bis auf wenige Ausnahmen für die Weiterverarbeitung ausreichende Mengen an RNA isoliert werden. Der Median betrug 68 µg RNA pro Probe. Bei den Schweinen mit Gelbkörper konnte nur wenig Material gewonnen werden, während bei den östrischen Tieren deutlich größere Mengen an Schleimhautgeschabsel anfielen. Dadurch konnte bei diesen Schweinen mehr RNA gewonnen werden als bei denen in der Gelbkörperphase.

Hinsichtlich der Gesamtmenge an isolierter RNA konnten bezogen auf alle drei Proben signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) festgestellt werden. Zwischen der RNeasy- und der Phenol-Chloroform-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,08$). Sowohl zwischen der RNeasy- und der RNAPure-Gruppe als auch zwischen der Phenol-Chloroform-Gruppe und der RNAPure-Gruppe konnte jeweils ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,005$ bzw. $p = 0,01$).

Die Reinheit war bei allen drei Methoden vergleichbar gut. Es konnten zwischen den Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$). Der gewünschte Wert von 1,7

beim Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde fast immer erreicht. Bei ganz geringen Konzentrationen von RNA in der gemessenen Lösung kam es aufgrund von Meßfehlern oder durch Kontaminationen mit Proteinen oder Salzen zu einem Quotienten $> 2,0$.

Tab. 5: Darstellung der Absorptionen bei 260 und 280 nm und der daraus berechneten Reinheit und Konzentrationen an RNA nach der Isolierung mittels RNeasy Mini Kit™, herkömmlicher Phenol-Chloroform-Extraktion bzw. GoldPeq RNAPure™

RNeasy Mini Kit™

Probe	Absorption bei 260 nm	Absorption bei 280 nm	Reinheit der RNA*	Konzentration an RNA (µg/µl)
1	0,101	0,069	1,46	0,446
2	0,005	0,002	2,50*	0,022
3	0,002	0,001	2,00	0,009
4	0,022	0,014	1,57	0,097
5	0,015	0,008	1,88	0,066
6	0,007	0,004	1,75	0,031

Phenol-Chloroform-Extraktion nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1986):

Probe	Absorption bei 260 nm	Absorption bei 280 nm	Reinheit der RNA*	Konzentration an RNA (µg/µl)
1	0,031	0,016	1,94	0,137
2	0,036	0,021	1,71	0,159
3	0,010	0,006	1,67	0,044
4	0,030	0,016	1,88	0,133
5	0,006	0,003	2,00	0,027
6	0,015	0,010	1,50	0,066
7	0,036	0,020	1,8	0,159
8	0,010	0,006	1,67	0,044
9	0,083	0,042	1,98	0,367

GoldPeq RNAPure™ :

Probe	Absorption bei 260 nm	Absorption bei 280 nm	Reinheit der RNA*	Konzentration an RNA (µg/µl)
1	0,021	0,011	1,91	0,093
2	0,154	0,092	1,67	0,681
3	0,209	0,128	1,63	0,924
4	0,178	0,094	1,89	0,787
5	0,182	0,109	1,67	0,804
6	0,007	0,003	2,33*	0,031
7	0,052	0,028	1,86	0,230
8	0,008	0,003	2,67*	0,035
9	0,040	0,021	1,90	0,177
10	0,035	0,020	1,75	0,155
11	0,138	0,083	1,66	0,610
12	0,273	0,164	1,66	1,207
13	0,913	0,499	1,83	4,035
14	0,437	0,258	1,69	1,932
15	0,529	0,307	1,72	2,338

- Die Reinheit der RNA wird als gut bezeichnet, wenn der Quotient der im Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionen zwischen 1,7 und 2,0 liegt. Werte über 2,0 beruhen auf Meßfehlern aufgrund der geringen RNA-Gehalte oder auch durch Verunreinigungen

4.2 Erster Versuchsteil: Differentielle Banden

Es konnten beim Vergleich von jeweils einem präpuberalen, einem östrischen und einem Schwein mit Gelbkörper insgesamt 16 differentielle Banden isoliert werden (Tab. 6).

Nach Isolation und zweimaliger Reamplifikation konnten bei elf Proben elektrophoretisch scharfe Banden dargestellt werden.

Tab. 6: Isolierte differentielle Banden und die Länge der enthaltenen cDNA

Bezeichnung der differentiellen Bande*	Größe des cDNA-Stückes
Edith Östrus G 1	-----
Edith Östrus G 2	150 bp
B Gelbkörper A 1	-----
B Gelbkörper A 2	-----
Moni Östrus A 1	150 bp
Moni Östrus A 2	150 bp
Moni Östrus G 1	-----
Moni Östrus G 2	-----
Sophie Östrus G 1 oben	150 bp
Sophie Östrus G 2 oben	150 bp
Sophie Östrus G 1 unten	300 bp
Sophie Östrus G 2 unten	300 bp
Babsi Gelbkörper A 1	150 bp
Babsi Gelbkörper A 2	150 bp
Babsi präpuberal G 1	200 bp
Babsi präpuberal G 2	200 bp

*Edith= Name des Zufallsprimers

Östrus= Zyklusphase des beprobten Schweines

A/C/G= Oligo-(dT)-Primer

1/ 2= Bezeichnung des Doppelansatzes

oben/unten= Ort der Bande

Abgesehen von „Babsi Gelbkörper A 1“ trat bei allen Proben mindestens eine Kolonie mit Insert auf.

Bei fünf Proben (Moni Östrus A 1; Moni Östrus A 2; Sophie Östrus G 1 oben; Sophie Östrus G 2 oben; Babsi Gelbkörper A 2) wurde die Sequenz analysiert. Die Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Sequenzen einer Gendatenbank (embl) verglichen. Die Sequenzen waren zu großen Teilen identisch mit der des Vektors. Die restlichen Bereiche enthielten keine Sequenzen, die über eine längere Strecke identisch mit bereits veröffentlichten Genen waren. Deshalb wurde auf den Versuch der Sequenzierung der anderen Proben verzichtet.

4.3 Zweiter Versuchsteil: Differentielle Banden

Zunächst wurden die Schweine, die sich in der gleichen Zyklusphase befanden, untereinander verglichen. Aufgrund der begrenzten Taschenzahl in den Gelen konnte bei der Verwendung der Fertiggele nur der Vergleich von vier Tieren gemacht werden.

Es stellte sich heraus, daß bei den Tieren innerhalb der einzelnen Gruppen differentielle Banden auftraten. Dabei gab es sowohl Banden, die nur bei einem Tier auftraten, als auch welche, die nur bei einem Tier fehlten. Bei fünf von neun differentiellen Banden waren diese auf dem Wiederholungsgel auch detektierbar (Tab. 7).

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen Gele ohne bzw. mit einer differentiellen Bande bei präpuberalen Schweinen.

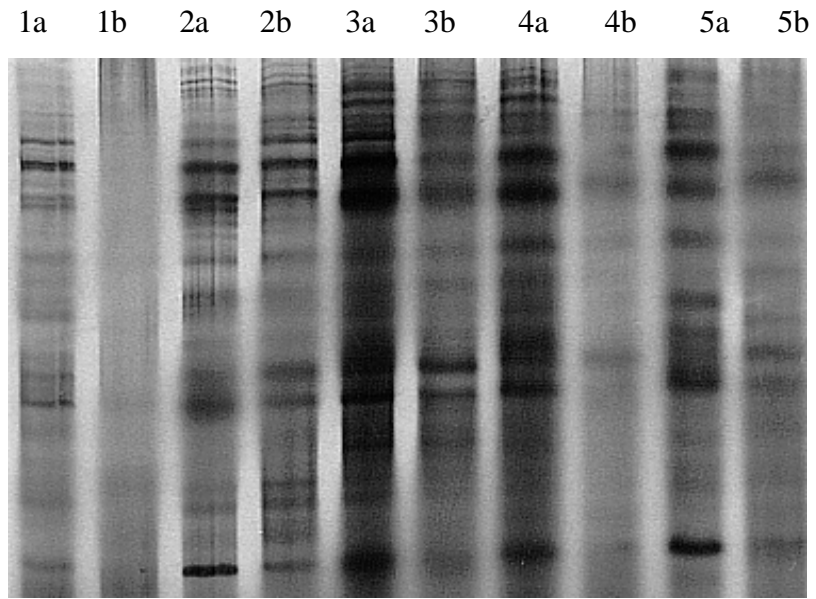


Abb. 4: RNA-Fingerprint von präpuberalen Schweinen, Ausschnitt ohne differentielle Banden
1-5: Proben mit a und b als Doppelansatz

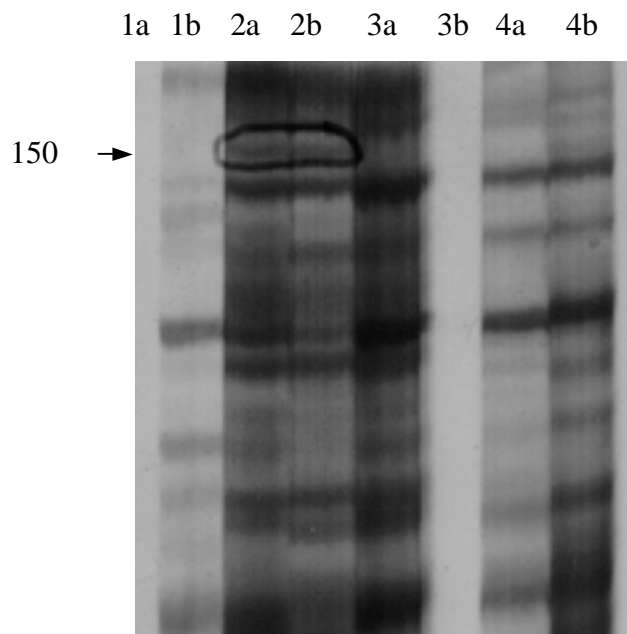


Abb. 5: RNA-Fingerprint von präpuberalen Schweinen, Ausschnitt mit einer differentiellen Bande
1-4: Proben mit a und b als Doppelansatz

Tab. 7: Differentielle Banden beim Vergleich innerhalb der jeweiligen Gruppen

Gruppe	Bezeichnung der Bande	Vorhandensein bzw. Fehlen bei dem entsprechenden Tier
präpuberal	Moni 5 C1/2	extra
	Sophie 1 A1/2	extra
Östrus	Moni 4 A1/2	fehlt
	Moni 4 C1/2	fehlt
	Sophie 4C1/2	fehlt
	Wolf 4 A1/2	extra
Gelbkörper (Tag 9)	Babsi 1 A2 oben	extra
	Babsi 1 A2 unten	extra
	Sophie 4 C1/2	fehlt

4.4 Wachstumsfaktoren

Die Proben wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von mRNA von drei Faktoren untersucht. Beim IGF-1 und EGF-precursor wurden jeweils zwei Primerpaare verwendet, beim IGFBP-2 eins. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

4.4.1 IGF-1

Bei den präpuberalen Tieren waren nur Tier 3 beim ersten Primerpaar und Tier 5 beim zweiten Primerpaar positiv. Bei den anderen Tieren konnte keine entsprechende cDNA amplifiziert werden.

Bei den östrischen Tieren waren beim ersten Primerpaar alle Proben negativ, beim zweiten alle positiv.

Bei den Tieren an Tag 9 des Zyklus waren alle Tiere beim ersten Primerpaar negativ. Beim zweiten Primerpaar war nur Tier 5 positiv.

4.4.2 IGFBP-2

Bei den präpuberalen Tieren konnte nur bei Schwein 3 und 4 IGFBP-2-spezifische cDNA amplifiziert werden.

Bei den Tieren im Östrus war nur Tier 5 negativ.

Bei den Tieren mit Gelbkörper waren Tier 1 und 4 positiv. Die restlichen Proben waren negativ.

4.4.3 EGF-precursor

Die präpuberalen Tiere waren beim ersten Primerpaar positiv mit Ausnahme von Tier 4, das negativ war. Beim zweiten Primerpaar zeigten alle Proben ein positives Ergebnis.

Bei den östrischen Tieren waren beim ersten Primerpaar Tier 1, 3 und 5 positiv, Tier 2 und 4 negativ. Beim zweiten Primerpaar waren alle Tiere positiv.

Bei den Tieren in der Gelbkörperphase lag nur bei Tier 3 ein negatives Ergebnis beim ersten Primerpaar vor. Die anderen Proben waren positiv.

Abbildung 6 zeigt Ergebnisse der Elektrophorese von mehreren Proben mit dem Primer für den EGF-precursor.

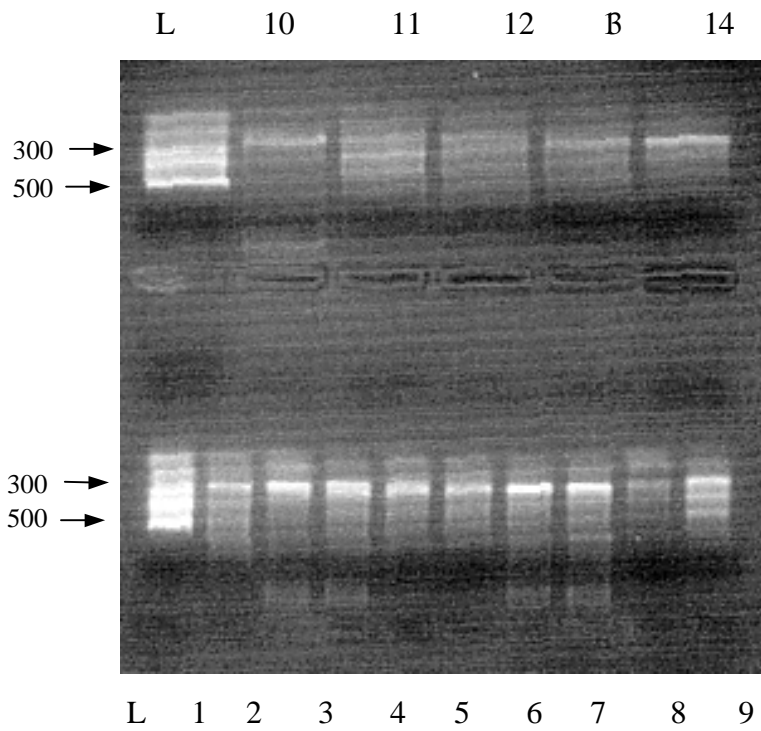


Abb. 6: Elektrophoretisch aufgetrenntes PCR-Produkt mit EGF-precursor-spezifischen Primern

L: Längenstandard

1-13: Proben aus verschiedenen Zyklusphasen

Tab. 8: Ergebnisse der Elektrophorese nach Amplifikation mit IGF-1-, IGFBP-2- und EGF-precursor-spezifischen Primern

Zyklusphase	Probe	IGF-1 I	IGF-1 II	IGFBP-2	EGF ¹ -I	EGF ¹ -II
präpuberale Phase	1	-	-	-	+	+*
	2	-	-	-	+	+
	3	+	-	+*	+	+
	4	-	-	+*	-	+*
	5	-	+	-	+	+
Östrus	1	-	+	+*	+	+
	2	-	+*	+*	-	+*
	3	-	+	+	+	+*
	4	-	+*	+	-	+
	5	-	+	-	+	+
Gelbkörper	1	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+
	3	-	-	-	-	+
	4	-	-	+*	+	+
	5	-	+*	-	+	+

¹: EGF-precursor

+ Bande detektierbar

- keine Bande vorhanden

*: Bei einer Probe des Doppelansatzes konnte keine Bande detektiert werden.

5 Diskussion

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß die Proteinzusammensetzung des Eileitersekretes während des Zyklus variiert (IRITANI et al. 1974). So wurden bei Untersuchungen mit Eileiterzellkulturen, bei denen die während der Kultivierungszeit synthetisierten Proteine analysiert wurden, zyklusabhängige Variationen bezüglich der Menge und Zusammensetzung der Proteine im Überstand festgestellt (MASTROIANNI u. GO 1979).

Da die Eileiterflüssigkeit auch Bestandteile enthält, die nicht im Serum vorhanden sind, ist davon auszugehen, daß von Epithelzellen des Eileiters Proteine aus bereits vorhandener mRNA oder nach Transkription spezifisch-aktivierter Gene synthetisiert und sezerniert werden (BUHI et al. 1989). Die in den Zellen von der DNA transkribierte mRNA ist Ausdruck der Aktivierung spezifischer Gene, die zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion (sogenannte housekeeping-genes) oder zur Erfüllung der Aufgaben der Zelle im Organismus dienen.

In bisher veröffentlichten Arbeiten wurden in der Regel Einzelgene oder eine Gruppe von Genen untersucht, deren Exprimierung in Eileiterzellen während verschiedener Zyklusphasen oder bei trächtigen bzw. nicht-trächtigen Tieren analysiert wurden (BUHI et al. 1990).

Erst mit der von LIANG und PARDEE (1992) etablierten Technik des Differential Display, die BAUER und Mitarbeiter (1993) methodisch zur Differential-Display-Reverse-Transcriptions-PCR (DDRT-PCR) erweiterten, steht seit jüngerer Zeit eine Technik zur Verfügung, die einen genaueren Einblick in die endokrin vermittelte Genaktivierung einer Zellpopulation erlaubt.

Bei der Methode des Differential Display beschränkt man sich nicht auf die Untersuchung spezieller Gene, sondern betrachtet die Veränderung der gesamten in der Zelle vorhandenen mRNA in den untersuchten Zeitabschnitten. Hierzu wird die mRNA mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und durch die PCR mit Zufallprimern vervielfältigt. Die Darstellung der ³⁵S-dATP markierten cDNA-Banden erfolgt mittels Elektrophorese. Durch den Vergleich der dargestellten cDNA-Banden ergibt sich die mRNA, die in dem betrachteten Untersuchungszeitraum transkribiert wurde.

Unter den bekannten Einzelgenen ist das System der Wachstumsfaktoren von Interesse. Sie üben einen großen Einfluß auf die zyklusabhängigen Veränderungen des Reproduktionstraktes aus. Außerdem beeinflussen sie bei trächtigen Tieren das Wachstum und die Differenzierung der Frucht und deren Hüllen.

Ziel meiner Arbeit war es, aus Epithelzellen von Schweineeileitern verschiedener Zyklusstadien RNA zu isolieren und nach der Methode des Differential Display zu untersuchen. Die dabei zu detektierenden differentiellen Banden sollten nach ihrer Isolierung kloniert und sequenziert werden. Außerdem sollte in diesem Stadien mittels RT-PCR das Vorliegen von mRNA von IGF-1, IGFBP-2 und EGF-precursor überprüft werden.

5.1 Vergleich von drei Methoden der RNA-Isolierung

Der Bedarf an mRNA für das Differential Display wurde mit 4 µg pro Probe angesetzt. Beim RNeasy Mini KitTM wurde dieser Wert deutlich unterschritten. Bei der herkömmlichen Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der angesetzte Bedarf nur von ca. der Hälfte der Proben deutlich überschritten. Beim GoldPeq RNAPureTM waren nur bei zwei der 15 Proben zu geringe Mengen zu verzeichnen. Die teilweise sehr hohen Werte für die Absorption (Probe 13, 14, 15) sind möglicherweise auf eine Kontamination mit Salzen zurückzuführen. Bei der rRNA-Banden-Darstellung wiesen die Proben eine vergleichbare Intensität wie die anderen auf, wobei bei den Proben 13 bis 15 für den Ansatz von einer Konzentration von ca. 1 µg/µl ausgegangen wurde.

Ursachen für die Probleme bei der Isolierung mit dem RNeasy Mini KitTM liegen möglicherweise darin, daß die schleimige Konsistenz der Schleimhautgeschabsel die Poren des QIA-ShreddersTM und der Säulen des RNeasy Mini KitTM verstopfte. Auffällig war, daß die in der Anleitung des Kits angegebenen Zeiten für die Zentrifugation häufig nicht ausreichten, um die Lösung ganz durch die Säule zu pressen.

Bei der herkömmlichen Phenol-Chloroform-Extraktion schwankte die Menge der extrahierten RNA bei den einzelnen Proben erheblich, ohne daß die Vorgehensweise unterschiedlich war. Eventuell

hat die verwendete Guanidinium-Thiocyanat-Lösung im Vergleich zum GoldPeq RNAPure™ eine geringere Potenz, RNasen zu deaktivieren, so daß es bei einem Teil der Proben trotzdem zur Zerstörung der RNA gekommen ist.

Bei Proben mit geringen Absorptionswerten nahm teilweise der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm einen Wert größer als zwei an. Dies ist auf eine Kontamination mit Proteinen oder Salzen oder durch Meßfehler aufgrund der geringen Absorptionen zurückzuführen. Letzteres erscheint dabei als die wahrscheinlichere Ursache. Mutmaßlich sind bei allen Proben, bei denen die RNA-Isolierung an einem Tag stattgefunden hat, vergleichbare Kontaminationen mit Proteinen oder Salzen vorhanden. Da Quotienten >2 nur bei Proben mit geringen RNA-Gehalten auftreten, erscheint es logischer, daß dies durch Meßfehler hervorgerufen wird und nicht durch Kontaminationen, die ausgerechnet nur bei diesen Proben vorhanden sind.

5.2 Wiederholbarkeit der differentiellen Banden

Von den insgesamt neun differentiellen Banden, die beim Vergleich innerhalb der drei Gruppen auftraten, waren fünf wiederholbar. Dies entspricht einem etwas niedrigeren Wert als ihn BAUER und Mitarbeiter (1994) angegeben haben.

Falsch positive differentielle Banden machen sich nicht nur in einer geringen Wiederholbarkeit bemerkbar. Auch die oft geringe Wiederfindungsrate im Northern Blot (SUN und Mitarbeiter (1994) geben sie mit weniger als 30 % an.) beruht auf falsch positiven Banden. CALLARD und Mitarbeiter (1994) vermuten als Ursache unter anderem die Tatsache, daß die Bande oft nicht nur aus einer cDNA-Sorte besteht, sondern aus mehreren. Dies wird nach dem Klonieren an dem Vorhandensein von Inserts gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz deutlich. Deshalb verwendeten sie nur die Hälfte des Templats zum Klonieren und blotteten die Produkte gegen die andere Hälfte des Templats. Bei der Probe, die ein starkes Signal ergibt, handelt es sich um das gesuchte cDNA-Fragment.

Andere Autoren versuchen schon im Vorfeld möglichst falsch positive Banden auszuschließen. SOMPAYRAC und Mitarbeiter (1995) verwenden möglichst cytoplasmatische RNA. Alle Proben werden in mehrfachen Ansätzen aufgetragen. Beim Auftreten von differentiellen Banden werden diese Reaktionen unter Verwendung von den entsprechenden undegenerierten Primern statt der degenerierten 3'-Primer wiederholt. Auch die Verwendung von längeren Primern und die Erhöhung der Annealing-Temperaturen in der PCR für eine stringentere Bindung wurden mehrfach vorgeschlagen (ZHAO et al. 1995). HADMAN und Mitarbeiter (1995) sehen in der Amplifikation zwischen zwei 5'-Primern eine Ursache für falsch positive Banden. Anstatt der Markierung der dNTP verwenden sie radioaktiv markierte 3'-Primer, so daß cDNA-Stücke, die so amplifiziert wurden, nicht sichtbar sind.

Eine weitere Ursache für das Auftreten von nicht wiederholbaren differentiellen Banden könnte auch eine unterschiedliche Schwärzung der beiden Autoradiographiefilme sein. Es wäre denkbar, daß bei einem Film die Schwärzung so stark ist, daß eine bestimmte Bande sichtbar ist, bei dem Film der Wiederholung diese aber gerade unterhalb der Sichtbarkeitsgrenze bleibt. RICKLING (1999) isolierte cDNA aus einem Bereich des Gels, wo keine Bande sichtbar war. Nach der Elektrophorese des Eluates in einem Agarose-Gel konnte eine Bande der erwarteten Größe dargestellt werden. Die Schwierigkeit besteht darin, daß die Dauer der Exposition des Autoradiographiefilmes von dem Alter (und damit der Strahlungsintensität) des ³⁵S-dATPs abhängig gemacht werden muß. Das Problem könnte dadurch gelöst werden, daß PCR und Elektrophorese am gleichen Tag wie der erste Ansatz des Zufallprimers wiederholt werden und die Autoradiographiefilme genau gleich lange auf die Gele gelegt werden.

Durch das häufige Vorkommen von falsch positiven Banden, die zudem noch durch die verschiedensten Gründe entstehen können, wird eine ganze Reihe von arbeitsaufwendigen Maßnahmen (Doppelansätze, Northern Blot u.s.w.) nötig. Dies macht oft den Vorteil des Differential Display hinsichtlich Arbeitsaufwand, Kosten und RNA-Bedarf wieder zunichte, so daß Methoden wie die subtraktive Hybridisierung wieder an Attraktivität gewinnen.

5.3 Schwierigkeiten bei der Sequenzierung der differentiellen Banden

Die Länge der cDNA, die aus den differentiellen Banden isoliert wurde, betrug durchschnittlich 150 bp. Diese geringe Größe führte beim Sequenzieren dazu, daß der Vektor über eine größere Strecke mitsequenziert wurde. Daher mußten zunächst über eine Gegenüberstellung mit der Vektor-Sequenz die Stücke herausgefiltert werden, die dem Insert entsprachen. Beim Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen in der Gendatenbank (embl) mit den verbliebenen Fragmenten konnte bei keiner Probe eine Homologie über eine längere Nukleotidfolge festgestellt werden. Dies kann daran liegen, daß bei der DDRT-PCR aufgrund der verwendeten Oligo(dT)-Primer oft hauptsächlich die 3'-untranslatierte Region amplifiziert wird, weil die cDNA-Fragmente häufig nur bis zu 300 bp umfassen (SOMPAYRAC et al. 1995). Dieser Abschnitt ist i.d. R. nicht mit veröffentlichten Genabschnitten homolog. Auszuschließen ist aber auch nicht, daß während der Präparation der Proben eine Kontamination stattgefunden hat, die in das Plasmid eingebaut wurde und somit anstatt des gewünschten Inserts kloniert und sequenziert wurde. Dies ist besonders leicht möglich, weil gerade kurze DNA-Stücke (wie z.B. Primer-Dimere) als Insert bevorzugt werden.

5.4 Auftreten von differentiellen Banden innerhalb einer Gruppe

Eigentlich sollten zunächst die Schweine innerhalb einer Gruppe auf übereinstimmende Genexpression hin untersucht werden, um dann bei deren Vorliegen die Tiere aus den drei Gruppen miteinander zu vergleichen. Es stellte sich aber heraus, daß schon innerhalb der Gruppen Unterschiede im Bandenmuster auftraten. Diese Tatsache kann mehrere Gründe haben:

5.4.1 Genetische Variabilität

Jedes Individuum unterscheidet sich von den Artgenossen durch eine Vielzahl von Mutationen. In der Regel beeinträchtigen diese Veränderungen des Genoms die Funktion der Proteine nicht. Allerdings spielen diese Mutationen beim Differential Display fast keine Rolle, weil eine differentielle Bande nicht durch ihre von den anderen Proben abweichende Sequenz charakterisiert wird, sondern nur durch ihre unterschiedliche Größe, die die Laufgeschwindigkeit und damit die

Position der Bande beeinflusst. Das heißt, daß nur bei Deletion oder Addition von größeren Fragmenten die Länge der cDNA derartig verändert wird, daß sich Abweichungen im Bandenmuster ergeben. Die einzige Stelle, an der auch Punktmutationen eine Rolle spielen können, ist der Ort, an den normalerweise der Primer hybridisieren würde. Wenn eine Mutation eine Bindung verhindert, fehlt eine Bande in der entsprechenden Spur, wenn ein Primer an einer Stelle zusätzlich binden kann, wird eine Bande mehr detektierbar.

Beim Differential Display wird in der PCR durch die Verwendung von Poly(T)-Anker-Primern die 3'-untranslatierte Region amplifiziert. Da diese, wie schon der Name sagt, nicht translatiert wird, ist der Selektionsdruck auf die Beibehaltung der Sequenz geringer, so daß die Sequenz sich stark von Tier zu Tier unterscheiden kann, ohne daß ein Funktionsverlust auftritt. Außerdem enthalten diese Bereiche von völlig verschiedenen Genen oft ähnliche Sequenzen (SOMPAYRAC et al. 1995).

In allen mir bekannten Arbeiten mit Verwendung des Differential Display wurden die Proben von verschiedenen Tieren gepoolt (z.B. GREEN und Mitarbeiter (1996) beschrieben die differentielle Genexpression im Uterus von trächtigen Schweinen). Es wurden in den Arbeiten keine Angaben darüber gemacht, ob auf Variationen im Bandenmuster zwischen den später gepoolten Proben untersucht wurde.

5.4.2 Inhomogenität der Proben hinsichtlich verschiedener Zellarten

Das Schleimhautgeschabsel besteht aus verschiedenen Zellarten, wie Drüsenzellen und cilientragenden Zellen, die entsprechend ihren Aufgaben verschiedene Gene exprimieren. Die gewonnenen Geschabsel der Tiere enthalten diese Fraktionen in variierendem Anteil. Es ist denkbar, daß eine mRNA-Sorte, die nur in einer Zellart vorkommt, i.d.R. nicht als Bande in Erscheinung tritt. Wenn in einer Probe die Zellart aber in großer Menge vorhanden ist, könnte damit die Nachweisgrenze überschritten werden und eine neue Bande auftreten. Zukünftig könnte man diese Ursache ausschließen, indem man von jedem Tier von verschiedenen Stellen des Eileiters Schleimhautgeschabsel entnimmt und diese gegeneinander testet. Da in der Ampulle vergleichsweise mehr cilientragende Zellen vorhanden sind, im Isthmus mehr Drüsenzellen, müßten bei einem Vergleich der Geschabsel unterschiedliche Bandenmuster auftreten, falls die Varianz der Zell-

fraktionen eine Rolle für die Entstehung von differentiellen Banden spielt.

Das Anlegen einer Zellkultur ist aus verschiedenen Gründen nicht sinnvoll. Wenn in dem Schleimhautgeschabsel, das zum größten Teil aus vollständig differenzierten Zellen besteht, Teilpopulationen zum Wachstum angeregt werden können, müssen dies bei jedem Ansatz nicht immer die gleichen Zellen sein. Somit wäre eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben nicht gewährleistet. Von verschiedenen Autoren wurde beim Anlegen einer Eileiterepithelzellkultur eine starke Vermehrung der Zellen und die Ausbildung eines Monolayers beschrieben (JOSHI 1995, HENRIKSEN et al. 1990). Morphologisch entsprachen die Zellen im Prinzip normalen Epithelzellen. WALTER (1995) stellte aber das Fehlen von Zilien und das seltene Vorkommen von sekretorischen Granula fest. OUHIBI und Mitarbeiter (1989) beschrieben eine mehr oder weniger starke Veränderung in der Morphologie nach mehreren Passagen. WALTER (1995) und HENRIKSEN et al. (1990) konnten einen positiven Cytokeratin-Nachweis führen. Trotz der Ähnlichkeiten der Zellen in Kultur mit dem Eileiterepithel kommt WALTER (1995) zu dem Schluß, daß Zellkulturen nur bedingt für Experimente geeignet sind. Dies dürfte in besonderem Maße für die Untersuchung der Genexpression zutreffen. Da vollständig differenzierte Zellen keine Zellteilung mehr durchführen können, bedeutet dies, daß sie sich entweder dedifferenziert haben oder daß es sich um Zellen handelt, die noch gar nicht differenziert waren. In beiden Fällen liegt eine andere Genexpression vor als bei differenzierten Zellen. Auch die teilweise abweichende Morphologie deutet auf eine veränderte Genexpression hin.

5.4.3 Gruppenhomogenität

Auch nach hormoneller Behandlung mit PMSG und hCG variiert der Ovulationszeitpunkt um mehrere Stunden. Beim Schwein ist es leider nicht möglich, den voraussichtlichen Ovulationszeitpunkt mittels Ultraschall vorherzusagen (WABERSKI u. WEITZE 1998). Dies müßte dann auch sehr genau (z.B. bis auf 30 min. Abweichungen) geschehen. Auch Blutuntersuchungen haben bisher keinen Anhaltspunkt für die Terminierung der Ovulation gegeben.

Eine genaue Festlegung des Ovulationszeitpunktes kann also mit den derzeitigen Methoden nur

retrospektiv für die Schweine in der Gelbkörperphase gemacht werden. Diese Tiere könnte man um den voraussichtlichen Ovulationszeitpunkt herum beispielsweise alle 30 min. mit Ultraschall untersuchen und dann die Schweine nach exakt der gleichen Zeitspanne schlachten. Allerdings stellt sich die Frage, ob für diese Gruppe nicht andere Faktoren einen größeren Einfluß auf die Genexpression haben (Tagesunterschiede, unterschiedliche Zykluslänge).

Bei den östrischen Schweinen könnte derzeit nur unter sehr großem Aufwand von Tiermaterial eine relativ genaue Gruppeneinteilung vorgenommen werden. Man könnte im entsprechenden Zeitraum nach der Behandlung alle 30 min. jeweils beispielsweise drei Schweinen die Eileiter entfernen und den späteren Ovulationszeitpunkt mittels Ultraschall feststellen. Anschließend könnten dann die Proben der Tiere, die sich gleich lange vor der Ovulation befanden, zu einer Gruppe zusammengefaßt werden.

5.5 Wachstumsfaktoren

Die Wachstumsfaktoren üben einen großen Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung von Embryonen und deren Hüllen aus (LIU et al. 1989).

KENNEDY und Mitarbeiter (1994) konnten bei Untersuchungen des Eileiters und des Uterus von Schweinen in allen Zyklusphasen mRNA sowohl vom EGF selbst als auch vom EGF-Rezeptor nachweisen. In den eigenen Untersuchungen konnte mit dem einen Primerpaar bei allen Tieren (präpuberal, Östrus und Gelbkörperphase) die mRNA für den EGF-precursor mittels PCR festgestellt werden. Mit dem anderen Primerpaar waren in jeder Gruppe bei ein bzw. zwei Schweinen keine entsprechende Bande bei der Elektrophorese detektierbar. Wahrscheinlich ist dies darauf zurückzuführen, daß das Primerpaar nicht optimal war. WOLLENHAUPT und Mitarbeiter (1999) zeigten, daß die Gehalte des EGFs während der Gelbkörperphase im Eileiter zunehmen.

Bei der Untersuchung auf IGF-1-mRNA funktionierte das eine Primerpaar gar nicht. Bei der einen positiven Probe handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Bande. Beim anderen Primerpaar waren alle Schweine der Östrus-Gruppe positiv. Außerdem konnte bei einem präpuberalen Tier

IGF-1-spezifische mRNA nachgewiesen werden. Möglicherweise wäre das Schwein in absehbarer Zeit brünstig geworden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von SIMMEN und Mitarbeitern (1990), die nach Applikation von Östrogen an ein präpuberales Schwein kurze Zeit später erhöhte Gehalte an IGF-1 im Uterus messen konnten. GEISERT und Mitarbeiter (1982) vermuteten eine gegenseitige Beeinflussung von einem 12 Tage alten Embryo und dem Endometrium hinsichtlich Östrogen- (durch den Embryo) und IGF-1-Synthese (im Endometrium). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse einer späteren Arbeit von SIMMEN und Mitarbeitern (1992), die sich auch auf den Uterus bezog. Bei dieser Untersuchung, die intakte Schweine an jedem Tag des Zyklus einbezog, wurden gerade im Östrus besonders niedrige IGF-1-mRNA-Gehalte gemessen. Möglicherweise reagiert der Eileiter anders auf den hormonellen Status als der Uterus. Darauf deuten die Ergebnisse von WISEMANN und Mitarbeitern (1992) hin. Sie gewannen Eileiterflüssigkeit mittels Katheter und untersuchten sie auf IGF-1. Im Östrus war der Gehalt an diesem Wachstumsfaktor erhöht. Allerdings stellt sich die Frage, in wie weit die Sekretion durch die Katheterisierung beeinflusst wurde.

In den eigenen Untersuchungen waren vier von fünf östrischen Schweinen für IGFBP-2-mRNA positiv. Außerdem wiesen die Proben zweier Tiere der Gelbkörper-Gruppe in der Elektrophorese entsprechende Banden auf. IGFBP-2 bindet zwar bevorzugt IGF-2, hat aber auch eine Affinität zu IGF-1. Möglicherweise ist die Synthese von IGFBP-2 im Östrus in den Eileiterepithelien darauf zurückzuführen, daß die IGF-1-Konzentration erhöht ist. In den Körperflüssigkeiten ist der größte Teil des IGF-1 und IGF-2 an die entsprechenden Bindungsproteine assoziiert, um die Insulin-ähnliche Wirkung der freien Wachstumsfaktoren zu unterbinden. Die Menge an zur Verfügung stehenden Bindungsproteinen müßte sich deshalb nach dem vorhandenen IGF-1 und IGF-2 richten, damit weder zuviel noch zuwenig freies IGF verfügbar ist.

Auch SIMMEN und Mitarbeiter (1992) stellten fest, daß im Östrus der Gehalt des IGFBP-2 am höchsten war. Möglicherweise liegt bei den eigenen Versuchen die Nachweisgrenze für die mRNA so hoch, daß geringe Gehalte von mRNA in der Gelbkörperphase nicht nachgewiesen wurden. In zukünftigen Untersuchungen müßte also eine möglichst hohe Sensitivität angestrebt werden, um vorhandene mRNA auch nachzuweisen.

Sicher sind EGF und IGF-1 und -2 nicht die einzigen Wachstumsfaktoren, die Einfluß auf das Wachstum des Konzeptus nehmen. Es wurden bereits diverse Proteine entdeckt, die nur zu

bestimmten Zeiten in der Eileiterflüssigkeit nachweisbar sind (z.B. BUHI et al. 1989, WOLLENHAUPT et al. 1997). Somit ist weiterer Forschungsbedarf vorhanden, um den Einfluß des Eileiters auf das Wachstum und die Differenzierung der Frucht zu verstehen und evtl. nachahmen zu können.

6 Zusammenfassung

Der Eileiter trägt mit seiner Sekretion wesentlich zum Erfolg der Reproduktion bei. Es werden nicht nur die Vorgänge bis zur Befruchtung beeinflusst, sondern auch das Wachstum und die Entwicklung des Konzeptus werden durch bestimmte Proteine unterstützt.

Bisher ist noch wenig über die zyklusspezifische Genaktivierung in den Eileiterschleimhautzellen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, bei präpuberalen, östrischen und Schweinen mit Gelbkörper das Eileiterepithel hinsichtlich Genaktivierung in Abhängigkeit von der Zyklusphase mittels der Technik des Differential Display zu untersuchen. Außerdem sollte in diesen Phasen mittels herkömmlicher RT-PCR das Vorliegen von mRNA von IGF-1, IGFBP-2 und EGF-precursor überprüft werden.

Bei der Isolation der RNA wurden drei Methoden miteinander verglichen: Der RNeasy Mini KitTM von Qiagen, die herkömmliche Phenol-Chloroform-Extraktion und die GoldPeq RNAPureTM von Peqlab. Letztere ergab konstant größere Mengen an RNA.

Im ersten Versuchsteil wurde für jede Gruppe ein Schwein untersucht. Es handelte sich hierbei um unbehandelte Schlachtschweine, deren Zyklusstand anhand des Ovarbefundes diagnostiziert wurde. Dies galt auch für die Tiere der präpuberalen Gruppe im zweiten Versuchsteil (Die Gruppengröße betrug jeweils fünf Tiere.). Die Schweine der Gruppen „Östrus“ und „Gelbkörper“ wurden hormonell vorbehandelt und dann kurz präovulatorisch bzw. am Tag 9 des Zyklus geschlachtet.

Im ersten Versuchsteil konnten 16 differentielle Banden isoliert werden. Davon stellten sich elf nach Reamplifikation in der Elektrophorese als eine scharfe Bande dar. Die Länge der cDNAs betrug überwiegend 150 bp. Bei fünf Proben wurde nach der Klonierung eine Sequenzierung durchgeführt, die aber in keinem Fall auswertbare Ergebnisse ergab. Dies lag vermutlich daran, daß die Inserts zu kurz waren. Auch nach Herausfiltern der nachfolgenden Sequenz des Vektors wiesen sie zu geringe Homologien mit bekannten Genen auf. Daher wurde auf den Sequenzierungsversuch bei den restlichen Proben verzichtet.

Im zweiten Versuchsteil traten beim Vergleich der Tiere innerhalb der jeweiligen Gruppe Unterschiede im Bandenmuster auf. Insgesamt wurden neun differentielle Banden festgestellt. Die Ursache für das Auftreten von abweichenden Banden bei Tieren, die sich im Prinzip in der gleichen Phase des Zyklus befinden, könnte zum einen in der genetischen Variabilität der Tiere liegen. Diese ist in der 3'-untranslatierten Region, die beim Differential Display bevorzugt amplifiziert wird und auf der kein Selektionsdruck liegt, besonders groß. Die zweite Ursache könnte darin liegen, daß es sich beim Schleimhautgeschabsel um ein Gemisch von Zellen handelt, die bei den verschiedenen Proben in unterschiedlichen Anteilen vorkommen. Der dritte Grund könnte die relativ grobe Gruppeneinteilung sein. Selbst die hormonell behandelten Schweine variieren hinsichtlich Ovulationszeitpunkt noch um mehrere Stunden, so daß zwischen diesen Tieren durchaus Unterschiede in der Genexpression auftreten können.

Beim IGF-1 konnte nur im Östrus entsprechende mRNA nachgewiesen werden. Auch die IGFBP-2-mRNA war ausschließlich im Östrus detektierbar. Dagegen konnte die mRNA für den EGF-precursor in allen Zyklusstadien nachgewiesen werden. Die Ergebnisse widersprechen teilweise den Beobachtungen, die andere Autoren am Uterus gemacht haben, so daß sicherlich im Eileiter noch genauere Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Außerdem handelt es sich bei den untersuchten nicht um die einzigen relevanten Wachstumsfaktoren, denn in letzter Zeit sind noch eine Reihe weiterer entdeckt worden.

6.1 Summary

Anja Seefeldt: Investigation of gene expression in the porcine oviduct.

The secretion of the oviduct is essential for a successful reproduction. It does not only influence the process until fertilisation but also supports the growth and differentiation of the conceptus.

There is little information about genes that are expressed in the epithelium of the oviduct during the estrous-cycle. In this study the oviductal gene expression was determined in prepubertal, estrous and interestrous pigs using the „differential display“-method. In additional experiments the expression of IGF-1-, IGFBP-2- and EGFprecursor-mRNA in the oviductal epithelium of these animals was investigated by the means of RT-PCR.

In the first experiments of this study three pigs (one per group) were investigated. They were normally fattened and the stage of estrous cycle was determined by visual examination of the ovaries. In the second experiments the oviducts of five pigs per group were examined. The perpubertal ones were slaughtered untreated, the others were treated with 800 I.E. PMSG and 500 I.E. hCG and were slaughtered 36 h (estrous group) respectively ten days (interestrous group) later.

In the first experiments 16 differentially expressed bands were detected. After reamplification eleven of them resulted after electrophoresis in a sharp band. Five of the eleven samples were sequenced showing no homology to known genes documented in databases.

In the second experiments the mRNA patterns of the pigs within the same group were compared. As the patterns were heterogenous within the groups a comparison of the different groups appeared senseless. There are three possible reasons for this heterogeneity:

1. Cycle-specific expression of genes is a continuous process. In pigs there is a problem in predicting the time of ovulation resulting in heterogeneity and differentially expressed genes.
2. Each sample contains different portions of cell-species which express different genes. In some cases only a special mRNA is probably amplified and detected in electrophoresis.
3. Mutations lead to variations in mRNA patterns of each individual pig.

In the third experiments IGF-1- and IGFBP-2-mRNA were detected only in estrous pigs, whereas EGF-mRNA was detected in all stages. Because of partly different results in former publications further investigations would be useful.

7 Literaturverzeichnis

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS u. J.D. WATSON (1990):

RNA- und Proteinsynthese.

in: Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts u. J.D. Watson (Hrsg.): Molekularbiologie der Zelle (deutsche Übersetzung), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 235-253

AN, G., G. LUO, R.W. VELTRI u. S.M. O'HARA (1995):

Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminiscent detection.

BioTechniques 20, 342-346

ARENTS, G. u. E.N. MOUDRIANAKIS (1993):

Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10489-10493

BAR, R.S., D.R. CLEMMONS, M. BOES, W.H. BUSBY, B.A. BOOTH, B.L. DAKE u. A. SANDRA (1990):

Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart.

Endocrinology, 127, 1078-1086

BARLOW, D.P., R. STÖGER, B.G. HERRMANN, K. SAITO u. N. SCHWEIFER (1991):

The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus.

Nature 349, 84-87

BAUER, D., H. MÜLLER, J. REICH, H. RIEDEL, V. AHRENKIEL, P. WARTHÖE u. M. STRAUSS (1993):

Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR).

Nucleic Acids Res. 21, 4272-4280

BAUER, D., P. WARTHÖE, M. ROHDE u. M. STRAUSS (1994):

Detection and differential display of expressed genes by DDRT-PCR.

PCR-Methods-Apppl. 4, 97-108

BERGER, S.L., D.M. WALLACE, R.S. PUSKAS u. W.H. ESCHENFELDT (1983):

Reverse transcriptase and its associated Ribonuclease H: Interplay of two enzyme activities controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid.

Biochemistry 22, 2365-2372

BERTIOLI, D.J., U.H.A. SCHLICHTER, M.J. ADAMS, P.R. BURROWS, H.-H. STEINBIß u. J.F. ANTONIW (1995):

An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs.

Nucleic Acids Res. 23, 4520-4523

BLUM, W.F., E.W. JENNE, F. REPPIN, K. KIETZMANN, M.B. RANKE u. J.R. BIERICH (1989):

Insulin-like growth factor I (IGF I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I.

Endocrinology 125, 766-772

BOURNER, M.J., W.H. BUSBY, N.R. SIEGEL, G.G. KRIVI, R.H. MCCUSKER u. D.R. CLEMMONS (1992):

Cloning and sequence determination of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): comparison of its structural and functional properties with IGFBP-1.

J. Cell Biochem. 48, 215-226

BRACKETT, B.G. u. L. MASTROIANNI (1974):

Composition of oviductal fluid.

in: A.D. Johnson, C.W. Foley (Hrsg.): The oviduct and its functions. Verlag Academic Press, New York, S. 135-159

BROWN, D.D. (1984):

The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes.

Cell 37, 359-365

BROWN, S.W. (1966):

Heterochromatin.

Science 151, 417-425

BUCHNER, R. u. D. MCKENZIE (1995):

Stratagene RAP-PCR Kits for identifying differentially displayed gene transcripts.

Stratagies in molecular biology 8; 12-14

BUESS, M., MORONI, C. u. H.H. HIRSCH (1997):

Direct identification of differentially expressed genes by cycle sequencing and cycle labelling using the differential display PCR primers.

Nucleic Acids Res. 25, 2233-2235

BUHI, W.C.; J.L. VALLET u. F.W. BAZER (1989):

De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture.

J Exp. Zool, 252; 79-88

BUHI, W.C., I.M. ALVAREZ, V. SUDHIPONG u. M.M. DONES-SMITH (1990):

Identification and Characterisation of De Novo-Synthesized Porcine Oviductal Secretory Proteins.

Biol. Reprod. 43, 929-938

BUHI, W.C., I.M. ALVAREZ, A.R. PICKARD, E.W. MCINTUSH, A.J. KOUBA, C.J. ASHWORTH u. M.F. SMITH (1997):

Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and messenger ribonucleic acid by the oviduct of cyclic, early-pregnant, and ovariectomized steroid-treated gilts.

Biol. Reprod. 57, 7-15

BUHI, W.C., I.M. ALVAREZ u. A.J. KOUBA (1997):

Oviductal regulation of fertilisation and early embryonic development.

J. Reprod. Fert. Suppl. 52, 285-300

BUHI, W.C., I.M. ALVAREZ u. A.J. KOUBA (2000):

Secreted proteins of the oviduct.

Cells Tissues Organs 166, 165-179

CAMPBELL, K.H., J. MCWHIR, W.A. RITCHIE u. I. WILMUT (1996):

Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line.

Nature 380, 64-66

CAPECCHI, M.R. (1994):

Gezielter Austausch von Genen.

Spektrum der Wissenschaft, 44-52

CHAMBON, P. (1981):

Split genes.

Sci. Am. 244, 60-71

CHIRGWIN, M.R., A.E. PRZYBYLA, R.J. MCDONALD u. W.J. RUTTER (1979):

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease

Biochem. 18, 5294-5299

CHOMCZYNSKI, P. u. N. SACCHI (1987):

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Analyt. Biochem. 162, 156-159

CLEMMONS, D.R., R.G. ELGIN, V.K. HAN, S.J. CASELLA, A.J. D'ERCOLE u. J.J. VANWYK (1986):

Cultured fibroblast monolayers secrete a protein that alters the cellular binding of somatomedin-C/insulin-like growth factor I.

J. Clin. Invest. 77, 1548-1556

COHEN, S. u. G. CARPENTER (1979):

Epidermal growth factor.

Annu. Rev. Biochem. 48, 193-216

COLGAN, D.F., K.G.K. MURTHY, C. PRIVES u. J.L. MANLEY (1996):

Cell-cycle related regulation of poly (A) polymerase by phosphorylation.

Nature 384, 282-285

CORPS, A.N., D.R. BRIGSTOCK, C.J. LITTLEWOOD u. K.D. BROWN (1990):

Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophoderm of the pig.

Development 110, 221-227

COX, R.A. (1968):

in: L. GROSSMANN u. K. MOLDAVE (Hrsg.): Methods in Enzymology.

Verlag Academic Press, Orlando, Bd. 12B, S. 120-129

DE CHIARA, T.M., E.J. ROBERTSON u. A. EFSTRATIADIS (1991):

Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene.

Cell 64, 849-859

DEMELLOW, J.S. u. R.C. BAXTER (1989):

Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-1 stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 199-204

ELGIN, R.G., W.H. BUSBY u. D.R. CLEMMONS (1987):

An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biological response to IGF-I.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3254-3258

FARELL, R.E. (1993):

Spectrophotometric methods.

in: Farrell, R.E.: RNA methodologies; a laboratory guide for isolation and characterization, Academic Press, San Diego S. 79-83

FEINBERG, A.P. (1993):

Genomic imprinting and gene activation in cancer.

Nature Genet. 4, 110-113

FRANCIS, G.L., F.M. UPTON, F.J. BALLARD u. K.A. MCNEIL (1988):

Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrum. Sequences and biological activities compared with those of a potent truncated form.

Biochem. J. 251, 95-103

FRANCIS, G.L. P.C. OWENS, K.A. MCNEIL, J.C. WALLACE u. F.J. BALLARD (1989):

Purification, amino acid sequence and assay cross-reactivities of porcine insulin-like growth factor-I and -II.

J. Endocrin. 122, 681-687

FREDERICKS, C.M. (1986):

Morphological and functional aspects of the oviductal epithelium.

in: A.M. Siegler (Hrsg.): The fallopian tube: basic studies and clinical contributions.

Verlag Futura Publishing Company Inc., New York, S. 67-80

FROESCH, E.R., H. BÜRGI, E.B. RAMSEIER, P. BALLY u. A. LABHART (1963):

Antibody suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity.

J. Clin. Invest. 42, 1816-1834

GABLER, C., B. LAUER, A. EINSPANIER, D. SCHAMS u. R. EINSPANIER (1997):

Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct.

J. Reprod. Fert. 109, 213-221

GARDNER, R.M., R.B. LINGHAM u. G.M. STANCEL (1987):

Contractions of the isolated uterus stimulated by epidermal growth factor.

FASEB J. 1, 224-228

GEISERT, R.D., R.H. RENEGAR, W.W. THATCHER, R.M. ROBERTS u. F.W. BAZER (1982):

Establishment of pregnancy in the pig. I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions.

Biol. Reprod. 27, 925-939

GEISERT, R.D., C.-Y. LEE, F.A. SIMMEN, M.T. ZAVY, A.E. FLISS, F.W. BAZER u. R.C.M. SIMMEN (1991):

Expression of messenger RNAs encoding Insulin-like Growth Factor-I, -II, and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy.

Biol. Reprod. 45, 975-983

GLUCKMANN, P.D. u. J.H. BUTLER (1983):

Parturition-related changes in insulin-like growth factors-I and -II in the perinatal lamb.

J. Endocrin. 99, 223-232

GOSPODAROWICZ, D. (1981):

Epidermal and nerve growth factors in mammalian development.

Annu. Rev. Physiol. 43, 251-263

GRAF, D., A.G. FISHER u. M. MERKENSCHLAGER (1997):

Rational primer design greatly improves differential display PCR (DD-PCR).

Nucleic Acids Res. 25, 2239-2240

GREEN, M.L.; L.L. BLAESER; F.A. SIMMEN u. R.C.M. SIMMEN (1996):

Molecular cloning of spermidine/spermine N-acetyltransferase from the periimplantation porcine uterus by messenger ribonucleic acid differential display: temporal and conceptus-modulated gene expression.

Endocrinology, 137; 5447-5455

GRIMES, R.W. u. J.M. HAMMOND (1992):

Insulin and insulin-like growth factors (IGFs) stimulate production of IGF-binding proteins by ovarian granulosa cells.

Endocrinology 131, 553-558

GROVE, R.I. u. R.M. PRATT (1984):

Influence of epidermal growth factor and cyclic AMP on growth and differentiation of palatal epithelial cells in culture.

Dev. Biol. 106, 427-437

GUIMARAES, M.J., F. LEE, A. ZLOTNIK u. T.MCCLANAHAN (1995):

Differential display by PCR: novel findings and applications.

Nucleic Acids Res. 23, 1832-1833

GURDON, J.B. (1962):

The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles.
J. Embryol. Exp. Morph. 10, 622-640

HAINING, R.E.B., I.T. CAMERON, C. VAN PAPENDORP, A.P. DAVENPORT, A. PRENTICE, E.J. THOMAS u. S.K. SMITH (1991):

Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunocytochemical localisation in normal and endometriotic tissues.
Human Reprod. 6, 1200-1205

HALBERT, S.A., S.E. SZAL u. S.H. BRODERSON (1988):

Anatomical basis of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction.
The Anatom. Record, 221, 841-845

HASTIE, N.D. u. J.O. BISHOP (1976):

The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissues.
Cell 2, 761-774

HÖFIG, A., F.A. SIMMEN, F.W. BAZER u. R.C.M. SIMMEN (1991):

Effects of insulin-like growth factor-I on aromatase cytochrome P450 activity and oestradiol biosynthesis in preimplantation porcine conceptuses in vitro.
J. Endocrinol. 130, 245-250

HOLLENBERG, M.D. u. P. CUATRECASAS (1973):

Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2964-2968

HSU, C.J. u. J.M. HAMMOND (1987):

Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro.
Endocrinology 120, 198-207

HUBANK, M. u. D.G. SCHATZ (1994):

Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA.
Nucleic Acids Res. 22, 5640-5648

HUNTER, R.H.F. (1974):

Chronological and cytological details of fertilisation and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*.
Anat. Rec. 178, 169-186

IRITANI, A.; E. SATO u. Y. NISHIKAWA (1974):

Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows.
J. Anim. Sci. 39, 582-588

ISENBERG, I. (1979):

Histones.
Annu. Rev. Biochem. 48, 159-191

JOHNSON, T.R., B.K. BLOSSEY, C.W. DENKO u. J. ILAN (1989):

Expression of insulin-like growth factor I in cultured rat hepatocytes: effects of insulin and growth hormone.
Mol. Endocrin. 3, 580-587

JONES, P.B.C., T.H. WELSH u. A.J.W. HSUEH (1982):

Regulation of ovarian progesterone production by epidermal growth factor in cultured granulosa cells.
J. Biol. Chem. 257, 11268-11273

JORGENSEN, P.E., L.G. JENSEN, B.S. SORENSEN, S.S. POULSEN u. E. NEXO (1998):

Pig epidermal growth factor precursor contains segments that are highly conserved among species.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 58, 287-298

KELLER, W. (1995):

No end yet to messenger RNA 3' processing.

Cell 81, 829-832

KENNEDY, T.G., K.D. BROWN u. T.J. VAUGHAN (1994):

Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine oviduct and endometrium.

Biol. Reprod. 50, 751-756

KO, Y., C.Y. LEE, T.I. OTT, M.A. DAVIS, R.C.M. SIMMEN, F.W. BAZER u. F.A. SIMMEN (1991):

Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy.

Biol. Reprod. 45, 135-142

LEI, Z.M. u. C.V. RAO (1992):

Expression of epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands, EGF and transforming growth factor- α , in human fallopian tubes.

Endocrinology 131, 947-957

LETCHER, R., R.C.M. SIMMEN, F.B. BAZER u. F.A. SIMMEN (1989):

Insulin-like growth factor-I expression during early conceptus development in the pig.

Biol. Reprod. 41, 1143-1151

LEWIN, B. (1980):

Complexity of mRNA populations.

in: Lewin, B. (Hrsg.): Gene expression II Eucaryotic Chromosomes; New York, Wiley, S. 694-727

LI, F., E.S. BARNATHAN u. K. KARIKO (1994):

Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of Northern blot for affinity capturing of cDNAs.

Nucleic Acids Res. 22, 1764-1765

LIANG, P., L. AVERBOUKH u. A.B. PARDEE (1993):

Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization.

Nucleic Acids Res. 21, 3269-3275

LIANG, P. u. A.B. PARDEE (1992):

Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.

Science 257, 967-971

LIANG, P., D. BAUER, L. AVERBOUKH, P. WARTHOF, M. ROHRWILD, H. MULLER, M. STRAUSS u. A.B. PARDEE (1995):

Analysis of altered gene expression by differential display.

Methods. Enzymol. 254, 304-321

LINSKENS, M.H.K., J. FENG, W.H. ANDREWS, B.E. ENLOW, S.M. SAATI, L.A. TONKIN, W.D. FUNK u. B. VILLEPONTEAU (1995):

Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display.

Nucleic Acids Res. 23, 3244-3251

LIU, L., S. GREENBERG, S.M. RUSSELL u. C.S. NICOLL (1989):

Effects of Insulin-like growth factors I and II on growth and differentiation of transplanted rat embryos and fetal tissues.

Endocrin. 124, 3077-3082

LUCE, M.J. u. P.D. BURROWS (1998):

Minimizing false positives in differential display.

Biotechniques 24, 766-768, 770

MANIATIS, T., S. GOODBOURN u. J.A. FISCHER (1987):

Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.

Science 236, 1237-1241

MASTROIANNI, L., M. URZUA u. R. STAMBAUGH (1970):

Protein patterns of monkey oviductal fluid before and after ovulation.

Fertil. Steril. 21, 817-820

MASTROIANNI, L.Jr., K.J. GO (1979):

Tubal secretions.

In: The biology of the fluids of the female genital tract.

Hrsg.: BELLER, F.K. u. G.F.B. SCHUHMACHER

Elsevier, North Holland, Amsterdam

MITCHELL, M.D. (1987):

Epidermal growth factor actions on arachidonic acid metabolism in human amnion cells.

Biochem. Biophys. Acta 928, 240-242

MONDSCHHEIN, J.S., S.A. SMITH u. J.M. HAMMOND (1990):

Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors.

Endocrinology 127, 2298-2306

MONDSCHHEIN, J.S., T.D. ETHERTON u. J.M. HAMMOND (1991):

Characterisation of insulin-like growth factor-binding proteins of porcine ovarian follicular fluid.

Biol. Reprod. 44, 315-320

MOSES, A.C., S.P. NISSLEY, P.A. SHORT, M.M. RECHLER, R.M. WHITE, A.B. KNIGHT u. O.Z. HIGA (1980):

Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3649-3653

MOTTOLA, C., R.G. MCDONALD, J.L. BRACKETT, J.E. MOLE, J.K. ANDERSON u. M.P. CZECH (1986):

Purification and amino-terminal sequence of an insulin-like growth factor-binding protein secreted by rat liver BRL-3A cells.

J. Biol. Chem. 261, 11180-11188

MROCZKOWSKI, B., M. REICH, K. CHEN, G.I. BELL u. S. COHEN (1989):

Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity.

Mol. Cell Biol. 9, 2771-2778

MURPHY, L.J., K. TACHIBANA u. H.G. FRIESEN (1988):

Stimulation of hepatic insulin-like growth factor I gene expression by ovine prolactin: evidence for intrinsic somatogenic activity in the rat.

Endocrinology 122, 2027-2033

MURRAY, M.K. (1996):

Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy.

J. Reprod. Fert. 106, 173-183

NATHANS, D. u. H.O. SMITH (1975):

Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules.

Annu. Rev. Biochem. 44, 273-293

NEVINS, J.R. (1983):

The pathway of eukaryotic mRNA formation.

Ann. Rev. Biochem. 52, 441-466

NIEDER, G.L. u. G.R. MACON (1987):

Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse.

J. Reprod. Fert. 81, 287-294

OGASAWARA, M., K.P. KAREY, H. MARQUARDT u. D.A. SIRBASKU (1989):

Identification and purification of truncated insulin-like growth factor I from porcine uterus.

Evidence for high biological potency.

Biochem. 28, 2710-2721

OGAWA, O., D.M. BECROFT, I.M. MORISON (1993):

Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism.

Nature Genet. 5, 408-412

OLIPHANT, G. (1986):

Biochemistry and immunology of oviductal fluid.

in: A.M. Siegler (Hrsg.): The fallopian tube: basic studies and clinical contributions.

Verlag Futura Publishing Company, Mount Kisco, S. 129-145

REEVES, S.A., M.-P. RUBIO u. D.N. LOUIS (1995):

General method for PCR amplification and direct sequencing of mRNA differential display products.

BioTechniques 18, 18-20

RICKLING, S. (1999)

Vergleichende Untersuchungen zur Genexpression persistierender und nicht persistierender Stadien von *Dictyocaulus viviparus*.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

RITVOS, O., T. RANTA, J. JALKANEN, A.M. SUIKKARI, R. VOUTILAINEN, H. BOHN u. E.M. RUTANEN (1988):

Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells.

Endocrinology 122, 2150-2157

ROBERTS, G.P., J.M. PARKER u. H.W. SYMONDS (1975):

Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct.

J. Reprod. Fert. 45, 301-313

SAHLIN, L., H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, P. STANCHEV, A.-M. DALIN, G. NORSTEDT u. H. ERIKSSON (1990):

Regulation of the uterine expression of messenger ribonucleic acids encoding the oestrogen receptor and IGF-I peptides in the pig uterus.

J. Vet. Med. 37, 795-800

SALMON, W.D. u. W.H. DAUGHADAY (1957):

A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro.

J. Lab. Clin. Med. 49, 825-836

SAMARAS, S., D. HAGEN, J. GADSBY, S. SHIMASAKI, N. LING u. J. HAMMOND (1991):

Ontogeny and localisation of porcine ovarian insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNA.

Biol. Reprod. 44, 187

SANGER, F. (1981):

Determining of nucleotide sequences in DNA.

Science 214, 1205-1210

SATOH, T., KOBAYASHI, K., S. YAMASHITA, M. KIKUCHI, Y. SENDAI u. H. HOSHI
(1994):

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo.

Biol. Reprod. 50, 835-844

SCHONBRUNN, A., M. KRASNOFF, J.M. WESTENDORF u. A.H. TASHJIAN (1980):

Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain. Modulation of hormone production and inhibition of cell proliferation.

J. Cell Biol. 85, 786-797

SCOTT, J. (1995):

A place in the world for RNA editing.

Cell 81, 833-836

SHUMAN, S. u. B. MOSS (1990):

Purification and use of vaccinia virus messenger RNA capping enzyme.

Methods in Enzymol. 181, 170-171

SIMMEN, R.C.M., F.A. SIMMEN, A. HOFIG, S.J. FARMER u. F.W. BAZER (1990):

Hormonal regulation of insulin-like growth factor gene expression in pig uterus.

Endocrinology 127, 2166-2174

SIMMEN, F.A., R.C.M. SIMMEN, R.D. GEISERT, F. MARTINAT-BOTTE, F.W. BAZER u. M. TERQUI (1992):

Differential expression, during the estrous cycle and pre- and postimplantation conceptus development, of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine insuline-like growth factor system.

Endocrinology 130, 1547-1556

SINGH, B., J.M. RUTLEDGE u. D.T. ARMSTRONG (1995):

Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localisation in porcine ovarian follicles.

Mol. Reprod. Dev. 40, 391-399

SMITH, M.M. (1991):

Histone structure and function.

Curr. Opin. Cell. Biol. 3, 429-437

SMITH, N.R., A. LI, M. ALDERSLEY, A.S. HIGH, A.F. MARKHAM u. P.A. ROBINSON (1997):

Rapid determination of the complexity of cDNA bands extracted from DDRT-PCR polyacrylamide gels.

Nucleic Acids Res. 25, 3552-3554

SOMMER; A. (1994):

Differential Display: Etablierung der Methode und erste Anwendung zur Identifizierung c-Myc-regulierter Gene.

Hannover, Univ., Fachber. Chemie, Dipl.

SOMPAYRAC, L., S. JANE, T.C. BURN, D.G. TENEN u. K.J. DANNA (1995):

Overcoming limitations of the mRNA differential display technique.

Nucleic Acids Res. 23, 4738-4739

SOUTHERN, E.M. (1975):

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503-517

SUN, Y., G. HEGAMYER u. N.H. COLBURN (1994):

Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinase-3.

Cancer Res. 54, 1139-1144

SWANCHARA, K.W., D.M. HENRICKS, G.P. BIRRENKOTT, A.B. BODINE u. M.E. RICHARDSON (1995):

Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in the porcine oviduct.

Biol. Reprod. 53, 911-922

TAVAKKOL, A., F.A. SIMMEN u. R.C.M. SIMMEN (1988):

Porcine insulin-like growth factor-I (pIGF-I): complementary desoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid encoding evolutionary conserved IGF-I-peptides.

Mol. Endocr. 2, 674-681

THOMAS, P.G.A., G.G. IGNOTZ, B.A. BALL, S.P. BRINSKO u. W.B. CURRIE (1995):

Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells.

Am. J. Vet. Res. 56, 1657-1662

TIEMANN, U. u. P.J. HANSEN (1995):

Steroid and growth factor regulation of [³H]thymidine incorporation by cultured endosalpingeal cells of bovine oviduct in vitro.

Cell. Devel. Biol. 31, 640-645

TRENTMANN, S.M., E. VAN DER KNAAP u. H. KENDE (1995):

Alternatives to 35S as a label for the differential display of eukaryotic messenger RNA.

Science 267, 1186-1187

UI, M., M. SHIMONAKA, S. SHIMASAKI u. N. LING (1989):

An insulin-like growth factor-binding proteins in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells.

Endocrinology 125, 912-916

WABERSKI, D. u. K.F. WEITZE (1998):

Ultraschall bei Fruchtbarkeitsstörungen des Schweines- neuere Aspekte.

Prakt. Tierarzt, coll. vet. XXVIII, 41-44

WAHLE, E. u. W. KELLER (1996):

The biochemistry of polyadenylation.

Trends Biochem. Sci. 21, 247-250

WANG, X. u. G.Z. FEUERSTEIN (1995):

Direct sequencing of DNA isolated from mRNA differential display.

BioTechniques 18, 448-453

WATSON, H., S. FRANKS u. R.C. BONNEY (1996):

Regulation of epidermal growth factor receptor synthesis by ovarian steroids in human endometrial cells in culture.

J. Reprod Fert. 107, 199-205

WELSH, J., K. CHADA, S.S. DALAL, R. CHENG, D. RALPH u. M. MCCLELLAND (1992):

Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA.

Nucleic Acids Res. 20, 4965-4970

WILLIAMS, J.G., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI u. S.V. TINGEY (1990):
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535

WILMUT, I., A.E. SCHNIEKE, J. MC WHIR, A.J. KIND u. K.H.S. CAMPBELL (1997):
Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.
Nature 385, 810-812

WISEMAN, D.L., D.M. Henricks, D.M. Eberhardt u. W.C. Bridges (1992):
Identification and content of insulin-like growth factor in porcine oviductal fluid.
Biol. Reprod. 47, 126-132

WOLLENHAUPT, K. u. K.-P. BRÜSSOW (1995):
Isolierung eines 97 kd Proteins aus dem Eileitersekret des Schweines mittels eines „High-
performance Electrophoresis-chromatography (HPEC)“ Systems.
Reprod. Dom. Anim. 30, 1-7

WOLLENHAUPT, K., U. TIEMANN, R. EINSPANIER, F. SCHNEIDER, W. KANITZ u. K.-P.
BRÜSSOW (1997):
Characterization of the epidermal growth factor receptor in pig oviduct and endometrium.
J. Reprod. Fert. 111, 173-181

WOLLENHAUPT, K., H. ALM, W. TOMEK u. K.-P. BRÜSSOW (1997):
Untersuchung des Einflusses eines zyklusspezifischen 97 kd Proteins aus dem Eileitersekret des
Schweines auf die de novo Proteinsyntheseleistung von präimplantativen Embryonen.
Reprod. Dom. Anim. 32, 213-219

WOLLENHAUPT, K., R. EINSPANIER, C. GABLER, F. SCHNEIDER, W. KANITZ u. K.-P. BRÜSSOW (1999):

Identification of the EGF/EGF-R system in the oviduct and endometrium of pigs in early stages of pregnancy and early conceptus.

Exp. Clin. Endocr. Diabetes 107, 530-538

WU, A.S.H., S.D. Carlson u. N.L. FIRST (1976):

Scanning electron microscopy study of the porcine oviduct and uterus.

J. Anim. Sci. 42, 804-809

WU, R.S., H.T. PANUSZ, C.L. HATCH u. W.M. BONNER (1986):

Histones and their modifications.

Crit. Rev. Biochem. 20, 201

XIA, P., J. RUTLEDGE, A.J. WATSON u. D.T. ARMSTRONG (1996):

Effect of estrogen-treated porcine ampulla oviductal epithelial cells on early embryonic development in vitro and characterisation of their protein synthetic activity.

Anim. Reprod. Sci. 45, 217-229

ZAPF, J. u. E.R. FROESCH (1986):

Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role.

Horm. Res. 24, 121-130

ZAPF, J., C. HAURI, WALDVOGEL, E.R. FROESCH (1986):

Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats.

J. Clin. Invest. 77, 1768-1775

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenin
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bp	basepairs
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDRT-PCR	Differential-Display-Reverse-Transkriptions-PCR
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat-Dinatriumsalz
EGF	epidermal-growth-factor
et al.	et alii
fmol	fentomol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
I.E.	Internationale Einheiten
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
kb	Kilo-Basenpaare

kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
M	Mol
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
min.	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RDA-cDNA	representational difference analysis of cDNA
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
sec.	Sekunde
Std.	Stunde
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TPE	TRIS-Phosphat-EDTA
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

Abkürzungen der Aminosäuren:

A	Alanin
B	Asparagin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Thyrosin
Z	Glutamin

8.2 Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

10x FA-Gel-Puffer:

41,8 g MOPS

800 ml Aqua dest

mit 1 M NaOH-Lösung pH-Wert auf 7,0 einstellen

16,6 ml 3 M Natriumacetat-Lösung

20 ml 0,5 M EDTA-Lösung

Aqua dest. ad 1000 ml

steril filtrieren

10x TBE-Puffer:

108 g TRIS

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)

ad 1000 ml Aqua bidest.

5x RNA-Auftragspuffer:

16 µl Bromphenolblau

80 µl 500 mM EDTA, pH 8,0

720 µl 37% Formaldehyd

2000 µl Glycerol

3084 µl Formamid

4000 µl 10x FA Gel Puffer

100 µl Aqua dest.

dNTP-Mixe:

1 μ l 100 mM A-Nucleotide

1 μ l 100 mM T-Nucleotide

1 μ l 100 mM C-Nucleotide

1 μ l 100 mM G-Nucleotide

96 μ l Ampuwa

ergibt 1 mM dNTP-Mix

1x TAE-Puffer:

0,04 M Tris-Acetat

0,001 M EDTA

1x TPE-Puffer:

0,09 M Tris-Phosphat

0,002 M EDTA

6x Agaroseauftragspuffer:

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylen Cyanol

Glycerol in Aqua dest.

8.3 Sequenzen der Wachstumsfaktoren/-bindungsproteine

IGF-1:

1 tacaaggta agatgacat cacatcctct tcgcatctct tctacttggc cctgtgcttg
61 ctctcctca ccagctctgc cacggctgga cctgagacc tctgtggggc tgagctggtg
121 gacgtcttc agttcgtgtg cggagacagg ggcttttatt tcaacaagcc cacagggtac
181 ggctccagca gtcggagggc gccacagacg ggcatcgtgg atgagtgctg ctccggagc
241 tgtgatctga ggaggctgga gatgtactgt gcaccctca agcctgcca gtcggcccgc
301 tccgtccgtg ccagcgcca cacggacatg cccaaggctc agaaggaagt acattgaag
361 aacacaagta gagggagttc aggaacaag aactacagaa tgtaggaaga cttcctgaa
421 gagtgaagaa tgacatgcca ctggcaggat cctttgctct gcacgagta cctgttaaac
481 accagaagac ctacaaaaa aataagttg aaaacattc aaaagatggg cattcccccc
541 aatgaaatac acaagtaaac attcccc

IGFBP-2:

1 gaggcgctc ccgcctgc agggcctgc cactgccc ctcctccc gccctcgc
61 tcaccgcc caacatgctg ccgagactgg gcggcaccgc gctgtcgtt ctgccgtgc
121 tctgtctgct gctgggcacg ggcggccgcg gggcgccgcg cgaggtgctg ttccgtgcc
181 cgcctgcac gcccgagagc ctggccgctt gcaggcccc tcccgccgcg ccgccctccg
241 ccggggcccg gccggctggc gactcccgcg cgcctgcga gcttgcctgg gagccgggt
301 gcggctgctg ctctgtgtgc gcggcctgg agggcgagcg gtgcggcgtg tacaccgc
361 gctgcgcca ggggctgcgc tgctatccc accgggctc cgagctccc ctgcaggcgc
421 tggctctggg cgaggcact tgcgaaaagc gcccgatgc cgagtacggc gccagccccg
481 agcaggtgc agacaatggc gacgatgctg agggaggcct ggtgagaac cacgtggatg
541 ggaacgtgaa ctgttggga ggtacaggcg gtgctggccg gaagcccctc aagtcaggca
601 tgaaggagct ggctgtgttc cgggagaaag tcacggagca gcaccggcag atgggcaagg
661 gtggcaagca tcacctggc ctggaggagc ccaagaagct gcggccgccg cctgccagga
721 cccctgcca gcaggagtg gaccaggctc tggaacggat ctccacatg cgcctccgg
781 atgagcgggg cccctggag cactgtact cctgcacat cccaactgt gacaagcatg
841 gcctgtaca cctcaaacag tgcaagatgt ctctaatgg gcagcgtggg gactgctggt
901 gcgtgaacc caacaccggg aagctgatcc agggggcccc caccatccgg ggggaccccg
961 agtgcctct ctctacaac gagcagcagg gggctcgcgg ggcacacacc cagcggatgc
1021 agtaaaccac agccagccgg tgcctggcac cccccccc accctcttc aaacgcagge
1081 agagcgggga gactgcttc gtggtgggtg ggggaggatt ttccaggagt tctgacatgc
1141 gtatttatat ttgaaagag accagcaccg agcttggcac ccgtcccc ctcctcccc
1201 cctccccagc tggagatgcc cagctggaga tgcccgcacc ctcctcctg gaatcctgc
1261 tggggaggga gggggtggct gcagtggcgg agctgggta gaggttggg aggggggaaa
1321 aaagaaattt ttattttga accctgtgt ctctttgct taagataaa ggaaggaaa
1381 ataataaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

EGF-precursor:

1 ctccctgatg ggaacggtg tcatcaatta atttctgcc caagcaatgt gtctgagtgt
61 agccatgact gtgttctgac atcagatggt cccatatgtt tctgtcctga agactcagta
121 cttgaggcag atggaaaaac atgtagcggc tgttcatcac ctgataatgg tgggtgcagc
181 cagctctgcc ttcctctcag tccagtaacc tgggaatgtg gctgctttcc tgggtatgac
241 ctacagtgg acaaaaagag ctgtagagct tcaggaccac caccgtttt gctgtttgc
301 aattctcaag atattcgaca catgcattt gacggaacag attatgaaac tctgctcaac
361 cagcaaatag gaatggttt ggcctagat catgaccctg tggaaaataa ggtatacttt
421 gccatacag ccctgaaatg gatagagaga gctaataatgg atggttcca gcgagaaagg
481 cttttgagg aagcagtcga tgtgccagaa ggtcttgcca tagactggat tggccgtaaa
541 ttctattgga cagacagagg gagatctctc attgaaggga gtgatttaa tggaaaatac
601 cgcgaaataa tcattaagga agacatctct cagccacgag gaattgctgt tcatccagtg
661 gccaagagat tattctggac tgatatggg actaatccac gaattgaaag ttcacccctt
721 caaggcattg gccgacgggt tatagccagc tcggatctgg tctggcccag cggaaataca
781 attgattact taactgaaa gttgtattgg tgcgatcca agcagtctgt gattgaaatg
841 tccaatctgg atggttcgag acgccagaga cttgccaga acgatgtagg tcaccattt
901 gcggtagctg tgtttgagga tcacgtgtgg ttctctgact ggactatgcc atcgtaata
961 agggtgaaca agaggactgg caaaaatagg gtacgtctcc gaggcagcat gctgaagccc
1021 tcatcactgg ttgtagtca tccattggca aaaccaggaa caaatccctg cttacaccaa
1081 aatggaggct gtgaacatat ctgcaaagag agttttgaa ctgctcagt tttgtgcat
1141 gaaggtttc tgaagcccc agatggaaaa atgtgtctgg ctctgaatgg ccaagagata
1201 ttggcagtc gtgggaaaga tctgagtgat ggagtaatgc cagtggacac cttaccaga
1261 agcagagagc ttgaagataa cttacagaa tctcaacaca ttctagtggc tgaatcatg
1321 gtttcagatg acgaggactg cggcgtcgc ggatgcagtg cgcaggcgcg gtgtgttaca
1381 gagggagagg acgccacgtg tcagtgtttg aaaggattg ctggagatgg aaacctgtgt
1441 tctgatatag atgagtgtga gctgggcacc tcggtgtgcc ctctacctc ctccgagtgc
1501 atcaataccg aaggtgtca cgtctcccgc tgctcggaag gctaccaggg agatgggatc
1561 cactgtctcg atattgatga gtgccaacta ggtgtgcaca cctgtgggga aaatgccacc
1621 tgtacaaata cggagggaaa ctacacctgc acatgtgctg gccgccctc tgaaccggga
1681 cggatttgc ctgaccctac tccacctct cacctcgggg agg

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Meinecke danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und zur Hilfestellung bei Problemen hat mich bei meiner Arbeit sehr unterstützt.

Bei Frau PD Dr. Meinecke-Tillmann, Frau Gümmer und Herrn Dr. Krisek möchte ich mich für die Unterstützung und machen hilfreichen Hinweis bedanken.

Mein Dank gilt Frau Podhajsky für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Geduld.

Besonderen Dank schulde ich Frau Ehklasi-Hundrieser und Herrn Gentzel, die immer bereit waren, mich bei Problemen zu beraten.

Frau Prof. Dr. Töpfer-Petersen, Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover, und Prof. Dr. Schnieder, Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, danke ich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. Niemann, Institut für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig Völkenrode (FAL), danke ich für das zur Verfügungstellen der Versuchstiere und manchen wertvollen Hinweis.

Meinem Chef Dr. Brunschön-Hellmich danke ich für die Erlaubnis, am Schlachthof Hannover Proben nehmen zu dürfen sowie ihm und meiner Kollegin und Kollegen für die aufmunternden Worte.

Meinen Eltern danke ich für ihre stete Bereitschaft, mich in jeglicher Hinsicht zu unterstützen, ohne die mir die Anfertigung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.