

# Technische Universität München

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Untersuchung der Genexpression im porcinen Endometrium während der Präimplantationsphase mittels HOCHDURCHSATZ-RNA-Sequenzierung und DNA-Microarrays

Anastazia Samborski

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D
2. Priv.-Doz. Dr. S. E. Ulbrich

Die Dissertation wurde am 08.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.07.2013 angenommen.

Tue nie etwas halb, sonst verlierst du mehr, als du je wieder einholen kannst.

*Louis Armstrong*

### Originalartikel

Deep Sequencing of the Porcine Endometrial Transcriptome on Day 14 of Pregnancy

Anastazia Samborski<sup>3</sup>, Alexander Graf<sup>3</sup>, Stefan Krebs<sup>3</sup>, Barbara Kessler<sup>4</sup>, and Stefan Bauersachs<sup>2,3</sup>

<sup>3</sup>Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Munich, Germany; Chair for Molecular Animal Breeding and Biotechnology, LMU Munich, Oberschleißheim, Germany

Publiziert in *Biology of Reproduction* (2013) 88(4):84, 1-13

Transcriptome Changes in the Porcine Endometrium During the Preattachment Phase

Anastazia Samborski<sup>4</sup>, Alexander Graf<sup>4</sup>, Stefan Krebs<sup>4</sup>, Barbara Kessler<sup>5</sup>, Myriam Reichenbach<sup>6</sup>, Horst-Dieter Reichenbach<sup>6</sup>, Susanne E. Ulbrich<sup>3,7</sup> and Stefan Bauersachs<sup>2,4</sup>

<sup>4</sup>Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Munich, Germany; <sup>5</sup>Chair of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, LMU Munich, Oberschleißheim, Germany; <sup>6</sup>Institute for Animal Breeding, Bavarian State Research Center for Agriculture, Grub, Germany; <sup>7</sup>Physiology Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany

Publiziert in *Biology of Reproduction* (2013) 89(6):134, 1-16

### Wissenschaftliche Vorträge

Untersuchung der differentiellen Genexpression im porcinen Endometrium am Tag 14 der Trächtigkeit mittels RNA-Sequenzierung

Anastazia Samborski<sup>1</sup>, Alexander Graf<sup>1</sup>, Stefan Krebs<sup>1</sup>, Barbara Kessler<sup>2</sup>, Myriam Reichenbach<sup>2</sup>, Horst-Dieter Reichenbach<sup>3</sup> and Stefan Bauersachs<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA) and <sup>2</sup>Chair of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Munich; <sup>3</sup>Institute for Animal Breeding, Bavarian State Research Center for Agriculture, Grub, Germany

*Presented at:* 44<sup>th</sup> Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 36<sup>th</sup> Joint Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine 2011 in Hannover



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1 LITERATUR</b> .....	<b>1</b>
1.1 Der Brunstzyklus.....	2
1.2 Fertilisation .....	6
1.3 Frühe Embryogenese .....	8
1.4 Erkennung und Aufrechterhaltung der Gravidität.....	10
1.6 DNA.....	14
1.7 RNA .....	15
1.8 Differenzielle Genexpression .....	17
1.9 Genregulation in der Entwicklung .....	20
1.10 Sequenzierung.....	20
1.10.1 Illumina Genome Analyzer.....	23
<b>2 ZIELSETZUNG:</b> .....	<b>25</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Geräte .....	27
3.1.2 Chemikalien .....	28
3.1.3 Kits, Reagenzien und Enzyme .....	28
3.1.4 Molekulargewichtsstandard .....	29
3.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	29
3.1.6 Software.....	30
3.1.7 Datenbanken .....	31
3.1.8 Oligonukleotide .....	31
3.1.9 Versuchstiere .....	32
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>32</b>

## Inhaltsverzeichnis

3.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere .....	32
3.2.2 Probenentnahme .....	32
3.2.3 Isolation und Analyse der RNA .....	34
3.2.4 Auswahl der Proben für RNA-Seq .....	36
3.2.5 RT-PCR .....	36
3.2.6 Herstellung der Libraries für RNA-Sequenzierung (RNA-Seq).....	37
3.2.7 Analyse der Sequenzdaten .....	42
3.2.8 GO Analyse.....	43
3.2.9 Gene Set Enrichment Analyse.....	43
3.2.10 Quantitative Real-time RT-PCR.....	44
3.2.11 Sequenzierung der qPCR-Fragmente .....	45
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Auswahl der Versuchstiere .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Probengewinnung .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 RNA-Isolierung und Analyse der Gesamt-RNA .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Probenauswahl für RNA-Seq Analyse .....</b>	<b>52</b>
4.4.1 Probenauswahl Tag 14.....	53
4.4.2 Probenauswahl Tag 12.....	56
<b>4.5 Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken und Sequenzierung für Tag 14 der Trächtigkeit .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Mapping der Sequenzen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene Tag 14 .....</b>	<b>60</b>
4.6.1 Hierarchisches Clustern der Expressionsprofile Tag 14 .....	61
<b>4.7 Validierung der Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse an Tag 14 mit quantitativer Real-time RT-PCR (qPCR)..</b>	<b>63</b>
<b>4.8 Vergleich RNA-Seq-Analyse mit Affymetrix-Microarray-Daten am Tag 14 der Trächtigkeit .....</b>	<b>65</b>
<b>4.9 Gene-Ontology-Analyse Tag 14 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.10 Gene Set Enrichment Analyse Tag 14.....</b>	<b>68</b>
<b>4.11 Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken und Sequenzierung für Tag 12 der Trächtigkeit .....</b>	<b>71</b>
<b>4.12 Mapping der Sequenzen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene Tag 12 .....</b>	<b>72</b>
4.12.1 Hierarchisches Clustern der Expressionsprofile Tag 12 .....	74

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.13 Validierung Tag 12 mit quantitativer Real-time RT-PCR (qPCR)</b> .....	<b>75</b>
<b>4.14 Vergleich differentiell exprimierter Gene Tag 12 und Tag 14</b> .....	<b>76</b>
<b>4.15 GO-Analyse Tag 12</b> .....	<b>76</b>
<b>4.16 Gene Set Enrichment Analyse Tag 12</b> .....	<b>77</b>
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>80</b>
<b>5.1 Differentielle Genexpression an Tag 14 der Trächtigkeit</b> .....	<b>80</b>
5.1.1 Vergleich der Datensätze aus RNA-Seq Tag 14 und Affymetrix Tag 14 .....	81
5.1.2 Gene Set Enrichment Analyse Tag 14 .....	82
5.1.3 GO-Analyse .....	83
5.1.4 Ausgewählte differentiell exprimierte Gene und ihre mögliche Funktion .....	84
<b>5.2 Differentielle Genexpression an Tag 12 der frühen Trächtigkeit</b> .....	<b>87</b>
5.2.1 Gene Set Enrichment Analyse.....	87
5.2.2 GO-Analyse .....	88
5.2.3 Ausgewählte Gene und ihre mögliche Funktion.....	91
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>94</b>
<b>7 SUMMARY</b> .....	<b>96</b>
<b>8 ANHANG:</b> .....	<b>98</b>
<b>9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>101</b>
<b>10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS:</b> .....	<b>105</b>
<b>11 TABELLENVERZEICHNIS:</b> .....	<b>107</b>
<b>12 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>
<b>13 DANKSAGUNG:</b> .....	<b>123</b>

## 1 Literatur

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach Lebensmitteln als Folge der stetig steigenden Bevölkerungszahlen ist auch die weltweite Schweinefleischproduktion vor neue Herausforderungen gestellt. Insbesondere sind die Anforderungen an die modernen Hochleistungssauen gestiegen. Dies trifft nicht nur auf die Planbarkeit und Stabilität der Produktion zu, sondern auch auf die Beibehaltung eines stetig hohen Reproduktionsniveaus innerhalb der Betriebe. Seit 1961 ist die Fleischproduktion von ca. 70 Millionen Tonnen auf mittlerweile fast 283 Millionen Tonnen angewachsen. 2010 wurden weltweit 294 Millionen Tonnen Fleisch produziert (Weltagrarbericht, [www.weltagrarbericht.de](http://www.weltagrarbericht.de)). Allein in Deutschland wurden 2011 8,2 Millionen Tonnen Fleisch produziert, 5,6 Millionen Tonnen davon allein Schweinefleisch (Pressemitteilung Statistisches Bundesamt zur Fleischproduktion, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)). Der Verbrauch bei Schweinefleisch pro Kopf bewegte sich in den Jahren 1998 bis 2007 weltweit auf relativ konstantem Niveau von ca. 15 Kilogramm pro Kopf und Jahr. Viele Betriebe haben im Hinblick auf die Anzahl der gehaltenen Tiere stark an Größe zugenommen, um die steigende Nachfrage erfüllen zu können. Die Fruchtbarkeit der Tiere spielt beim wirtschaftlichen Betriebserfolg eine entscheidende Rolle.

Die Rate von embryonalen Verlusten während der frühen Trächtigkeit liegt beim Schwein zwischen 20% bis 46% (Ross et al., 2009). Während der sogenannten Peri-Implantationsphase, meist zwischen Tag 11 und Tag 12 der Gestation (Stroband and Van der Lende, 1990, Yelich et al., 1997), stellen sich die meisten embryonalen Verluste ein. Es ist bekannt, dass sich der Trophoblast zu diesem Zeitpunkt stark differenziert und expandiert, gefolgt von der Implantation ab Tag 14 (Geisert et al., 1982a, Stroband and Van der Lende, 1990, Yelich et al., 1997). Die Implantation, wie auch die Elongation des Trophoblasten, sind für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit Schlüsselfaktoren. Zum einen ermöglichen sie den Austausch von Nährstoffen zwischen dem Uterus und dem Konzeptus durch die vergrößerte Oberfläche der Plazenta (Stroband and Van der Lende, 1990), zum anderen maximieren sie somit den Nährstoffaustausch durch die gesamte Gestation hindurch aufgrund des erhöhten Kontaktes zwischen der Plazenta und des Uterus als Folge der epitheliochorialen Plazentation welche an Tag 14 der Trächtigkeit beginnt (Stroband and Van der Lende, 1990, Ross et al., 2009).



## 1.1 Der Brunstzyklus

Die strukturellen und funktionellen Veränderungen die im Endometrium während des Brunstzyklus stattfinden, dienen dem Ziel die Implantation der Blastozyste im Uterus zu ermöglichen und die weitere Versorgung des sich entwickelnden Konzeptus sicher zu stellen. Ein regelmäßiger und ganzjähriger Brunstzyklus stellt sich bei der Sau nach dem Pupertätseintritt ein, welcher durch die erste Brunst gekennzeichnet ist. Der Eintritt in die Geschlechtsreife hängt beim Schwein auch maßgeblich von den vorherrschenden Haltungsbedingungen und der erfolgten Fütterung ab (Soede et al., 2011). Ist eine Sau geschlechtsreif, so nimmt die Expression von gonadotropen Hormonen stark zu. Während der Brunst ovulieren die Graaf'schen Follikel und die ersten befruchtungsfähigen Eizellen haben sich entwickelt. Bei diesen Vorgängen spielt der Hypothalamus als zentrales Steuerorgan eine übergeordnete Rolle (Soede et al., 2011). Er setzt erhöhte Mengen des sogenannten Gonadotropin-freisetzenden Hormons (GnRH) frei, die zur Ausschüttung der Gonadotropine follikelstimulierendes Hormon (FSH), und luteinisierendes Hormon (LH) führen (Guthrie et al., 1990, Esbenshade et al., 1990). Das Hormon FSH unterstützt die Reifung des Follikels und die Ausschüttung der wichtigen Follikelhormone (Knox, 2005). Zu diesen Follikelhormonen gehört auch die Gruppe der Östrogene mit Hormonen wie Östradiol, Östron und Östriol (Hsueh et al., 1984). Die Östrogene spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der charakteristischen Brunstsymptome. Das zweite Gonadotropin, LH, unterstützt den Follikelsprung ebenso wie die Gelbkörperbildung (Knox, 2005). Durch einen Anstieg an LH im Blut vermehrt Expression von Gelbkörper-fördernde Hormone exprimiert (Knox, 2005).

Der Sexualzyklus des Schweins ist ein sogenannter polyöstrischer Zyklus und hat eine durchschnittliche Dauer von etwa 21 Tagen (Soede et al., 2011). Solch ein regelmäßiger Brunstzyklus stellt sich bei der Sau in der Regel am 150. - 220. Lebenstag ein (Soede et al., 2011). Er lässt sich in fünf Abschnitte gliedern, deren Übergänge jedoch fließend und nicht starr voneinander trennbar sind: Proöstrus (Tag 18-21), Östrus (Tag 1-2), Metöstrus (Tag 3-6), Diöstrus I (Tag 7-12) und Diöstrus II (Tag 13-18).

Der Proöstrus ist die Phase in der die Follikelreifung im Ovar stattfindet. Er ist gekennzeichnet durch die Bildung der sogenannten Tertiärfollikel und einer erhöhten Ausschüttung der follikelstimulierenden Hormone FSH und LH ein (Knox, 2005). Diese Follikel befinden sich im Wachstum und bestehen aus zwei Arten von Zellen: Den Theka- und den Granulosazellen (Morbeck et al., 1992). Die Granulosazellen besitzen Rezeptoren für FSH. Bindet FSH an diese Rezeptoren werden die Granulosazellen zu erhöhter Proliferation angeregt und es bilden sich zusätzliche Rezeptoren für das Hormon LH. Durch die Bindung von LH wird das weitere Wachstum und die Reifung der Follikel angeregt (Kessel et al., 1985,

## Literatur

Jia et al., 1985). Auf der Oberfläche der Thekazellen befinden sich ebenfalls spezifischen Rezeptoren für LH (LHR) (Liu et al., 1998). Durch die Bindung von LH an seinen spezifischen Rezeptor wird in beiden Zellgruppen ein Adenylatcyclase-Signalweg aktiviert, infolgedessen ein Anstieg der cAMP Synthese messbar ist (Esbenshade et al., 1990). cAMP, ein sogenannter „second messenger“, aktiviert die Phosphorylierung für die Steroidsynthese bestimmter Enzyme. Diese Enzyme wiederum katalysieren die Synthese von sog. Androgenen, wie z.B. Testosteron und Androstendion (Ainsworth et al., 1990) ebenso wie auch Progesteron(P4). Diese Androgene diffundieren nach ihrer Synthese in die Granulosazellen ein (Conley et al., 1994).

FSH, das zweite Gonadotropin, ist wohl eines der wichtigsten Hormone zur Kontrolle des Follikelwachstums (Picton et al., 1999). Im Schweinefollikel befinden sich die FSH Rezeptoren (FSHR) ausschließlich auf der Oberfläche der Granulosazellen (Liu et al., 1998). Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren werden Signalwege in Gang gesetzt, die die Aromatisierung der Androgene in Östrogene bewirken; in erster Linie zu Östron und 17 $\beta$ -Östradiol (E2) (Ainsworth et al., 1990). Für diese Umwandlung von Androgenen in E2 ist das Enzym P450 Aromatase (Cyp19) zuständig (Corbin et al., 2003). Sobald es aktiv ist, aromatisiert es Testosteron zu E2. Im Menschen kommt die P450 Aromatase ausschließlich in den Granulosazellen der Follikel vor, im Schwein jedoch ist sie in beiden Zellgruppen, Theka- wie auch Granulosazellen zu finden (Guthrie et al., 1994).

Die Ausschüttung der Östrogene durch die Granulosazellen stellt einen entscheidenden Faktor für den weiteren Verlauf des Brunstzyklus dar. Die ausgeschütteten Östrogene wirken fördernd auf die Bildung neuer follikulärer Bindestellen für die Gonadotropine und steigern somit das Follikelwachstum. Die außerdem durchblutungsfördernden Eigenschaften der Gonadotropine führen bereits in der späten Proöstrus-Phase zu einer sichtbaren Schwellung der Vulva (Mburu et al., 1995) und einer verdickten und ödematisierten Schleimhaut (Soede et al., 2011). Das Endometrium beginnt mit einer gesteigerten Expression von verschiedenen Rezeptoren, wie den Östrogenrezeptor alpha (ESR1), den Progesteronrezeptor (PGR) und des Oxytocinrezeptors (OXTR).

Die Synthese der Gonadotropine wird in erster Linie durch Steroide, insbesondere von Östrogen, durch sogenannte Feedback-Mechanismen geregelt. Auch bestimmte Peptide, wie Inhibin und Aktivin, spielen bei den Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle (Noguchi et al., 2010).

Zunächst lässt sich beobachten, dass die Östrogenkonzentration bis in die späte Follikelphase ansteigt. Diese steigende Konzentration an Östrogen bewirkt einen negativen Östrogen-Feedback bei dem die LH-Sekretion zunächst gehemmt wird (Noguchi et al., 2010). Überschreitet jedoch die Menge an Östrogen eine bestimmte Konzentration, so stellt sich

ein positiver Östrogen-Feedback ein und zieht eine gesteigerte Sekretion von LH nach sich (Grant et al., 1989). Die zunehmende Konzentration von Östradiol-17- $\beta$  (E2) verläuft synchron mit dem Wachstum des Follikels (Guthrie et al., 1993). Wie schon beschrieben wird die Östrogensynthese durch FSH stimuliert (Slomczynska and Wozniak, 2001). Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass auch LH eine Rolle bei der gesteigerten Östrogensynthese eine Rolle spielt (Picton et al., 1999).

Der Östrus, der durch Indikatoren wie den Duldungsreflex gekennzeichnet ist, beginnt zeitgleich mit dem zuvor beschriebenen LH-Peak (Pope, 1988). Während der Hauptbrunst, auch Östrus genannt, bilden sich die Tertiärfollikel zu Graaf'schen Follikeln um. Alle anderen enzymatischen Systeme im Follikel werden gehemmt, so dass Progesteron (P4) das vorherrschende Steroid ist und innerhalb des Follikels ein signifikanter Konzentrationsanstieg beobachtet werden kann (Downey, 1980). In diesem Abschnitt des Sexualzyklus kommt es auch zum Eisprung, der sogenannten Ovulation. Hierbei ovuliert nur ein Teil der vorhandenen Follikel, der Rest geht in die Atresie über und bildet sich zurück (Guthrie et al., 1995).

Der Metöstrus ist eine Phase weitreichender morphologischer und funktioneller Umstrukturierungen. Zum einen verschwindet die Basalmembran zwischen den Theka- und den Granulosazellen vollständig, des weiteren wachsen vermehrt Blutgefäße ein und schaffen so ein dichtes Netz aus Gefäßen (Niswender et al., 1994, Ricke et al., 1999), welches eine bessere Durchblutung des Gewebes ermöglicht. Nun beginnt auch die sogenannte Luteinisierung der Theka- und Granulosazellen der Follikel (Downey, 1980). Durch diesen Vorgang steigt die Progesteronkonzentration im Follikel erheblich an und das LH induziert die Produktion von Prostaglandinen wie PGE und Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) (Evans et al., 1983, Tsang et al., 1988). Prostaglandine bewirken eine erhöhte Blutversorgung der Follikel und zusammen mit der steigenden Progesteronkonzentration induzieren sie Vorgänge, die ebenfalls an der Auflösung der Follikelwand mitwirken. Versuche, bei denen die PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -Synthese gehemmt wurde, zeigten, dass hierbei auch die Ovulation selbst gehemmt werden kann (Ainsworth et al., 1975, Tsang et al., 1979). PGF<sub>2</sub> $\alpha$  wird nicht nur im Corpus luteum (CL, Gelbkörper) selbst gebildet, sondern ist auch in der Uterusschleimhaut zu finden (Barb et al., 1984).

Geht der Sexualzyklus in den Metöstrus über, kommt es zu einer Umstrukturierung der Follikel zum CL. Das CL ist in der Lage, Progesteron zu produzieren, welches für den Erhalt einer Trächtigkeit essenziell ist. Nach der Ovulation (Eisprung) kommt es zur Bildung einer Follikelhöhle welche durch unverletzte Granulosazellen wieder aufgefüllt wird (Schnurrbusch et al., 1977). Diese Granulosazellen zeigen eine erhöhte Proliferation und beginnen damit Fett einzulagern. Diese Zellen werden nun Lutealzellen genannt und bilden den Gelbkörper. So entsteht am Ende des Metöstrus eine temporäre Hormondrüse, das Corpus luteum. Ist

das CL voll entwickelt, startet die Synthese des Progesterons (Spencer et al., 2004). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die kleinen Lutealzellen aus den Thekazellen bilden und die großen Lutealzellen ihren Ursprung in den Granulosazellen haben (Farin et al., 1988). Beide Gruppen sind in der Lage Progesteron zu produzieren, jedoch scheinen die großen Lutealzellen höhere Progesteronmengen auszuschütten (Fitz et al., 1982). Trotz der Unterschiede der beiden Zelltypen, bilden sie im Gewebe einen festen Zellverband (Farin et al., 1986).

Der Brunstzyklus der Sau hat die Phase des Diöstrus erreicht. Das vom Corpus luteum synthetisierte Progesteron erreicht am 12. Zyklustag die maximale Konzentration und markiert den Scheideweg für die entwickelten Gelbkörper (Bazer et al., 1986). Bei einer Ingravidität der Sau bilden sich die Gelbkörper aufgrund der fehlenden Trächtigkeitssignale eines Konzeptus zurück. Die Luteolyse beginnt (Bazer et al., 1986, Roberts et al., 1996). Als Luteolyse bezeichnet man den strukturellen Abbau des Corpus luteum, um den Eintritt in einen neuen Brunstzyklus zu ermöglichen. Hauptfaktor in der Luteolyse ist das Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) (Barb et al., 1984, Guthrie and Rexroad, 1980). Die Luteinzellen bilden spezifische Rezeptoren aus, an die das Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  binden kann, wobei die großen Luteinzellen früher die entsprechenden Rezeptoren exprimieren als die kleinen. Durch die Luteolyse verliert der Gelbkörper die Fähigkeit Progesteron zu synthetisieren und folglich sinkt der Progesteronspiegel im Plasma signifikant ab (McGuire et al., 1994, Diekman et al., 1978, Wiesak et al., 1992). Des Weiteren wird parallel hierzu die Anzahl der LH-Bindestellen reduziert (Ziecik et al., 1980). Durch den nun erhöhten Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  Spiegel wird ein erhöhter  $Ca^{2+}$ -Influx ausgelöst. Es bilden sich vermehrt  $Ca^{2+}$ -Komplexe die zu einer Abnahme der cAMP Konzentration führen. Im Anschluss finden die Migration von Makrophagen in die Luteinzellen und der Abbau des Kapillarnetzes statt. Die Zahl der Immunzellen in luteolytischen Gewebe zur Zeit der Luteolyse zeigt einen deutlichen Anstieg in vielen Säugern wie z.B Ratte, Schwein, Mensch und Rind (Standaert et al., 1991, Bulmer, 1964, Wang et al., 1992, Lei et al., 1991). Die von den eingewanderten Makrophagen synthetisierten Zytokine, allen voran der Tumor-Nekrose-Faktor alpha ( $TNF\alpha$ ) hemmen die gesamte Steroidgenese und die Luteinzellen werden apoptotisch. Es findet eine Volumenabnahme des Corpus luteum statt und er wird zum Corpus albicans (weißer Körper) (Niswender et al., 1994, Niswender et al., 2000, Hehnke et al., 1994). Durch den fehlenden Effekt des Progesterons aus dem Corpus luteum können die Gonadotropine erneut das Wachstum neuer Follikel anregen (Spencer et al., 2004). Es beginnt ein neuer Brunstzyklus.

Bei Vorliegen einer Trächtigkeit produzieren die Gelbkörper weiterhin Progesteron. Die steigende Konzentration an Progesteron führt anschließend zu einer Hemmung der weiteren Gonadotropinausschüttung und es werden keine neuen Follikel gebildet (Galway et al., 1990).

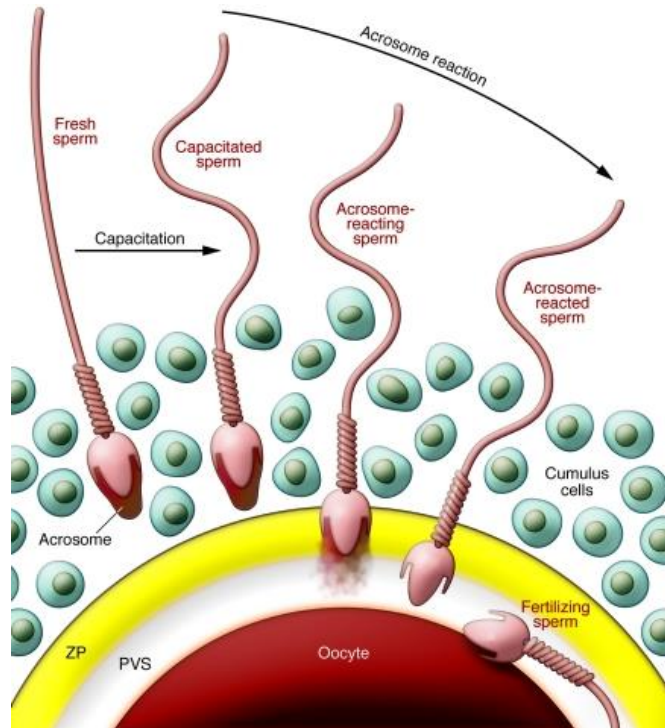
## 1.2 Fertilisation

Im weiblichen Individuum beschreibt die Oogenese die Bildung einer befruchtungsfähigen haploiden Gamete. Während der Ovulation wandern die Eizellen, die in diesem Stadium von Schichten aus Kumuluszellen und der Corona radiata umgeben sind, in den Eileitertrichter. Zu diesem Zeitpunkt befinden sie sich in der Metaphase der zweiten meiotischen Reifeteilung. Die Befruchtung findet in der Ampulla-Isthmus-Verbindung (AIV) statt (Halbert et al., 1988). Der Eileiter besteht aus drei Segmenten: Eileitertrichter, Ampulle und Isthmus. Die Übergänge zwischen den Segmenten heißen folglich Ampulle-Isthmus-Verbindung (AIV) und uterotubale Verbindung (UTV) (Halbert et al., 1988). Kapazitierte Spermien binden während der Befruchtung an ZP3-Rezeptoren, sulfatierte Glykoproteine, die als spezifische Rezeptoren an der Zona Pellucida der Eizellen fungieren (Hinsch et al., 1997).

Die Zona pellucida ist eine, von der wachsenden Oozyte sekretierte, extrazelluläre Matrix, die zusätzlich noch durch eine Plasmamembran umgeben ist (McLeskey et al., 1998). In Säugetieren besteht die Zona pellucida aus drei sulfatierten Glykoproteinen, ZP1, ZP2 und ZP3. ZP2 und ZP3 bilden zusammen eine filamentartige Matrix. Diese wird durch ZP1 quervernetzt (Green, 1997, Hinsch and Hinsch, 1999). Grundsätzlich wird bei der Anheftung der Spermatozoe an die Oozyte zwischen einer primären und sekundären Bindung an die Zona pellucida unterschieden. Bei der primären Bindung reagieren die Akrosom-intakten Spermatozoen an ZP3 (Bleil and Wassarman, 1980, Bleil and Wassarman, 1983, Arnoult et al., 1996), und die sekundäre Bindung erfolgt hauptsächlich an ZP2. Zudem wird ZP2 eine wichtige Funktion in der Verhütung der Polyspermie zugesprochen (Topfer-Petersen et al., 1997, Bleil and Wassarman, 1988, Kurasawa et al., 1989).

Unter der Kapazitation der Spermien versteht man eine Reihe von Veränderungen der Spermien im weiblichen Genitaltrakt, welche die Spermien in die Lage versetzen, eine Eizelle zu befruchten (Austin, 1952). Proteine auf der Oberfläche des Spermienkopfes werden verändert, umverteilt oder sogar entfernt, eine hyperaktive Beweglichkeit ist zu beobachten und der Metabolismus wird oxidativ (Tulsiani et al., 1997). So sind nur kapazitierte Spermien in der Lage die Kumulus-Schicht um die Eizelle zu durchdringen. Diese besteht vornehmlich aus Follikelzellen des Ovars und einer von diesen sekretierten extrazellulären Matrix (Camaioni et al., 1996). Es wurde bereits festgestellt, dass diese Schicht möglicherweise als eine adhäsive Oberfläche fungiert und somit das Anheften der Spermatozoen ermöglicht (Camaioni et al., 1996, Eppig et al., 1996). Im Anschluss findet die Akrosom-Reaktion statt. Die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida induziert einen Calcium-Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Dieser intrazelluläre Anstieg der Calciumkonzentration im Spermium führt zu einer Fusion der äußeren Akrosomenmembran mit der darüber liegenden Plasmamembran (Kim et al., 2008). Hierbei bilden sich Poren, die sog. Hybridvesikel aus. Der

Inhalt des Akrosoms, bestehend aus Enzymen wie z.B. bestimmte Proteasen strömt in die Umgebung aus und interagiert mit der Zona pellucida (ZP) (Stambaugh and Buckley, 1969, Fraser, 1982). Auf der nun frei zugänglichen Akrosomen-Membran werden weitere membranassoziierte akrosomale Enzyme freigesetzt (McLeskey et al., 1998, Ward et al., 1994).



**Abbildung 1: Mechanismen der Interaktion von Spermium und Eizelle**

Jedes Spermium in Säugetieren ist von einer membranähnlichen Hülle umgeben. Diese Hülle wird **Akrosom** genannt und beinhaltet eine große Anzahl an verschiedenen hydrolytischen Enzymen. In den weiblichen Fortpflanzungsorganen, durchlaufen die Spermien die sogenannte Kapazitation, die die Akrosomreaktion erst möglich macht. Bei der Eizelle angekommen, entlassen die Spermien die akrosomalen Enzyme und können so in die Zona pellucida (ZP) und den perivitellinen Raum durchdringen zur Befruchtung der Eizelle durchdringen (Ikawa et al., 2010).

Hat die Spermatozoe die Zona pellucida passiert, tritt es in den Pervitellinraum ein, einen schmalen Hohlraum zwischen der Zona pellucida und der Plasmamembran der Eizelle. Es findet nun die Verschmelzung der Plasmamembranen von Spermatozoon und Oozyte statt (Ikawa et al., 2010). Diese Fusion löst eine lange Reihe von essentiellen Reaktionen aus, die Veränderungen der Plasmamembran, ebenso wie der Zona pellucida (Zona-Reaktion) nach sich ziehen (Topfer-Petersen et al., 1997). Das Ziel dieser weitreichenden Umstrukturierungen ist es, die Plasmamembran wie auch die Zona pellucida für weitere Spermien undurchdringlich zu machen, und somit eine Polyspermie zu verhindern. Hierbei

löst Calcium eine Exozytose der kortikalen Granula aus (Kortexgranulareaktion), welche sich unterhalb der Vitellusmembran befinden (Topfer-Petersen et al., 1997).

In einer erfolgreichen Gametenfusion spielt vor allem Calcium eine entscheidende Rolle (Evans et al., 1995). Die Fusion schreitet solange fort, bis die Spermatozoe vollständig mit der Eizelle verschmolzen ist. Mit Eindringen des Spermiums in die Eizelle schrumpft diese beträchtlich und es bildet sich ein sogenannter perivitelliner Raum (Talbot and Dandekar, 2003). Die zweite meiotische Teilung ist nun abgeschlossen und der weibliche Vorkern ist entstanden. Ebenfalls unmittelbar nach der Fusion wird auch der männliche Vorkern gebildet.

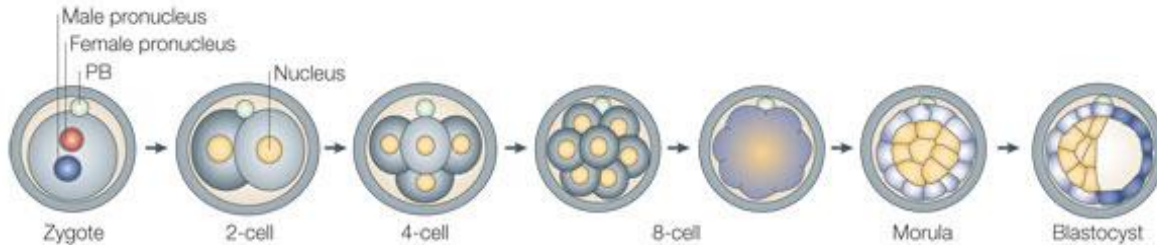
Haben sich beide Vorkerne vollständig ausgebildet, bewegen sie sich unter Volumenzunahme aufeinander zu und es kommt zur Verschmelzung der beiden Vorkerne. Hierbei löst sich nur die Kernmembran des weiblichen Vorkerns auf. In dieser Phase findet die sogenannte Amphimixis (Verschmelzung der Zellkerne) statt (Kondrashov, 1993). Die Syngamie ist vollendet und es hat sich eine Zygote mit diploidem Chromosomensatz gebildet (Palermo et al., 1997).

### **1.3 Frühe Embryogenese**

Der Zeitabschnitt zwischen der Befruchtung bis zur Implantation der geschlüpften Blastozyste an die Uterusschleimhaut (Endometrium) wird auch als Präimplantationsphase bezeichnet. Dieser Zeitraum spielt eine entscheidende Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung (Blomberg et al., 2008). Es finden z.B. die epigenetische Reprogrammierung und die Bildung totipotenter Zellen statt, ebenso wie die Aktivierung des embryonalen Genoms. Ebenfalls ist eine Ausbildung von Zellkontakten, wie auch die Entwicklung des Embryoblasten und Trophoblasten zu beobachten.

Vor der ersten mitotischen Teilung der diploiden Zygote, auch erste Furchungsteilung genannt, lösen sich die Membranen der Vorkerne auf. 15 Stunden nach der Ovulation bildet sich ein 2-Zell-Embryo (Prather and First, 1988). In der Metaphase-Ebene der Teilungsspindel ordnen sich die maternalen und paternalen Chromosomen an und eine Trennung der Chromatiden findet statt. Es bilden sich zwei gleich große Blastomeren (Graham and Deussen, 1978). Die Eizelle besteht durch die Furchungsteilungen zunehmend aus immer kleinere Zellen, wobei das Zytoplasma der Eizelle auf die neugebildeten Zellen verteilt wird. Jedoch verändert sich die Gesamtgröße des Embryos bis zum frühen Blastozystenstadium nicht (Fernandez-Gonzalez et al., 2007). Zwanzig bis 24 Stunden nach der ersten Furchungsteilung, teilen sich die Blastomere in der 2. Furchungsteilung noch einmal (Hunter, 1974, Prather and First, 1988). Alle Blastomere dieser beiden ersten Teilungen sind totipotent. Totipotenz beschreibt die Fähigkeit von Zellen jeweils unabhängig voneinander einen vollständigen Organismus zu formen. Jedoch verliert sich diese Fähigkeit spätestens im

8-Zell-Stadium (Fernandez-Gonzalez et al., 2007). Im 4- bzw. 8-Zell-Stadium wandern die Embryonen von der Ampulle durch den Isthmus in die Uterushornspitze ein. Hat der Embryo das 16-Zellstadium erreicht, findet bei jeder weiteren Furchung eine Umstrukturierung in den Blastomeren statt.



**Abbildung 2: Frühe Embryogenese in Säugetieren**

**Die Fertilisation findet im Ovidukt statt. Wenige Stunden nach der Kernverschmelzung in der Eizelle findet die erste Zellteilung zum 2-Zellstadium statt. Diese Entwicklung wird über das 4-Zellstadium, das 8-Zellstadium bis hin zur Morula weitergeführt. Im Eileiter entwickelt sich anschließend aus der Morula die Blastozyste (Keimbläschen) (Zernicka-Goetz, 2005).**

Es bilden sich spezifische Zell-Zell-Kontakte zwischen den Blastomeren die im Inneren des Embryos liegen. Die Blastomere als Ganzes werden kleiner, dieser Vorgang wird auch Kompaktierung genannt (Li et al., 2009). Es bildet sich die Morula. Die äußeren Blastomeren entwickeln sich zum Trophoblasten. Der Trophoblast stellt die Zellen zur Verfügung, die nach der Implantation die fetalen Anteile der Plazenta bilden. Die im Inneren vom späteren Trophoblasten umgebenen Zellen bilden den Embryoblasten, den späteren Fetus (Kelly et al., 1978).

Durch das Zusammenfließen von Interzellularräumen, einer gesteigerten Flüssigkeitsaufnahme aus dem Uteruslumen und spezifischen Zellumlagerungen bildet sich ein zusammenhängender flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, das Blastozoele. Aus der Morula bildet sich so die Blastozyste (Prather and First, 1988). Bei den meisten Säugetieren befindet sich der Embryo zu diesem Zeitpunkt, 6 bis 8 Tage nach der Befruchtung, im mittleren Abschnitt des Uterushornes. Am achten Tag der Gravidität, nach weiteren Zelldifferenzierungen und Umstrukturierungen innerhalb der Blastozyste besteht diese nun aus einem äußeren Trophoblasten, einem Embryoblasten und einer inneren Schicht aus endodermalen Zellen (Yelich et al., 1997, Stroband and Van der Lende, 1990).

Als eine Art Hülle umschließt der einschichtige Zellverband des Trophoblasten das Blastozoele. Aus dieser Hülle bildet sich später das Chorionepithel, die äußerste Fruchthülle des Embryos, aus. Das Chorion wird später für die Implantation und den Stoffaustausch zwischen Embryo und Mutter essentiell sein. Der Embryoblast, oder auch innere Zellmasse



genannt, besteht aus einem partiell an den Trophoblasten fixierten Zellhaufen der in das Blastozoele ragt (Kelly et al., 1978). Bei diesen Zellen handelt es sich um pluripotente Stammzellen, deren Tochterzellen die Fähigkeit besitzen sich zu allen Zelltypen des Organismus ausdifferenzieren zu können (Smith, 2001). Aus diesen Zellen bildet sich im Laufe der Trächtigkeit der Fetus.

Durch die stetige Aufnahme von Flüssigkeit ins Blastozoele und eine gesteigerte Vermehrung der Trophoblastzellen nimmt das Volumen der Blastozyste immer weiter zu. Der perivitelline Spalt verschwindet und die Zona pellucida dehnt sich soweit aus, bis sie reißt. Dieser Vorgang wird auch als Schlüpfen der Blastozyste, oder „Schlupf“, bezeichnet (Sinowatz et al., 2001). Der Konzeptus behält zunächst die kugelige Form bei. Die Gastrulation beginnt ca. am 9. Tag der Gravidität und erst ab dem 12. Tag erhält der Konzeptus durch das starke Wachstum des Trophoblasten eine filamentöse Form und bildet sich schlauchförmig aus (Geisert et al., 1982b, Stroband and Van der Lende, 1990, Yelich et al., 1997). Der Embryoblast entwickelt sich hierbei zur Keimscheibe und ist immer zentral innerhalb der fadenförmigen Struktur zu finden (Yelich et al., 1997, Dziuk, 1985).

#### **1.4 Erkennung und Aufrechterhaltung der Gravidität**

Voraussetzung für die Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit im Schwein ist das Vorhandensein einer ausreichend großen Zahl von lebensfähigen Embryonen in beiden Hörnern des Uterus (Polge et al., 1966). Während der Elongation des Trophoblasten, zwischen Tag 10 und 12, werden Östradiol-17 $\beta$  (E2) [(Stroband and Van der Lende, 1990, Ford et al., 1982) und Prostaglandin E2 (PGE2) (Waclawik et al., 2009b, Lewis and Waterman, 1983) in hohen Mengen vom Konzeptus synthetisiert. Ein wichtiger Faktor für die Erhaltung der Trächtigkeit ist das Östradiol-17 $\beta$  (E2). Es wird eine bestimmte Mindestkonzentration an E2 benötigt. Diese Mindestkonzentration entspricht in etwa der Menge an E2, die von mindestens vier vitalen Embryonen produziert werden kann (Bazer et al., 1986). Die Fähigkeit zur Synthese von E2 besitzt der Embryo bereits während des Kugelstadiums (Bazer et al., 1986, Fischer et al., 1985, Pusateri et al., 1990). Die Abgabe von E2 erfolgt durch den Embryo in einem zweiphasigen Muster zwischen Tag 11-30 (Geisert et al., 1990) und hat zur Folge, dass das PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  aus dem Endometrium nicht endokrin durch die endometrialen Gefäße bis in das Ovar weitergeleitet wird (Braileanu et al., 2000). Dieses Signal von E2 setzt Prozesse in Gang, die den Prostaglandin-Metabolismus im Endometrium dahin gehend verändern, dass mehr Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) ausgeschüttet wird (Ziecik et al., 2002). Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass dieses E2 Signal des Konzeptus eine erhöhte Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2) auslöst. In Kombination mit der positiven PGE2-Rückkopplung im Endometrium führt dies zu einem Anstieg des PGE2:PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Verhältnisses und verhindert so die Luteolyse (Waclawik et al., 2009b). Bei einer Ingravität löst dieses

PGF<sub>2α</sub> die Luteolyse aus, und die Regression des Gelbkörpers führt zu einem Sinken der Progesteronkonzentration und das Schwein beginnt einen neuen Zyklus (Braileanu et al., 2000). Während der Trächtigkeit wird PGF<sub>2α</sub> exokrin in das uterine Lumen abgegeben um die Luteolyse zu unterdrücken (Geisert et al., 1982a, Bazer et al., 1986). Während PGF<sub>2α</sub> ein weites Wirkungsfeld aufweist, wirkt Östradiol-17β sehr lokal in der nahen Umgebung des Konzeptus (White et al., 2005). Es ist unter anderem bekannt, dass es einen Effekt auf die Expression des „secreted phosphoproteins 1“ (SPP1) hat, welches einen stimulierenden Einfluss auf die trophektodermale Zelladhäsion und -migration jedoch nicht auf dessen Proliferation besitzt. Somit scheint es eine Rolle bei der Elongation wie auch bei der Anheftung des Konzeptus zu spielen (White et al., 2005). Während der Phase der Implantation enthält das uterine Histiotrophe erhöhte Konzentrationen an E2 (Lewis et al., 1983, Geisert et al., 1990), PGF<sub>2α</sub> (Waclawik et al., 2009b) und Progesteron (P4) (Stone and Seamark, 1985).

In vielen Säugetieren spielt die Aufrechterhaltung der Progesteronausschüttung eine zentrale Rolle in der Etablierung einer Trächtigkeit (Spencer et al., 2007). Das hauptsächlich vom Corpus luteum gebildete Progesteron (P4) bewirkt eine Ruhigstellung des Myometriums während der gesamten Trächtigkeit ebenso wie es sekretorische Funktionen des Endometriums unterstützt. Innerhalb des eröffneten Follikels beginnen die intakten Granulosa- wie auch Thekazellen stark zu proliferieren und an Größe zu zunehmen. Es können nun Merkmale von steroidbildenden Zellen an ihnen beobachtet werden. Als sogenannte Granulosalutein- und Thekaluteinzellen bilden sie nun als Corpus luteum eine temporäre Drüse (Yuan et al., 1993, Niswender et al., 1994). Durch die steigende Progesteronkonzentration während der frühen Trächtigkeit kommt es zu einer Reduzierung der Glykokalyx des Luminalepithels (Bazer et al., 2009b).

Generell kann zwischen einer invasiven und nicht-invasiven Plazentation unterschieden werden. Beim Schwein liegt eine nicht-invasive Form der Plazentation vor, wobei der Trophoblast nicht in das maternale Gewebe eindringt (Keys and King, 1988). Die Implantation der Konzepti beginnt etwa am 13. Trächtigkeitstag in den Uterushörnern. Um eine Anlagerung des Konzeptus zu ermöglichen, muss zunächst eine Depolarisierung des Luminalepithels stattfinden. Es kommt zur Reduktion von anti-adhäsiven Komponenten, darunter Mucine der Glykokalyx des Luminalepithels (Bazer et al., 2009b). Die Glykokalyx stellt eine Kapsel an der Außenseite der Zellen dar und kommt bei prokaryotischen wie auch eukaryotischen Zellen vor. Diese Kapsel besteht vorwiegend aus Oligosacchariden die kovalent an Membranproteine (Glykoproteine) wie auch Membranlipide (Glykolipide) der Zellen gebunden sind. In der Glykokalyx von tierischen Zellen können stets fünf stark konservierte Molekülfamilien identifiziert werden. Dazu gehören die Immunglobuline, die Integrine, die Cadherine, sowie die Selektine und diverse Zelladhäsionsmoleküle. Viele dieser

Molekülfamilien stehen ebenfalls mit dem Mikrofilamentsystem der Zellen in Verbindung. Die sogenannten Mikrofilamente (auch Aktinfilamente genannt) bilden zusammen mit den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten den Hauptbestandteil des Zytoskeletts einer Zelle (Alberts, 2002). Durch die Implantation kommt es im Endometrium zu starken funktionellen Veränderungen, begleitet von weitreichenden Umstrukturierungen des Gewebes (Reynolds et al., 2005b, Cencic et al., 2003). Hierdurch wird bereits an Tag 13 der Trächtigkeit eine gesteigerte Vaskularisierung an den Implantationsstellen sichtbar (Keys and King, 1988). Durch die Anlagerung des Konzeptus kommt es bei Endometrium wie auch Trophoblast zu starken Einfaltungen und das Endometrium beginnt sogenannte Endometriumpfropfen zu bilden. Diese werden vom Trophoblasten komplett umschlossen. Ab Tag 14 wird diese sog. „enge Apposition“ wieder flacher und es kommt zur Ausbildung und Verzahnung der Mikrovilli. Jedoch bleiben auch hierbei das maternale wie auch embryonale Gewebe intakt (Cencic and La Bonnardiere, 2002). Bei dieser Form der Plazentation, die auch als epitheliochoriale Plazentation bezeichnet wird, spielt die histotrophe Ernährung eine wichtige Rolle, bei der alle für den Konzeptus benötigten Stoffe vom maternalen Drüsengewebe gebildet werden (Roberts et al., 1996).

Eine weitere Gruppe von Molekülen, die einen entscheidenden Beitrag zur Embryo-maternalen Kommunikation wie auch zur Entwicklung des Konzeptus beiträgt, ist die Gruppe der Wachstumsfaktoren wie fibroblast growth factor 7 (FGF7). Die Konzentration an Wachstumsfaktoren nimmt in der Präimplantationssphase im Endometrium stark zu und Untersuchungen zeigten, dass die Ausschüttung der Wachstumsfaktoren von E2 und/oder P4 reguliert wird (Waclawik et al., 2009a, Waclawik et al., 2009b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch eine erhöhte Menge an Entzündungsmediatoren, zu denen die Cytokine ebenso wie die Wachstumsfaktoren gehören, ebenso eine Rolle bei der Entwicklung des Konzeptus, der Implantation und der Etablierung der Trächtigkeit spielen (Waclawik et al., 2009b, Croy et al., 2009).

Im Schwein produzieren der Konzeptus ebenso wie das Endometrium Interferone (IFN), jedoch wirken diese nicht antiluteolytisch (Johnson et al., 2009). In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass das Trophoctoderm des Konzeptus in der Lage ist, Typ I-Interferone (IFN delta, IFND) ebenso wie Typ II-Interferone (IFN gamma, IFNG) zu produzieren (Cencic et al., 2003, Joyce et al., 2007b). Möglicherweise lässt sich daraus ableiten, dass IFNG als das Interferon welches in der höchsten Konzentration vom Konzeptus wie auch dem Endometrium gebildet wird, bei der Regulation des mütterlichen Immunsystems und der Angiogenese im Endometrium mitwirkt (Murphy et al., 2009).

### 1.5 Anatomie des Uterus und Eileiters

Der Eileiter stellt die Verbindung zwischen den Ovarien und den darmartig verschlungenen Uterushörnern (Cornua uteri) dar. Er ist in drei Teilabschnitte gegliedert: Das Infundibulum, die Ampulle und den Isthmus. Das Infundibulum hat ein trichterförmiges Aussehen und geht in die Ampulle über, an die der recht schmale und lange Isthmus angeschlossen ist. Dieser Teil des Eileiters ist stark gewunden und hat die Aufgabe die noch unbefruchteten Eizellen bis zur Befruchtung im Eileiter zurück zu halten (Halbert et al., 1988). Während des Zyklus, wie auch während der frühen Trächtigkeit erfüllt der Eileiter wichtige Funktionen, wie die Bildung von Stoffwechselprodukten (Murray, 1996, Iritani et al., 1974). So ist der Eileiter dazu fähig, den frühen Konzeptus durch die Sekretion bestimmter Stoffe wie Signalpeptide und Wachstumsfaktoren, in der Entwicklung zu unterstützen (Buhi et al., 1997, Xia et al., 1996). Drei Schichten bilden die Wand des Eileiters: Schleimhaut (Tunica mucosa), Muskulatur (Tunica muscularis) und die Serosa (Tunica serosa). Für die Funktion des Eileiters spielt die Schleimhaut eine zentrale Rolle. Sie besteht aus Flimmerzellen und Drüsenzellen die mit Zilien ausgestattet sind. Diese Drüsenzellen sind in der Lage Proteine, Elektrolyte, Aminosäuren, Albumine und Zucker zu sekretieren. Es hat sich gezeigt, dass die Zilienlänge im Ovulationszeitraum am längsten ist und die Drüsenzellen in dieser Zeit die höchste Sekretionsrate zeigen (Iritani et al., 1974). Die Hauptaufgabe des Eileiters besteht darin, die gebildeten Oozyten im Infundibulum aufzufangen und in Richtung Uterus zu transportieren. Dies geschieht durch peristaltische Kontraktionen der Eileitermuskulatur und wird durch den verstärkten Flimmerstrom der Flimmerzellen des Epithels unterstützt (Hunter, 1974). Erreichen die Oozyten den Übergang zwischen Ampulle und Isthmus kommt es dort zur Befruchtung (Hunter, 1974). Die vollständige Wanderung des Konzeptus durch den kompletten Eileiter nimmt in etwa 2 Tage in Anspruch.

Der Uterus selbst besteht beim Schwein aus den Uterushörnern (Cornua uteri), dem Uteruskörper (Corpus uteri) und dem Gebärmutterhals (Cervix uteri) (Hall et al., 1993). Die langen Uterushörner haben eine dünne, schlauchartig, gewundene Form. Der Uteruskörper hingegen misst nur 5 cm und nimmt im Gegensatz zu den Uterushörnern keine Embryonen auf. Der Uteruskörper wird durch den Gebärmutterhals von der Vagina getrennt (Gray et al., 2001).

Die Wand des Uterus wird von 4 Schichten gebildet: Der Tunica mucosa (Endometrium) mit Lamina propria mucosae, der Tunica muscularis (Myometrium), der Tunica subserosa und der Tunica serosa (Spencer et al., 2005, Mueller et al., 2006). Die Gebärmutter Schleimhaut, oder auch Endometrium, besteht aus einem hochprismatischen Epithel, welches einschichtig bis mehrschichtig sein kann, und der drüsenreichen Lamina propria mucosae. Hier finden sich ebenfalls Flimmerzellen die zeitweise Kinozilien tragen ebenso wie die sezernierenden

Drüsenzellen mit Mikrovilli. Von den Zellen der Lamina propria mucosae wird später auch die sogenannte „Uterinmilch“ zur Versorgung des Embryos sezerniert (Burton et al., 2010).

Das Myometrium, oder Tunica muscularis, besteht aus Bündeln von glatten Muskelfasern, die im Uteruskörper wie auch in den Hörnern zirkulär angeordnet sind. Eine Gefäß- und Nervenschicht liegt dieser Muskelschicht auf und versorgt das Endometrium (Spencer et al., 2005, Mueller et al., 2006).

### **1.6 DNA**

Der Zellkern, oder auch Nucleus genannt, ist ein Kompartiment jeder eukaryotischen Zelle, und enthält neben Proteinen wie z.B. Histonen auch die chromosomale DNA. Umgeben wird der Zellkern von einer mit Poren durchsetzten Doppelmembran, deren äußere Membran in die Membran des endoplasmatischen Retikulums übergeht. Die DNA liegt im Zellkern als Chromatin vor. Das Chromatin wird von drei Hauptbestandteilen gebildet. Der DNA, den Histonen und anderen Proteinen, wie z.B. RNA-Polymerasen (Brown, 1999).

Die DNA ist ein langes Polymermolekül in Form einer Doppelhelix (Watson and Crick, 1953b). Die einzelnen Bausteine bezeichnet man als Nukleotide (Watson and Crick, 1953a). Ein Nukleotid besteht immer aus jeweils drei Grundbausteinen, die durch Phosphodiesterbrücken verbunden sind: Einem Zuckermolekül, einer stickstoffhaltigen Base und einem Phosphorsäuremolekül (Brown, 1999).

Im Zellkern liegt die DNA stets als Chromatin vor. Als Chromatin bezeichnet man die Organisation der DNA in den Chromosomen die durch den Zusammenschluss von DNA mit bestimmten Verpackungsproteinen gebildet wird (Nickerson et al., 1989). In den Chromosomen besteht das Chromatin zu jeweils zwei gleich großen Teilen aus DNA und Proteinen. Ein Teil dieser Proteine wird von DNA- und RNA-Polymerasen sowie diversen Regulationsproteinen gebildet, der andere Teil besteht aus den sogenannten Histonen. Histone sind hochkonservierte Proteine die eine entscheidende Rolle in der Bildung des Chromatins spielen. DNA und immer 8 Histone bilden ein sogenanntes Nucleosom. Jeweils zwei Moleküle der verschiedenen Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Core-Octamer (Eickbush and Moudrianakis, 1978). Um dieses Core-Octamer windet sich die DNA zwei Mal herum (Luger et al., 1997) und wird von einem Histonprotein H1, welches von außen an das Nucleosom bindet, an der richtigen Position fixiert (Allan et al., 1986, Allan et al., 1980). Die Anordnung der DNA in Form von Nucleosomen führt zu einem effizienten Schutz vor Endonucleasen, die an die in dieser Form verpackte DNA nicht binden können. Nur ein ca. 50-70bp kurzes Stück DNA, welches ein Nucleosom mit dem anderen verbindet, liegt frei und kann von Endonucleasen gespalten werden.

So stellte sich nun die Frage, wie RNA- und DNA-Polymerasen an diese verpackte DNA binden können. Diverse Versuche zeigten, dass z.B. RNA-Polymerasen die Core-Octamere von der DNA abstreifen können, und diese sich nach dem Ablesen des Abschnittes wieder an die DNA anheften. In Bereichen mit aktiven Genen ist die Chromatinstruktur weniger stark kondensiert und somit weniger dicht gepackt, so dass der RNA-Polymerase-Komplex an diese Gene binden kann. Diese aktiven Bereiche werden auch als Euchromatin bezeichnet. Im Gegensatz zum sogenannten Heterochromatin, befinden sich in diesem Bereich die meisten Gene und es kann die höchste Genaktivität beobachtet werden (Ogbourne and Antalis, 1998, McGhee et al., 1980, Lee et al., 1993). Interessanterweise liegen nicht in jeder Zelle alle Gene in der aktiven Konformation vor. Nur aktive Gene sind für die Polymerasen zugänglich. Andere Gene, die nur in bestimmten Zelltypen oder Geweben exprimiert werden, liegen innerhalb des Chromatins eingeschlossen vor (Ogbourne and Antalis, 1998, McGhee et al., 1980, Lee et al., 1993). Diese Bereiche mit geringerer Genaktivität werden auch als Heterochromatin bezeichnet. Somit spielt auch die Chromatinstruktur eine wichtige Rolle bei der gewebespezifischen Genexpression.

### **1.7 RNA**

Neben den drei bekanntesten Typen von RNA, der rRNA, tRNA und mRNA, kommen auch noch verschiedene Arten kleiner nicht kodierender RNAs, wie beispielsweise microRNAs (miRNAs) oder siRNAs (small interfering RNA), und lange nicht kodierende RNAs (lncRNA) in den Zellen vor. Die sogenannten miRNAs stellen unter anderem einen wichtigen Faktor bei der Regulation der Genexpression dar. siRNAs hingegen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen RNA-Viren dar. Zusammen mit einem Enzymkomplex, der RISC (RNA induced silencing complex) genannt wird, können miRNAs spezifisch an mRNAs binden und so die Translation des gebundenen Targets blockieren oder zu dessen Abbau führen (Lagos-Quintana et al., 2001). Ribosomale RNA und tRNA gehören zu den sog. stabilen Molekülen, die eine lange Halbwertszeit in der Zelle haben und aus diesem Grund sehr langlebig sind (Rubio and Hopper, 2011). Die dritte Klasse der RNAs, die mRNA, wird während der Transkription noch weiter prozessiert (Brenner et al., 1961, Gros et al., 1961). Die mRNA bildet durch die der Transkription folgende Translation das Bindeglied zwischen dem Gen und dessen Expressionsprodukt, dem Polypeptid. Bei der mRNA handelt es sich um ein relativ instabiles Molekül mit einer Halbwertszeit, die bei vielen Säugetier-mRNAs die 6 Stunden-Marke nicht überschreitet. Diese Eigenschaft ist wichtig für die Regulation der Genexpression, da sich durch eine geringe Lebensdauer des mRNA-Moleküls eine herabgesetzte Transkriptionsrate relativ schnell in einer herabgesetzten Menge an finalem Transkript und schließlich dem entsprechenden Protein widerspiegelt.

### *Prozessierung und Modifikation der mRNA*

Im Gegensatz zu Prokaryoten, bei denen jedes Transkript eine direkte Kopie des transkribierten Gens darstellt, erfolgt in den eukaryotischen Zellen eine Prozessierung der mRNA. Diese Prozessierungsschritte finden fast immer noch komplett im Kern statt. Zum einen kommt es zu strukturellen Veränderungen, sowie Modifizierung der Sequenz an den Enden der mRNA-Moleküle, wie zum Beispiel die 5'-Cap Struktur oder das Anfügen des 3'-Poly-A-Schwanzes durch die PolyA-Polymerase (Gaitskhoki, 1979). Zum anderen werden in Eukaryoten die Introns entfernt (Gao and Wang, 2012, Zahler, 2012), ebenso wie es in einigen Fällen zu nachträglichen Modifikationen in der Nucleotidsequenz kommen kann (RNA-Editing) (Ashkenas, 1997).

Der Großteil aller eukaryotischen mRNAs enthalten eine 5'-Cap Struktur sowie einen 3'-Poly-A-Schwanz. Die Cap-Struktur ist gekennzeichnet durch eine modifizierte 7-Methylguanin Base, welche nach der Transkription an das mRNA-Molekül angehängt wird und vor dem sofortigen Abbau schützt (Gaitskhoki, 1979). Handelt es sich bei einer Bindung zwischen zwei Nucleotiden normalerweise um eine 5'-3'-Bindung, so liegt in der Cap-Struktur eine ungewöhnliche 5'-5'-Bindung zwischen den beiden Kohlenstoffatomen der Nucleotide vor (Adams and Cory, 1975).

Der Poly-A-Schwanz, eine Struktur die ebenfalls in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden ist, besteht aus einer langen Reihe von bis zu 250 Adenosin-Nucleotiden, die an das 3'-Ende des mRNA-Moleküls angehängt wird. Diese sog. Polyadenylierung wird von der Poly(A)-Polymerase durchgeführt und die genaue Funktion der so entstehenden Struktur ist noch nicht völlig geklärt (Gaitskhoki, 1979). Eine Hypothese beschäftigt sich mit der Möglichkeit, das die Länge des Poly-(A)-Schwanzes festlegt, wie lange eine mRNA im Cytoplasma stabil bleiben kann, bevor sie abgebaut wird (McLaughlin et al., 1973, Wickens, 1990).

Eine weitere Form der Modifikation, die in Eukaryoten vorkommt, ist das Entfernen von Introns, auch Spleißen genannt. Da durch die Transkription zunächst eine originalgetreue Kopie des Matrizenstranges hergestellt wird, enthält diese auch die etwaigen Introns die auch das transkribierte Gen besessen hat. Diese Intronbereiche müssen vor der Translation aus dem jeweiligen Transkript entfernt werden. Somit entsteht ein sogenannter offener Leserahmen. Dieser zusammenhängende Bereich, auch als kodierender Bereich bezeichnet, kann dann anschließend bei der Translation gelesen werden. Es sind mindestens fünf verschiedene Arten von Introns bekannt, die jeweils auch über einen anderen Spleißmechanismus verfügen (Gao and Wang, 2012, Zahler, 2012). Die wichtigste Gruppe jedoch stellt die sog. „GT-AT“-Intronklasse dar, in die fast alle Introns von Genen des Zellkerns, die zu mRNA transkribiert werden, gehören (Padgett et al., 1985). Der Name dieser Klasse beschreibt die Tatsache, dass alle Mitglieder dieser Klasse am 5'- und am 3'-

Ende ihrer Sequenz die gleichen Dinucleotidsequenzen besitzen, die ersten zwei Nucleotide sind GT und die letzten zwei Nucleotide AG (Padgett et al., 1985).

Die dritte Form der Modifikation von mRNAs wird als RNA-Editing bezeichnet (Ashkenas, 1997). Unter RNA-Editing versteht man die nachträgliche Veränderung der transkribierten mRNA durch den Einbau neuer Nucleotide, sowie auch deren Entfernung oder die Veränderung schon bestehender Nucleotide. Diese Art der Modifikation macht es möglich aus einem einzigen Gen zwei Proteine zu schaffen, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaft geringfügig unterscheiden (Ashkenas, 1997). Ein Beispiel für so ein RNA-Editing ist das Apolipoprotein-B, welches in Leberzellen (Apolipoprotein-B100) aber auch in Darmzellen (Apolipoprotein-B48) exprimiert wird (Smith and Sowden, 1996). Diese zwei Formen des Apolipoproteins werden durch das gleiche Gen kodiert, und unterscheiden sich nur in der Länge. Die Form B100 ist hierbei dann 4563 Aminosäuren lang und die B48 Form ist nur 2153 Aminosäuren lang. In den Darmzellen entsteht durch eine zusätzliche Desaminierung an einem Cytosin ein Uracil und somit ein zusätzliches Terminationscodon, welches für einen früheren Transkriptionsstopp sorgt (Smith and Sowden, 1996).

### **1.8 Differenzielle Genexpression**

Zwar befindet sich in (fast) jeder Zelle die gesamte genetische Information, jedoch werden nicht alle Gene in einer Zelle zu jeder Zeit benötigt. Nur spezifische Gene, die für ständig in der Zelle ablaufenden Vorgänge essentiell sind, wie z.B. Ribosomen, Polymerasen, Gene für strukturelle Proteine oder Gene in überlebenswichtigen Stoffwechselfvorgängen, sind konstant aktiv und werden daher auch als sog. "Housekeeping-Gene" bezeichnet (Eisenberg and Levanon, 2003, Butte et al., 2001, Greer et al., 2010). Die meisten Gene die in einer Zelle vorliegen haben jedoch sehr spezielle Funktionen und werden nur unter bestimmten Umständen benötigt (Herrmann, 1969). So wird zum Beispiel eine gewebespezifische Genexpression auch vom umgebenden Gewebe mit beeinflusst. Somit stellt die Möglichkeit der Regulation der Genexpression eine Möglichkeit für die Zelle dar, sich an die Umwelt und an sich ändernde Umstände zu adaptieren, und so sind Gene, deren Genprodukte gerade nicht benötigt werden, inaktiv (Ogbourne and Antalis, 1998).

In mehrzelligen Eukaryonten gibt es verschiedenste Mechanismen der Regulation der Genexpression (Ogbourne and Antalis, 1998). Zum Beispiel kann die Genexpression als Reaktion auf Umwelteinflüsse reguliert werden, wie z.B. die Toleranz bei Pflanzen im Bezug auf bestimmte Stoffe wie Aluminium (Simoes et al., 2012). Es ist in mehrzelligen Organismen so möglich, die Aktivität einzelner Zellgruppen zum Wohl des Gesamtorganismus zu steuern. So können z.B. ganze Zellgruppen zur Produktion von Hormonen oder Wachstumsfaktoren angeregt werden und somit andere Gruppen von Zellen im Organismus beeinflussen (Herrmann, 1969).



## Literatur

Zum anderen ist durch eine differentielle Expression eine entwicklungsabhängige Reaktion des Organismus möglich. So werden Gene zu bestimmten Stadien der Entwicklung aktiv oder inaktiv. Beispiele hierfür wären die Entwicklung des Embryos (Nothias et al., 1995) oder auch die Anpassung der embryonalen und maternalen Gewebe an die verschiedenen Stufen einer Trächtigkeit (Nothias et al., 1995, Ross et al., 2009).

Die Regulation der Genexpression beinhaltet jedoch noch einen weiteren Vorteil – vor allem für mehrzellige Organismen – die Möglichkeit der Spezialisierung von Zellen innerhalb des Organismus (Herrmann, 1969). So können durch unterschiedliche Genexpressionsmuster, unterschiedliche Zelltypen generiert werden. Diese etablierten Expressionsmuster sind im Wesentlichen von Dauer, so dass z.B. eine ausdifferenzierte Hautzelle sich normalerweise nicht mehr zu einer Leberzelle entwickeln kann.

Die Genregulation kann hierbei in allen Ebenen der Genexpression eingreifen, wobei hier die Regulation auf Ebene der Transkription am besten untersucht ist (Ogbourne and Antalis, 1998). Das Grundprinzip dieser Regulation ist die Bindung eines DNA-bindenden Proteins an eine vom Gen stromaufwärts liegende Bindestelle für Transkriptionsfaktoren. Diese Bindung kann beides, aktivierend oder inaktivierend wirken. Es sind verschiedene Arten dieser stromaufwärts gelegenen Proteinbindestellen beschrieben (Ogbourne and Antalis, 1998).

TATA-Box: Die sog. TATA-Box stellt eine Bindestelle für RNA-Polymerasen und deren Transkriptionsfaktoren dar. Die Bindung an die TATA-Box wirkt aktivierend auf die Transkription des darauf folgenden Gens (Usheva et al., 1992, Savinkova et al., 2009).

Stromaufwärts gelegene Promotorelemente: Diese Promotorelemente finden sich z.B. in allen menschlichen Zellen als Bindestellen für Proteine, die die Aktivierung der Transkription anregen (Muller et al., 1988).

Enhancer: Die Gruppe der Enhancer stellt Transkriptionsaktivatoren dar und sind Bindestellen an die mehrere Proteine binden können. Im Allgemeinen können Enhancer weiter entfernt vom Gen welches sie beeinflussen liegen als z.B. ein Promotor. Ein Enhancer kann die Expression mehrerer Gene steuern und spielt somit wohl eine Rolle in der gewebespezifischen Genexpression (Ogbourne and Antalis, 1998, Jones et al., 1985, Santoro et al., 1988).

Silencer: Silencer sind Enhancer ähnliche Elemente, jedoch hat die Bindung an sie eine inhibierende, anstatt einer aktivierenden Wirkung auf die Transkription (Kim et al., 1996, Brand et al., 1985).

Für die Bindung an diese DNA-Bindestellen besitzen Transkriptionsfaktoren und -kofaktoren spezifische DNA-bindende Domänen (Ogbourne and Antalis, 1998, Muller et al., 1988). Zum einen ist die sog. Helix-turn-Helix bekannt, welche aus 2 durch 4 Aminosäuren getrennte

## Literatur

alpha-Helices besteht (Muller et al., 1988). Diese Aminosäuren sind in der Lage bei einer Bindung an die DNA mit den Aminosäuren der DNA zu interagieren und machen es so möglich an eine definierte Bindestelle zu binden (Laughon and Scott, 1984). Des weiteren sind beispielsweise die sog. Zink-Finger- (Miller et al., 1985) und die Leucin-Zipper-Domänen bekannt. Auch diese Elemente ermöglichen es Proteinen an die DNA binden zu können.

## 1.9 Genregulation in der Entwicklung

Eine der wichtigsten Fragestellungen im Bezug auf die Genexpression stellt die Frage nach der Organisation der Entwicklung eines Organismus dar. Die Entwicklung eines erwachsenen Organismus aus einer befruchteten Eizelle ist einer der komplexesten biologischen Prozesse. Bei diesem Vorgang müssen definierte Zellen zu ganz präzisen Zeitpunkten die richtigen Gene aktivieren und exprimieren. Der wichtigste Modellorganismus in der Erforschung der Embryogenese ist *Drosophila*. Schon früh konnte man bei *Drosophila* sogenannte homöotische Mutationen beobachten (McGinnis et al., 1984b). Diese Mutationen führen dazu, dass im Organismus z.B. ein Körperteil durch einen anderen ersetzt wird. Das wohl bekannteste Beispiel für solch eine Mutation ist der Antennapedia-Kopf, bei dem die Antennen durch Beine ersetzt sind (Scott and O'Farrell, 1986, Gehring and Hiromi, 1986). Untersuchungen an diesen homöotischen Genen ergab, dass alle diese Gene eine gemeinsame, hochkonservierte, etwa 180 bp lange Sequenz besitzen, die Homöobox (McGinnis et al., 1984b). Diese Homöobox codiert für eine Helix-turn-Helix-Struktur. Somit codieren diese homöotischen Gene für DNA-bindende Proteine und stellen eine Gruppe von Regulationsgenen dar, die die Expression anderer Gene steuern können (Laughon and Scott, 1984). Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Homöobox-Gene ihre eigene regulatorische Region oder auch die regulatorische Region anderer Homöobox-Gene binden können (Fainsod et al., 1986, Desplan et al., 1988). Andere homöopatische Gene in *Drosophila* sind auch Labial, für die Entwicklung des Kopfes zuständig, oder Ultrabithorax, zuständig für die Entwicklung des Hinterleibes (Scott and O'Farrell, 1986, Gehring and Hiromi, 1986).

Im Verlauf der weiteren Forschung auf diesem Gebiet fand man solche Homöobox-Gene auch in Wirbeltieren, wie z.B. dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (Harvey et al., 1986). Auch im menschlichen Genom und in der Maus konnten solche Homöobox-Gene nachgewiesen werden (Simeone et al., 1988, McGinnis et al., 1984a).

## 1.10 Sequenzierung

Erstmals 1944 identifizierte Avery (Avery et al., 1944) die DNA als Trägersubstanz der Erbinformation. Nur ein knappes Jahrzehnt später schafften es Watson und Crick die Doppelhelixstruktur der DNA zu entschlüsseln (Watson and Crick, 1953b). Trotz dieser enormen Fortschritte um das Verständnis der DNA und ihrer Funktion, war die Desoxyribonukleinsäure (DNA) bis Anfang der 1970er Jahre ein schwer zu analysierendes Molekül. Dabei stellte sich vor allem die Größe des Moleküls als gravierendstes Problem dar. Die Situation änderte sich jedoch grundlegend, als 1975 Sanger das erste Verfahren vorstellte, um DNA direkt sequenzieren zu können. Das DNA-Sequenzanalyse-Verfahren wurde 1975 erstmals vorgestellt (Sanger and Coulson, 1975) und 1977 von Sanger durch das

## Literatur

sog. Kettenabbruchsverfahren erweitert (Sanger et al., 1977). Das Kernelement dieser Methode ist die Fähigkeit der DNA-Polymerase die DNA-Synthese basenspezifisch abbrechen zu können. Hierbei wird dann nicht nur ein Gemisch aus den vier dNTP's, wobei eines  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -markiert wurde, eingesetzt, sondern je auch eines der 2,3'-Dideoxynucleotide als Terminator. Die 3'-OH Gruppe ist bei diesen 2,3'-Dideoxynucleotiden nicht vorhanden und so kann die DNA-Polymerase dort kein weiteres dNTP anhängen und es kommt zur Termination der DNA-Synthese. Es werden vier Reaktionen angesetzt, mit jeweils einer der vier Basen als terminierende Base ohne 3'-OH-Gruppe. Die so entstanden DNA-Fragmente werden in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der Bandenmuster kann die Lage aller Adenine in der vorliegenden Sequenz erhalten werden (Sanger et al., 1977). Dasselbe wird für die drei anderen Basen durchgeführt, wodurch sich das komplette Bandenmuster einer DNA-Sequenz ergibt.

Zeitgleich zur erweiterten Methode nach Sanger wurde auch das Verfahren von Maxam und Gilbert vorgestellt (Maxam and Gilbert, 1977). Diese Methode findet heute jedoch keine Verwendung mehr. Hierbei wird ein DNA-Fragment, meist am 5'-Ende radioaktiv markiert. Anschließend findet eine Denaturierung statt und die Fragmente werden basenspezifisch chemisch aufgespalten. Die so entstandenen DNA-Spaltprodukte werden dann für jede Base einzeln in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anhand des so erhaltenen Bandenmusters, kann die Sequenz des DNA-Fragments ermittelt werden.

Im Anschluss an diese beiden Verfahren kam noch die sog. Kapillarsequenzierung mit Nachweis Fluoreszenz-markierter Terminatorkleotide anstatt der eingesetzten Radioaktivität auf. Hierbei findet die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente nicht in einem gewöhnlichen Polyacrylamidgel statt, sondern in einem Kapillar-System. Hierbei wird auch keine radioaktiv sondern Fluoreszenz-markierte DNA verwendet, bei der sich die Sequenzinformation nicht nur aus der räumlichen Trennung, wie noch bei der Gelelektrophorese, der verschiedenen DNA-Fragmente zum Laserstrahl ergibt. Weitere Vorteile des Kapillar-Systems sind eine bessere Auftrennung, längere Leseweiten, ein hoher Grad an Automatisierung und eine isolierte Analyse der einzelnen Proben. (Zhang et al., 1991).

Durch all diese Fortschritte auf dem Gebiet der Sequenzierung, konnte der Durchsatz pro Gerät und Tag von ca. 10 Kilobasen am Anfang der 1980er Jahre auf über 1000 Kilobasen im Jahr 2000 mit Hilfe der Kapillarsequenzierung gesteigert werden (Stratton et al., 2009).

Heute ist die meistverbreitete Methode zur Sequenzierung von DNA das sog. „Next Generation Sequencing“ oder auch „Massively parallel DNA-sequencing“ genannt (Chan, 2005). Diese Technologie bieten verschiedene Firmen an, wie z.B. Illumina (Bentley, 2006). Gemeinsam haben all diese Plattformen stets die individuell komplexe Zusammenstellung

der Reagenzien, bestehend aus allen nötigen Enzymen und Chemikalien, ebenso die spezialisierten Geräte mit der benötigten hoch-auflösenden Optik und der Soft- wie auch Hardware. Jede dieser Plattformen bietet ebenfalls ein standardisiertes Protokoll zur Probenvorbereitung. Grundsätzlich funktionieren die Verfahren meist nach einem ähnlichen Prinzip. Das Ziel ist die Herstellung einer sog. Library, fragmentierte DNA, die für die Sequenzierung vorbereitet ist. Diese Libraries werden hergestellt, indem an die zu untersuchende fragmentierte DNA Plattform-spezifische Adaptorsequenzen ligiert werden. Diese Adaptoren ermöglichen es, die DNA-Fragmente sofort durch PCR zu amplifizieren, ohne einen Zwischenschritt mit bakterieller Klonierung einschleichen zu müssen (Mardis, 2008). So können im Vergleich zur Kapillarsequenzierung, bei der ca. 96 reads von bis zu 1000 Bb erzielt werden konnten, nun mehrere Millionen Reads in einem Lauf erzielt werden (bei HiSeq Milliarden). Es fand also eine extreme Miniaturisierung der Sequenzreaktion mit einer parallel stattfindenden Detektion statt (Mardis, 2008).

Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellt die sog. "single-molecule" Sequenzierung dar, wie z.B. bei den Plattformen von Helicos oder Pacific Biosciences. Hierbei entfällt der Schritt der Amplifizierung der DNA durch PCR komplett. Es wird keine Anreicherung der DNA mehr benötigt um sequenzieren zu können (Mardis, 2008).

### 1.10.1 Illumina Genome Analyzer

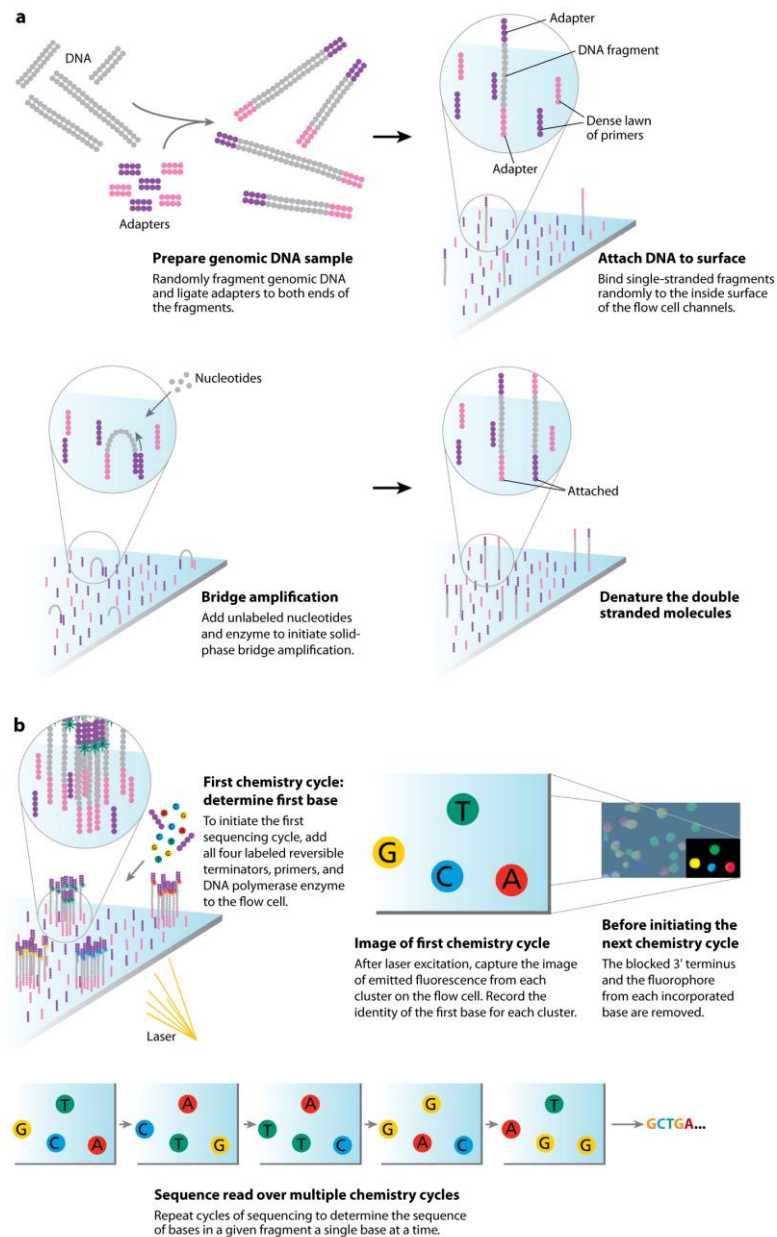


Abbildung 3: Das Illumina "Sequencing-by-Synthesis" System

Die durch Brückenamplifikation entstandenen Cluster-Stränge werden geprimed und alle 4 Basen werden mit der DNA-Polymerase gleichzeitig in die Flow-cell Kanäle gegeben. Die zugegebenen Nucleotide tragen hierbei jeweils eine basenspezifische fluoreszente Markierung. Außerdem ist die 3'-OH Gruppe blockiert, so dass es nach jedem Einbau einer Base zuerst zu einem Synthesestopp kommt. Nach jedem Einbau wird das Fluoreszenzsignal detektiert ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

Die Amplifikation der Einzelstrang DNA beim Illumina Genome Analyzer startet mit einer Illumina spezifischen Adapter Library. Diese DNA-Fragmente an deren glatte Enden die Adapter ligiert wurden, können an die ebenfalls mit Adaptern ausgestattete Oberfläche der

## Literatur

Flow-cell binden. Dieser Vorgang findet völlig automatisiert in der sog. "Cluster-Station" von Illumina statt. Die sog. Flow-cell ist ein Glasträger mit 8 Kanälen, auf dessen Oberfläche sich ebenfalls die Illumina-spezifischen Adaptoren befinden. Hierdurch erlaubt es die Flow-cell, dass auf der Oberfläche ihrer 8 Kanäle Brückenamplifizierungen (bridge-amplification) stattfinden können. Durch monoklonale Vervielfältigung werden in diesem System aus einzelnen gebunden Sequenzen, viele multiple DNA-Kopien amplifiziert, die sog. Cluster. Jeder dieser Cluster repräsentiert das ursprüngliche, dort gebundene Molekül welches die Clusterbildung initiierte. In jeden Kanal kann eine andere Probe geladen werden, oder auch mehrere Proben in einem Kanal der Flow-cell kombiniert werden, dass sog. Multiplexing. Jeder fertige Cluster enthält ca. 1000 Kopien des ursprünglich dort gebundenen Fragments. Dies ist dann ausreichend für die benötigte Signalstärke zur späteren Detektion der eingebauten Basen.

Wie in Abbildung 3 zu sehen, handelt es sich bei Illumina um ein "sequencing-by-synthesis" System. Alle 4 Basen werden mit der DNA-Polymerase gleichzeitig in die Flow-cell Kanäle gegeben. Die Nucleotide tragen hierbei jeweils eine basenspezifische fluoreszente Markierung und die 3'-OH Gruppe ist blockiert, so dass es nach jedem Einbau einer Base zuerst zu einem Synthesestopp durch die DNA-Polymerase kommt. Nach jedem Einbau folgt ein Schritt bei dem mittels Laser die fluoreszent markierten und neu eingebauten Basen angeregt werden und dieses Signal detektiert wird. Nach jeder Signaldetektion wird die 3'-OH blockierende Gruppe der eingebauten Nucleotide chemisch entfernt und die Stränge für den nächsten Einbau vorbereitet (Mardis, 2008).

## **2 Zielsetzung:**

In der vorliegenden Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die Transkriptomveränderungen des Endometriums während der frühen Trächtigkeit im Schwein gewonnen werden. Vor allem die Reaktion des Endometriums auf die Gegenwart und die Signale des Konzeptus standen bei dieser Studie im Vordergrund. Im Fokus des Interesses standen die zwei Zeitpunkte Tag 12 und Tag 14 der frühen Trächtigkeit. Diese beiden Zeitpunkte wurden anhand der stattfindenden weitreichenden Veränderungen gewählt. Zum einen findet zwischen Tag 11 und Tag 12 der Trächtigkeit die Elongation des Trophoblasten statt, auf den der Prostaglandin-(PG)-Mechanismus des Endometriums reagiert. Aufgrund dieses komplexen Zusammenspiels kommt es schließlich zur Unterbindung der Luteolyse. Zum anderen beginnt ab Tag 13 der Trächtigkeit die Implantation der Embryonen. Es wird die epithelochoreale Plazentation initiiert und die Bildung von Zonen mit verstärkter Vaskularisierung kann beobachtet werden. Insbesondere die Phase der Implantation stellt für das Endometrium einen Vorgang mit elementaren funktionellen Veränderungen dar, die eine starke Umstrukturierung des endometrialen Gewebes nach sich ziehen. Somit war die Änderung der Genexpression zu diesen Zeitpunkten der Trächtigkeit auf Seiten des Endometriums von besonderer Bedeutung.

Zur Untersuchung der Fragestellung sollte zuerst ein streng standardisiertes Protokoll etabliert werden, nach dem die Jungsauen für die Probenentnahme vorbereitet werden können und somit eine standardisierte Probenentnahme gewährleistet werden konnte. Die Sauen wurden jeweils künstlich besamt, wobei die trächtigen Tiere mit Sperma und die Kontrolltiere mit Seminalplasma besamt wurden. Auch für die Probenentnahme aus Jungsauen an Tag 12 und Tag 14 der Trächtigkeit sollte ein ebenfalls standardisiertes Entnahmeprotokoll etabliert werden, um die Entnahme von homologem und vergleichbarem Gewebematerial zu gewährleisten. Es wurde streng darauf geachtet, die Proben unter möglichst gleich bleibenden Bedingungen zu entnehmen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Schwankungen der Qualität des Probenmaterials zu verhindern.

Anschließend wurde aus allen Gewebeproben RNA isoliert um anschließend eine RNA-Seq-Analyse des Transkriptoms durchzuführen. Hierbei stand der Vergleich der Transkriptomveränderung zwischen Proben aus trächtigen und aus nicht-trächtigen Tieren und die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen im Vordergrund. Ebenso sollte die Frage bearbeitet werden, ob das Mapping der gewonnen Sequenzen mit dem vorhandenen Genomassembly Ergebnisse von guter Qualität liefern kann, wie auch die Suche nach geeigneten Parametern für das Mapping und geeigneter Software zur Datenauswertung und Identifizierung von differentiell exprimierten Genen. Auch die Etablierung geeigneter



## Zielsetzung

Validierungsmethoden, wie die quantitative real-time RT-PCR, stand im Mittelpunkt der Arbeiten.

Aufgrund der so gewonnenen Erkenntnisse sollte ein besseres Verständnis über die Vorgänge im Endometrium während und kurz vor der Implantation des Konzeptus erlangt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Analysewaage Mettler AE200	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Analysefeinwaage LA120S	Sartorius, Göttingen
Gewebe-Homogenisator (DIA900)	Heidolph, Schwabach
Dispergierstab 10 F	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer IkaMag™ RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Crosslinker	Spectrolinker, Albany, NY, USA
Schüttler IKA VIBRAX VXR	Ika Labortechnik, Staufen
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, INC., NY, USA
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Herahybrid12	Kendro, Langenselbold
Mikrowelle 8521	Privileg
<i>Zentrifugen</i>	
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
<i>Hybridisierungsöfen</i>	
VT 5042EK	Heraeus, Langenselbold
Herahybrid12	Kendro, Langenselbold
<i>Gelelektrophorese-Apparaturen</i>	
Gibco BRL Horizontal Gel	Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe
Illumina Genome Analyzer IIx	Illumina, San Diego, USA
Qubit Fluorometer System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

## Material und Methoden

NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Germany
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
StepOne	ABI, Carlsbad, CA, USA
<b>3.1.2 Chemikalien</b>	
2-Propanol (Isopropanol)	Merck KGaA, Darmstadt
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Germany
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ethanol (Rotipuran >99,8% p.a.)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NAOH)-Plätzchen	Merck, Darmstadt
RNAlater™	Ambion, Huntington, UK
TRIzol™ Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
<i>Wasser</i>	
AccuGene (frei von Dnase, Rnase)	Cambrex Bio Science
Millipore-Wasser (ultrafiltriert)	Millipore, Schwalbach
<b>3.1.3 Kits, Reagenzien und Enzyme</b>	
36 bp cycle sequencing kit (v.4)	Illumina, San Diego, USA
Cluster generation single read cBot Kit	Illumina, San Diego, USA
AccuPrime™ SuperMix II	Life technologies, Darmstadt, Germany
mRNA-Seq sample preparation Kit	Illumina, San Diego, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Germany
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Germany
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Sprint RT Complete-Double Pre-Primed mix	Clontech, Mountain View, CA, USA

## Material und Methoden

SYBR Green PCR Master Mix	ABI, Carlsbad, CA, USA
Agilent RNA Nano 6000 Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
Agilent DNA1000 Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
DNA Polymerase I (E.coli) (10U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe

### 10x TBE-Puffer

108 g	Tris Base		
		55 g	Borsäure
		40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
		ad 1 Liter	H <sub>2</sub> O

### 2,5x Probenpuffer für Agarosegele (2,5x HSE, 10 ml)

2,4 g	Harnstoff
5 g	Saccharose
1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
1 ml	1% Bromphenolblau
ad 10 ml	H <sub>2</sub> O

### 3.1.4 Molekulargewichtsstandard

Gene Ruler (100bp DNA Ladder: SM0241/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
GeneRuler (100bp DNA Ladder Plus: SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

DNA 1000 LabChip	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
RNA Nano 6000 LabChip	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
X-Tracta	Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Germany

## Material und Methoden

0,5/1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
200 µl PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Aesculap-Skalpellgriffe	tibed, Wilhelmshaven
Aesculap-Skalpellklingen 13	tibed, Wilhelmshaven
Anschneidemesser (18cm)	tibed, Wilhelmshaven
Chirurgische Pinzette	tibed, Wilhelmshaven
Gentle Skin™ Latexhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Kolbenhubpipette 2/10/20/100/200/1000 µl	Gilson, Bad Camberg
Kolbenhubpipette 500-2500ml	Eppendorf, Hamburg
Kolbenhubpipette 500-5000ml	Eppendorf, Hamburg
Kurzzeitmesser	Roth, Karlsruhe
RNase freie Spitzen 10, 20, 100, 200, 1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Germany
RNase freie 2,5ml Spitzen	Eppendorf, Hamburg
RNase freie 5ml Spitzen	Eppendorf, Hamburg
48well PCR Reaktionsgefäße	ABI, Carlsbad, CA, USA
48well PCR Reaktionsgefäß Klebefolie	ABI, Carlsbad, CA, USA
Dialyse Membranen Millipore	Millipore, Schwalbach
Porendurchmesser 0,025µm Durchmesser 47mm	
5ml Transportröhrchen	Roth, Karlsruhe
<b>3.1.6 Software</b>	
Excel Software 2007	Microsoft
Word Software 2007	Microsoft
Nanodrop v3.7.1	Peqlab, Erlangen
StepOne Software	ABI, Carlsbad, CA, USA
Bioconductor	<a href="http://www.bioconductor.org/">http://www.bioconductor.org/</a>
R Software	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>

### 3.1.7 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
DAVID Bioinformatics Resources 2008	<a href="http://david.abcc.ndifcrf.gov/">http://david.abcc.ndifcrf.gov/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Gene Set Enrichment Analysis	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp">http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp</a>
CoPub	<a href="http://services.nbic.nl/cgi-bin/copub/CoPub.pl">http://services.nbic.nl/cgi-bin/copub/CoPub.pl</a>
Affymetrix NetAffx™ Analysis Center	<a href="http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx">http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx</a>

### 3.1.8 Oligonukleotide

**Tabelle 1: Oligonukleotide für qPCR Validierung Tag 12**

Gene symbol	Ensembl gene ID	Hsa Entrez Gene ID	Ssc Entrez Gene ID	Target accession no.	Sequence forward primer	Primer sequence reverse	PCR-product (bp)
STC1	ENSSSCG00000009642	6781	100125345	NM_001103212.1	ACACGCACCAGCGAGCTGAC	GCTGTGAACACCTCGCCCCC	156
IRF1	ENSSSCG00000014277	3659	396611	NM_001097413.1	CCTTGTGCACCGTAGGCGGG	GGCTTGCCAGGCCCAAGAG	191
STAT1	ENSSSCG00000016057	6772	396655	NM_213769.1	AAATGCCGGCGCCAGAACCA	CGGGAGCTGGCTGACGTTGG	157
RN18S	ENSSSCG00000020503		100861538	NR_002170.3	GGGAGGAGGCTGACCGGGTT	ATACATGCCGACGGGCGCTG	84
GADPH	ENSSSCG0000000694	2597	396823	NM_001206359.1	AACTGCTTGGCACCCCTGGC	CTGGAGAGCCCTCGGCCAT	150
UbiquitinB		7314	100125968	NM_001105309.1	GCAGCTGGAAGATGGCCGCA	GCAGCCACCCCTCAGACGGA	88
ACTB	ENSSSCG00000007585	71	397653	XM_003357928.1	CGAGCGCTTCCGGTTCAG	GTGGTCCC GCCAGACAGCAC	156
OSTN	ENSSSCG00000011815	344901	100049691	NM_001098597.1	CCCCTGGACAGACTCTCAGCAGG	GCCTCTGGAATTGGAAGCCGGT	132
IRG1	ENSSSCG00000009469	730249	100524951	XM_003131032.1	GGGAAGTGC TGC TGCCGCAT	CCATGGGTGCCCCAGCATGAG	98
CDH17	ENSSSCG00000006106	1015	100157834	XM_001927101.1	ACCAGCCACTGCCACGTTTTCT	CCAGGAAGCAGAGCCAAAGAGATCC	200
GPR83	ENSSSCG00000014954	10888	100513220	XM_003129769.1	CAATAGAAGTGGTTGTCGGGCGA	CACGCTGGCTTGTGTTCCCA	133
FXRD4	ENSSSCG00000010202	53828	100511475	XM_003133041.2	TGTGACCCGGGCGCTTCCTC	GATCATCCCGCCAGCTGCA	121
BAALC	ENSSSCG00000006053	79870	100170128	NM_001129969.1	TTGAGCCCGCTACTACGAGAGC	CACCATTTGCCAGACACGCCATCT	162
SPP1	ENSSSCG00000009216	6696	397087	NM_214023.1	GAGGGCAGCACTGACAGCCG	GAAGGGCAGAGGCCGAAGCCC	134
FGF9	ENSSSCG00000009278	2254	396717	NM_213801.1	TTCACAGGGGACCCGCAGTC	ATGCTGACCAAGCCACGGC	187
S100A9	ENSSSCG00000006588	6280	100127489	Ssc.2381.1.A1_at	ACCACATCCTGGAAGACCTG	TCCCTGTGAGAAGTACCGT	100
SERPIN7	ENSSSCG00000004891	8710	100603190	Ssc.3693.1.S1_at	TGCAGGAAAAAGCTGTGAAG	CCCCAATCCCAAATCTTAT	129
PBD-2	ENSSSCG00000029990	1672	404699	Ssc.21145.1.S1_at	TCAACAGGATTGAAGGGACC	CTTCAC TTGGCCTGTGTGTC	103
IL24	ENSSSCG00000015655	11009		Ssc.12822.1.A1_at	TTCAAATGGGTGTCCTTTC	GTGGGGCCACTTAAAGAACA	114

**Tabelle 2: Oligonukleotide für qPCR Validierung Tag 14**

Gene symbol	Ensembl gene ID	Hsa Entrez Gene ID	Ssc Entrez Gene ID	Target accession no.	Sequence forward primer	Primer sequence reverse	PCR-product (bp)
RN18S	ENSSSCG00000020503		100861538	NR_002170.3	GGGAGGAGGCTGACCGGGTT	ATACATGCCGACGGGGCTG	84
GAPDH	ENSSSCG00000000694	2597	396823	NM_001206359.1	AAC TGC TTGGCACCCTGGC	CTGGAGAGCCCTCGGCCAT	150
UBB	ENSSSCG00000018033	7314	100125968	NM_001105309.1	GCAGCTGGAAGATGGCCGCA	GCAGCCACCCCTCAGACGGA	88
SPP1	ENSSSCG00000009216	6696	397087	NM_214023.1	GAGGGCAGCACTGACAGCCG	GAAGGGCAGAGGCGAAGCCC	134
STC1	ENSSSCG00000009642	6781	100125345	NM_001103212.1	ACACGCACCAGCGAGCTGAC	GCTGTGAACACCTCGCCCC	156
IRF1	ENSSSCG00000014277	3659	396611	NM_001097413.1	CCTTGTGCACCGTAGGCGGG	GGCTTGCCAGGCCCAAGAG	191
STAT1	ENSSSCG00000016057	6772	396655	NM_213769.1	AAATGCCGCGCCAGAACCA	CGGGAGCTGCTGACGTTGG	157
FGF9	ENSSSCG00000009278	2254	396717	NM_213801.1	TTCCAGGGGACCCGCAGTC	ATGCTGACCAAGCCACGGC	187
LOC100521597	ENSSSCG00000004968	54852	100521597	XM_003121761.1	CGGCCATCGCTACTCTGCC	GACGGTGTTCAGCACGGCCA	95
CLDN11	ENSSSCG00000011747	5010	100302016	NM_001161641.1	CATGAGCCTGGCGTGGCCAA	GACACAGCCACCCACGAGGC	195
CLDN10	ENSSSCG00000009500	9071	100153752	NM_001243444.1	GCAGCTGCAGCGGCAGTAT	TAGTCGGTGGCAGCGTGGA	104
IFITM1	ENSSSCG00000028736	8519	100127358	XM_003124230.1	CCGTGCCCGACCACATCGTC	GCAC TTGGCGGTGAGGCAT	158
HPGD	ENSSSCG00000009699	3248	100156186	NM_001190248.1	AAAGTGGCGCTGGTGACCGG	GTTGTGCC TGGTCCGCCACA	196
S100A9	ENSSSCG00000006588	6280	100127489	Ssc.2381.1.A1_at	ACCACATCCTGGAAGACCTG	TCCCTCGTGAAGCTACCGT	100
SERPIN7	ENSSSCG00000004891	8710	100603190	Ssc.3693.1.S1_at	TGCAGGAAAAACGTGTAAG	CCCCAATCCCAATCCTTAT	129
IL24	ENSSSCG00000015655	11009		Ssc.12822.1.A1_at	TTCAAATGGGTGTCCCTTTC	GTGGGGCCACTAAAGAACA	114
PBD-2	ENSSSCG00000029990	1672	404699	Ssc.21145.1.S1_at	TCAACAGGATTGAAGGGACC	CTTCACTTGCCCTGTGTGTC	103
PLP1	ENSSSCG00000012536	5354	397029	NM_213974.1	ACCATCTCGGGGAGGGCCT	GCCACACAACGGTCAGGGCA	72
IDO1	ENSSSCG00000007007	3620	100519877	XM_003134213.2	AAAGTTCGCTGGGGCAGTGC	AACTCACGGACGGAGGGGCC	194
MPP3	ENSSSCG00000017372	4356	100512807	XM_003131358.3	GCCAAGCGAGTGGGGACAC	GAGGCTCTGGGACTCGGCA	117

### 3.1.9 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren für diese Studien handelte es sich um Masthybriden einer Kreuzung aus Deutsche Landrasse und Pietraint. Die Tiere waren zur Zeit der Schlachtung zwischen 5 und 6 Monaten alt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Vor der Probennahme wurden beide Gruppen von Tieren, die trächtigen Tiere ebenso wie die nicht trächtige Kontrollgruppe gleich behandelt. Nach dem Umställen wurde die Ovulation der Tiere durch gezielte Gabe von je 750 Einheiten FSH und LH pro Sau synchronisiert. Die Jungsaunen für die trächtige Gruppe wurden zwei Mal mit einer Standardmenge von Samen eines Ebers der Rasse Deutsche Landrasse besamt. Die Jungsaunen für die nicht trächtige Kontrollgruppe wurden ebenfalls zwei Mal besamt, jedoch nur mit dem Überstand des abzentrifugierten Samens eines Deutsche Landrasse Ebers. Hierfür wurden die Spermienportionen für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und für die Kontroll-Besamung verwendet. Die Jungsaunen wurden dann entsprechend dem zu untersuchendem Trächtigkeitstag entweder Tag 12 oder Tag 14 nach der Besamung geschlachtet.

### 3.2.2 Probenentnahme

Bei Tieren des 14. Trächtigkeitstages wurde der Uterus sofort nach dem Ausbluten entnommen und jedes Horn einzeln longitudinal und auf der anti-mesometrialen Seite eröffnet. Hier waren die hyperämischen Zonen, also die Bereiche des Endometriums an denen die Embryonen bereits angeheftet waren, an der mesometrialen Seite sichtbar. Vor der Probenentnahme wurden die

## Material und Methoden

Embryonen jeweils mit einer Pinzette abgehoben und entfernt (in RNAlater konserviert), um einer Verunreinigung der Endometriumproben durch Gewebe embryonalen Ursprungs zu vermeiden.

Bei den trächtigen Tieren wurden Proben des Endometriums aus den hyperämischen Zonen gewonnen. Die Proben bestanden hierbei stets aus der Lamina epithelialis, der Lamina propria und der Tela submucosa, jedoch wurde darauf geachtet nichts von der Tunica muscularis in den Proben zu haben. Es wurden immer drei Proben pro Horn aus den gleichen Regionen entnommen: proximal (am Ende des Horns, in der Nähe der Ovarien), medial und distal (Nahe des Corpus uteri).

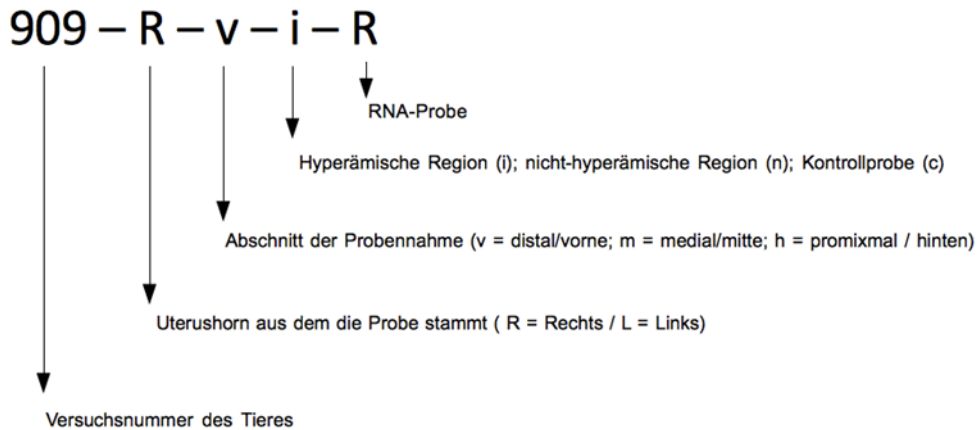
Bei Tieren des 12. Trächtigkeitstages wurde der Uterus ebenfalls sofort nach der Tötung entfernt. Jedoch wurden hier zuerst die Spitzen am Ende des Horns mitsamt den Ovarien abgeschnitten und die Hörner vor der longitudinalen Eröffnung mit einer heparinhaltigen PBS-Lösung gespült, um uterine Flüssigkeit und Embryonen zu gewinnen. Die Endometriumproben wurden anschließend aus vergleichbaren Zonen wie bei Tag 14 entnommen, jedoch nicht aus hyperämischen Zonen da diese zum Zeitpunkt Tag 12 noch nicht vorhanden sind. Die Anheftung des Embryos findet normalerweise ab dem 13. Trächtigkeitstages statt. Die Anzahl der Embryonen wurde in der Spülflüssigkeit bestimmt.

Die Proben der nicht trächtigen Kontrollgruppe wurden aus vergleichbaren Regionen entnommen. Die Proben wurden nach ihrer Gewinnung sofort in RNAlater überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewogen, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### *Probennomenklatur*

Um die verwendeten Tiere versuchsintern einwandfrei identifizieren zu können und die Proben unverwechselbar zu machen, wurde den geschlachteten Tieren eine fortlaufende Versuchsnummer zugeordnet. Außerdem wurde in der Nomenklatur auch vermerkt, ob die Probe aus dem Rechten oder Linken Uterushorn entnommen wurde. Ebenso enthält die Nomenklatur die Information in welchem Abschnitt des Uterushorns die Proben entnommen wurde: proximal, medial oder distal. Zusätzlich wurde in der Probennomenklatur auch vermerkt, ob die Probe von einem trächtigen Tier stammte, oder einem Kontrolltier entnommen wurde. Außerdem wird noch vermerkt, dass die Probe zur RNA-Isolation entnommen wurde.





**Abbildung 4: Proben-Identifikationsnummer**

**Jede Probe wurde mit so einer Proben-Identifikationsnummer gekennzeichnet. Auf diese Weise wurde jede Probe eindeutig identifizierbar, und konnte dem entsprechenden Trächtigkeitstag und Abschnitt in dem die Probe gewonnen wurde, zugeordnet werden.**

#### *Probengewinnungsprotokoll*

Das Tierprotokoll wurde bei jeder Schlachtung zunächst handschriftlich verfasst und anschließend in eine zentrale Datenbank übertragen. Hierbei wurde die Menge an gespülten bzw. abgehobenen Embryonen in jedem Horn festgehalten, ebenso wie die Anzahl der Follikel und sonstige Auffälligkeiten die für die spätere Auswahl der Tiere für die RNA-Seq-Analyse von Wichtigkeit sein könnten. Alle Tiere die hier während der Schlachtung bereits negativ auffielen, wie z.B. durch zu wenige bzw. gar keine Embryonen bei trächtigen Tieren, wurden für die spätere Analyse ausgeschlossen.

### **3.2.3 Isolation und Analyse der RNA**

Die Gesamt-RNA wurde aus den gewonnenen Proben mittels Trizol-Protokoll nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Proben wurden aus der Aufbewahrung bei -80°C herausgenommen und bei Raumtemperatur für 10 min aufgetaut. Pro 50-100 mg Gewebe wurde 1ml Trizol in 5ml Transportröhrchen (Rotilabo, Roth, Karlsruhe) vorgelegt. Die Probe wurde anschließend zum Trizol gegeben und sofort mit einem Gewebe-Homogenisator (DIAX 900, Heidolph, Schwabach) für 1 min zerkleinert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Proben zur vollständigen Lyse für 5min bei 1000 Upm bei Raumtemperatur geschüttelt (IKA VIBRAX VXR). Dem Homogenisat wurden pro 1ml eingesetztem Trizol 200 µl Chloroform zugegeben und für 15 s per Hand stark geschüttelt. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 g und 4°C für 15min

## Material und Methoden

zentrifugiert. Bei diesem Schritt trennt sich die Probe in drei Phasen auf. Eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase, welche Proteine enthielt; eine trübe weiße Interphase welche DNA und Protein enthielt und eine obere klare wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol pro ursprünglich eingesetzten Milliliter Trizol überführt. Die Probe wurde kurz geschüttelt (Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA) und anschließend zur Fällung der RNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert (5417 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das sichtbare Sediment wurde mit 1ml 75% Ethanol vorsichtig überschichtet und erneut für 5 min bei 7.500 g und 4°C zentrifugiert (5417 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde erneut per Pipette abgenommen und verworfen. Das erhaltene Sediment wurde für mindestens 30 min an der Luft neben einer Bunsenbrennerflamme getrocknet. Im Anschluss wurde das Sediment in 100 µl steril filtriertem Reinstwasser gelöst, für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 58°C auf einem Thermomixer (5437, Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

### *Isopropanol/Natriumacetat-Fällung*

Die erhaltenen RNA-Proben können durch die Natriumacetat-Fällung weiter gereinigt werden. Ziel der Fällung ist es, mögliche Verunreinigungen durch Proteine zu entfernen. Durch die hohe Konzentration von Natriumacetat und Isopropanol kommt es hierbei bevorzugt zu einer selektiven Fällung von Nukleinsäuren, wie z.B. RNA. Hierfür wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Isopropanol zuzüglich 1/10 Volumen einer 3 molaren Natriumacetat-Lösung gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Im Anschluss wird die Probe mit 1 ml 75% Ethanol überschichtet und für 5 min bei 7.500 g zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls abgenommen und verworfen. Das so gereinigte Sediment wird für mindestens 30 min an der Luft unter einer Bunsenbrennerflamme getrocknet. Im Anschluss wird die Probe wieder mit 100 µl steril filtriertem Reinstwasser gelöst.

### *Analyse von RNA-Proben*

Am NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Germany) wurde zum einen die Reinheit der isolierten RNA anhand der Verhältnisse der UV-Absorption bei 260nm:280nm und 260nm:230nm überprüft und zum anderen die Menge an Gesamt-RNA bestimmt. Anschließend wurde die Integrität der gewonnenen Gesamt-RNA auf einem microfluidischem RNA Nano 6000 Chip mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) überprüft. Es wurden nur Proben für weiter Analysen verwendet, die eine RNA integrity number (RIN) von mindestens 7,0 zeigten.

### 3.2.4 Auswahl der Proben für RNA-Seq

Aus vorangegangenen Untersuchungen der frühen Trächtigkeit zum Zeitpunkt Tag 14 nach der Besamung mittels DNA-Mikroarrays (Ostrup et al., 2010) waren Gene bekannt die im Vergleich von trächtigen Tieren und Kontrolltieren signifikante Unterschiede in der Expression aufwiesen.

**Tabelle 3: Verwendete Kandidatengene für die Auswahl der Proben zur RNA-Seq-Analyse.**

Gensymbol	Fold change Tr/Ko	Länge Fragment [bp]
S100A9	448,8	100
SLC16A1	27,7	146
SERPINB7	29,9	129
CD24	29,2	122
IL24	-12,9	114
PBD-2	-14,8	103

Es wurde ein Test mittels PCR-Reaktionen durchgeführt, um die für die RNA-Proben auf ihre Expressionsprofile im Hinblick auf die bekannten Kandidatengene zu untersuchen.

cDNA-Synthese für RT-PCR und quantitative RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurden insgesamt 2,5 µg Gesamt-RNA in 20 µl Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde die Probe zu dem vorgelegten Sprint-RT Complete Lyophilisat gegeben und sorgfältig durch auf und ab pipettieren gemischt. Die Probe wurde anschließend in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 70°C gestoppt und die Probe im Anschluss auf Eis gestellt.

### 3.2.5 RT-PCR

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Master Mix für die RT-PCR**

Reagenzien	Menge [µl]
Primer forward [10 pmol/µl]	0,5
Primer reverse [10pmol/µl]	0,5
AccuPrime Mix (2x)	10,0
ddH2O	8,0

Es wurden je 19 µl des angesetzten Mastermix (Tabelle 4) in die Vertiefungen einer 96-well PCR-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurde je Reaktion 1 µl der synthetisierten cDNA zugegeben. Die Proben wurden in einen Thermocycler (Biometra, Göttingen) gestellt und die PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen gestartet.

**Tabelle 5: Programm des Thermocycler für die RT-PCR**

Zyklenanzahl	Temperatur und Zeit
1x	94°C / 2 min
30x (CD24, SERPINB7, PBD-2)	94°C / 30 sec
25x (S100A9, SLC16A1)	60°C / 30 sec
33x (IL24)	68°C / 30 sec
1x	68°C / 2 min
	20°C / ∞

*Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Reaktionen*

Durch den Einsatz einer Agarosegelelektrophorese in Anwesenheit von Ethidiumbromid wurden die Produkte der PCR-Reaktionen analysiert. Bei der Agarosegelelektrophorese werden die aufgetragenen Nukleinsäuren durch das Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe in der Agarose aufgetrennt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches sich in den doppelsträngigen Bereichen der Nukleinsäure einlagert, können diese bei Bestrahlung mit UV-Licht nachgewiesen werden. Durch die Intensität der Fluoreszenz und Anhand der Stärke der Banden konnten Rückschlüsse auf die Menge an Transkript im Vergleich von trächtigen Tieren und Kontrolltieren gezogen werden. Anhand der Fragmente im Vergleich zum verwendeten Molekulargewichtstandard konnte die ungefähre Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren bestimmt werden. Für das Einlaufen der Proben in das Gel wurden eine Feldstärke von 3V/cm für 15 min und für den Hauptlauf 5V/cm für 1,5 h angelegt. Es wurden jeweils 5 µl PCR-Reaktion mit 3.33 µl des Probenpuffers (2,5x HSE) gemischt und das Gel damit beladen. Durch das erhaltene Gelbild konnte kontrolliert werden, ob die gewonnenen Proben die erwartete Genexpression zeigen, die für Proben eines Kontrolltieres oder eines trächtigen Tieres sprechen.

**3.2.6 Herstellung der Libraries für RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)**

Für eine genaue Messung der Konzentration der Gesamt-RNA jeder Probe wurde für die Sequenzierung nochmals mit dem qBit Fluorometer System (Invitrogen, USA) gemessen. Hierfür wurde zuerst die Quant-iT Working solution hergestellt. Es wurden 3µl des Quant-iT reagent mit 597 µl des Quant-iT Puffers vermischt. Von dieser Quant-iT working solution wurden zwei Mal 190 µl abgenommen und mit jeweils 10 µl der zwei unterschiedlichen Standards aus dem Kit vermischt. Im Anschluss wurden noch 199 µl Quant-iT working solution mit 1 µl der Probe gemischt. Alle Reaktionsgefäße wurden sorgfältig für 2-3 sec auf einem Vortexer (Scientific Industries, USA) gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde anschließend in den Qubit Fluorometer gestellt und die Messung gestartet. Der erhaltene Wert (QF Value) wurde mit einem Verdünnungsfaktor (200/ingesetzte µl Probe) multipliziert und ergab so die Konzentration der Gesamt-RNA der gemessenen Probe.

$$\text{Konzentration Gesamt RNA} = \text{QF Value} \times (200/x)$$

x = eingesetzte  $\mu\text{l}$  Probe

Anschließend wurden die Proben jedes Tieres gepoolt. Es wurde die gleiche Menge an Gesamt-RNA aus allen drei Regionen eines Horns (proximal, medial, distal) und eines Tieres zu einer Probe vereinigt. Anschließend wurden die so vereinigten Proben nach Herstellerangaben mit dem mRNA-Seq Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) für die Sequenzierung vorbereitet.

#### *Isolierung der mRNA*

Zuerst wurden alle RNA's mit einem Poly(A)-Schwanz mit Hilfe von oligo-dT ummantelten Kügelchen aus 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA isoliert. Es wurden 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in 50  $\mu\text{l}$  Reinstwasser gelöst und anschließend für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde kurz auf Eis abgekühlt. 15  $\mu\text{l}$  der oligo-dT ummantelten Kügelchen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) aliquotiert und zwei Mal an einer magnetischen Station mit 100  $\mu\text{l}$  Bead Binding Puffer gewaschen, der Überstand wurde abgenommen und die Kügelchen wurden in 50  $\mu\text{l}$  Bead Binding Puffer resuspendiert. Zu den resuspendierten Kügelchen wurde die Gesamt-RNA gegeben. Die Probe wurde für 5 min in einem Hybridisierungs-ofen bei ca. 23 °C (entspricht Raumtemperatur) auf Stufe 10 rotiert. Anschließend wurden die Kügelchen zwei Mal mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer an der Magnetstation gewaschen und der Überstand entfernt und verworfen. Durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl Lösung zu den Kügelchen und Erhitzen der Probe für 2 min bei 80°C wurde die RNA von den Kügelchen eluiert. An der Magnetstation wird der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 50  $\mu\text{l}$  Binding-Puffer überführt. Die Probe wurde anschließend für 5 min bei 65°C erhitzt und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Die Kügelchen wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gesäubert. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  der mRNA-Probe zu den Magnetkügelchen gegeben und wieder für 5 min bei Raumtemperatur im Hybridisierungs-ofen rotiert. Die Magnetkügelchen wurden zwei Mal mit je 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen, der Überstand abgenommen und verworfen. Es wurden 17  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl Lösung zu den Magnetkügelchen gegeben und für 2 min bei 80°C erhitzt, um die RNA von den Magnetkügelchen zu eluieren. Direkt im Anschluss wird das Reaktionsgefäß in die Magnetstation gestellt, der Überstand abgenommen und in ein 200  $\mu\text{l}$  PCR-Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Volumen sollte bei ca. 16  $\mu\text{l}$  liegen.

#### *Fragmentation der mRNA*

Anschließend wurde diese RNA bei erhöhter Temperatur und mit Hilfe von divalenten Kationen fragmentiert. Die erhaltenen 16  $\mu\text{l}$  mRNA werden mit 4  $\mu\text{l}$  Fragmentationspuffer in einem 200  $\mu\text{l}$  PCR-

## Material und Methoden

Reaktionsgefäß gemischt und für genau 5 min bei 94°C in einem PCR Thermocycler inkubiert. Dann wurden 2 µl Stopp-Puffer hinzugegeben und die Probe auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Es wurden 2 µl 3 M NaOAC (pH 5,2), 2 µl Glycogen und 60 µl 100% EtOH zugegeben und die Probe für 30 min bei -80°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 20.200 g und 4°C für 25 min zentrifugiert. Das überschüssige Ethanol wurde abgenommen und verworfen, ohne das Sediment zu beschädigen. Das Sediment wurde mit 300 µl 70% EtOH vorsichtig überschichtet und nochmal für 25 min bei 20.200 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgenommen und das Sediment für 10 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Sediment in 11,1 µl Reinstwasser gelöst.

### *Erst-Strang-cDNA Synthese*

Die so entstandenen Fragmente wurden unter Einsatz der Superscript II reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) und Zugabe von Random Primern zu Erst-Strang-cDNA umgeschrieben. In einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß wurden die 11,1 µl fragmentierte mRNA und 1 µl Random-Primer gemischt und für 5 min bei 65°C in einem PCR Thermocycler (Biometra, Göttingen) inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und es wurden 4 µl Erst-Strang-Puffer, 2 µl 100 mM DTT, 0,4 µl 25 mM dNTP Mix und 0,5 µl RNase (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde der Probe 1 µl Super Script II reverse Transkriptase hinzugegeben und auf einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

**Tabelle 6: Programm des Thermocycler für die Erst-Strang-cDNA-Synthese**

25 °C	10 min
42°C	50 min
70°C	15 min
4°C	Halten

Abschließend wird die Probe auf Eis gestellt.

### *Zweit-Strang-cDNA Synthese*

Die Synthese der Zweit-Strang-cDNA findet anschließen durch die DNA Polymerase I und mit Zugabe von RNase H statt. Es wurden 68,8 µl Wasser zum Erst-Strang-Synthese-Mix gegeben und im Anschluss noch 10 µl GEX Second Strang Buffer und 1,2 µl 25 mM dNTP Mix. Die Probe wurde gut gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 µl RnaseH und 5 µl DNA Polymerase I hinzugefügt, die Probe sorgfältig gemischt und für 2,5 Stunden bei 16°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) gereinigt.

### *PCR-Produkt Reinigung*

Dazu wurde je Volumen Probe 5 Volumen von Puffer PB zugegeben und das Gemisch auf eine QIAquick Säule aufgetragen und für 30-60 s bei Raumtemperatur bei 10.000 g zentrifugiert. Der

## Material und Methoden

Durchfluss wurde verworfen und es wurden 750 µl Puffer PE auf die QIAquick Säule gegeben und ebenfalls für 30-60 s bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die QIAquick Säule für 1 min bei 25.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die QIAquick Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und um die DNA von der Säule zu eluieren wurden 50 µl Puffer EB auf die Mitte der QIAquick membran gegeben und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das erhaltene Volumen sollte bei 48 µl liegen.

### *Reparatur der cDNA Fragment-Enden*

Im nächsten Schritt wurden die Enden der so entstandenen cDNA Fragmente durch Zugabe von T4 DNA Polymerase, Klenow DNA Polymerase und der T4 Polynucleotid Kinase repariert. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde folgende Mischung vorgelegt:

**Tabelle 7: Mastermix für die Reparatur der Enden der cDNA Fragmente**

Wasser	27,4 µl
10x End Repair Buffer	10 µl
25 mM dNTP Mix	1,6 µl
T4 DNA Polymerase	5 µl
Klenow DNA Polymerase	1 µl
T4 PNK	5 µl

Zu dem vorgelegten Gemisch wurde die Probe zugegeben und bei 20°C für 30 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe erneut mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) gereinigt.

### *Anhängen eines Adenins an die DNA Fragmente*

Im Anschluss wird an die Fragmente noch eine einzelne Base Adenin angehängt und es werden spezielle Adapter ligiert. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 5 µl A-Tailing Puffer, 10 µl 1mM dATP und 5 µl Klenow Exo- vorgelegt und die eluierte DNA zugegeben. Das Gemisch wurde anschließend für 30 min bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert und mit dem MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

Es wurden 250 µl Puffer PB zur Probe gegeben und diese im Anschluss auf die MinElute Säule aufgetragen und für 1 min bei Raumtemperatur und 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule aufgegeben. Im Anschluss wurde die Säule erneut für 1 min bei Raumtemperatur und 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut bei 25.000 g für 1 min zentrifugiert. Die MinElute Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und um die DNA von der MinElute membran zu eluieren wurden 23 µl Puffer EB aufgebracht, für 1 min inkubiert und anschließend für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert.

### *Ligieren der Adapter an die cDNA Fragmente*

## Material und Methoden

Zu der gereinigten DNA wurden 25 µl 2x Rapid T4 DNA Ligase Puffer und 1 µl PE Adapter Oligo Mix gegeben und sorgfältig gemischt. Im Anschluss wurde noch 1 µl T4 DNA Ligase zugegeben, das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dem MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) gereinigt.

### *Isolation der cDNA Templates*

Die so entstandenen cDNA Produkte wurden anschließend in einem 2%igen Agarose Gel (Biozym Phor Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Germany) nach ihrer Größe aufgetrennt und es wurde ein Gelstück auf einer Höhe von ca. 200 bp (+/- 25 bp) ausgeschnitten (X-Tracta, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Germany). Zum beladen des Gels wurden 10 µl Probe mit 6,67 µl 2,5x HSE Puffer gemischt.

Die in dem ausgeschnittenen Gelstück enthaltene DNA wurde isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Die Gelstücke wurden gewogen und entsprechend dem Gewicht weiter verwendet. Pro Volumen Gel wurden 3 Volumen Puffer QG zugegeben (100 mg ~ 100 µl) und für 10 min bei 50°C inkubiert, wobei die Probe alle 2-3 min auf einem Vortexer gemischt wurden. Im Anschluss wurde 1 Volumen Gelgewicht an Isopropanol zugegeben und sorgfältig gemischt. Das Gemisch wurde auf die QIAquick Säule aufgebracht und für 1 min bei Raumtemperatur und 17.900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 17.900 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut bei 17.900 g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und es wurden 30 µl Eluations Puffer auf die Mitte der Qiaquick Membran gegeben und für 1 min bei Raumtemperatur und 17.900 g zentrifugiert. Das erhaltene Volumen lag bei ca. 30 µl.

### *Anreicherung der cDNA durch PCR*

Die so erhaltene cDNA wurde mittels PCR in 15 Zyklen amplifiziert und bildete so die endgültige Library für die anschließende Sequenzierung.

Folgendes Gemisch wurde in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt:

**Tabelle 8: Mastermix für die Anreicherung der cDNA**

Wasser	7,0 µl
5x Phusion Buffer	10,0 µl
PCR Primer PE 1.0	1,0 µl
PCR Primer PE 2.0	1,0 µl
25mM dNTP Mix	0,5 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl

Zu diesem Gemisch wurden 30 µl der gereinigten cDNA gegeben und mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:



**Tabelle 9: Programm des Thermocycler zur Anreicherung der cDNA**

	30 sec	98°C
15x	10 sec	98°C
	30 sec	65°C
	30 sec	72°C
	5 min	72°C
	Hold	4°C

Im Anschluss wurde die Probe erneut mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

Die Konzentration und Größe der erhaltenen cDNA Fragmente wurde mit einem Agilent DNA 1000 Chip auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) und mit dem Qubit Fluorometer System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überprüft. Die Sequenzierung der erhaltenen Libraries wurde auf einem Illumina Genome Analyzer Ix System (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Es wurden 75bp lange single reads auf einer flow cell mit dem 36 bp cycle sequencing kit (v4) generiert.

### 3.2.7 Analyse der Sequenzdaten

Die erhaltenen Sequenzen wurden in eine lokal installierte Version der Galaxy Plattform (Blankenberg et al., 2010, Goecks et al. 2010, Blankenberg et al., 2010) hochgeladen. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem FastQ-Trimmer (v.1.0.0) Programm (Blankenberg et al., 2010) vom 3'-Ende getrimmt und mit dem FASTQ-Filter (v.1.0.0) nach einer minimalen Länge der Sequenzen von 30 Basenpaaren gefiltert (Blankenberg et al., 2010). Alle so erhaltenen Sequenzen unter einer Länge von 30 bp wurden bei diesem Schritt verworfen und flossen nicht in die weiteren Analysen ein. Die restlichen erhaltenen Sequenzen wurden mit TopHat (v.1.4.0) auf das Schweinegenom (Sscrofa 10.2, Aug 2011) gemapped. Anschließend wurden für alle Sequenzen die RPKM Werte berechnet (RPKM Calculator v.1.0.0) und nur Gensequenzen für die weitere Auswertung verwendet, die mindestens in drei von vier Tieren mind. 10 ihnen zugeordnete Sequenzen vorweisen konnten. Nach diesen Kriterien wurden die Sequenzen gefiltert. Alle so detektierten Sequenzen wurden anschließend zur Analyse der differentiell exprimierten Gene und Isoformen mit DESeq (Anders and Huber, 2012) und einer False discovery rate (FDR, Anteil falsch positiv detektierter Gene unter allen differentiell exprimierten Genen) von 0,01 durchgeführt. Das DESeq stellt ein Packet dar, welches auf Grundlage der Varianz die eingespeisten Daten auf differentielle Genexpression testen kann. Als Grundlage dient hierbei die These dass der Mittelwert ein zuverlässiger Prädiktor für die Varianz ist. Wie z.B. dass Gene mit einer vergleichbaren Expression auch eine vergleichbare Varianz über ihre Replikate aufweisen. Im Anschluss an die Berechnung der Varianz-Mittelwert-Abhängigkeit, testet das Programm die Daten auf differentielle Genexpression. Hierbei werden die zwei zu untersuchenden Konditionen untereinander verglichen.

Für jedes Gen wird ein absoluter Mittelwert des Expressionslevels über beide Konditionen berechnet, ebenso ein Mittelwert für jede Kondition einzeln, der Fold change aus dem Vergleich der zwei Konditionen untereinander, der logarithmische (zur Basis 2) Fold change und der p-Value für die statistische Signifikanz des errechneten Fold change.

Anschließend führt das DESeq Paket noch eine sogenannte Clusteranalyse durch und stellt diese bildlich in einer sogenannten Heatmap als Darstellung einer paarweisen Korrelationsanalyse dar. Bei der hierarchischen Clusteranalyse wird der euklidische Abstand zur Berechnung der Distanz herangezogen.

### **3.2.8 GO Analyse**

Eine funktionale Klassifikation der erhaltenen differentiell exprimierten Gene wurde durch die Analyse von verschiedenen funktionalen Datenbanken mittels des „Functional Annotation Clustering“ Programms der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) in den Hauptkategorien „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“ „Zelluläre Komponente“ durchgeführt. Mit Hilfe dieser Datenbank konnten die gefunden differentiell exprimierten Gene den zugehörigen Genontologie-Kategorien zugeordnet werden. Im ersten Schritt bestimmt hierbei das Programm, mit welcher Häufigkeit eine Ontologie in einer bestimmten Menge an zufällig ausgewählten Gene vorkommt. Als nächsten Schritt vergleicht das Programm den so ermittelten Erwartungswert mit den tatsächlichen Werten für die eingespeisten differentiellen Gene. Als angereichert wurden Ontologien bezeichnet, denen signifikant mehr Gene als erwartet zugeordnet werden konnten. Somit konnte die durchgeführte Gene Ontology Analyse Hinweise auf überrepräsentierte Funktionen unter den identifizierten Genen liefern. Bei der GO-Analyse erfolgt eine Zuordnung der Gene zu drei Hauptkategorien: „Biologische Prozesse“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“. Diese sind ihrerseits nochmals in verschiedene untergeordnete Ebenen unterteilt. Bei der Hauptkategorie „Molekulare Funktion“ werden die Funktionen von Genprodukten auf molekularer Ebene beschrieben. Bei der Kategorie „Zelluläre Komponente“ wird das Genprodukt einem funktionellen Kompartiment innerhalb der Zelle oder deren extrazellulären Umgebung zugeordnet. „Biologische Prozesse“ beinhaltet biologische Vorgänge oder molekulare Ereignisse an denen ein Genprodukt beteiligt ist.

### **3.2.9 Gene Set Enrichment Analyse**

Zur weiteren Charakterisierung der RNA-Seq Daten wurde noch eine Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v2.07) durchgeführt (Subramanian et al., 2005). Bei der GSEA (Broad Institute, MIT, Cambridge, Massachusetts, USA) handelt es sich um ein statistisches Verfahren für eine sogenannte gewichtete Genexpression zum paarweisen Vergleich zweier Konditionen. Diese Gengruppen können beliebig gewählt werden, so können sie manuell zusammengestellt werden oder aus Datenbanken stammen. Um einen Vergleich zweier Konditionen durchführen zu können, haben die Gengruppen beispielsweise ähnliche Funktionen oder gleiche Regulationsmechanismen vorzuweisen. In dieser

Arbeit wurden die erhaltenen Datensätze mit ähnlichen Datensätzen anderer Spezies verglichen, um eventuelle Korrelationen zwischen den untersuchten Datensätzen identifizieren zu können. Das Ziel von GSEA als souveräne Methode zur Genexpressionsanalyse ist es, eine präferentielle Verteilung von vorgegebenen Sets an Genen im untersuchten Datensatz nachzuweisen. Dazu wurde dem Programm eine Rangliste der exprimierten (detektierbaren) Gene vorgegeben, die aus dem Fold change (FC) und dem korrigierten P-Wert berechnet wurde. Anschließend wurde vom GSEA-Programm ein sogenannter Enrichment score (ES) berechnet, welcher einer gewichteten Statistik für das Maß der Anreicherung der Gengruppe zugrunde liegt. Eine Gengruppe gilt als angereichert, wenn viele Gene aus dieser Gengruppe hohe Ränge in der hierarchisch sortierten Genliste aufweisen, d.h. in Richtung der am signifikantesten hochregulierten oder herunterliegenden Gene. Der Wert M, das Maximum der kumulativen Summe, zeigt an wie hoch die Anreicherung von der untersuchten Gengruppe im Vergleich zur ganzen Genliste ist. Je mehr Gene der Gengruppe hohe Ränge in der Gen-Rangliste einnehmen, desto höher ist M. Jedoch sind nicht nur Gene mit hohen Rängen interessant, auch Ränge mit niedrigen Rängen sind von Interesse, betrachtet man z.B hoch- und runterregulierte Gene. Hierbei besetzen die hoch-regulierten Gene hohe Ränge und die herunter regulierten Gene niedrige Ränge in der Genliste. Bei der GSEA handelt es sich um eine kumulative (engl. running sum) Statistik und sie basiert auf einem *bootstrapping*-Verfahren der Gengruppen. Hierbei werden nach der Berechnung der kumulativen Summe Permutationstests durch Genrandomisierungen durchgeführt, um festzustellen ob der berechnete Wert M tatsächlich eine signifikante Höhe aufweist. Dieser bei der Ränge-Verteilung angewendete Permutatiostest entspricht dem Kolmogorov-Smirnov-Test.

### **3.2.10 Quantitative Real-time RT-PCR**

Zur Validierung der RNA-Seq-Daten wurden die gleichen RNA-Proben, die für die Sequenzierung herangezogen wurden, ebenfalls für die quantitative Real-time RT-PCR (qPCR) verwendet. Die RNA-Proben wurden mit dem Sprint RT Complete-Double Pre-Primed mix (ClonTech, USA) in cDNA umgeschrieben und die erhaltene cDNA ebenfalls wie für die Sequenzierung pro Tier über alle drei Abschnitte eines Horns gepoolt.

Für die nachfolgenden qPCR-Reaktionen wurde immer 10 ng cDNA (entspricht 10 ng Gesamt-RNA) je Reaktion eingesetzt. Um spezifische Fragmente zu ausgewählten regulierten Genen amplifizieren zu können, wurden spezifische Primer mit Hilfe der NCBI Primer-Blast Plattform ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) entworfen. Die Real-time PCR-Reaktionen wurden in

## Material und Methoden

einem Gesamtvolumen von 20 µl und folgender Zusammensetzung der Komponenten auf einem Step One Gerät (ABI, USA) durchgeführt:

1 µl cDNA (entspricht 10ng cDNA)

10 µM forward Primer

10 µM reverse Primer

18,2 µl 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, USA)

Für alle Reaktionen war die Annealing-Temperatur 60°C. Ubiquitin B, GADPH und LOC448984 (18S ribosomale RNA) wurden als Referenzgene herangezogen, da sie schon im Vorfeld als Referenzgene im Endometrium beschrieben und verwendet wurden (Merkl et al., 2010, Bauersachs et al., 2006). Die relativen Expressionsunterschiede wurden mit Hilfe der  $2^{(\text{delta-delta CT})}$  Methode ermittelt (Livak and Schmittgen, 2001). Die Anzahl der Zyklen zur Erreichung eines spezifischen Schwellenwertes (Threshold) (CT) der untersuchten Gene wurde am geometrischen Mittel der Housekeeping Gene normalisiert (delta CT). Alle amplifizierten PCR Fragmente wurden mit einem DNA 1000 Chip (Agilent Technologies, Germany) auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany) analysiert, um zu überprüfen ob es zu einer spezifischen Amplifizierung des Fragmentes kam oder mehrere unspezifische Produkte sichtbar sind. Zur weiteren Kontrolle der erhaltenen PCR-Fragmente wurden diese zusätzlich noch sequenziert um die Richtigkeit der erhaltenen Amplifikate zu überprüfen.

### 3.2.11 Sequenzierung der qPCR-Fragmente

#### *Mikrodialyse der qPCR-Fragmente*

Alle in der qPCR amplifizierten Produkte wurden durch Sequenzierung identifiziert. Dazu wurden die Fragmente direkt aus der 48-well PCR-Platte verwendet. Um vorhandene Primer, Salze und freie Nukleotide zu entfernen wurde zunächst eine Mikrodialyse durchgeführt. Es wurden die kompletten 20 µl der Reaktion auf spezielle Kernporenmembranen (Millipore, Porendurchmesser 0,025 µm, Durchmesser 45mm) überführt. Diese Filterscheiben wurden dann in einer Petrischale (100 mm Durchmesser) frei schwimmend auf 40 ml 0,25-fach konzentriertem TE-Puffer pH 8 für eine halbe Stunde inkubiert. Der Puffer wurde dabei konstant mit einem Mini-Rührfisch bewegt, um eine gleichmäßige Dialyse zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Filterscheibe aus dem Puffer genommen, die Proben abpipettiert und in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

#### *Sequenzierung der qPCR-Fragmente*

Für die Sequenzierung wurden zu 3 µl der dialysierten Probe 3 pmol des forward Primers gegeben und das Reaktionsvolumen mit Wasser auf 6 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Langen) auf einem 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Langen) sequenziert. Die Durchführung der

## Material und Methoden

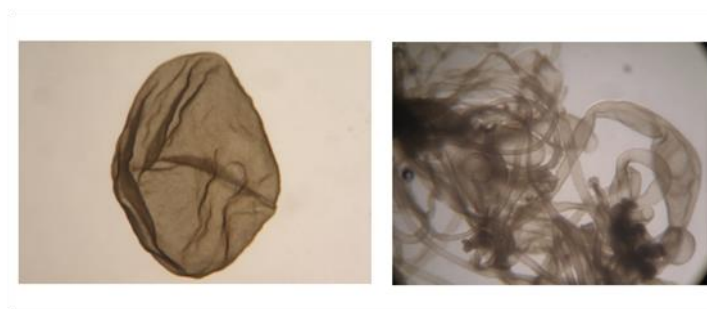
Sequenzierung wurde durch den Sequenzierservice des Genzentrums (AG Dr. H. Blum, LAFUGA, Genomics) ausgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswahl der Versuchstiere

Um eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Proben in der vorliegenden Studie zu gewährleisten, wurden eine standardisierte Vorbereitung der Tiere sowie ein bei jeder Schlachtung gleichmäßig abzuarbeitendes Protokoll zur Probengewinnung ausgearbeitet. Vor der Probennahme wurde die Ovulation aller zur Probenentnahme bestimmten Tiere durch gezielte Hormongabe synchronisiert. Dies geschah nach der Umstallung durch eine standardisierte Gabe von je 750 Einheiten FSH und LH pro Tier. Mit Eintritt der so ausgelösten Ovulation wurden jene Jungsaugen, die für die Probengewinnung aus trächtigen Tieren vorgesehen waren, zweifach im Abstand von 12 h mit einer Standardmenge des Ejakulates eines Ebers der Rasse Deutsche Landrasse besamt. Die Tiere, die zur Kontrollgruppe gehören sollten, wurden ebenfalls zwei Mal besamt, jedoch nur mit dem Überstand der zentrifugierten Standardmenge des Ebersamens. Nach erfolgreicher Besamung wurden die Tiere jeweils entweder am 12. bzw. 14. Trächtigkeitstag geschlachtet. Jedes geschlachtete Tier wurde in das Tierprotokoll mit seiner fortlaufenden Nummer, der Menge an Follikeln und Embryonen, sowie etwaigen beobachteten Besonderheiten eingetragen.

Die Auswahl der Zeitpunkte der frühen Trächtigkeit basierte darauf, dass während dieser Phase Ereignisse stattfinden, die entscheidend zu einer Etablierung einer Trächtigkeit beitragen. Zum einen findet zwischen dem 10. und dem 12. Trächtigkeitstag ein starker Anstieg der Östrogensynthese im elongierenden Konzeptus statt. Östrogen gilt hierbei als ein Schlüsselfaktor für die maternale Erkennung des Konzeptus ebenso wie für die Etablierung der Trächtigkeit. Zum anderen durchläuft der frühe Konzeptus in diesem Stadium der Trächtigkeit eine extreme phänotypische Umstrukturierung. Aus den am 10. Trächtigkeitstag noch ovoiden Embryonen entwickeln sich durch starkes Wachstum des Trophoblasten bis zum 12. Trächtigkeitstag lange, filamentöse Embryonen (Yelich et al., 1997).



**Abbildung 5: Kugelförmiger und filamentöser Konzeptus**

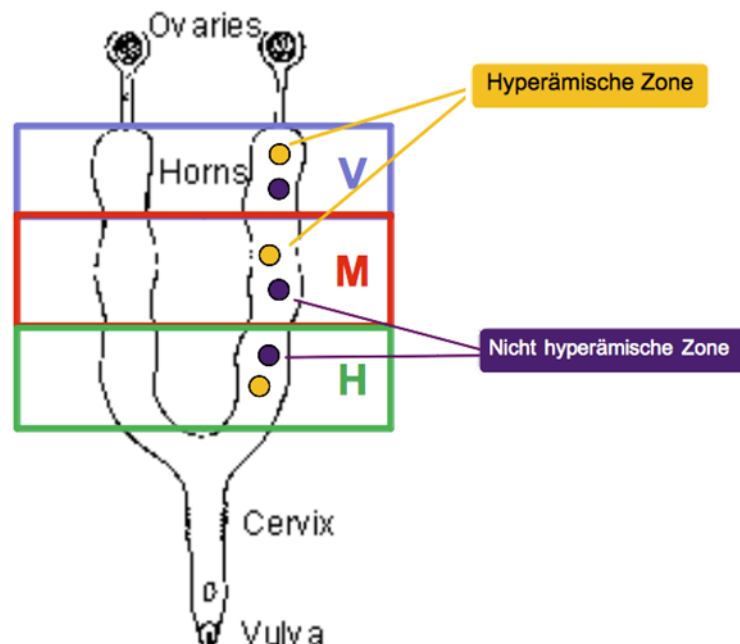
**In der linken Abbildung ist ein noch kugelförmiger Konzeptus zu sehen, aufgenommen an Tag 10 der Trächtigkeit. In der rechten Abbildung sind, durch starkes Trophoblastenwachstum, nun filamentöse Konzepte an Tag 12 der Trächtigkeit zu sehen.**

## Ergebnisse

An Tag 14 finden ebenfalls für die Etablierung der Trächtigkeit, elementare Schlüsselereignisse statt. Zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit findet bereits die Anlagerung des elongierten Konzeptus an die Uterusschleimhaut statt. Diese Anlagerung führt zu einer gesteigerten Durchblutung der betroffenen Stellen an der Schleimhaut und es bilden sich hyperämische Zonen, die bereits mit bloßem Auge erkennbar sind. Außerdem wird in diesem Stadium der frühen Trächtigkeit die sog. epitheliochoriale Plazentation initiiert. Beim Schwein liegt eine nicht-invasive Form der Plazentation vor, bei der der Trophoblast nicht in das maternale Gewebe des Uterus eindringt, sondern nur die vom Endometrium ausgebildeten Ausbuchtungen (Endometriumpfropfen) umschließt und anschließend über das maternale Drüsengewebe histotroph ernährt wird (Dantzer, 1985, Ostrup et al., 2010).

### **4.2 Probengewinnung**

Jedes geschlachtete Tier wurde in das Tierprotokoll mit seiner fortlaufenden Nummer, der Anzahl an Follikeln und Embryonen, sowie etwaigen Besonderheiten eingetragen. Nach der Tötung und der Eröffnung der Uterushörner wurden je Horn bei Tag 12 drei und bei Tag 14 sechs Proben entnommen. Hierfür wurde das Horn in drei Abschnitte untergliedert: proximal, medial und distal. Bei Jungsauern im 14. Trächtigkeitstag hatte die Anheftung der Embryonen an die Uterusschleimhaut bereits eingesetzt und die hyperämischen Stellen, stärker durchblutete Regionen der Schleimhaut an denen der Uterus angeheftet war, waren bereits sichtbar. Vor der Probenentnahme wurden die Embryos mit Hilfe einer Pinzette abgehoben und gesondert in RNA later gegeben. Anschließend wurden von jedem Abschnitt des Uterus zwei Proben genommen. Eine Probe wurde direkt in den hyperämischen Zonen gewonnen und eine Probe aus einer angrenzenden, nicht hyperämischen Region.



**Abbildung 6: Übersicht der Probenentnahme**

Das eröffnete und freipräparierte Horn wurde immer in drei Abschnitte unterteilt: proximal (v), medial (m) und distal (h). Es wurden, wie hier abgebildet, bei Tag 14 der Trächtigkeit jeweils aus jedem Abschnitt zwei Proben entnommen. Eine Probe aus einer hyperämischen Zone und eine Probe aus der angrenzenden, nicht-hyperämischen Region des Abschnittes. An Tag 12 wurde je Horn nur eine Probe je Abschnitt entnommen, da noch keine hyperämischen Zonen sichtbar waren.

Bei Tieren an Tag 12 der Trächtigkeit wurden die Uterushörner vor der Eröffnung mit einer PBS-Lösung gespült. Dazu wurde die Spitze der Uterushörner entfernt und die Hörner einzeln mit der PBS-Lösung befüllt und ausgespült. Die Spülflüssigkeit, in der sich nun die Embryonen befanden, wurde aufgefangen und die Embryonen gezählt.

Bei der Probennahme wurde streng darauf geachtet, dass die Biopate ausschließlich aus Gewebe der Lamina epithelialis, der Lamina propria und der Tela submucosa bestanden. Eine Verunreinigung der Proben durch Anteile des darunterliegenden Gewebes der Tunica muscularis wurde vermieden. Anteile dieser Muskelschicht im entnommenen Gewebe hätten das spätere Ergebnis der durchgeführten Expressionsanalysen verfälscht. Ebenso verhielt es sich mit den gespülten, wie auch den per Pinzette abgehobenen Embryonen. Das Abheben der Embryonen bzw. das Ausspülen mit PBS-Lösung musste sehr sorgfältig erfolgen, da auch Rückstände des embryonalen Gewebes die späteren Genexpressionsanalysen des endometrialen Gewebes verfälschen würden. Insgesamt wurden für Tag 14 bei 24 Tieren Proben genommen und für Tag 12 wurden 18 Tiere beprobt. Bei der Probenentnahme Tag 14 zeigten sich 12 Tiere als trächtig und 10 Tiere als Kontrolltiere. Nur zwei



## Ergebnisse

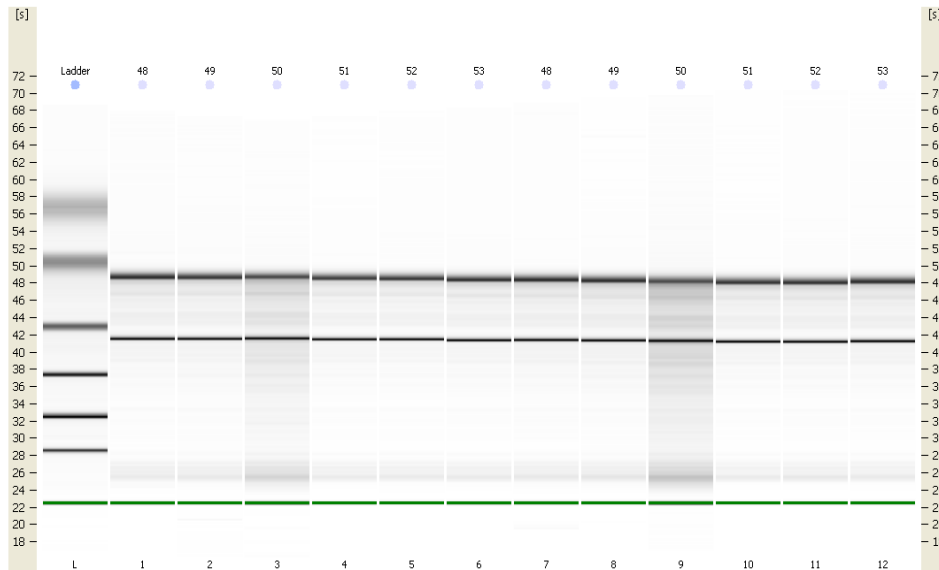
Tiere konnten sofort ausgeschlossen werden, da in einem Uterus Urin und im anderen Uterus kleine Fremdkörper unbekannter Herkunft entdeckt wurden. Bei der Probennahme zu Tag 12 (insgesamt 18 Jungsaugen) konnten 9 Tiere als trächtige Tiere beprobt werden und 8 Tiere als Kontrollen. Nur ein Tier musste aufgrund von Blut im Uterus, sofort aus der Studie ausgeschlossen werden.

### **4.3 RNA-Isolierung und Analyse der Gesamt-RNA**

Um vergleichende Genexpressionsanalysen durchführen zu können, wurde aus den entnommenen Gewebeprobe zuerst die Gesamt-RNA isoliert. Dies geschah stets nach dem gleichen Protokoll. Die Proben wurden zuerst mit einem Gewebe-Homogenisator in einer vorgelegten Menge TRIzol zerkleinert und anschließend nach Herstellerangaben isoliert. Die so erhaltene Gesamt-RNA wurde nochmals von möglichen Verunreinigungen mittels Natriumacetat-Fällung bereinigt. Die Menge an isolierter RNA und deren Reinheit wurden mit Hilfe eines Nanodrop-Photometers ermittelt. Das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260nm und 280 nm (OD 260/280) erreichte stets Werte von 1,9-2,2. Die Messergebnisse für das Verhältnis der OD 260/230 lagen bei Werten von 2,0 bis 2,3. Alle Ergebnisse deuteten auf eine sehr reine Gesamt-RNA hin, da mögliche Verunreinigungen wie z.B. Salze und Proteine bei 230 nm bzw. 280 nm absorbieren würden.

Um eine Aussage über die Qualität der isolierten Gesamt-RNA treffen zu können, wurde die RNA zusätzlich mit Hilfe eines Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert. Die Absorptionsspektren des Nano-Drop geben zwar Auskunft über die Reinheit der RNA, jedoch nicht über deren Qualität. Ein Abbau der RNA durch RNasen lässt sich anhand der UV-Spektren nicht nachweisen oder überprüfen. In Abbildung 7 ist das gelähnliche Bild eines typischen Laufes auf dem Bioanalyzer 2100 zu sehen.

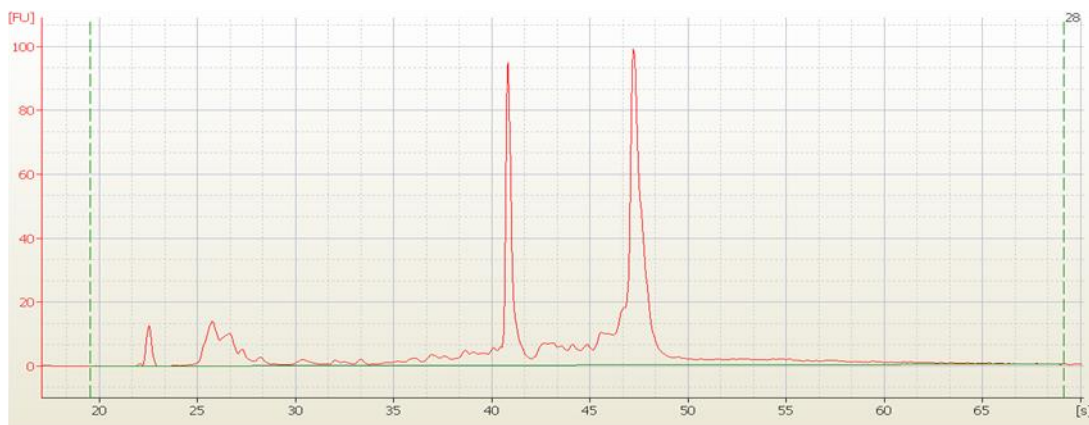
## Ergebnisse



**Abbildung 7: Gelähnliches Bild 2100 Bioanalyser isolierter Gesamt-RNA**

In der ersten Spur (L) aufgetragen sind 1  $\mu$ l des RNA-Molekulargewichtsstandards aus dem RNA Nano 6000 Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). In den Spuren 1-12 wurde 1  $\mu$ l Gesamt-RNA mit einer Konzentration von 200ng/ $\mu$ l aufgetragen.

Die analysierten Proben zeigen stets zwei deutliche Banden, die Banden der ribosomalen 18S und 28S RNAs und eine breitere Bande für tRNAs und die kleineren ribosomalen RNAs (5S und 5,8S). Es konnte kein Schmier oder ähnliches beobachtet werden, das auf Abbauprodukte der RNA hindeuten könnte. Auch die Elektropherogramme der Proben zeigten keinerlei Anhaltspunkte für eine Degradation der RNA oder Verunreinigungen in der Gesamt-RNA (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Elektropherogramm isolierter Gesamt-RNA**

Zu sehen ist das Elektropherogramm einer Probe mit einer RIN von 9,3.

Somit zeigt auch das Ergebnis der Analyse mit Hilfe des Bioanalyzers 2100, dass es sich bei der isolierten Gesamt-RNA um reine und von Verunreinigungen freie RNA von sehr guter Qualität

## Ergebnisse

handelt. Für alle weiteren Analysen wurden nur Proben verwendet, die eine RNA integrity number (RIN) von 7,0 bis 10 zeigten.

**Tabelle 10: Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 14 mit entsprechender RIN und den 28s/18s Ratio**

Probe	RIN	28s/18s Ratio	Probe	RIN	28s/18s Ratio
909-R-v-i-R	8.5	1.7	912-R-h-c-R	8.2	1.5
909-R-m-i-R	8.3	1.5	916-R-v-c-R	7.8	1.7
909-R-h-i-R	8.2	1.5	916-R-m-c-R	7.4	1.6
903-R-v-i-R	8	1.5	916-R-h-c-R	8.1	1.5
903-R-m-i-R	8.2	1.4	917-R-v-c-R	8.1	1.9
915-R-m-i-R	8.2	1.5	917-R-m-c-R	8.1	1.6
918-R-m-i-R	7.9	1.5	917-R-h-c-R	8	1.4
918-R-h-i-R	7.7	1.6	902-R-v-c-R	7	1.6
912-R-v-c-R	8.6	1.4	902-L-m-c-R	7.1	1.5
912-R-m-c-R	8.8	1.5	902-L-h-c-R	7.4	1.4

**Tabelle 11: Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 12 mit entsprechender RIN und den 28s/18s Ratio**

Probe	RIN	28s/18s Ratio	Probe	RIN	28s/18s Ratio
003-L-v-p-R	9,2	1,3	004-L-v-c-R	8,3	1,7
003-L-m-p-R	9,5	1,3	004-L-m-c-R	8,9	1,8
003-L-h-p-R	9,1	1,3	004-L-h-c-R	9	1,7
008-L-v-p-R	8,6	1	006-L-v-c-R	9	1,7
008-L-m-p-R	7,9	1,3	006-L-m-c-R	8,9	1,4
008-L-h-p-R	9,1	1,2	006-L-h-c-R	8,7	1,3
010-L-v-p-R	8,7	1,4	007-L-v-c-R	8,1	1,6
010-L-m-p-R	9,1	1,3	007-L-h-c-R	8,2	1,4
010-L-h-p-R	8,8	1,2	011-L-v-c-R	8,3	1,2
012-L-v-p-R	9,2	1,5	011-L-m-c-R	8,6	1,7
012-L-m-p-R	8,9	1,5	011-L-h-c-R	8,6	1,7
012-L-h-p-R	9	1,4			

### 4.4 Probenauswahl für RNA-Seq Analyse

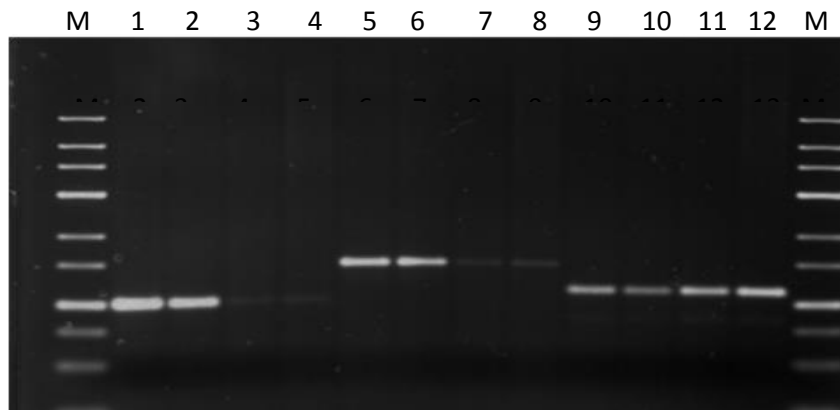
Aus früheren Arbeiten (Bauersach et al., 2012; Oestrup et al., 2010), die sich mit vergleichenden Genexpressionsanalysen an Tag 14 bzw. Tag 12 der Trächtigkeit beim Schwein beschäftigt haben, waren bereits Gene bekannt, die zu diesem Zeitpunkt in trächtigen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reguliert sind.

**Tabelle 12: Verwendete Kandidatengene für die Auswahl der Proben zur RNA-Seq-Analyse**

Gensymbol	Entrez Gene ID	Gename	Produktlänge [bp]	Fold change
<i>S100A9</i>	100127489	S100 calcium binding protein A9	100	448,8
<i>SLC16A1</i>	100156854	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	146	27,7
<i>SERPINB7</i>	100152588	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	129	29,9
<i>CD24</i>	100519934	signal transducer CD-24-like	122	29,2
<i>IL24</i>	100739374	interleukin-24-like	114	-12,9
<i>PBD-2</i>	404699	beta-defensin 2	103	-14,9

#### 4.4.1 Probenauswahl Tag 14

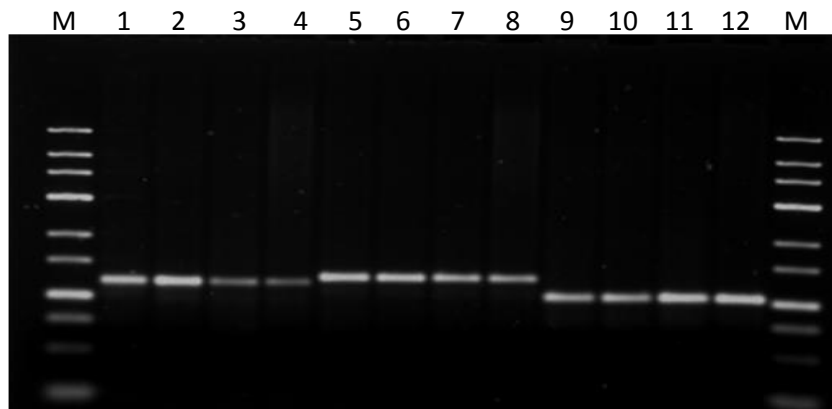
Alle isolierten Proben Tag 14 wurden mit einer RT-PCR für die Kandidatengene in Tabelle 12 auf die erwartete Expression dieser Gene überprüft. Aufgrund der relativ starken Expressionsunterschiede dieser Gene zwischen trächtigen und zyklischen Tieren, war eine quantitative PCR nicht notwendig. Die Gesamt-RNA wurde hierfür in cDNA umgeschrieben und anschließend wurden die spezifischen Fragmente in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Für die folgenden RNA-Seq-Analysen wurden nur Proben von Tieren herangezogen, die das erwartete Expressionsprofil der Kandidatengene zeigten.



**Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese für die Kandidatengene *S100A9*, *SLC16A1* und *IL24***

In den Spuren M wurden 4  $\mu$ l (einer 1:10 Verdünnung) des Molekulargewichtsstandards Low Range Marker (Fermentas) aufgetragen. In den Spuren 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10 wurden je zwei Proben von trächtigen Tieren und in den Spuren 3 und 4, 7 und 8, 11 und 12 je zwei Proben von Kontrolltieren aufgetragen. Zu sehen sind in den Spuren 1-4 die PCR-Produkte für das Gen *S100A9*, in den Spuren 5-8 die PCR-Produkte für das Gen *SLC16A1* und in den Spuren 9-12 die PCR-Produkte für das Gen *IL24*.

## Ergebnisse



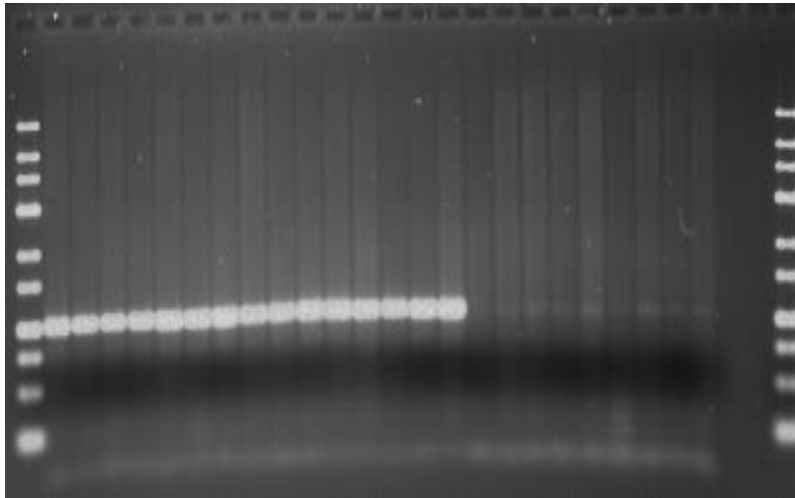
**Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese für die Kandidatengene CD24, SERPINB7 und DEFB1**

In den Spuren M wurden 4  $\mu$ l (einer 1:10 Verdünnung) des Molekulargewichtsstandard Low Range Marker (Fermentas) aufgetragen. In den Spuren 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10 wurden zwei Proben von trächtigen Tieren und in den Spuren 3 und 4, 7 und 8, 11 und 12 zwei Proben von Kontrolltieren aufgetragen. Zu sehen sind in den Spuren 1-4 die PCR-Produkte für das Gen CD24, in den Spuren 5-8 die PCR-Produkte für das Gen SERPINB7 und in den Spuren 9-12 die PCR-Produkte für das Gen DEFB1.

In den Abbildungen 9 und 10 zu sehen sind im Vergleich die PCR-Produkte der Kandidatengene S100A9, SLC16A1, IL24, CD24, SERPINB7 und DEFB1. Die erwarteten Genexpressionsunterschiede zwischen den Proben trächtiger Tiere und den Proben der Kontrolltiere sind gut sichtbar. Es wurden je Gen immer dieselben zwei Proben aus trächtigen und Kontrolltieren aufgetragen.

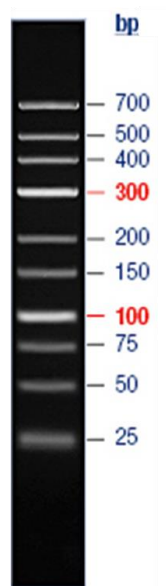
## Ergebnisse

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28



**Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese für das Kandidatengen S100A9**

In den Spuren 1 und 28 wurden 4  $\mu$ l (einer 1:10 Verdünnung) des Molekulargewichtsstandard Low Range Marker (Fermentas) aufgetragen. In den Spuren 2 bis 13 wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt von trächtigen Proben und in den Spuren 14 bis 25 wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt von Proben aus Kontrolltieren aufgetragen.



**Abbildung 12: Fermentas GeneRuler™ Low Range Marker**

In Abbildung 11 zu sehen ist das Agarosegelbild der PCR-Produkte von S100A9 von 12 Proben von trächtigen Tieren und von 12 Proben aus Kontrolltieren. Gut zu erkennen ist hierbei der starke Unterschied in der Amplifikatmenge zwischen Proben aus trächtigen und Kontroll-Tieren. Zusätzlich ist zu sehen, dass die drei Proben eines Kontrolltieres in den Spuren 14-16 die Expression eines

## Ergebnisse

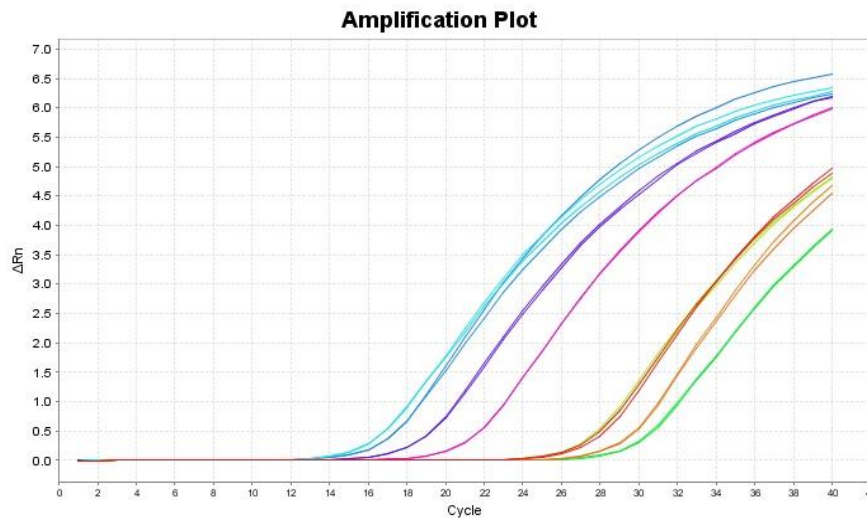
trächtigen Tieres aufweisen. Dies könnte seinen Ursprung in der Vorbereitung der Tiere haben. Die Kontroll-Tiere wurden ebenfalls besamt, jedoch nur mit dem Überstand des abzentrifugierten Spermas. Es ist somit nicht völlig auszuschließen, dass auch ein Kontroll-Tier eine Trächtigkeit aufweisen kann, wenn der Überstand nicht restlos frei von Spermien war. Aus vorangegangenen Studien mit der Affymetrix-Plattform war bereits bekannt, dass *S100A9* im Endometrium trächtiger Tiere eine ca. 450-fach höhere Expression zeigt als bei nicht trächtigen Kontrolltieren.

Insgesamt wurden 36 Proben, jeweils drei Proben pro Tier, auf ihre Expressionsprofile der Kandidatengene getestet. Drei getestete Proben eines Kontrolltieres, zeigten eine Genexpression eines trächtigen Tieres und wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Nur die Proben, die bei allen ausgesuchten Kandidatengen das erwartete Expressionsprofil in den Kontroll- wie auch trächtigen Tieren zeigten, wurden für die weitere RNA-Seq Analyse ausgewählt.

### 4.4.2 Probenauswahl Tag 12

Bei der Analyse von Tag 12 wurden alle Proben mit den vier Kandidatengen *S100A9*, *SERPINB7*, *PBD-2* und *IL24* aus Tag 14 getestet. Alle Proben wurden per Real-time RT-PCR (qPCR) auf ihre Expressionswerte hin untersucht. Die Methode der qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) und unterscheidet sich nur durch die anschließende Quantifizierung durch Fluoreszenzmessungen der produzierten DNA-Produkte während des PCR-Laufs. Für die Fluoreszenzmessung werden der Reaktion Fluoreszenzfarbstoffe zugegeben, welche in die doppelsträngige DNA interkalieren. Im Verlauf der Reaktion nimmt mit zunehmender Menge an PCR-Produkt auch die Höhe der messbaren Fluoreszenz zu. Die Gesamt-RNA wurde hierfür pro Tier über alle drei Abschnitte gepoolt und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die spezifischen Fragmente in der qPCR-Reaktion amplifiziert. Die relativen Expressionslevel wurden mit Hilfe der  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  Methode ermittelt (Livak and Schmittgen, 2001). Für die folgenden RNA-Seq-Analysen wurden nur Proben von Tieren herangezogen, die das erwartete Expressionsprofil der Kandidatengene zeigten. Als Referenzgene wurden Ubiquitin B, GADPH und LOC448984 (18S ribosomale RNA) eingesetzt, da sie sich bereits in früheren Analysen als geeignet erwiesen hatten (Bauersachs et al., 2006, Merkl et al., 2010).

## Ergebnisse



**Abbildung 13: qPCR-Analyse für das Kandidatengen S100A9**

Die Kurven in den Farben Blau, Pink und Lila zeigen die Amplifizierung von S100A9 in Proben von trächtigen Tieren und die Kurven in den Farben Grün, Gelb und Rot zeigen den Amplifikationsverlauf von S100A9 in nicht trächtigen Kontrolltieren.

In Abbildung 13 zu sehen sind die Amplifikationsprofile der qPCR-Analyse von S100A9 von 4 Proben von trächtigen Tieren und 4 Proben aus Kontrolltieren. Die Proben wurden jeweils doppelt gemessen, so dass insgesamt 16 Kurven zu sehen sind. Gut zu erkennen ist hierbei der starke Unterschied in der Höhe der ct-Werte zwischen Proben aus trächtigen und Kontroll-Tieren.

**Tabelle 13: Delta C(T)-Werte der getesteten Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 12**

	S100A9	SERPINB7	DEFB1	IL24
002-Ko	11.9	15.4	2.9	5.3
004-Ko	13.2	18.9	2.5	5.2
006-Ko	11.5	18.6	2.9	4.5
013-Ko	14.2	16.2	2.7	5.9
007-Ko	13.4	18.2	1.3	3.8
009-Ko	12	17.1	0.9	4.8
011-Ko	8.6	16.2	1.8	3.7
001-Tr	1.4	7.9	8.4	4.8
003-Tr	1.2	10.2	7.7	9.6
005-Tr	2.7	9.3	6.3	9.4
014-Tr	5.4	10	4.1	6.7
008-Tr	1.9	8.4	8	5.5
010-Tr	1	9.5	8.5	9.8
012-Tr	0.5	8.8	8.3	13.6

In Tabelle 13 sind die vier Kandidatengene und 14 getestete Tiere aufgeführt, die mit Hilfe der qPCR analysiert wurden. Es sind jeweils die erhaltenen Expressionswerte aus der Delta C(T)-Berechnung

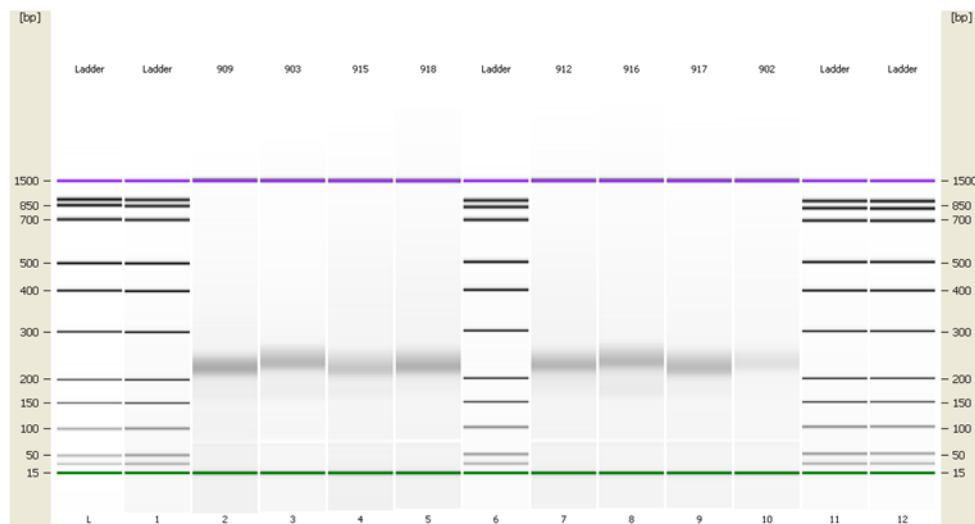


## Ergebnisse

aufgelistet. Nur die Tiere 004\_Ko, 006\_Ko, 007\_Ko und 011\_Ko sowie die Tiere 003\_Tr, 008\_Tr, 010\_Tr und 012\_Tr wurden für die RNA-Seq-Analyse weiterhin verwendet, da sie insgesamt den erwarteten Expressionswerten entsprachen.

### 4.5 Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken und Sequenzierung für Tag 14 der Trächtigkeit

Die RNA-Seq-Libraries wurden aus Proben von trächtigen Tieren (n=4) und Proben von Kontrolltieren (n=4) vorbereitet. Nach erfolgreicher cDNA-Synthese und der Ligation der spezifischen Adaptors, wurden die erhaltenen cDNA-Templates in einem Agarose-Gel aufgereinigt. Die entsprechenden Gelstücke wurden anschließend auf einer Höhe von ca. 200 Bp ausgeschnitten, die darin enthaltene DNA isoliert und durch PCR-Amplifikation angereichert. Die Konzentration und Größe der erhaltenen cDNA-Fragmente wurde mit einem Agilent DNA 1000 Chip überprüft.

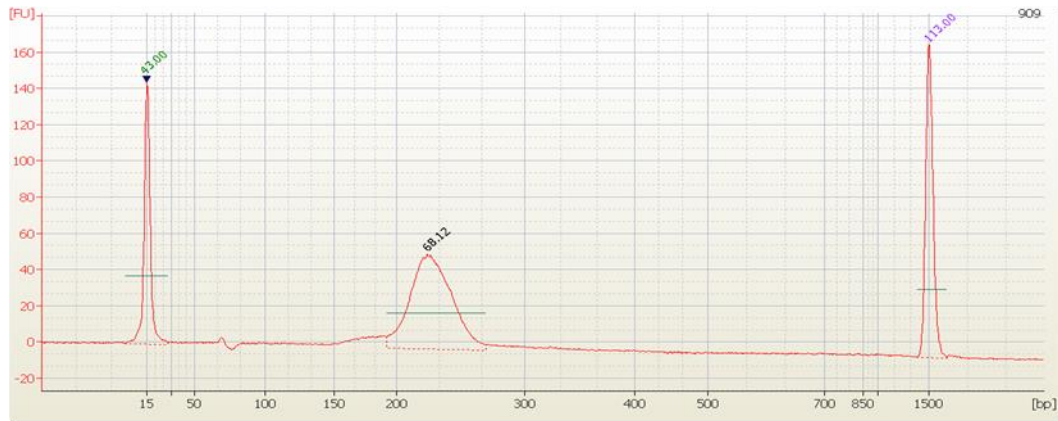


**Abbildung 14: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyzer Analyse der amplifizierten cDNA-Fragmente**

Zu sehen ist in den Spuren Ladder ist der aufgetragene Molekulargewichtsstandard. In Spuren 2-5 sind die Proben 903\_Pr, 915\_Pr, 918\_Pr und 909\_Pr (Pr = pregnant) und in den Spuren 7-10 sind die Proben 917\_Co, 902\_Co, 912\_Co und 916\_Co (Co = control) aufgetragen.

In Abbildung 14 zu sehen ist das gelähnliche Bild der Agilent DNA 1000 Chip Analyse der aus dem Agarose-Gel isolierten und angereicherten cDNA-Proben. Zu sehen sind die Proben als breite Bande mit einer Größe von ca. 200 – 250 bp. Da das Gelstück auf einer Höhe von etwa 200 bp ausgeschnitten wurde, erfüllt das Ergebnis die Erwartungen, da mit der PCR-Amplifizierung noch zusätzliche Adaptorsequenzen angefügt wurden.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: Elektropherogramm eines isolierten cDNA Amplifikates**

Zu sehen ist bei 15 bp der Peak des Lower Marker und bei 1500 bp der Peak des Upper Marker, sowie bei ca. 230 bp der Peak der aufgereinigten cDNA Amplifikates.

Anschließend wurde die Konzentration der angereicherten cDNA mit der Qbit-Methode gemessen (siehe Tab.14).

**Tabelle 14: Konzentrationen der isolierten cDNA Amplifikate**

Probe	ng/ $\mu$ l
909	8
903	7.48
915	6.28
918	7.76
902	2.74
912	7.9
917	7.4
916	8.34

Die Analysen wurden mit den Datensätzen von 917\_Co, 902\_Co, 912\_Co und 916\_Co (Co = control) sowie den Datensätzen von 903\_Pr, 915\_Pr, 918\_Pr und 909\_Pr (Pr = pregnant) durchgeführt. Jede Library wurde anschließend auf einer Lane einer single-read flow-cell analysiert. Bei diesem Lauf konnten pro analysierte Library zwischen 20 und 34 Millionen reads (76 bp single reads) generiert werden. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem FastQ-Trimmer (v.1.0.0) Programm (Blankenberg et al., 2010) vom 3'-Ende her getrimmt und mit dem FASTQ-Filter (v.1.0.0) nach einer minimalen Länge der Sequenzen von 30 Basenpaaren gefiltert (Blankenberg et al., 2010). Alle so erhaltenen Sequenzen unter einer Länge von 30 bp wurden bei diesem Schritt verworfen und flossen nicht in die weiteren Analysen ein (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Übersicht der Anzahl der Sequenzen vor und nach dem Filtern mit dem FASTQ-Filter**

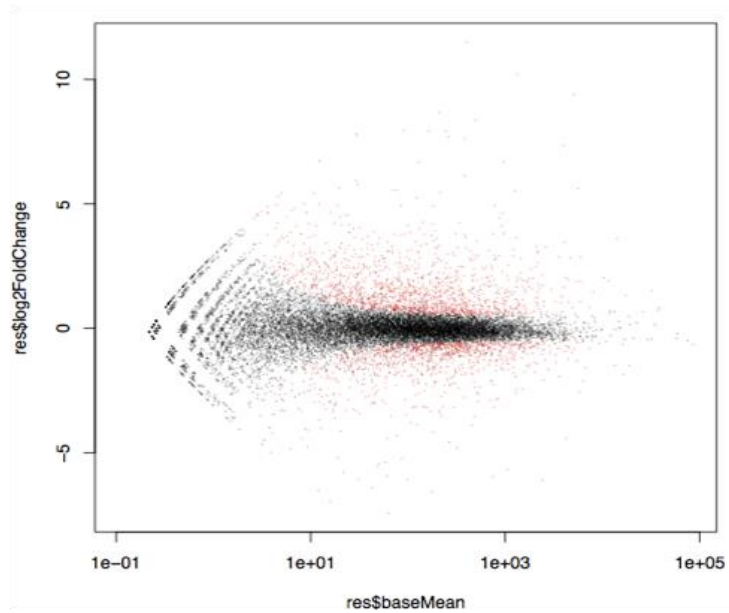
Tier	Anzahl Sequenzen vor dem Filtern	Anzahl Sequenzen nach dem Filtern
909_Pr	35860105	26445599
903_Pr	24892048	19972354
915_Pr	34902417	21790022
918_Pr	31744974	21229735
902_Co	27690231	19825753
912_Co	30230644	21959870
917_Co	33626849	22075238
916_Co	25967266	21093711

#### 4.6 Mapping der Sequenzen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene Tag 14

Anschließend wurden die generierten Sequenzen nach dem Filtern und Trimmen anhand der Qualitäts-Scores mit Hilfe von Tophat (v.1.4.0) mit dem aktuellen Genomassembly (Sscrofa 10.2, Aug 2011) aligniert. Eventuelle Transkriptvarianten konnten mit Hilfe des Cufflinks Pakets (v 1.3.0) detektiert werden und anschließend zusätzlich mit der Genannotation der NCBI-Datenbank (RefSeq-Transkripte) abgeglichen werden. Die weitere statistische Analyse zur Ermittlung der differentiell exprimierten Gene wurde mit DESeq durchgeführt. Dafür wurde im ersten Schritt die Anzahl der Reads pro Transkript berechnet. Für die statistische Auswertung wurden nur Gene verwendet, die mindestens bei drei von vier Tieren mind. 10 ihnen zugeordnete Sequenzen vorweisen konnten. Es wurden insgesamt 1467 Gene identifiziert, die eine signifikante Änderung (korrigierter P-Wert <0,01) ihrer Expression im Vergleich von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zeigen. Hierbei waren 992 Gene signifikant hochreguliert und 475 Gene runter reguliert.

Abbildung 16 zeigt einen Vulkanplot, in dem die Verteilung der signifikant differentiell exprimierten Gene graphisch dargestellt werden kann.

## Ergebnisse



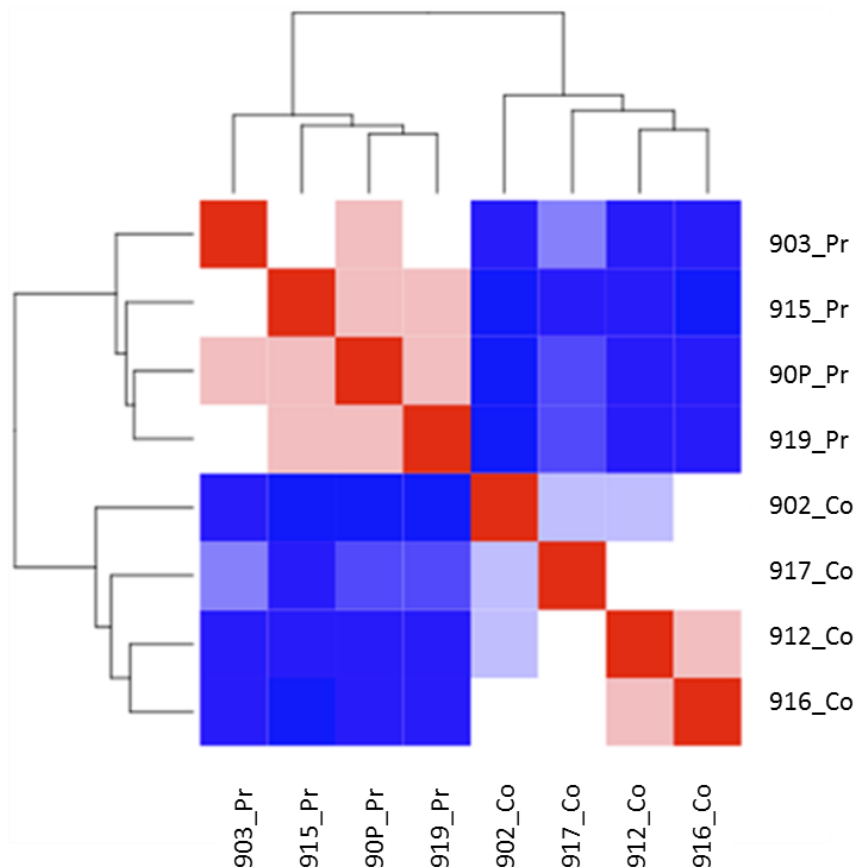
**Abbildung 16: Vulkanplot der durchschnittlichen Expression (baseMean) gegen den log<sub>2</sub>FC von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 14 der frühen Trächtigkeit**

Die Expressionsprofile der Datensätze von 917\_Co, 902\_Co, 912\_Co und 916\_Co, sowie 903\_Pr, 915\_Pr, 918\_Pr und 909\_Pr wurden mit Hilfe des DESeq-Pakets (Bioconductor) verglichen und die erhaltenen Expressionswerte als Vulkanplot dargestellt. Die schwarzen Punkte stellen Gene dar, die nicht signifikant unterschiedlich waren. Die roten Punkte stellen Gene dar, die bei einem korrigierten p-Wert von 0,01 und einem Fold Change von 2 als Schwellenwert in den trächtigen Tieren signifikant unterschiedliche Expressionswerte aufwiesen.

### 4.6.1 Hierarchisches Clustern der Expressionsprofile Tag 14

Das Programm führte zusätzlich eine paarweise Distanzberechnung der Proben durch. Hierbei werden Expressionsmuster verglichen um sie anschließend in Abhängigkeit ihrer Ähnlichkeit zu einander in sogenannte Cluster zu ordnen. Zur Berechnung der Distanz verwendet das Programm den euklidischen Abstand. Hierzu wird für jedes Gen der Abstand zwischen den zwei betrachteten Konditionen (Trächtig und Kontrolle) in einem Distanzvektor berechnet, aus diesem wird die Wurzel gezogen, um somit die Distanz zwischen den beiden Konditionen für jedes Gen zu ermitteln. Diese ermittelte Distanz über jede Probe gemessen, wird dann als Maß für die Ähnlichkeit herangezogen.

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in trächtigen und nicht trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 14 der Trächtigkeit**

Zu sehen sind die vier untersuchten trächtigen Tiere (903\_Pr, 915\_Pr, 909\_Pr, 918\_Pr) und die vier Kontrolltiere (902\_Co, 917\_Co, 912\_Co, 916\_Co). Rot zeigt hierbei die höchst mögliche Übereinstimmung der Proben. Blau deutet auf eine sehr niedrige Übereinstimmung in der Expression hin.

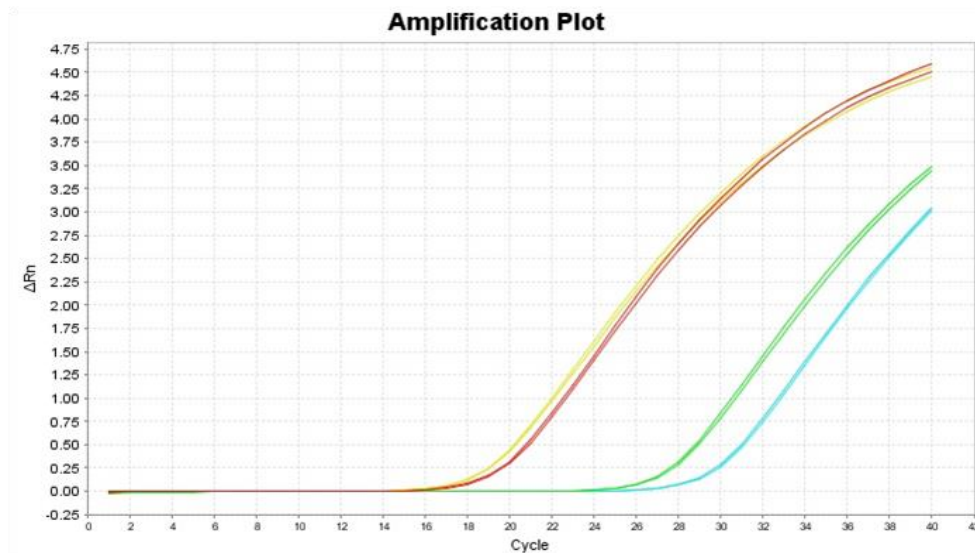
Das Ergebnis dieser Clusteranalyse ist in Abbildung 17 zu sehen. Hierbei handelt es sich um eine sog. Heatmap der Genexpression von trächtigen Tieren und Kontrolltieren. Anhand der Farbverteilung, die von Rot bis zu Dunkelblau reicht, und der Länge der Äste unter den Gruppen lässt sich das Maß der Ähnlichkeit zwischen den Gruppen ablesen. Jeder Datensatz hat mit sich selbst die größte Ähnlichkeit im Hinblick auf das Expressionsmuster. Bei einem solchen Selbstvergleich, bei dem die identischen Datensätze miteinander verglichen werden, ist die Distanz erwartungsgemäß 0; dies entspricht der Farbe Rot. Je weniger Ähnlichkeit zwei Expressionsmuster aufweisen, desto heller wird die Farbe des Quadrates ausfallen. Wie in der Clusteranalyse zu sehen, zeigen die beiden Gruppen innerhalb ihrer Gruppierung eine gleichmäßige dunkle Färbung der Quadrate, was auf eine hohe Ähnlichkeit der Expressionsmuster innerhalb der Gruppen schließen lässt. Beim Vergleich beider Gruppen miteinander zeigt sich eine deutlich hellere Blaufärbung der Quadrate, was auf große

## Ergebnisse

Unterschiede in den Expressionsmustern schließen lässt. Auch die Länge der Äste zeigt das gleiche Ergebnis. Innerhalb der zwei Gruppen sind die Verzweigungen und die Länge der Äste nur sehr kurz, was für eine große Ähnlichkeit schließen lässt. Zwischen den beiden Gruppen jedoch fallen die Abstände, also die Länge der Äste deutlich größer aus, was auf dominante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hindeutet.

### 4.7 Validierung der Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse an Tag 14 mit quantitativer Real-time RT-PCR (qPCR)

Zur Validierung der erhaltenen RNA-Seq Daten wurden einige ausgewählte Gene mittels quantitativer Real-time RT-PCR (qPCR) untersucht (siehe Abbildung 18). Für die Analyse wurden dieselben Proben wie für die RNA-Seq-Analyse verwendet. Nach Umschreiben der RNA-Proben wurde die cDNA aller drei Abschnitte pro Tier gepoolt. Ubiquitin B, GADPH und LOC 448984 (18S ribosomale RNA) wurden als Referenzgene herangezogen, da sie sich in früheren Analysen als geeignet erwiesen hatten (Merkl et al., 2010, Bauersachs et al., 2006). Die relativen Expressionslevel wurden mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Methode ermittelt (Livak and Schmittgen, 2001).



**Abbildung 18: Amplifizierungsplot der quantitativen real-time RT-PCR von S100A9**

**Die Kurven in den Farben Rot und Gelb zeigen die Amplifizierung von S100A9 in Proben von Trächtigen Tieren und die Kurven in den Farben Blau und Grün zeigen den Amplifikationsverlauf von S100A9 in nicht trächtigen Kontrolltieren.**

In Tabelle 16 sind die 18 Gene aufgeführt die mit Hilfe der qPCR validiert wurden. Die erhaltenen Expressionswerte aus der  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Berechnung wurden mit den Expressionswerten aus der RNA-Seq-Analyse verglichen (siehe Tabelle 17). Es konnte bei fast allen Genen eine sehr gute Übereinstimmung der Expression beobachtet werden. Nur bei drei Genen (CLDN11, IFITM1 und PAQR5) konnten die Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse nicht bestätigt werden.

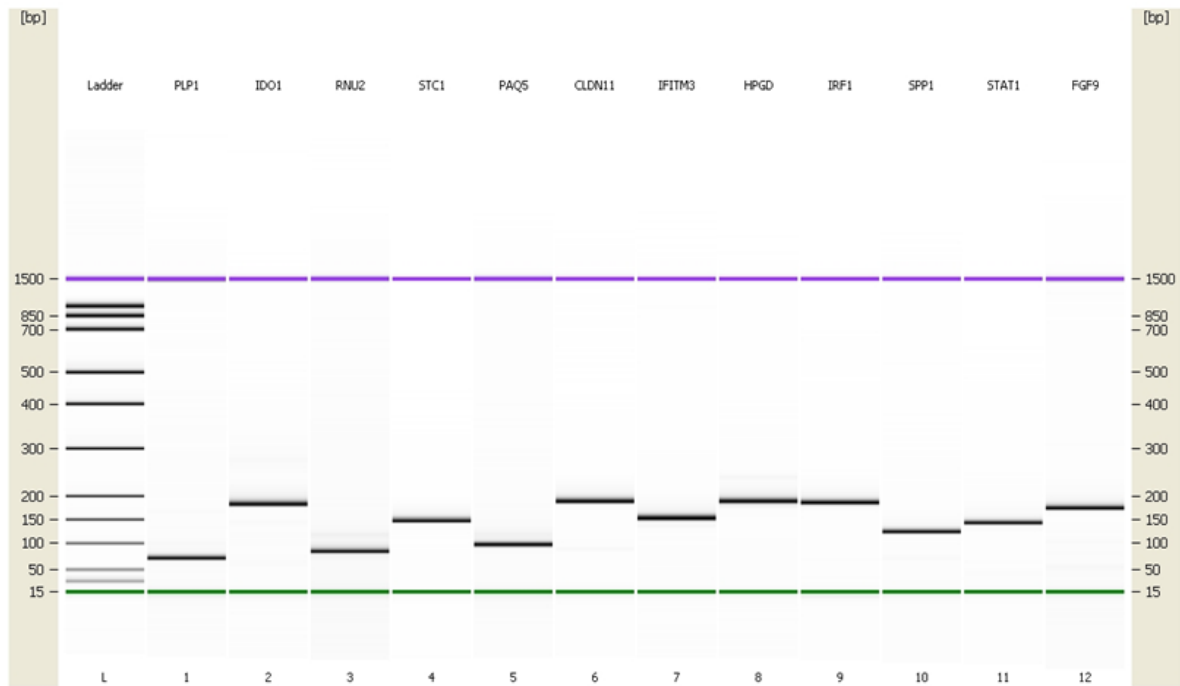
## Ergebnisse

**Tabelle 16: Mittels quantitativer Real-time RT-PCR validierte Gene**

Gene name	Gene symbol	Ensembl gene ID	Hsa Entrez gene ID	Ssc Entrez gene ID	Probe Set no.
claudin 10	CLDN10	ENSSSCG00000009500	9071	100153752	Ssc.30779.1S1_at
claudin 11	CLDN11	ENSSSCG00000011747	5010	100302016	Ssc.8335.1S1_at
EPS8-like 3	EPS8L3	ENSSSCG00000006820	79574		
fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	EPS8L3	ENSSSCG00000009278	2254	396717	Ssc.214.1S1_at
hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	FGF9	ENSSSCG00000009699	3248	100156186	Ssc.15266.1S1_at
indoleamine 2,3-dioxygenase 1	HPGD	ENSSSCG00000007007	3620	100519877	
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IDO1	ENSSSCG00000028736	8519	100127358	Ssc.11098.1S1_at
interleukin 24	IFITM1	ENSSSCG00000015655	11009		Ssc.12822.1A1_at
interferon regulatory factor 1	IL24	ENSSSCG00000014277	3659	396611	Ssc.19494.1S1_at
membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)	IRF1	ENSSSCG00000017372	4356	1005512807	
membrane progesterin receptor gamma-like	MPP3	ENSSSCG00000004968	54852	100521597	Ssc.18808.1S1_at
proteolipid protein 1	PAQR5	ENSSSCG00000012536	5354	397029	Ssc.8177.1A1_at, Ssc.8177.1A2_at
S100 calcium binding protein A9	PLP1	ENSSSCG00000006588	6280	100127489	Ssc.2381.1A1_at
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	S100A9	ENSSSCG00000004891	8710	100603190	Ssc.3693.1S1_at
secreted phosphoprotein 1	SPP1	ENSSSCG00000009216	6696	397087	Ssc.1011.1S1_at
signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa	STAT1	ENSSSCG00000016057	6772	396655	Ssc.6025.1S1_at, Ssc.6025.2.A1_at
stanniocalcin 1	STC1	ENSSSCG00000009642	6781	100125345	Ssc.15105.1S1_at, Ssc.2464.1S1_at
beta-defensin 2	PBD-2	ENSSSCG00000029990	1672	404699	Ssc.21145.1S1_at

Im Anschluss wurden die in der qPCR amplifizierten Fragmente mittels einer Mikrodialyse aufgereinigt und auf einen DNA 1000 Chip (Agilent Technologies, Germany) aufgetragen. So konnte überprüft werden, ob die in den PCR-Reaktionen eingesetzten Primer spezifisch gebunden haben oder ob es zur Bildung von zusätzlichen oder unspezifischen Fragmenten kam.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyser Analyse der qPCR Fragmente nach Mikrodialyse**

**Aufgetragen in den Spuren 2 bis 12 wurden jeweils 1µl PCR-Fragment nach der Mikrodialyse. In Spur 1 wurde 1µl des DNA Molekulargewichtstandart aufgetragen.**

Wie in Abbildung 19 zu sehen, ergab die Analyse durch den DNA 1000 Chip eindeutige Banden ohne zusätzliche unspezifische Amplifikate. Auch die Größe der Amplifikate stimmte in allen 18 Genen mit den erwarteten Produktgrößen überein.

Zur weiteren Kontrolle der erhaltenen qPCR-Fragmente wurden diese nach der Mikrodialyse sequenziert um die Richtigkeit der Sequenz der erhaltenen Amplifikate sicherstellen zu können. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus mit den bekannten Sequenzen aus GenBank verglichen. Das Maß der Übereinstimmung wurde hierbei in Prozent angegeben. Alle untersuchten 18 Gene zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den entsprechenden Sequenzen der Datenbank.

### **4.8 Vergleich RNA-Seq-Analyse mit Affymetrix-Microarray-Daten am Tag 14 der Trächtigkeit**

Durch den direkten Vergleich unseres RNA-Seq Datensatzes mit dem Datensatz einer vorangegangenen Affymetrix Analyse von Tag 14 der Trächtigkeit im Schwein, die von Ostrup et al. (Ostrup et al., 2010) durchgeführt wurde, konnten die Ergebnisse aus der Affymetrix-Analyse bestätigt bzw. die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung validiert werden.



## Ergebnisse

**Tabelle 17: Vergleich der Ergebnisse aus der qPCR Validierung, RNA-Seq und Affymetrix**

**Aufgezeigt sind die log2 FC und P-Werte der 19 Gene die per qPCR, RNA-Seq und Affymetrix untersucht wurden.**

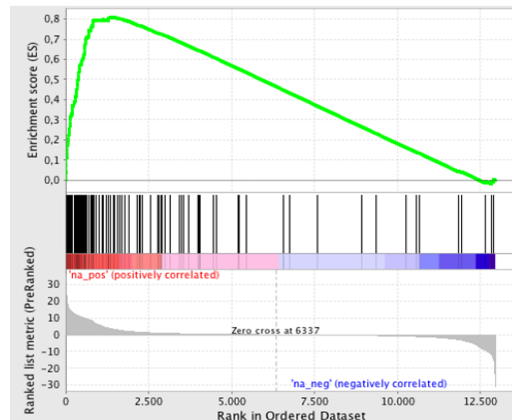
Gene name	Gene symbol	Ensembl gene ID	Hsa Entrez gene ID	Ssc Entrez gene ID	Probe Set no.	RNA Seq log2FC	P- Value RNA-Seq	qPCR log2FC	P- Value qPCR	Affymetrix log2FC	P- Value Affy
claudin 10	CLDN10	ENSSSCG00000009500	9071	100153752	Ssc.30779.1S1_at	-0,5	0,050	-0,5	0,250	-1,3	0,000
claudin 11	CLDN11	ENSSSCG00000011747	5010	100302016	Ssc.8335.1S1_at	0,4	0,150	0,2	0,490	1,8	0,010
EPS8-like 3	EPS8L3	ENSSSCG00000006820	79574			-5,0	0,000	-3,5	0,000		
fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	FGF9	ENSSSCG00000009278	2254	396717	Ssc.214.1S1_at	2,4	0,000	3,0	0,000	1,3	0,000
hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	HPGD	ENSSSCG00000009699	3248	100156186	Ssc.15266.1S1_at	-1,0	0,010	-1,2	0,000	-1,7	0,000
indoleamine 2,3-dioxygenase 1	IDO1	ENSSSCG00000007007	3620	100519877		8,4	0,000	7,4	0,000		
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	ENSSSCG00000028736	8519	100127358	Ssc.11098.1S1_at	0,4	0,110	0,3	0,620	-1,1	0,000
interleukin 24	IL24	ENSSSCG00000015655	11009		Ssc.12822.1A1_at	-7,6	0,000	-5,3	0,030	-3,7	0,000
interferon regulatory factor 1	IRF1	ENSSSCG00000014277	3659	396611	Ssc.19494.1S1_at	3,3	0,000	2,9	0,000	1,8	0,000
membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)	MPP3	ENSSSCG00000017372	4356	1005512807		-2,6	0,000	-2,0	0,070		
membrane progesterin receptor gamma-like	PAQR5	ENSSSCG00000004968	54852	100521597	Ssc.18808.1S1_at Ssc.8177.1A1_at Ssc.8177.1A2_at	0,4	0,100	0,2	0,012	1,5	0,000
proteolipid protein 1	PLP1	ENSSSCG00000012536	5354	397029		8,1	0,000	7,5	0,000	0,0	
S100 calcium binding protein A9	S100A9	ENSSSCG00000006588	6280	100127489	Ssc.2381.1A1_at	9,4	0,000	9,2	0,000	8,8	0,000
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	SERPINB7	ENSSSCG00000004891	8710	100603190	Ssc.3693.1S1_at	3,1	0,000	5,4	0,020	4,9	0,000
secreted phosphoprotein 1	SPP1	ENSSSCG00000009216	6696	397087	Ssc.1011.1S1_at	3,7	0,000	3,3	0,030	0,8	

Verglichen wurden jene Gene die nach der RNA-Seq Analyse Tag 14 der frühen Trächtigkeit auch per qPCR nochmals validiert wurden (siehe Tabelle 17). Nur eines der überprüften Gene, IFITM1, zeigte eine deutliche Abweichung in der Regulation zwischen RNASeq/qPCR und den Ergebnissen der Affymetrix Analyse. Im Affymetrix Datensatz tauchte das Gen mit negativer Regulation auf, wohingegen der RNA-Seq Datensatz eine leicht erhöhte Genexpression zeigt. Es kommen auch Gene vor, die bei der Affymetrix Analyse nicht auf dem Chip vorkamen und somit auch nicht verglichen werden konnten. Bei den restlichen Genen die auf dem Chip vorkamen, waren die Expressionsunterschiede bei vielen Genen im RNA-Seq-Datensatz stärker ausgeprägt als im Affymetrix-Datensatz (FGF9, IRF1, S100A9, SPP1 und STAT1). Bei den Genen CLDN10, CLDN11, HPGD und SERPINB7 war die Regulation jedoch im Affymetrix Datensatz stärker ausgeprägt als im Datensatz der RNA-Seq Analyse. Bei einigen wenigen Genen (IL24, PAQR5 und PBD-2) konnte eine übereinstimmende Regulation in beiden Datensätzen beobachtet werden.

Zum weiteren Vergleich der beiden Datensätze wurde auch eine Gene Set Enrichment Analyse durchgeführt. Bei der GSEA (Broad Institute, MIT, Cambridge, Massachusetts, USA) handelt es sich um ein statistisches Verfahren für eine gewichtete Genexpression zum paarweisen Vergleich von zwei Konditionen. Auch dieser Vergleich unseres Tag 14 Datensatzes mit dem Genset der hoch-regulierten

## Ergebnisse

Gene der Mikroarray-Studie Tag 14 (Abb. 20) (Ostrup et al., 2010) zeigte mit 119 als identisch identifizierten Genen mit ähnlicher Verteilung, ebenfalls eine hohe Übereinstimmung. Außerdem wurden auch noch die herunter-regulierten Gene des Affymetrix Datensatzes mit unserem Datensatz verglichen, wobei ebenfalls eine hohe Übereinstimmung mit 101 gleichen Genen mit ähnlicher Verteilung identifiziert werden konnte, vor allem im Hinblick darauf, dass der Affymetrix Datensatz insgesamt 263 differentiell exprimierte Gene aufführt.



**Abbildung 20: Enrichment plot für die in der Affymetrix-Microarray-Analyse am Tag 14 hochregulierten Gene im Vergleich mit dem Tag 14 RNA-Seq-Datensatz**

### 4.9 Gene-Ontology-Analyse Tag 14

Mit den erhaltenen differentiell exprimierten Genen aus der RNA-Seq-Analyse wurde eine funktionale Klassifikation mit Hilfe des „Functional Annotation Clustering“-Programmes der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Dennis et al., 2003) durchgeführt. Dieses Programm durchsucht verschiedene funktionale Datenbanken, ordnet so die eingespeisten differentiellen Gene Genontologie-Kategorien, Pathways, biologischen Keywords usw. zu und sucht nach überrepräsentierten Kategorien. Neben Genontologien, werden auch KEGG-Pathways, Keywords aus Proteinbanken usw. berücksichtigt. Mit Hilfe der Genontologie (GO)-Kategorien können die differentiell exprimierten Gene im Hinblick auf wichtige biologische Prozesse oder relevante funktionelle Gruppen untersucht werden, in denen sie eine Rolle spielen könnten. Die Analysen wurden in allen drei Hauptkategorien „Biologischer Prozess“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“ durchgeführt.

Für die GO-Analyse wurden die Listen der hoch- und herunter-regulierten Gene einzeln untersucht.

**Tabelle 18: GO-Analyse der hoch-regulierten Gene Tag 14**

In der linken Spalte zu sehen sind die GO-Kategorien eines Clusters. In Klammern angegeben ist die Anzahl der Gene der Kategorie und der fold enrichment score für die Kategorie. In der rechten Spalte ist der Enrichment score für den ganzen Cluster angegeben.

Functional group description	Enrichment score
defense response (111, 3.62), inflammatory response (74, 4.56)	28.51
positive regulation of immune system process (67, 5.64), activation of immune response (28, 5.97)	23.16
Glycoprotein (309, 1.62), integral to membrane (325, 1.25)	14.18
regulation of cytokine production (43, 4.76), positive regulation of cytokine production (20, 4.45)	10.39
regulation of leucocyte activation (44, 5.31), regulation of lymphocyte activation (42, 5.69), regulation of T-cell activation (34, 5.82)	8.46
chemotaxis (34, 4.26)	7.47
regulation of programmed cell death (80, 1.97)	5.45
cell adhesion (62, 1.78)	4.14
JAK-STAT cascade (10, 5.14)	2.56

Bei der Analyse der hoch-regulierten Gene zeigen sich, wie in Tabelle 18 zu sehen, GO-Kategorien wie „Positive Regulation des Immunsystems“, „Regulation der Cytokinproduktion“, „Regulation der Leukozytenproduktion“, „Regulation der T-Zell Aktivierung“ und „Regulation des programmierten Zelltodes“.

**Tabelle 19: GO-Analyse der herunter-regulierten Gene Tag 14 der frühen Trächtigkeit**

In der linken Spalte zu sehen sind die GO-Kategorien eines Clusters. In Klammern angegeben ist die Anzahl der Gene der Kategorie und der fold enrichment score für die Kategorie. In der rechten Spalte ist der Enrichment score für den ganzen Cluster angegeben.

Functional group description	Enrichment score
Glycoprotein (188, 1.86), disulfide bond (105, 1.54)	11.26
Plasma membrane (151, 1.45)	8.99
lipid biosynthetic process (25, 3.06), fatty acid biosynthetic process (10, 5.00)	4.75
steroid biosynthetic process (10, 4.65), cholesterol metabolic process (9, 3.87)	4.05
cell adhesion (37, 2.09)	3.87
response to steroid hormone stimulus (13, 2.68), response to estrogen stimulus (7, 2.64)	2.13

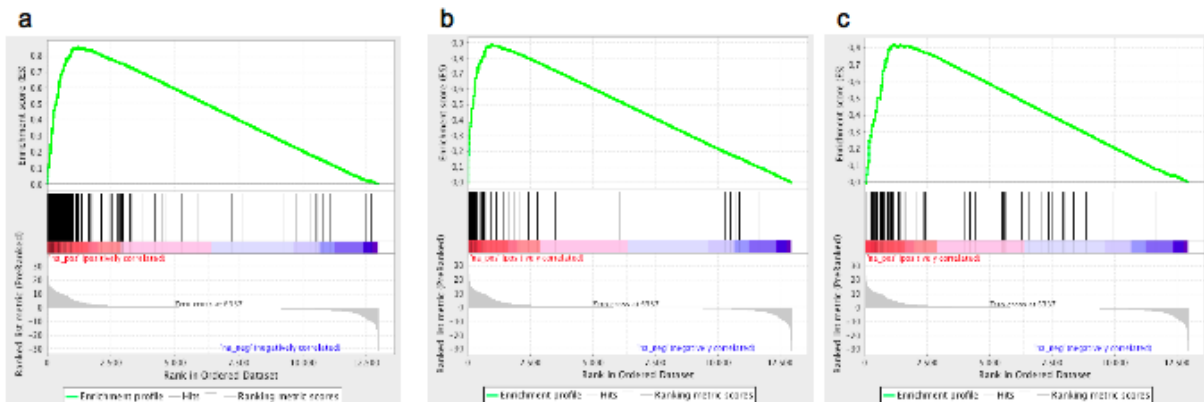
Bei der Analyse der herunter-regulierten Gene Tag 14 (siehe Tab. 19) ergab DAVID GO-Kategorien wie „Glycoprotein“, „Plasmamembran“, „Steroidbiosyntheseprozesse“ und „Cholesteroll-metabolische Prozesse“.

#### 4.10 Gene Set Enrichment Analyse Tag 14

Zur weiteren Charakterisierung der RNA-Seq Daten wurde der Datensatz mit anderen verwandten Datensätzen oder Datensätzen aus anderen Spezies mit Hilfe der Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) verglichen. Bei der GSEA (Broad Institute, MIT, Cambridge, Massachusetts, USA) handelt es sich um ein statistisches Verfahren für eine gewichtete Genexpression zum paarweisen Vergleich von zwei Konditionen. Das Programm berechnet aus dem angepassten p-Value und dem Fold change eine

## Ergebnisse

Gen-Rangliste. Im Anschluss wird aufgrund der Verteilung der Gene aus den verschiedenen Datensätzen ein sogenannter Enrichment Score berechnet. Abbildung 21 zeigt drei Beispiele von Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression in trächtigen Tieren Tag 14. Der Vergleich mit einem Datensatz hoch-regulierter Gene aus bovinem Endometrium nach Gabe von Interferon-alpha vs. Placebo-Gabe (Bauersachs et al., 2012) (Abb. 21a) zeigt eine signifikante Anreicherung der verglichenen Datensätze. Auch bei einem Vergleich unseres Datensatzes mit einem Datensatz von IFNG-induzierten Genen (Sana et al., 2005) (Abb. 21b) sowie mit einem Datensatz von IFNA-induzierten Genen (Abb. 21c) (Der et al., 1998) zeigten sich ebenfalls signifikante Anreicherungen zwischen den verglichenen Datensätzen. Beim Vergleich des Datensatzes der IFNG-induzierten Gene zeigte sich bei 57 Genen eine Anreicherung durch eine gleiche Regulierung. Der Vergleich mit dem Datensatz der Interferon-alpha induzierten Gene konnte 62 ähnlich regulierte Gene identifizieren.

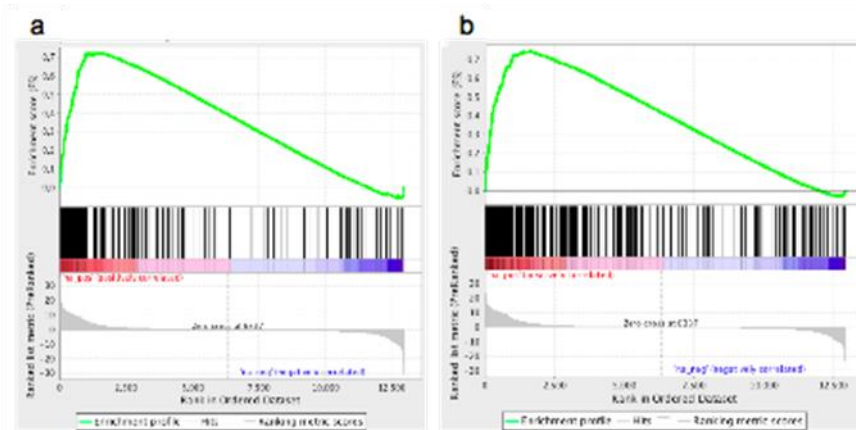


**Abbildung 21: Drei Beispiele von Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression im trächtigen Endometrium an Tag 14**

Gezeigt sind Vergleiche der Rangliste der detektierbaren Gene mit einem Datensatz hoch-regulierter Gene in bovinen Endometrium nach Gabe von Interferon-alpha vs. Placebo (Bauersachs et al., 2012) (a), mit einem Datensatz Interferon-gamma induzierter Gene (Sana et al., 2005)(b) und mit einem Datensatz Interferon-alpha induzierter Gene (Der et al. 1998)(c).

Ebenso zeigten auch Vergleiche mit Datensätzen von hoch-regulierten Genen an Tag 15 (Abb. 22a) und Tag 17 (Walker et al., 2010) (Abb. 22b) im bovinen Endometrium ähnliche Ergebnisse. Auch hier konnten sehr gute Anreicherungen bei den verglichenen Datensätzen identifiziert werden. Der Vergleich mit Tag 15 zeigte 208 übereinstimmende Gene mit gleicher Regulierung auf und bei dem Vergleich mit Tag 17 konnten bei 389 Genen eine signifikante Anreicherung identifiziert werden.

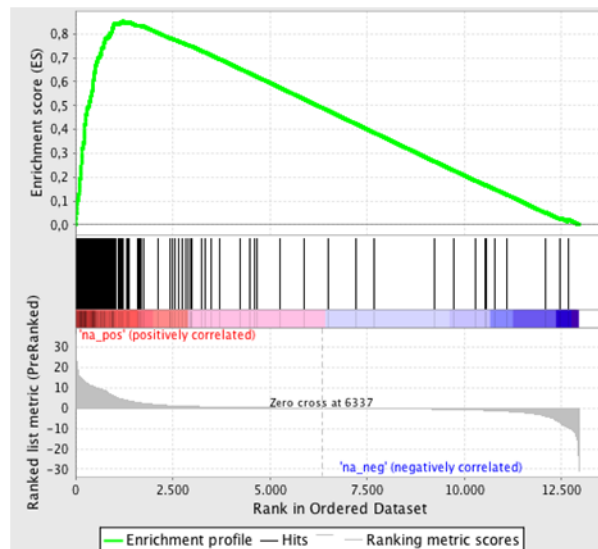
## Ergebnisse



**Abbildung 22: Zwei Beispiele von Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression in trächtigen Tieren Tag 14**

Gezeigt sind die Enrichment plots der Vergleiche unseres Datensatzes mit Datensätzen von hoch-regulierten Genen der Analyse Tag 15 im bovinen Endometrium (a) und der Analyse Tag 17 im bovinen Endometrium (Walker et al., 2010) (b).

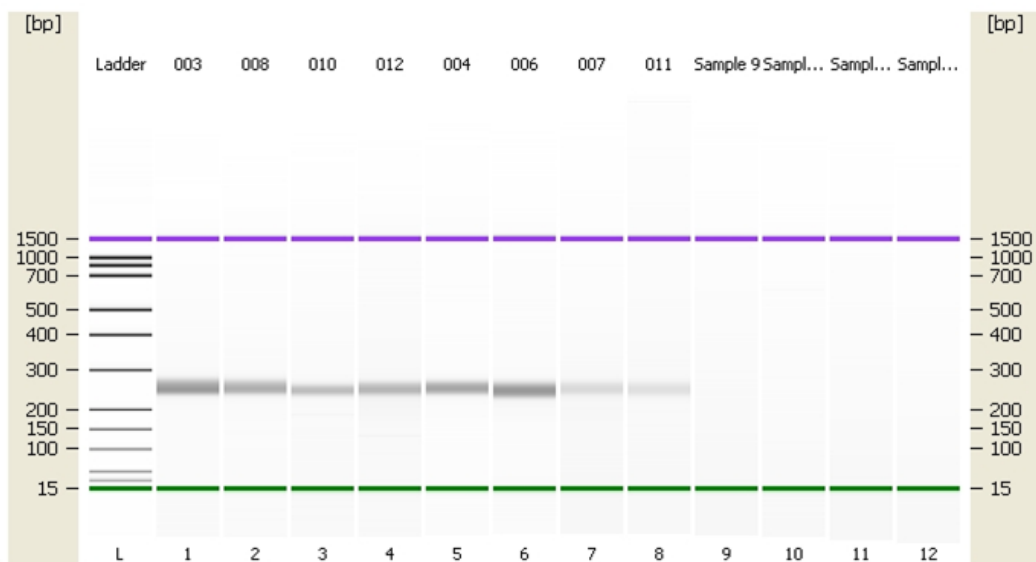
Außerdem wurde noch ein Vergleich unseres Datensatzes mit den hoch-regulierten Genen an Tag 18 im bovinen Endometrium durchgeführt (siehe Abb.23). Auch hier konnten wir mit 487 gleich regulierten Genen eine sehr hohe Ähnlichkeit beider Datensätze beobachten.



**Abbildung 23: Enrichment plot Vergleich Datensatz RNA-Seq-Analyse Tag 14 mit hoch-regulierten Genen Tag 18 im bovinen Endometrium**

#### 4.11 Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken und Sequenzierung für Tag 12 der Trächtigkeit

Die RNA-Seq-Libraries wurden aus Proben von trächtigen Tieren (n=4) und Proben von Kontrolltieren (n=4) vorbereitet. Die Analysen wurden mit den Tieren 011\_Co, 007\_Co, 004\_Co und 006\_Co (Co = control) sowie den Tieren 010\_Pr, 008\_Pr, 012\_Pr und 003\_Pr (Pr = pregnant) durchgeführt. Das fertige cDNA-Template aus der Probenvorbereitung zur Sequenzierung wurde durch Gelelektrophorese aufgereinigt, durch PCR amplifiziert anschließend aus dem Gel bei einer Größe von ca. 260 bp ausgeschnitten und aus dem Gelstück isoliert. Das Ergebnis wurde, wie in Abbildung 24 zu sehen, mit Hilfe eines Agilent DNA 1000 Chips überprüft. Die breiten Banden befanden sich, wie zu erwarten, in einer Region von ca. 260 bp Größe.



**Abbildung 24: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyzer Analyse der isolierten cDNA Templates**

Zu sehen ist in der Spur Ladder der aufgetragene Molekulargewichtsstandard. In den Spuren 1-4 sind die Proben 011\_Co, 007\_Co, 004\_Co und 006\_Co (Co = control) und in den Spuren 5-8 sind die Proben 010\_Pr, 008\_Pr, 012\_Pr und 003\_Pr (Pr = pregnant) aufgetragen.

Anschließend wurden die Konzentrationen der Proben mit Hilfe der Qbit-Messmethode bestimmt.

**Tabelle 20: Konzentrationen der isolierten cDNA Templates**

Probe	ng/ $\mu$ l
003	7.49
008	4.84
010	3.15
012	4.24
004	5.21
006	6.37
007	2.63
011	1.93

Jede Library wurde anschließend auf einer Lane einer single-read flow-cell analysiert. Es konnten bei diesem Lauf pro analysierte Library zwischen 31 und 36 Millionen Reads generiert werden. Die Sequenzen wurden anschließend, wie bereits bei Tag 14 beschrieben, gefiltert.

**Tabelle 21: Übersicht der Anzahl der Sequenzen vor und nach dem Filtern mit dem FASTQ-Filter**

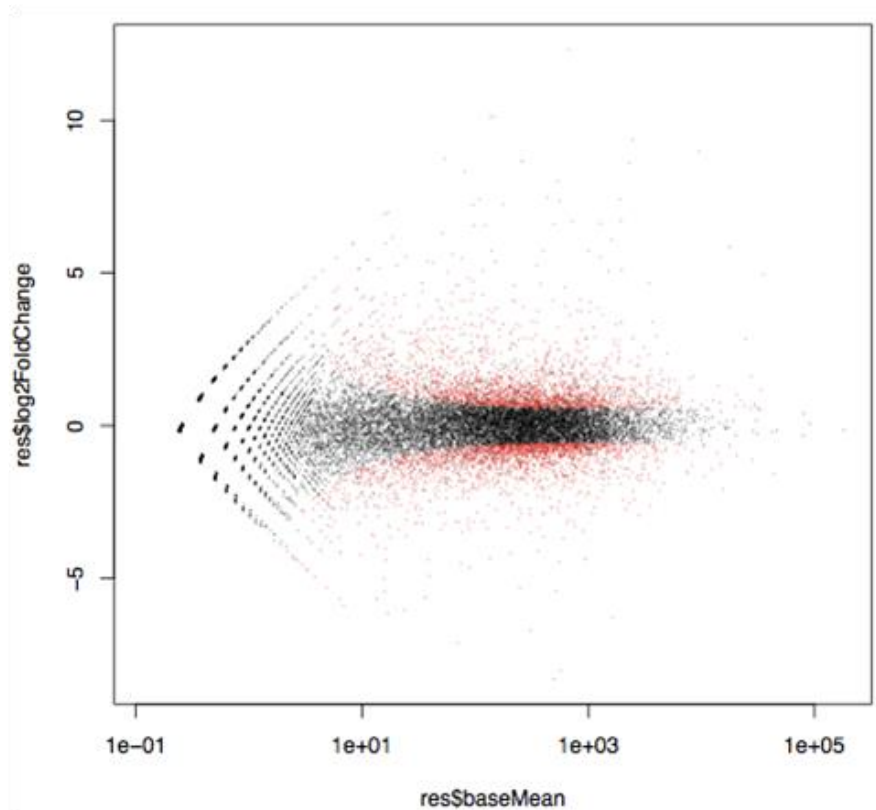
Tier	Anzahl Sequenzen vor dem Filtern	Anzahl Sequenzen nach dem Filtern
003_Pr	36375233	34630085
008_Pr	37205670	35106584
010_Pr	35046014	33111797
012_Pr	37141773	35113134
004_Co	33418166	31867966
006_Co	34198525	30277168
007_Co	33512048	32309730
011_Co	31566274	30515572

#### 4.12 Mapping der Sequenzen und Identifizierung differentiell exprimierter Gene Tag 12

Mit Hilfe von TopHat (v.1.4.0) wurden diese generierten Reads im Anschluss auf das Schweinegenom (Sscrofa 10.2, Aug 2011) gemapped. Durch Verwendung des Cufflinks-Programms (v.1.3.0) konnten eventuelle Transkriptvarianten identifiziert werden. Diese wurden anschließend zusätzlich mit der Genannotation des NCBI abgeglichen. Für die Normalisierung und statistische Auswertung der Readcount-Daten wurde DEseq verwendet. Insgesamt wurden 1945 Gene identifiziert die eine signifikante Änderung (FDR 1%) ihrer Expression im Vergleich von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zeigen. Davon war die Expression von 1044 Genen signifikant erhöht und die von 901 Gene signifikant erniedrigt.

Abbildung 25 zeigt einen Vulkanplot, in dem die Verteilung der signifikant differentiell exprimierten Gene graphisch dargestellt wird.

## Ergebnisse



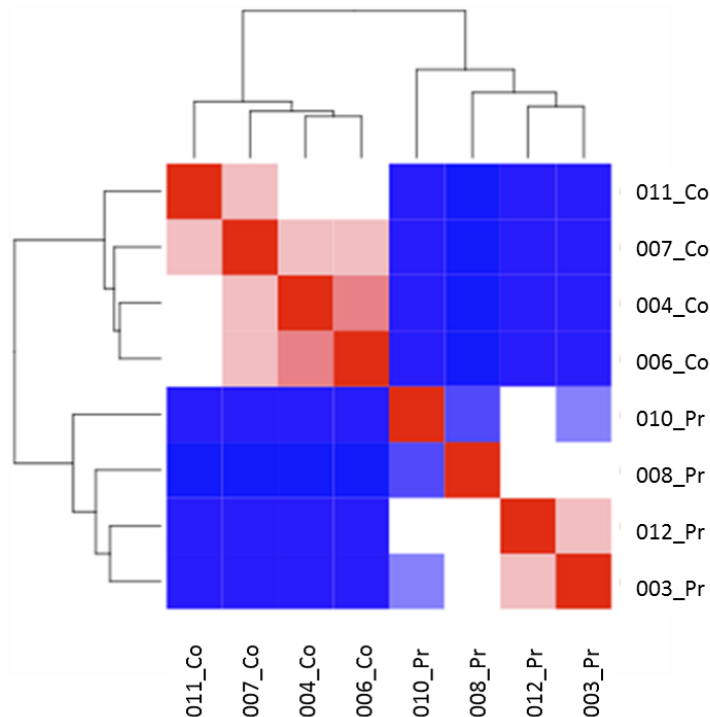
**Abbildung 25: Vulkanplot der Expressionswerte von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 12 der Trächtigkeit**

Die Expressionsprofile der Datensätze von 004\_Co, 006\_Co, 007\_Co und 011\_Co, sowie 003\_Pr, 008\_Pr, 010\_Pr und 012\_Pr wurden mit Hilfe des DESeq-Pakets (Bioconductor) verglichen und die erhaltenen Expressionswerte als Vulkanplot dargestellt. Die schwarzen Punkte stellen Gene dar, die nicht signifikant reguliert werden. Die roten Punkte stellen Gene dar, die einen p-Wert von  $\leq 0,01$  und einen Expressionsunterschied von mindestens 2-fach als Schwellenwert erfüllen.



#### 4.12.1 Hierarchisches Clustern der Expressionsprofile Tag 12

Bei der sogenannten hierarchischen Clusteranalyse (siehe Abb. 26) werden Expressionsmuster verglichen um sie anschließend in Abhängigkeit ihrer Ähnlichkeit zu einander graphisch zu ordnen.



**Abbildung 26: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 12 der frühen Trächtigkeit**

Zu sehen sind die vier untersuchten trächtigen Tiere (010\_Pr, 008\_Pr, 012\_Pr, 003\_Pr) und die vier Kontrolltiere (011\_Co, 007\_Co, 004\_Co, 006\_Co). Rot zeigt hierbei die höchst mögliche Übereinstimmung der Proben. Blau deutet auf eine sehr niedrige Übereinstimmung der Expression hin.

Die vier Expressionsprofile der trächtigen Tiere (010\_Pr, 008\_Pr, 012\_Pr, 003\_Pr) werden einer Gruppe zugeordnet, ebenso wie die vier Expressionsprofile der Kontrolltiere (011\_Co, 007\_Co, 004\_Co, 006\_Co). Das erhaltene Farbspektrum der Quadrate, ebenso wie die Längen der Äste in der Graphik lässt auf große Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen schließen. Die Farbverteilung innerhalb der Gruppen deutet auf eine hohe Übereinstimmung der Expressionsprofile hin. Die Ähnlichkeit in der Genexpression zwischen den Mitgliedern einer Gruppe ist somit sehr hoch, wohingegen die Ähnlichkeit der Genexpression im Vergleich der zwei Gruppen sehr niedrig zu sein scheint. Auch die Länge der Äste der Baumstruktur der Graphik lässt auf das gleiche Ergebnis schließen. Die Äste innerhalb der Gruppen sind sehr kurz, was für eine hohe

## Ergebnisse

Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern der Gruppe spricht. Die Äste zwischen den beiden Gruppen jedoch sind länger und deuten somit auf größere Unterschiede in der Genexpression hin.

### 4.13 Validierung Tag 12 mit quantitativer Real-time RT-PCR (qPCR)

Die erhaltenen RNA-Seq Daten wurden durch eine qPCR-Analyse einiger ausgewählte Gene untersucht. Für diese Analyse wurden dieselben Proben wie für die RNA-Seq-Analyse herangezogen. Die hergestellte cDNA wurde pro Tier für alle drei Abschnitte gepoolt. Die relativen Expressionslevel wurden mit Hilfe der  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  Methode ermittelt (Livak and Schmittgen, 2001).

**Tabelle 22: Validierte Gene mittels quantitativer real time RT-PCR**

Gene name	Gene symbol	Ensembl gene ID	Hsa Entrez gene ID	Ssc Entrez gene ID	RNASeq log2FC	P-Value RNA-Seq	qPCR log2FC	P-Value qPCR
fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	FGF9	ENSSSCG00000009278	2254	396717	2.97	0.000	3.74	0.00
interferon regulatory factor 1	IRF1	ENSSSCG00000014277	3659	396611	0.46	0.144	0.51	0.19
immunoresponsive 1 homolog (mouse)	IRG1	ENSSSCG00000009469	730249	100524951	6.50	0.000	8.04	0,00
osteocrin	OSTN	ENSSSCG00000011815	344901	100049691	9.97	0.000	12.42	0,00
S100 calcium binding protein A9	S100A9	ENSSSCG00000006588	6280	100127489	9.23	0.000	10.64	0,00
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	SERPINB7	ENSSSCG00000004891	8710	100152588	9.41	0.000	8.87	0,00
secreted phosphoprotein 1	SPP1	ENSSSCG00000009216	6696	397087	2.46	0.003	2.47	0.01
signal transducer and activator of transcription 1, 31 kDa	STAT1	ENSSSCG00000016057	6772	100738308	1.62	0.000	1.19	0.00
stanniocalcin 1	STC1	ENSSSCG00000009642	6781	100125345	3.36	0.155	2.49	0.10
brain and acute leukemia, cytoplasmic	BAALC	ENSSSCG00000006053	79870	100170128	-5.66	0,000	-5.82	0.00
cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	CDH17	ENSSSCG00000006106	1015	100157834	-7.94	0,000	-6.28	0,00
FXD domain containing ion transport regulator	FXD4	ENSSSCG00000010202	53828	100511475	-5.09	0,000	-7.50	0,00
G protein-coupled receptor 83	GPR83	ENSSSCG00000022490	10888	100513220	-7.85	0,000	-3.95	0,00
interleukin 24	IL24	ENSSSCG00000015655	11009	100621682	-2.55	0,000	-5.19	0.02

In Tabelle 22 sind die 14 Gene aufgeführt die mit Hilfe der qPCR validiert wurden. Die erhaltenen Expressionsunterschiede aus der  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  Berechnung wurden mit den Expressionsunterschieden aus der RNA-Seq Analyse verglichen. Es konnte bei allen Genen eine hohe Übereinstimmung der Expressionsunterschiede beobachtet werden.

Die Analyse durch den DNA 1000 Chip (Bioanalyzer) ergab eindeutige Banden ohne zusätzliche unspezifische Amplifikate. Auch die Größe der Amplifikate stimmte in allen 14 Genen mit den erwarteten Produktgrößen überein.

Zusätzlich bestätigte die Sequenzierung der PCR-Produkte die Spezifität der erhaltenen PCR-Fragmente.

#### 4.14 Vergleich differentiell exprimierter Gene Tag 12 und Tag 14

Bei einem direkten Vergleich der detektierten differentiell exprimierten Gene aus beiden Zeitpunkten, wurden 436 Gene identifiziert, die an Tag 12 und an Tag 14 differentiell exprimiert waren. Hierbei waren von 202 herunter-regulierten Genen in Tag 12, 17 Gene an Tag 14 hoch-reguliert, und von 234 hoch-regulierten Genen an Tag 12, 18 Gene an Tag 14 herunter-reguliert. Insgesamt zeigten also nur 35 Gene im Datensatz von Tag 14 eine gegenläufige Regulierung im Vergleich zu Tag 12.

#### 4.15 GO-Analyse Tag 12

Wie bereits bei der GO-Analyse der differentiellen Gene Tag 14 der frühen Trächtigkeit, wurden auch bei den differentiellen Genen Tag 12 die hoch-regulierten und herunter-regulierten Gene einzeln betrachtet.

**Tabelle 23: GO-Analyse der hoch-regulierten Gene Tag 12 der frühen Trächtigkeit**

In der linken Spalte zu sehen sind die GO-Kategorien eines Clusters. In Klammern angegeben ist die Anzahl der Gene der Kategorie und der fold enrichment score für die Kategorie. In der rechten Spalte ist der Enrichment score für den ganzen Cluster angegeben.

Functional group description	Enrichment score
Mitosis (48, 4.5), cell cycle process (72, 2.6), condensed chromosome (30, 4.6)	13.44
spindle organization (13, 5.9), microtubule cytoskeleton organization (21, 2.9)	4.76
Glycoprotein (259, 1.3), extracellular region part (75, 1.5)	4.14
blood vessel development (25, 2.1), angiogenesis (15, 2.1)	2.49
inflammatory response (28, 1.8), defense response (39, 1.3)	2.19
response to estrogen stimulus (11, 2.1), response to steroid hormone stimulus (16, 1.7)	2.05

Bei der Analyse der hoch-regulierten Gene zeigten sich, wie in Tabelle 23 zu sehen, GO-Kategorien wie „Mitose“, „Glykoprotein“, „Angiogenese“ und „Immunantwort“.

**Tabelle 24: GO-Analyse der herunter-regulierten Gene Tag 12 der frühen Trächtigkeit**

In der linken Spalte zu sehen sind die GO-Kategorien eines Clusters. In Klammern angegeben ist die Anzahl der Gene der Kategorie und der fold enrichment score für die Kategorie. In der rechten Spalte ist der Enrichment score für den ganzen Cluster angegeben.

Functional group description	Enrichment score
keratin filament (14, 3.9), cytoskeletal part (50, 1.3), intermediate filament (23, 3.1)	8.49
vitamin binding (14, 2.7), transaminase activity (6, 7.2)	2.24
steroid biosynthetic process (9, 2.7), lipid biosynthetic process (21, 1.7) cholesterol metabolic process (7, 2.0)	1.75
embryonic morphogenesis (16, 1.3), chordate embryonic development (19, 1.5)	1.07
Arachidonic acid metabolism (4, 1.8)	0.75
phospholipase activity (8, 2.4)	0.49

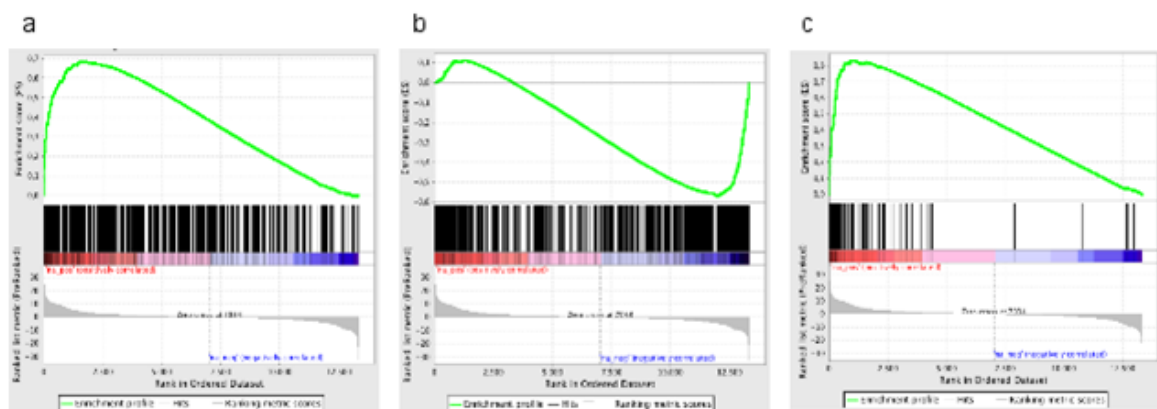
Wie in Tabelle 24 zu sehen, zeigten sich bei der Analyse der herunter-regulierten Gene GO-Kategorien wie „Keratinfilament“, „Aktivität der Transaminase“, „Prozess der Steroidbiosynthese“

und „Phospholipaseaktivität“, sowie „Morphogenese des Embryo“ und „Entwicklung Embryo Wirbeltiere“.

#### 4.16 Gene Set Enrichment Analyse Tag 12

Der Datensatz von Tag 12 der Trächtigkeit wurde mit anderen verwandten Datensätzen oder Datensätzen aus andern Spezies mit Hilfe der Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) verglichen. Hierbei handelt es sich um ein statistisches Verfahren für eine gewichtete Genexpression zum paarweisen Vergleich von zwei Konditionen.

Zuerst wurde unser Datensatz von Tag 12 mit drei Datensätzen von Untersuchungen am Schwein zum Zeitpunkt Tag 14 der Trächtigkeit verglichen, unter anderem auch mit dem zuvor besprochenen Datensatz aus dieser Arbeit. In Abbildung 27 zu sehen ist jeweils der Vergleich des Tag 12 Datensatzes mit den hoch-regulierten Genen von Tag 14 aus dieser Arbeit (a), den herunter-regulierten Genen aus dem Tag 14 Datensatz (b) und mit den hoch-regulierten Genen aus der vorangegangenen Affymetrix-Microarray-Analyse Tag 14 im Schwein (c).



**Abbildung 27: Enrichment plots Tag 12 mit drei Tag 14 Datensätzen**

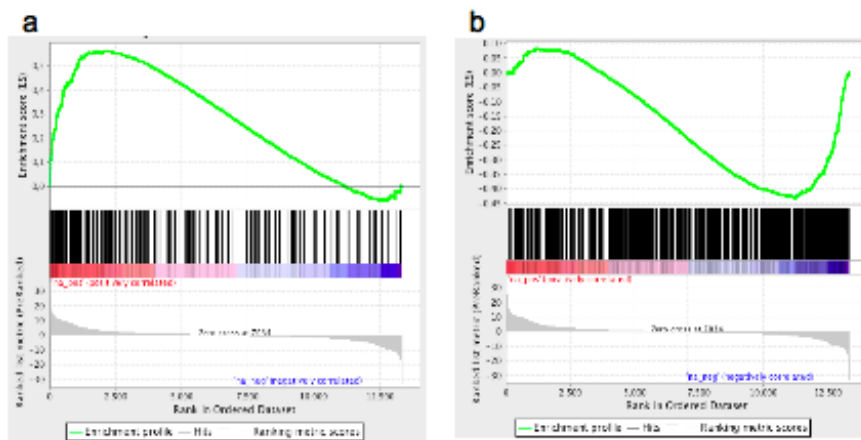
**Verglichen wurde der Datensatz von Tag 12 mit den hoch-regulierten Genen (a) und herunter-regulierten Genen (b) des RNA-Seq Datensatz Tag 14. Außerdem aufgeführt eine GSEA mit dem Datensatz der hoch-regulierten Gene aus der Affymetrix-Microarray-Analyse Tag 14 (c).**

In allen drei Vergleichen konnte eine signifikante Anreicherung der verglichenen Datensätze untereinander festgestellt werden. Der Vergleich unseres Tag 12 Datensatzes mit den hoch- wie auch herunter-regulierten Genen aus unserem Tag 14 Datensatz zeigte bei den hoch-regulierten Genen eine Anreicherung von insgesamt 735 Genen und bei dem Vergleich mit den herunter-regulierten Genen von Tag 14 von 721 Gene auf. Bei dem Vergleich mit der vorangegangenen Affymetrix-Microarray-Analyse an Tag 14 (Ostrup et al., 2010) konnten ebenfalls 120 Gene mit gleicher Regulation identifiziert werden.

Zum Vergleich und besseren Charakterisierung des Datensatzes Tag 12 wurden ebenfalls GSEA mit Datensätzen aus anderen Spezies durchgeführt. In Abbildung 28 zu sehen sind die Enrichment plots

## Ergebnisse

von Vergleichen mit einem Set hoch-regulierter Gene aus einer Agilent-Microarray-Analyse Tag 12 im Pferd und einem bovinen Illumina-Datensatz von herunter-regulierten Genen Tag 18 der Trächtigkeit.

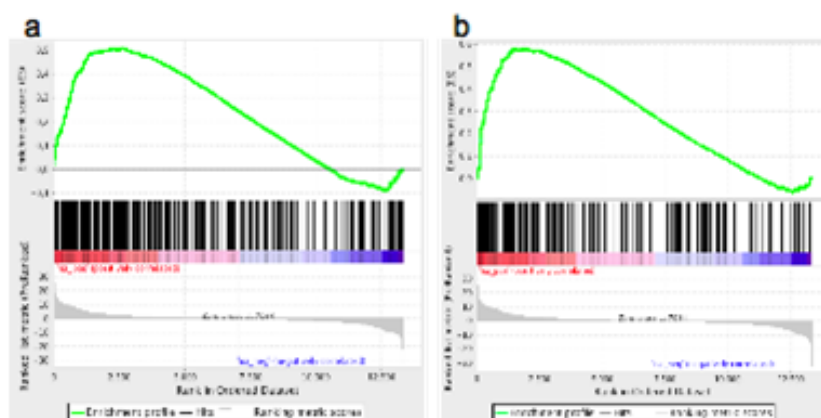


**Abbildung 28: Enrichment plots der Vergleiche mit hoch-reglierten Genen Tag 12 Pferd und herunter-regulierten Genen Tag 18 Rind der Trächtigkeit**

Zu sehen ist der Enrichment plot aus dem Vergleich des Tag 12 Datensatzes mit den hoch-regulierten Genen einer Agilent-Microarray-Analyse Tag 12 im Pferd (a) und mit den herunter-regulierten Genen aus sequenzierten Daten Tag 18 im Rind (b).

Bei diesen Vergleichen konnten jeweils signifikante Anreicherungen zwischen den Datensätzen beobachtet werden. Der Vergleich mit Pferd an Tag 12 zeigte 248 Gene mit gleicher Regulierung und der Vergleich mit den herunter-regulierten Genen an Tag 18 im Rind zeigte 734 Gene die in beiden Datensätzen zu finden sind.

Zur weiteren Analyse unseres Datensatzes zum Tag 12 wurden ebenfalls noch Vergleiche mit einem Datensatz zur Reaktion auf Östradiol nach 24h (Dutertre et al., 2010) (Abb. 29a) und einem Datensatz zur Reaktion auf ein Antigen (Goldrath et al., 2004) (Abb. 29b) durchgeführt.



**Abbildung 29: Enrichment plots der GSEA von Datensätzen zur Reaktion auf Östradiol und auf ein Antigen**

## Ergebnisse

**Zu sehen ist der Vergleich des Tag 12 Datensatzes mit den Genen aus einer Studie zur Reaktion auf Östradiol (Dutertre et al., 2010) nach 24h (a) und mit den Genen zur Reaktion auf ein Antigen (b) (Goldrath et al., 2004).**

Bei beiden Vergleichen konnten ebenfalls eine signifikante Anreicherung der Gene zwischen den verglichenen Datensätzen gefunden werden. Bei diesen Gene Set Enrichment Analysen konnten insgesamt 741 Gene mit übereinstimmender Regulation gefunden werden. Der Vergleich mit dem Datensatz einer Reaktion auf Östradiol (Dutertre et al., 2010) zeigte 457 Gene mit gleicher Regulierung auf und durch den Vergleich mit Genen einer Reaktion auf ein Antigen (Goldrath et al., 2004) konnten 284 Gene identifiziert werden.

## 5 Diskussion

Die Etablierung einer Trächtigkeit in Säugetieren erfordert meist eine Verlängerung der lutealen Lebenszeit, um somit eine anhaltende Progesteronproduktion sicher zu stellen. Progesteron ist das Schlüsselement, welches die sekretorischen Funktionen des Endometriums stimuliert und somit das Wachstum und die Implantation des Konzeptus möglich macht. Die Erkennung der Trächtigkeit durch den maternalen Organismus und die folgende Etablierung der Trächtigkeit erfordern beim Schwein ein zweiphasiges Muster der Östrogenausschüttung (Geisert et al., 1990). Der porcine Konzeptus schüttet erhöhte Mengen von Östrogenen aus an Tag 11/12 und noch einmal zwischen den Tagen 15 und 30 der Trächtigkeit. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Östradiol-17- $\beta$ . In der Zeit zwischen dem 11. und 12. Trächtigkeitstag findet eine rasante Umstrukturierung und Expansion der Trophoblastenmembran des Konzeptus statt (Geisert et al., 1982a, Stroband and Van der Lende, 1990, Yelich et al., 1997, Ross et al., 2009), gefolgt von der Implantationsphase ab Tag 13 der Trächtigkeit und der epitheliochorealen Plazentation, welche ab Tag 14 zu beobachten ist (Ross et al., 2009, Stroband and Van der Lende, 1990). Während der Elongation des Trophoblasten ist auch ein Anstieg der Östrogenausschüttung des Konzeptus zu beobachten (Stroband and Van der Lende, 1990, Ford et al., 1982). Das komplexe Zusammenspiel der Signalwirkung von Östrogen (E2) mit dem Prostaglandin (PG)-Metabolismus führt schließlich zu einer Unterbindung der Luteolyse (Bazer and Thatcher, 1977, Waclawik et al., 2009a). Es konnte schon gezeigt werden, dass eine Hemmung der Prostaglandinsynthese vor der Implantation in verschiedenen Spezies, wie auch beim Schwein, das Ausbleiben einer Trächtigkeit nach sich ziehen kann (Kennedy et al., 2007). Bevor eine Implantation stattfinden kann, synthetisieren der Trophoblast ebenso wie das Endometrium erhöhte Mengen an Prostaglandin E2 (PGE2).

Dieser Vorgang der funktionalen Umstrukturierungen des Endometriums während der Implantation wird begleitet von umfangreichen Gewebeumstrukturierungen und gefolgt von erhöhten Vaskularisierung an den Implantationsstellen (Reynolds et al., 2005a).

### 5.1 Differentielle Genexpression an Tag 14 der Trächtigkeit

In dieser Studie, in der Endometriumproben aus trächtigen und nicht-trächtigen Kontrollsaugen verglichen wurden, konnten 1467 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Die mRNA-Konzentration im Endometrium in trächtigen Tieren an Tag 14 war für 992 Gene signifikant höher und für 475 Gene signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Proben von Tag 14 wurden zuerst untersucht, da bereits eine Studie zur frühen Trächtigkeit im Schwein an Tag 14 mit der Affymetrix-Microarray-Technologie (Ostrup et al., 2010) vorlag. Somit war es möglich die RNA-Seq-Methode mit einer zusätzlichen Möglichkeit der Validierung, durch Vergleiche des neuen RNA-Seq-Datensatzes mit dem Affymetrix-Datensatz zu etablieren.

### 5.1.1 Vergleich der Datensätze aus RNA-Seq Tag 14 und Affymetrix Tag 14

Der Vergleich des Datensatzes aus der RNA-Seq-Analyse und der Affymetrix-Analyse zum Zeitpunkt Tag 14 (Ostrup et al., 2010) zeigte eine hohe Übereinstimmung der Datensätze, nicht nur bei den Genen mit erhöhten Expressionswerten, sondern auch bei Genen mit niedrigeren Expressionswerten in trächtigen Tieren. So war es möglich, die Ergebnisse unserer Studie durch die bereits existierenden Daten aus der Affymetrix-Microarray-Studie und durch Real-time RT-PCR-Analysen (qPCR) zu untermauern. Vier Gene, CLDN10, CLDN11, PAQR5 und IFITM1, die in beiden Datensätzen in ihrer Regulation nicht übereinstimmten, wurden anhand der GSEA ausgesucht und per qPCR validiert. Die Daten aus der Affymetrix-Analyse zeigten bei allen Genen eine stärkere Regulation im Vergleich zu den generierten Daten der RNA-Seq-Analyse mit signifikanten Unterschieden bei der Mikroarray-Analyse aber nicht bei RNA-Seq. Das Ergebnis der RNA-Sequenzierung konnte durch die qPCR bestätigt werden. Bei IFITM1 zeigte sich sogar eine komplett gegenteilige Regulierung. Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass es mehrere Gene gibt, welche IFITM1 sehr ähnlich bzw. nahezu identisch sind. Durch die Lage der Primer und die Lage der Affymetrix Probe sets wurde durch die qPCR die Expression zweier Gene und bei der Mikroarray-Analyse sogar die Expression von vier Genen nachgewiesen. Die zur Auswertung der RNA-Seq-Daten verwendete Annotation enthielt ebenfalls zwei IFITM1-Gene entsprechend den qPCR-Primern. Damit ist für dieses Gen letztendlich kein Vergleich der Daten möglich.

Im Fall der drei Gene CLDN10, CLDN11 und PAQR5 zeigt sich stets im Datensatz der Affymetrix-Analyse eine leicht verstärkte Expression im Vergleich zu den RNA-Seq- und qPCR-Daten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Affymetrix probe sets nicht ein ganzes Gen abdecken, sondern nur einen Teil davon. Im Gegensatz dazu wurde bei der Auswertung der RNA-Seq-Daten der log<sub>2</sub>FC auf der Basis der Menge an zugeordneten Sequenzen über die gesamte Länge des Gens berechnet, inklusive der möglichen Isoformen. Aus diesem Grund können die Ergebnisse zwischen den beiden Methoden leicht variieren. Die Betrachtung der zugeordneten Reads im Integrated Genome Viewer (IGV) zeigte jedoch keine deutlichen Unterschiede der Read-Coverage in den Bereichen der Affymetrix Probe Sets zwischen trächtigen und Kontrollproben. Im Falle der qPCR könnte ein Grund die Lage der Primer sein, da diese nicht immer in der gleichen Region des Gens lokalisiert sind wie die Affymetrix probe sets. Auch dies würde eine leichte Abweichung zwischen den Ergebnissen dieser beiden Methoden erklären. Außerdem ist eine Schwankung der Daten aufgrund der untersuchten Tiere ebenfalls möglich. Auch bei einem stark standardisierten Protokoll ist nicht auszuschließen, dass solch komplexe biologische Prozesse, die auf so vielen verschiedenen Ebenen und durch so viele verschiedene Faktoren reguliert werden, von Tier zu Tier auch leichte Schwankungen aufweisen. Hierbei könnte auch das Alter der beprobten Tiere eine Rolle spielen. Bei der vorangegangenen Affymetrix-Studie waren die Versuchstiere keine Jungsauen mehr, sondern schon erwachsene Tiere die teilweise schon einmal trächtig waren (Ostrup et al., 2010). Dies könnte ebenfalls einen Einfluss



auf die Genexpression bei den trächtigen und auch bei den zyklischen Kontrolltieren und somit die erhaltenen Ergebnisse haben.

### 5.1.2 Gene Set Enrichment Analyse Tag 14

Mit Hilfe der durchgeführten Gene Set Enrichment Analysen konnte unser Datensatz mit verwandten Datensätzen verglichen und somit aufgrund der Übereinstimmungen besser charakterisiert werden. Eine hohe Übereinstimmung brachte der Vergleich mit drei Datensätzen, zum einen der Vergleich mit den hochregulierten Genen aus einem bovinen Datensatz nach Gabe von Interferon-alpha vs. Placebo (Bauersachs et al., 2012), einem Datensatz Interferon-gamma induzierter Gene (Sana et al., 2005), ebenso wie mit einem Datensatz Interferon-alpha induzierter Gene (Der et al., 1998).

Bei einem Vergleich unseres Datensatzes und Genen, die im bovinen Endometrium am Tag 18 der Trächtigkeit im Vergleich zum Tag 18 des Zyklus als hochreguliert gefunden wurden (Bauersachs et al., 2006) konnten wir eine starke Anreicherung in Richtung der Gene mit erhöhter Expression in trächtigen Tieren beobachten. Außerdem wurden noch Analysen mit bovinen Datensätzen aus Tag 15 und Tag 17 (Walker et al., 2010) durchgeführt.

Die hohe Übereinstimmung der Vergleiche unseres Datensatzes mit Datensätzen aus bovinen Studien deutet auf ähnliche Mechanismen bei der Etablierung einer Trächtigkeit und der Implantation im Schwein wie auch im Rind hin. Den Hauptteil der übereinstimmenden Gene stellen die Interferon-stimulierten-Gene (ISGs) dar. Es ist bekannt, dass die Expression von ISGs zu bestimmten Phasen der Trächtigkeit in diversen Spezies, wie z.B. verschiedenen Haustieren, Nagetieren, Primaten, einschließlich des Menschen, erhöht ist.

Bei den hier durchgeführten Vergleichen konnten klassische ISG's wie z.B. IFIT1, STAT1, IRF1, IRF2 und B2M identifiziert werden (Spencer et al., 2008, Bazer et al., 2009b). In Wiederkäuern, wie z.B. Schaf, Kuh und Ziege, sind die benötigten Faktoren für die Erkennung der Trächtigkeit ebenso wie für die Erhaltung des CL interferon-tau (IFN- $\tau$ ) induziert (Bazer et al., 2008). Das Trophektoderm des Schweinekonzeptus sezerniert beide Typen von Interferonen, Typ I wie auch Typ II Interferone, während der Elongationsphase zwischen Tag 14 und Tag 20 der Trächtigkeit (Cencic et al., 2003). Die Produktion von Typ I und/oder Typ II Interferonen in der Präimplantationsphase und die nachfolgende Induktion der ISG's im Uterus stellt eine Gemeinsamkeit zwischen Haustieren, Nagetieren und Primaten dar (Spencer et al., 2008). Interferone scheinen in Wiederkäuern, Nagetieren, Primaten und Schweinen einen Effekt auf das Wachstum und die Entwicklung der Plazenta, ebenso wie auf die Empfänglichkeit des Uterus für den Konzeptus zu haben (Bazer et al., 2008, Bazer et al., 2009a), wobei IFN- $\tau$  nur in Wiederkäuern und Interferon-delta (IFN- $\delta$ ) nur in Schweinen (Cencic et al., 2003) und Pferden (Murphy et al., 2009) vorzukommen scheint.

Ebenfalls untersucht wurde die Übereinstimmung der Gene bei drei weiteren Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression. Es wurde ebenfalls mit dem vorangegangenen Affymetrix-Datensatz (Ostrup et al., 2010) eine Gene Set Enrichment Analyse

durchgeführt, wobei mit 119 Genen mit gleicher Regulierung eine hohe Übereinstimmung beobachtet werden konnte und somit der neue Datensatz der RNA-Seq-Analyse bestätigt werden konnte.

### 5.1.3 GO-Analyse

Zur Bestimmung wichtiger funktioneller Gruppen wie auch bedeutender biologischer Prozesse wurde eine Genontologie Analyse (GO-Analyse) durchgeführt. Bei der Analyse der Gene mit erhöhter Expressionsrate konnten diese überwiegend zu Genontologien wie „Immunabwehr“ oder „Aktivierung einer Immunantwort“ zugeordnet werden. Durch diverse Studien ist bereits bekannt, dass bei verschiedenen Vorgängen wie dem Wachstum des Konzeptus, der Implantation oder der Etablierung einer Trächtigkeit eine erhebliche Menge an Entzündungsmediatoren beteiligt ist (Waclawik, Croy et al., 2009). Der Konzeptus (Delta-Interferone) wie auch das Endometrium (IFNG) produzieren Interferone (IFN's) und es ist denkbar, dass Interferon gamma (IFNG) eine fundamentale Rolle in der Regulation des mütterlichen Immunsystems, wie auch der Angiogenese des Endometriums, spielt (Murphy et al., 2009). Ein weiterer Genontologie-Begriff, welcher bei dieser Analyse ebenfalls eine Rolle spielt, ist „Glykoprotein“. Als wichtige integrale Membranproteine haben Glykoproteine eine wichtige Aufgabe bei der Zell-Zell-Interaktion (Zheng et al., 2007, Vanarsdall et al., 2008). Glykoproteine spielen auch noch an anderen Stellen, wie z.B. des Immunsystems eine Rolle. Als ein Teil des „major histocompatibility complex (MHC)“ besitzen sie ebenfalls die Fähigkeit mit T-Zellen zu interagieren (Kajikawa et al., 2006).

Gene die in Genontologien wie z.B. „Regulation der Cytokinproduktion“ vorkommen, sind vor allem wichtig für die interzelluläre Kommunikation. Im Menschen wie auch bei anderen Säugetieren stellen Cytokine vor allem Zellsignal-Proteine dar. Außerdem spielen Cytokine während der Embryogenese eine wichtige Rolle in verschiedenen Vorgängen der Entwicklung. Durch Modulationen des Immunsystems wie auch des endokrinen Systems wirken die Cytokine z.B. bei der Implantation des Embryos, der Entwicklung des Endometriums und dem Wachstum des Trophoblasten mit (Saito, 2001). Ebenfalls ist bekannt, dass Cytokine eine starke Korrelation zwischen dem Embryo und dem Endometrium fördern. Eine erfolgreich aufrecht erhaltene Trächtigkeit stellt ein Ergebnis dieser engen Interaktion dar (Segeber et al., 2009).

Bei der Signalübermittlung erfüllen die Integrine als Rezeptoren der Zelloberfläche eine wichtige Aufgabe. Sie machen die Anheftung zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix möglich. Sie leiten Information aus der ECM in die Zelle weiter und spielen ebenfalls in vielen Zellsignalprozessen, bei der Regulation des Zellzyklus, der Implantation und der Embryogenese eine wichtige Rolle (Tokyol et al., 2008, Humphries, 2000). Aus diesem Grund scheinen Gene die im „Integrin-gesteuerten Signalweg“ eine Rolle spielen, einen starken Effekt auf die Implantation des Konzeptus zu haben, da die Etablierung einer Trächtigkeit immer von der Interaktion zwischen dem Konzeptus und dem

Endometrium abhängt. Im Menschen scheint ein Polymorphismus in der beta-3-Untereinheit von Integrinen sogar eine Rolle bei Fehlgeburten zu spielen (Ivanov et al., 2012).

Bei den Genen mit niedrigeren Expressionsraten in trächtigen Tieren konnten Genontologien wie „Steroidbiosynthese“ mit 10 identifizierten Genen (z.B. IDI1, HMGCS1 und LSS) und „Lipidbiosynthese“ mit 16 identifizierten Genen (z.B. SCD, FASN und LSS) identifiziert werden, die für wichtige biologische Prozesse bei der Trächtigkeit stehen. Zu den Steroiden gehören auch Sexualhormone wie Östrogen, Progesteron und Testosteron (Wiesak, 1989). Das vom Konzeptus ausgeschüttete Östrogen stellt das Hauptsignal zur Erkennung einer Trächtigkeit dar und wird in großen Mengen hauptsächlich zwischen dem 14 und 18 Trächtigkeitstag produziert (Geisert et al., 1990). Progesteron hingegen wird hauptsächlich vom Gelbkörper gebildet und fördert die Aufrechterhaltung der frühen Trächtigkeit (Wiesak, 1989).

### **5.1.4 Ausgewählte differentiell exprimierte Gene und ihre mögliche Funktion**

#### *Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (FGF9, FGFR2, FGFR3)*

Wachstumsfaktoren übernehmen eine wichtige Rolle in der Embryo-maternalen Kommunikation ebenso wie in der Entwicklung des frühen Konzeptus. Die Expression des Wachstumsfaktors FGF9 war in unserer Studie in trächtigen Tieren signifikant erhöht. Im humanen Endometrium ist FGF9 bereits vor längerer Zeit als interessanter Wachstumsfaktor aufgefallen. Jedoch ist zu beachten, dass die Lokalisation der Expression im Endometrium beim Schwein eine andere ist als im Menschen (Tsai et al., 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Schwein die stärkste Expression von FGF9 im apikalen Bereich der glandulären Epithelzellen zu finden ist (Ostrup et al., 2010), wohingegen die humanen glandulären Epithelzellen das Gen nur in sehr niedrigen Mengen exprimieren (Tsai et al., 2002). Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Typen der Implantation sein. Beim Schwein liegt, im Gegensatz zum Menschen und anderen Säugern, eine sogenannte nicht-invasive Form der Plazentation vor, bei der der Trophoblast nicht in das maternale Gewebe des Uterus eindringt, sondern nur vom Endometrium ausgebildete Ausbuchtungen umschließt (Wildman et al., 2006, Carter and Enders, 2004). Somit bleibt beim Schwein das endometriale Gewebe intakt und könnte aus diesem Grund während der Implantation in den glandulären Epithelzellen größere Mengen FGF9 exprimieren. Weiterhin ist bereits bekannt, dass FGF9 mit sehr hoher Affinität seine beiden Rezeptoren (FGFR2 und FGFR3) bindet, dabei jedoch nicht die Zellproliferation im humanen Endometrium zu beeinflussen scheint (Hecht et al., 1995). Obwohl der Rezeptor FGFR2, der in unserer Studie leicht herunter-reguliert ist, jedoch mit einem  $\log_2FC$  von -0,39 (p-Wert 0,153) nicht signifikant war, in den Epithelzellen lokalisiert ist, scheint FGF9 eine höhere Affinität zu seinem anderen Rezeptor FGFR3 zu haben (Tsai et al., 2002). Die in Østrup et al. gefundene niedrigere Expression von FGFR3 in trächtigen Tieren konnte in der RNA-Seq-Analyse bestätigt werden (Ostrup et al., 2010). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es noch andere Faktoren und Regulationsmechanismen der Proliferation der Epithelzellen des Endometriums (Sherwin et al.,

2004)) geben muss als FGF9. Es wurde bereits in anderen Arbeiten diskutiert, ob FGF9 nicht auch ein endokriner Regulator sein könnte (Revest et al., 2000, Miyakawa et al., 1999). Es wird postuliert, dass die erhöhte Expression von FGF9 daher eher eine Wirkung auf die Embryo-maternale Kommunikation hat, als direkte Effekte auf die Geschehnisse im Endometrium selbst (Ostrup et al., 2010).

### *STAT 1 (signal transducer and activator of transcription factor 1)*

Es war bereits bekannt, dass die Expression von STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), ein Gen mit höheren Expressionswerten in trächtigen Tieren, von Interferonen stimuliert wird (Choi et al., 2007). Im Gegensatz zum Schwein, bei dem das Erkennungssignal der Trächtigkeit das vom Embryo ausgeschüttete Östrogen ist, bildet in den meisten Wiederkäuern ein Typ I-Interferon (Interferon  $\tau$ ) das Hauptsignal für die maternale Erkennung der Trächtigkeit (Joyce et al., 2005). Die Interferone, IFN-  $\delta$  und IFN- $\gamma$ , die beim Schwein vom Konzeptus synthetisiert werden, wirken nicht antiluteolytisch. Es wurde festgestellt, dass im Falle des Östrogens die Ausschüttung durch den Konzeptus mit dem Anstieg der Expression von STAT1 im Endometrium der Trächtigkeit korreliert. Durch Zugabe von Östrogen bei zyklischen Tieren konnte dann ebenfalls ein Anstieg der STAT1-Expression beobachtet werden (Joyce et al., 2007a). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass die Ausschüttung der Interferone delta und gamma durch den Konzeptus ebenfalls mit einem Anstieg der Expressionsrate von STAT1 korreliert (Joyce et al., 2007a). Bei einer gleichzeitigen Gabe von Östrogen und den beiden Interferonen, IFN-  $\delta$  und IFN- $\gamma$ , bei zyklischen Tieren zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg von STAT1 im Endometrium. Somit scheint es eher so, als würde die uterine Expression von STAT1 durch zwei Faktoren gesteigert, zum einen von Östrogen und zum anderen von zwei Interferonen, Interferon  $\delta$  und Interferon  $\gamma$  (Joyce et al., 2007a). Das vom Konzeptus sezernierte Östrogen steigert die Expression von STAT1 in der Epithelschicht und spielt damit eine Rolle bei der Erkennung der Trächtigkeit und den folgenden strukturellen Veränderungen der endometrialen Epithelschicht als Vorbereitung für die Anheftung des Konzeptus, während die beiden vom Konzeptus ausgeschütteten Interferone die Expression von STAT1 im darunter liegenden uterinen Stroma erhöhen und somit einen Beitrag zur Umgestaltung der Gebärmutterwand leisten. Dies gewährleistet eine maximale Durchblutung des Gewebes für den sich entwickelnden Konzeptus (Joyce et al., 2007a). Die Anheftung eines Konzeptus an das Endometrium zieht immer eine erhöhte Expressionsrate von STAT1 im uterinen Milieu nach sich. Diese Beobachtung und der Umstand, dass STAT1 ebenfalls in den trächtigen Proben Tag 12 hoch-reguliert ist, lässt darauf schließen, dass STAT1 durch das vom Konzeptus ausgeschüttete Östrogen und die Interferone parakrin reguliert sein könnte (Joyce et al., 2007a). Die gesteigerte Expression von STAT1 hat grundsätzlich zur Folge, dass Gene aktiviert werden, die hauptsächlich antiproliferative, pro-apoptotische und entzündungsfördernde Funktionen haben. Damit beeinflusst STAT1 die Umstrukturierung des Endometriums hinsichtlich der folgenden Implantation und Plazentation maßgeblich (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

### *SPP1 (secreted phosphoprotein 1)*

Die Expression von uterinem SPP1 ist der Expression von STAT1 sehr ähnlich. In unserer Studie waren die Expressionswerte von SPP1 bei Tag 12 wie auch Tag 14 erhöht. Bei SPP1 (secreted phosphoprotein 1), auch als Osteopontin bekannt, handelt es sich um ein durch Östrogen induziertes extrazelluläres Matrixprotein (White et al., 2005). Das Protein besitzt eine Arg-Gly-Arg Sequenz (RGD-Motiv). Dieses Motiv wird zur Bindung an Integrinrezeptoren auf Zelloberflächen benötigt. Durch dieses Merkmal besitzt das Protein die Fähigkeit an Integrinrezeptoren zu binden und Proteine des Cytoskeletts zu aktivieren, um so fokale Adhäsionen zu formen (Erikson et al., 2009). SPP1 scheint ein wichtiger Faktor für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit zu sein (Johnson et al., 2003) und wurde in aktuellen Studien beim Menschen und beim Schwein als hochreguliert im Endometrium während des sog. „Window of implantation“ bzw. während der Implantation gefunden (Carson, 2002, Garlow et al., 2002). Weiterführend ist ebenfalls bekannt, dass SPP1 die trophectodermale Zelladhäsion und Migration stimuliert, jedoch nicht dessen Proliferation. Somit treibt es die Elongation des Konzeptus und dessen Anheftung an das Endometrium an (White et al., 2005).

Aus diesem Grund ist es denkbar, dass der Einfluss des embryonalen Östrogens auf die Areale der Anheftung oder jene nahe des Konzeptus begrenzt ist als Folge der trophectodermalen Sulfatase. Das Endometrium des Schweins ist in der Lage, Östradiol in die inaktive Form Östronsulfat umzuwandeln. Die Konzentration dieser inaktiven Form ist in den Uteri von trächtigen Tieren immer hoch (Flood, 1974). Durch die Sulfatase des Trophectoderms ist es möglich, die aktive Form des Östrogens wieder herzustellen und so eine lokal begrenzte Wirkung auf das Endometrium auszuüben und die Expression von STAT1 und SPP1 zu steigern (Joyce et al., 2007b). Dies untermauert unsere Studie, in der bei STAT1 und SPP1 ebenfalls eine gesteigerte Expressionsrate in trächtigen Tieren nachgewiesen werden konnte.

### *IRF1 (interferon regulatory factor 1)*

IRF 1, ein Gen welches in dieser Studie ebenfalls eine erhöhte Expressionsrate im Endometrium von trächtigen Jungsauen zeigte, spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von vielen bekannten Interferon-stimulierten Genen (ISG, interferon-stimulated genes). Es ist bekannt dafür, sogenannte „IFN stimulated response elements“ (ISRE's) zu binden und zu transaktivieren. Es wird durch Typ I- und Typ II-Interferone induziert (Floyd-Smith et al., 1999) und spielt bei der Maus eine wichtige Rolle in der Plazentaentwicklung (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von IRF1 zwischen den Zeitpunkten Tag 12 und Tag 15 bis zum Tag 25 der Trächtigkeit ansteigt (Joyce et al., 2007b). Daten aus aktuellen Studien lassen darauf schließen, dass IRF1 ebenfalls in der Lage sein könnte einen Komplex mit STAT1, einem der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Interferon-Signalwegs, zu bilden (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

## 5.2 Differentielle Genexpression an Tag 12 der frühen Trächtigkeit

Bei der Untersuchung der Endometriumpuben aus trächtigen und nicht-trächtigen Kontrollsaueu verglichen zum Zeitpunkt 12, konnten 1945 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Die mRNA-Konzentration war von 1044 Genen signifikant höher und von 901 Genen signifikant niedriger.

### 5.2.1 Gene Set Enrichment Analyse

Bei dem Vergleich unseres Datensatzes mit verschiedenen anderen Datensätzen, konnten gute Übereinstimmungen hinsichtlich der untersuchten Gene identifiziert werden. Zum einen fand ein Vergleich unseres Tag 14 Datensatzes mit anderen porzinen Datensätzen statt. Zum anderen wurden die hoch wie auch die herunter-regulierten Genes aus dem RNA-Seq Datensatz von Tag 14, mit dem Affymetrix-Datensatz von Tag 14 (Ostrup et al., 2010) verglichen. Hierbei konnten in allen drei Fällen sehr gute Übereinstimmungen hinsichtlich der differentiellen Gene beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass viele Vorgänge aus Tag 14 schon in Tag 12 gestartet werden. Vor allem die Erkennung und Etablierung der Trächtigkeit beginnt vornehmlich zwischen Tag 11 und Tag 12 und dauert bis zur erfolgreichen Implantation ab Tag 14 der Trächtigkeit, wobei der Konzeptus mit der Ausschüttung von Östrogen, dem Hauptsignal zur Erkennung der Trächtigkeit im Schwein ab Tag 11 beginnt (Joyce et al., 2007b). Allein diese Vorgänge, von der Erkennung des Konzeptus (Geisert et al., 1990) über die Umstrukturierung der Epithelschicht als Vorbereitung zur Implantation (Burghardt et al., 2009), bis hin zur Implantation selbst, sind Ereignisse die nicht starr nach einander stattfinden, sondern ineinander übergehen und in einer erfolgreichen Etablierung einer Trächtigkeit münden.

Es wurden auch Vergleiche des porzinen Tag 12 Datensatzes mit Datensätzen aus anderen Spezies durchgeführt, zum einen mit hoch-regulierten Genen eines Datensatzes vom Pferd (Merkl et al., 2010) und zum anderen mit den herunter-regulierten Genen eines bovinen Datensatzes Tag 18. Bei dem Vergleich mit dem Tag 18 Datensatz im Ring konnte eine signifikante Anreicherung detektiert werden. Da diese Übereinstimmungen der Datensätze von anderen Spezies bei Tag 14 nachgewiesen werden konnten, untermauert dies die Vermutung, dass ähnliche Mechanismen bei den verschiedenen Spezies eine Rolle während der frühen Trächtigkeit spielen.

Außerdem zeigte ein Vergleich zwischen unserem Datensatz Tag 12 und einem Datensatz von Östradiol-induzierten Genen (Dutertre et al., 2010) eine hohe Übereinstimmung. Dies ist nicht weiter verwunderlich, schüttet doch im Schwein der Konzeptus selbst ab Tag 11 als Erkennungssignal Östrogene aus und induziert im Endometrium somit eine Reaktion auf die ansteigenden Mengen an Östrogenen (Joyce et al., 2007b).

Ein weiterer Vergleich unseres Datensatzes mit einem Datensatz zur Reaktion auf ein Antigen (Goldrath et al., 2004) zeigte ebenfalls eine übereinstimmende Regulation bei 284 identifizierten Genen. Antigene sind Stoffe, an die sich z.B. Antikörper spezifisch binden und so von Immunzellen wie den T-Zellen des Organismus erkannt werden können. Somit können Sie eine Immunantwort des Organismus induzieren. Aus diesem Grund entspricht die hohe Übereinstimmung den Erwartungen,

beachtet man den Umstand dass beide Vorgänge, eine Immunantwort auf ein Antigen, ebenso wie auch die Etablierung einer Trächtigkeit, Mechanismen sind, die durch Interferon-induzierte Gene reguliert werden (Yang et al., Der et al., 1998).

### 5.2.2 GO-Analyse

Bei einer Genontologie-Analyse werden die zu untersuchenden Gene bestimmten funktionellen Gruppen zugeordnet um Rückschlüsse auf biologische Prozesse ziehen zu können, in denen diese Gene mitwirken. Bei der Analyse der differentiellen Gene aus Tag 12 der frühen Trächtigkeit, konnten bei den hoch-regulierten Genen funktionelle Kategorien wie „Mitose“ und „Prozesse des Zellzyklus“ als überrepräsentiert identifiziert werden. Die Zeit zwischen Tag 10 und Tag 12 der frühen Trächtigkeit stellt die entscheidende Phase hinsichtlich eines möglichen Abbruchs der Trächtigkeit dar. Der Konzeptus schüttet vermehrt Östrogene aus, das wichtigste Erkennungssignal einer Trächtigkeit im Schwein (Joyce et al., 2007b). Der Trophoblast differenziert und expandiert rapide, und anschließend findet die Implantation statt (Stroband and Van der Lende, 1990, Yelich et al., 1997). Das Endometrium bereitet sich auf die Implantation mit weitreichenden funktionalen Änderungen vor, vor allem durch eine umfangreiche Umstrukturierung des Gewebes und einer gesteigerten Proliferation des Epithels. Dies macht im Anschluss die Bildung von hyperämischen Zonen mit verstärkter Vaskularisierung an den Implantationsstellen möglich (Reynolds et al., 2005b). So erscheint es möglich, dass mit solchen Prozessen eine gesteigerte Zellteilung im Endometrium einhergeht. Dafür sprechen auch weitere gefundene Genontologien, wie beispielsweise „Spindelorganisation“ bei den hoch-regulierten Genen.

Auch Genontologien wie „Angiogenese“ und „Entwicklung von Blutgefäßen“ konnten bei den Genen mit erhöhter Expressionsrate als überrepräsentiert identifiziert werden. Dies spricht ebenfalls für die weitreichenden Vorgänge im Endometrium als Vorbereitung auf die Implantation. Als Vorstufe zur epitheliochorialen Plazentation findet nachweislich eine gesteigerte Vaskularisation an den Implantationsstellen statt (Reynolds et al., 2005b). Hierzu müssen verstärkt Blutgefäße in dem betroffenen Gewebe gebildet werden.

Bei der Genontologie-Analyse von Tag 12 konnten auch einige funktionelle Gruppen identifiziert werden, die bereits bei der Analyse von Tag 14 aufgefallen waren. Dies erscheint logisch, bedenkt man dass viele Prozesse die bei Tag 14 in vollem Gange sind, schon etwas früher initiiert werden müssen. Ebenfalls sind solche Vorgänge nicht streng nach Tagen abgrenzbar und die Übergänge stellen sich oft fließend dar. Somit kann der Beginn oder das Ende bestimmter Ereignisse durchaus um einige Stunden schwanken.

Auch bei Tag 12 konnten bei der Analyse der Gene mit erhöhter Expression Genontologien wie „Immunabwehr“ oder „Aktivierung einer Immunantwort“ als überrepräsentiert identifiziert werden. Wie schon bei der Diskussion der Daten von Tag 14 geschildert, ist durch diverse Studien bereits bekannt, dass bei verschiedenen Vorgängen wie dem Wachstum des Konzeptus, der Implantation

## Diskussion

oder der Etablierung einer Trächtigkeit eine erhebliche Menge an Entzündungsmediatoren beteiligt ist (Waclawik, Croy et al., 2009). Auch produzieren der Konzeptus wie auch das Endometrium beträchtliche Mengen an Interferonen (IFN). Somit ist denkbar, dass vor allem Interferon gamma (IFNG) eine fundamentale Rolle in der Regulation des mütterlichen Immunsystems, wie auch der Angiogenese des Endometriums, spielt (Murphy et al., 2009).

Auch Genontologien hochregulierter Gene wie „Reaktion auf Östrogenstimulus“ mit 11 identifizierten Genen (z.B. CD24, STS, TGFBR1) und „Reaktion auf Steroidhormonstimulus“ mit 16 identifizierten Genen (z.B. INSR, AURKA, ILR6), passen in das Bild der Vorgänge im Endometrium an Tag 12.

Bei der GO-Analyse von herunter-regulierten Genen, tauchten Begriffe wie „Transaminase Aktivität“ und „Vitaminbindung“ auf. Die Aminotransferasen, oder auch Transaminasen genannt, stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die im Allgemeinen eine Übertragung einer  $\alpha$ -Aminogruppe eines Donormoleküls auf ein Akzeptormolekül katalysieren. Dieser Vorgang wird auch als Transaminierung bezeichnet. Für die Transaminierung wird ein wichtiger Kofaktor benötigt, das Pyridoxalphosphat (PLP). PLP stellt die aktive Form des Pyridoxins (Vitamin B6) dar, und übernimmt bei der Reaktion der Transaminierung die Rolle des Boten, indem es die zu übertragende Aminogruppe vom Donor zum Akzeptormolekül transportiert. Im Organismus spielen Transaminasen vor allem bei Mechanismen wie dem Aminosäurestoffwechsel eine große Rolle. In der Medizin finden Enzyme dieser Gruppe wie die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und die Alanin-Aminotransferase (ALAT), in Blutwerten gemessen, als diagnostische Marker für Lebererkrankungen Anwendung (Whitehead et al., 1999, Khosravi et al.).

Im Bezug auf Untersuchungen zur Trächtigkeit in verschiedenen Spezies wie Schaf und Kaninchen (Hafez and White, 1967) ist die sogenannte Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) aufgefallen. Bei unseren GO-Analysen konnte die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase 1 (GOT1) identifiziert werden. Die GOT1 ist eine Phosphat-abhängige Transaminase, die eine Rolle beim Aminosäuremetabolismus spielt. Im Schaf konnte gezeigt werden, dass es zu signifikanten Änderungen in der Enzymaktivität kommt. Es konnte nachgewiesen werden, dass es vor allem kurz vor und während der Implantationsphase zu einem Anstieg der Aktivität der GOT1 kommt, während in den Phasen davor und danach keine nennenswerte Aktivität beobachtet werden konnte (Hafez and White, 1967). Auch bei Studien im Kaninchen konnte eine Veränderung der Enzymaktivität von GOT während der Trächtigkeit gezeigt werden. Vor der Implantation zeigte hier die GOT eine höhere Aktivität als nach der Implantation (Hafez and White, 1967). Sollte dies der Fall sein, könnte die Aktivität zum Zeitpunkt Tag 12 der frühen Trächtigkeit der GOT noch gering sein, und somit die Gene für diese Aktivität in unserem Datensatz herunter-reguliert, und erst im Anschluss ansteigen, da die Implantation erst ab Tag 13 beginnt.



## Diskussion

Ebenfalls bei den herunter-regulierten Genen fielen weitere Begriffe wie „Morphogenese des Embryo“ und „Entwicklung Embryo Wirbeltiere“ auf. In diesen Gruppen fielen vor allem die sogenannten HOX-Gene (wie z.B. HOXB2, HOXB5, HOXB4) als stark überrepräsentiert auf. HOX-Gene gehören zu einer Gruppe von Genen, die regulativ wirken und deren Genprodukte Transkriptionsfaktoren sind, die während der Morphogenese eine wichtige Rolle spielen (Tabin, 1992, Garcia-Fernandez, 2005). Als Mitglieder der sogenannten homöotischen Gene, besitzen sie eine stark konservierte Basensequenz, die Homöobox genannt wird. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, während der Morphogenese die Glieder des Embryos entlang der Körperachse zu ordnen (Lewis, 1978). HOX-Gene wurden bereits im Zusammenhang mit der hämatopoetischen Entwicklung sowie Differenzierung beschrieben (Magli et al., 1997), sowie auch als Mediatoren von Steroidhormonen während der Entwicklung der endometrialen Zellen im Embryo (Gao et al., 2002). In einer vorangegangenen Studie im bovinen Endometrium fielen diese Gene zum ersten Mal in Zusammenhang mit dem Endometrium und Trächtigkeit auf (Bauersachs et al., 2012) und waren ebenfalls im trächtigen Endometrium herunterreguliert.

Ein weiterer Begriff der bei den herunter-regulierten Genen identifiziert werden konnte, war „Keratinfilament“. Es ist bekannt, dass kurz vor der Implantation der Konzepte, etwa am 12. Trächtigkeitstag in den Uterushörnern, zunächst eine Depolarisierung des luminalen Epithels stattfinden muss. Dies macht unter anderem eine Anlagerung des Konzeptus an das Endometrium erst möglich. Es kommt zur Reduktion von anti-adhäsiven Komponenten, darunter Mucine der Glykocalyx des Luminalepithels (Bazer et al., 2009b). Bei der Depolarisierung des Luminalepithels muss es auch zu einer Umstrukturierung der Epithelzellen kommen und somit muss auch das Zytoskelett, als das Stabilität und Formgebende System der Zelle, umstrukturiert werden. Zum Zytoskelett einer Zelle gehören Aktinfilamente (auch Mikrofilamente genannt), Mikrotubuli und auch die Intermediärfilamente, zu denen die Keratinfilamente gehören. Keratinfilamente sind die Strukturen des Zytoskeletts, die mit Zellstrukturen in Zellmembranen, wie z.B. den Hemidesmosomen, verankert sind. Die intrazelluläre Domäne bindet hierbei über Ankerproteine an die Keratinfilamente. Bei einer Umstrukturierung des Luminalepithels könnten solche Zellmembranstrukturen wie Hemidesmosomen ebenfalls betroffen sein, und somit auch verstärkt die Keratinfilamente als Teil des Zytoskeletts (Alberts, 2002).

Auch Schlagwörter wie „Arachidonsäure Metabolismus“ und „Phospholipaseaktivität“ konnten identifiziert werden. Prostaglandine sind wichtige Faktoren zur Etablierung einer Trächtigkeit. Erst ein komplexes Zusammenspiel zwischen Östrogen (E2) und dem Prostaglandin Metabolismus des Endometriums ermöglicht die Verhinderung der Luteolyse (Bazer and Thatcher, 1977, Waclawik et al., 2009b). Der wichtigste Baustein der Prostaglandine stellt die in Membranphospholipiden vorkommende Arachidonsäure dar. Diese wird durch die Phospholipase aus den Membranphospholipiden entlassen und für den Prostaglandin Metabolismus zur Verfügung gestellt (Godkin et al., 2008). Es ist bekannt dass zwischen Tag 10 und 13 die Expression der Enzyme die im

Prostaglandin Syntheseweg eine Rolle spielen, während der frühen Trächtigkeit dahingehend verändert wird, dass die Synthese des antiluteolytischen Prostaglandin E2 (PGE2) favorisiert wird und die Synthese des luteolytischen Prostaglandin F2 (PGF2) herunter reguliert wird (Waclawik and Ziecik, 2007, Bazer and Thatcher, 1977, Waclawik et al., 2006). Somit ist denkbar, dass die negative Regulation von Prozessen wie „Arachidonsäure Metabolismus“ und „Phospholipase Aktivität“ die Regulation des Prostaglandin Synthesewegs im Hinblick auf die Abnahme der Konzentration an PGF2 widerspiegelt.

Auch Begriffe wie „Steroidbiosynthese“ und „Lipidbiosynthese“ konnten bei den herunter-regulierten Genen identifiziert werden. Bereits bei der Analyse der Tag 14 Daten sind diese Genontologien, die für wichtige Prozesse bei der Trächtigkeit stehen, diskutiert worden. So liegen hier bei Tag 12 die gleichen Mechanismen zu Grunde wie bei Tag 14. Zu den Steroiden gehören auch Sexualhormone wie Östrogen, Progesteron und Testosteron (Wiesak, 1989). Ein wichtiges Sexualhormon stellt das vom Konzeptus ausgeschüttete Steroidhormon Östrogen dar, welches das Hauptsignal zur Erkennung einer Trächtigkeit darstellt. Es wird vom Konzeptus in großen Mengen, hauptsächlich zwischen dem 14. und 18. Trächtigkeitstag produziert (Geisert et al., 1990). Progesteron hingegen, wird hauptsächlich von den Corpora lutea gebildet und fördert die Aufrechterhaltung der frühen Trächtigkeit (Wiesak, 1989).

### **5.2.3 Ausgewählte Gene und ihre mögliche Funktion**

#### *CDH17 (Cadherin 17)*

Das in unserer Studie herunter-regulierte Gen CDH17 gehört zur umfangreichen Familie der Cadherine. Cadherine bilden die transmembrane Komponente der sog. Adherens junctions und bestehen aus drei verschiedenen Segmenten. Zum einen besitzen Cadherine eine extrazelluläre Region, aufgebaut aus sieben Cadherin-Domänen, die zuständig ist für die Cadherin-Cadherin-Interaktion (Takeichi, 1990). Zum anderen aus einer Transmembranregion (Blaschuk et al., 1995) und einer stark konservierten cytoplasmischen Region, die an Actin-Filamente binden kann und somit die Zelloberfläche mit dem Cytoskelett verbindet (Gama and Schmitt, 2012). Cadherine sind Calcium-abhängige, membranassoziierte Glykoproteine, die eine Klasse von Typ I Transmembranproteinen bilden (Takeichi, 1991, Gumbiner, 1996). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Bindung von Zellen innerhalb eines Zellverbandes (Lee et al., 2010).

Die Zelladhäsion stellt einen dynamischen Prozess dar, der auf verschiedenen Regulationsebenen beeinflusst wird. Dazu gehören die Transkription, die Proteinstabilität und die posttranslationale Modifikation. Obwohl intrazelluläre Signalwege, wie der MAP-Kinase Signalweg einen Effekt auf die Cadherin unterstützte Adhäsion haben können, löst die Bildung dieser Zellverbindungen ebenfalls Signalwege aus, die z.B. Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie EGFR einschließen (Knudsen and Wheelock, 2005). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass der dynamische Charakter der Cadherin-Catenin Komplexe ebenfalls wichtig für die Embryogenese und jegliche Art von Wundheilung ist,

## Diskussion

jedoch auch einen Beitrag zur Tumorbildung und Wachstum leisten kann (Wheelock et al., 2001). Im Menschen konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von CDH17 ein erhöhtes Risiko bedeutet, einen Tumor am Eierstock auszubilden (Huang et al., 2012). Zusätzlich häufen sich auch die Hinweise darauf, dass die durch Cadherine gebildete Adhäsion auch eine wichtige Signalwirkung während der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums hat (Wheelock et al., 2001).

### *IL24 (Interleukin 24)*

Interleukin-24 gehört zur Interleukin-10 Familie von Cytokinen, zu der auch IL19, IL20, IL22 und IL26 gehören (Poindexter et al., 2005). Sie wirken über ihre Rezeptoren, die alle der Familie der Klasse II Cytokin Rezeptoren angehören. Alle Mitglieder der IL-10 Familie wirken über ihre Rezeptoren auf die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 (Xie et al., 2000). STAT1 ist in unserer Studie ebenfalls ein Gen mit erhöhter Expression und fiel bereits bei der Analyse der Daten Tag 14 der frühen Trächtigkeit als signifikant hoch-reguliertes Gen auf. IL 24 und andere Mitglieder der IL-10-Familie scheinen auch in Antigen-stimulierten menschlichen peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) exprimiert zu werden (Poindexter et al., 2005). Außerdem ist diese Familie von Cytokinen ebenfalls an der Regulation von Entzündungsreaktionen und Reaktionen des Immunsystems beteiligt (Kotenko, 2002, Chada et al., 2004). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die Expression von IL-24 in humanen PBMC von proinflammatorischen Cytokinen angetrieben wird, und es ebenfalls in T-Zellen und Makrophagen exprimiert wird (Poindexter et al., 2005). Da für eine erfolgreiche Etablierung einer Trächtigkeit auch die Unterdrückung der maternalen Immunabwehr gegen den Konzeptus eine Rolle spielt, ist es schlüssig, dass in der vorliegenden Studie eine negative Regulation der Expression von IL-24 beobachtet werden konnte.

### *IRG1 (immune-responsive gene 1)*

In Zusammenhang mit Untersuchungen zur Trächtigkeit von Mäusen ist IRG1, welches in der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression aufwies, bereits als essentieller Faktor für die Implantation aufgefallen (Catalano et al., 2005). In Mäusen gibt es Hinweise darauf, dass IRG1 nur im uterinen luminalen Epithel exprimiert wird und das nur während der Trächtigkeit. Der Höhepunkt der Expression von IRG1 liegt während der Implantation (Chen et al., 2003). Die Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation des Konzeptus stellt einen komplexen Vorgang dar, der von verschiedenen Faktoren, wie z.B. den Sexualhormonen  $17\beta$ -Östradiol (E2) und Progesteron (P4) reguliert wird (Ross et al., 2009). In Mäusen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass IRG1 von Progesteron reguliert wird, jedoch zur vollen Entfaltung seiner Wirkung das Zusammenwirken beider Hormone, Progesteron wie auch E2, benötigt (Chen et al., 2003). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von IRG1 durch den von Östrogen induzierten Leukemia inhibitory factor (LIF) gesteigert wird. Bei Untersuchungen in der Maus konnte gezeigt werden, dass durch die Wirkung von LIF die Expression von IRG1 während der Implantation hochreguliert wird

## Diskussion

(Sherwin et al., 2004). Da die Proteinsequenz von IRG1 über 83% Übereinstimmung bei einem Vergleich zwischen Maus und Mensch zeigte (Chen et al., 2003), lässt sich daraus ableiten, dass dieses Gen und das daraus resultierende Protein eine konservierte Rolle in verschiedenen Säugerspezies hat. Aus diesem Grund könnte es ebenfalls einen positiven Effekt auf die Implantation beim Schwein ausüben, und folglich würde eine erhöhte Expressionsrate an Tag 12 der frühen Trächtigkeit, also kurz vor Beginn der Implantationsphase im Schwein, für diese These sprechen.

Die Daten der vorliegenden Studie gaben Einblicke in die grundlegenden Veränderungen der Transkriptomzusammensetzung während der frühen Phase der Trächtigkeit, insbesondere kurz vor und während der Implantation, und bieten somit im Hinblick auf folgende Untersuchungen zu den Mechanismen der embryo-maternalen Kommunikation eine Grundlage für weitere Analysen. Die Auswertung der RNA-Seq-Daten ergab ein sehr komplexes Bild zu den molekularen Vorgängen des Endometriums zu den beiden untersuchten Zeitpunkten Tag 12 und Tag 14 der Trächtigkeit. Bei diesem Vergleich mit der Affymetrix-Studie von Tag 14, ergaben die Datensätze der RNA-Seq Analyse eine deutlich höhere Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Genen und es konnten Gene identifiziert werden, die bei der Affymetrix Studie in Verbindung mit der Trächtigkeit im Schwein nicht aufgefallen waren. Dies ergab ein deutlicheres Bild von den beteiligten Mechanismen im Endometrium, die zu einer erfolgreichen Etablierung der Trächtigkeit führen.

## 6 Zusammenfassung

Die Etablierung einer Trächtigkeit erfordert in Säugetieren eine Verlängerung der lutealen Lebensdauer für eine anhaltende Produktion von Progesteron (P4). Die maternale Erkennung der Trächtigkeit sowie deren Etablierung erfordern beim Schwein ein zweiphasiges Muster der Östrogen (E2)-Sekretion. Der Konzeptus schüttet erhöhte Mengen an Östrogen zwischen Tag 11 und 12, wie auch zwischen Tag 15 und 30 der Trächtigkeit aus. Zwischen den Tagen 11 und 12 der Gestation findet im Konzeptus eine rasante Differenzierung und Expansion der Trophoblastenmembranen. Ein komplexes Zusammenspiel der Signalwirkung von E2 in Verbindung mit dem Prostaglandinmetabolismus, führen letztendlich zu einer Unterbindung der Luteolyse.

Zur Charakterisierung der komplexen Änderungen des Transkriptom im Endometrium an den Tagen 12 und 14 der Trächtigkeit im Zuge der Erkennung der Trächtigkeit und beginnenden Plazentation, wurde eine Transkriptomsequenzierung mittels Illumina RNA-Seq von jeweils 4 endometrialen Gewebeproben aus trächtigen Tieren und nicht trächtigen Kontrolltieren durchgeführt.

Die Sequenzierung ergab für die Proben von Tag 14 zwischen 21 und 30 Millionen Sequenzen (76bp single reads) pro Probe und für Tag 12 zwischen 31 und 36 Millionen Sequenzen (76bp single reads) pro Probe. Die erhaltenen Sequenzen wurden nach Qualität und Länge gefiltert und die verbleibenden Sequenzen anschließend mit TopHat (v. 1. 4. 0) dem Schweinegenom (Sscrofa 10.2, Aug 2011) zugeordnet. Eventuelle Isoformen von Transkripten wurden mit Hilfe von Cufflinks (v. 1. 3. 0) erstellt und mit der Genannotation des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgeglichen. Zur Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde mit Hilfe von DESeq durchgeführt.

Die Analyse ergab für Tag 14 1467 differentiell exprimierte Gene, 922 mit höherem und 475 mit niedrigerem Expressionsniveau in den Proben von trächtigen Tieren. Bei Tag 12 konnten 1945 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, 1044 Gene mit höherem und 901 mit niedrigerem Expressionsniveau in den Proben von trächtigen Tieren. Die Expression ausgewählter Gene wurde mit qPCR validiert. Der Datensatz der RNA-Seq Analyse von Tag 14 wurde auch mit einem bereits publiziertem Affymetrix Datensatz von Tag 14 der Trächtigkeit verglichen (Oestrup et al., 2010). Die so erhaltenen Daten zeigen eine starke Übereinstimmung zwischen den beiden Datensätzen, obwohl die Daten der Affymetrix-Analyse nur 263 differentiell exprimierte Gene erfasst. Die meisten dieser detektierten Gene sind sogenannte ISG's (Interferon stimulated genes). Dies könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen Mechanismus, in Bezug auf die Etablierung der Trächtigkeit und Implantation sein.

Die RNA-Seq Datensätze wurden ebenfalls mit Hilfe von GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) und DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) weiter charakterisiert. Unter den Genen mit höheren mRNA-Konzentrationen im trächtigen Endometrium bei Tag 14 waren vor allem solche Gene überrepräsentiert, die eine Rolle bei der „positiven Regulation des

## Zusammenfassung

Immunsystems“, „Regulation der Cytokinproduktion“, Regulation der Leukozytenproduktion“, „Regulation der T-Zell Aktivierung“ und „Regulation des programmierten Zelltodes“ spielen. An Tag 12 waren insbesondere Gene überrepräsentiert, die mit Vorgängen wie „Mitose“, „Glykoprotein“, „Angiogenese“ und „Immunantwort“ assoziiert sind.

Für die Gene mit niedrigeren mRNA-Konzentrationen im trächtigen Endometrium ergab die DAVID-Analyse bei Tag 14 eine Überrepräsentation der funktionellen Kategorien wie „Glycoprotein“, „Plasmamembran“, „Steroid-Biosynthese-Prozesse“ und „Cholesterol-Metabolische Prozesse“. Bei Tag 12 konnten funktionelle Kategorien wie „Keratinfilament“, „Transaminase-Aktivität“ und „Prozess der Steroid-Biosynthese“ identifiziert werden.

Die Daten der vorliegenden Studie geben Einblicke in die grundlegenden Veränderungen hinsichtlich des Transkriptoms während der frühen Phase der Trächtigkeit, insbesondere kurz vor und während der Implantation. Bei dem erfolgten Vergleich mit der Affymetrix-Studie von Tag 14, ergaben die Datensätze der RNA-Seq Analyse eine deutlich höhere Anzahl an signifikant exprimierten Genen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die RNA-Seq Analyse ein umfassendes Bild der stattfindenden Veränderungen des endometrialen Transkriptoms an den Tagen 14 und 12 der Trächtigkeit ergab.

## 7 Summary

Establishment of pregnancy in mammals requires prolongation of luteal life span for sustained progesterone (P4) production. Maternal recognition and establishment of pregnancy in pigs requires a biphasic pattern of estrogen (E2) secretion. The porcine conceptus secretes increased levels of E2 on day 11 and 12 and between days 15 and 30 of pregnancy. Between days 11 and 12 of gestation, the porcine conceptus undergoes rapid differentiation and expansion of its trophoblastic membranes. A complex interplay of E2 signaling with prostaglandin (PG) metabolism in the endometrium finally results in the prevention of luteolysis.

To characterize the complex transcriptome changes at day 12 and day 14 of pregnancy in the endometrium in the course of recognition of pregnancy and initial placentation, endometrial samples of four pregnant animals and four corresponding non-pregnant controls were subjected to transcriptome analysis by the use of Illumina RNA-Seq.

For day 14 of pregnancy between 21 and 30 million 76 bp single reads were produced per sample and between 31 and 36 million 76 bp single reads per sample for day 12. The obtained reads were filtered according to their length and quality and the remaining reads were mapped with TopHat (v.1.4.0) to the draft porcine genome sequence assembly (Sscrofa 10.2, Aug 2011). Transcript isoforms were assembled using the Cufflinks package (v.1.3.0) and combined with the gene annotation from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genome Browser. Analysis of differential gene expression was performed with DESeq.

This analysis revealed for day 14 1467 differentially expressed genes, 992 with higher and 475 with lower expression levels in the samples from pregnant animals. Furthermore the analysis of day 12 revealed 1945 differentially expressed genes, 1044 with higher and 901 with lower expression levels in the samples from pregnant animals. Expression of selected genes was validated by the use of quantitative real-time RT-PCR. The RNA-Seq data set of day 14 was compared with the published porcine Affymetrix data set from day 14 of pregnancy (Oestrup et al. Biol Reprod 2010). The obtained data show a strong accordance between the two data sets, though the Affymetrix data set only detected 263 differentially expressed genes. Another GSEA with a bovine data set of day 18 pregnancy also revealed a strong concordance. Most of these detected genes are so called ISG's (Interferon stimulated genes). This could be an evidence for a common mechanism concerning the successful establishment of pregnancy and implantation.

To characterize the RNA-Seq data set Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) was used. For the genes from day 14 with higher mRNA levels in pregnant samples, terms like „positive regulation of immune system process“, „regulation of cytokine production“, „regulation of leukocyte production“, „regulation of T-cell activation“ and „regulation of programmed cell death“ were found as overrepresented. The analysis

## Summary

of genes with higher mRNA levels in pregnant samples from day 12 revealed enriched terms like „mitosis“, „glycoprotein“ and „defense response“.

Overrepresented terms for the genes with lower expression levels in pregnant samples from day 14 were related to „glycoprotein“, plasma membrane“, „steroid biosynthetic process“, and „cholesterol metabolic process“. For day 12 the genes with lower expression levels revealed overrepresented terms like „keratin filament“, „transaminase activity“ and „steroid biosynthetic process“.

The presented data of this study provide an insight into the fundamental changes concerning the transcriptome during the phase of early pregnancy, particularly the time before and during implantation. Looking at the results of the new RNA-Seq data set in comparison to the finding from the Affymetrix microarray study, we could detect a higher number of differentially expressed genes.

In conclusion, RNA-Seq revealed a comprehensive picture of transcriptome changes in porcine endometrium at day 14 and day 12 of pregnancy.



**8 Anhang:****Tabelle: Progesteronwerte der beprobten Jungsauen Tag 12**

Zyklustag	Status	Probennummer	Progesteron [ng/ml Plasma]
12	Kontrolle	002	31.8
12	Kontrolle	004	27.6
12	Kontrolle	006	50.0
12	Kontrolle	007	19.8
12	Kontrolle	009	30.8
12	Kontrolle	011	8.8
12	Kontrolle	013	22.2
12	Kontrolle	015	50.0
12	Kontrolle	017	17.9
12	trächtig	001	27.7
12	trächtig	003	43.6
12	trächtig	005	40.7
12	trächtig	008	39.4
12	trächtig	010	34.6
12	trächtig	012	42.1
12	trächtig	014	19.8
12	trächtig	016	50.0
12	trächtig	018	44.7

Anhang

**Tabelle: Progesteronwerte der beprobten Jungsauen Tag 14**

Zyklustag	Status	Probennummer	Progesteron [ng/ml Plasma]
14	Kontrolle	902	50.0
14	Kontrolle	904	20.0
14	Kontrolle	906	20.8
14	Kontrolle	908	30.6
14	Kontrolle	909	50.0
14	Kontrolle	910	31.6
14	Kontrolle	912	37.4
14	Kontrolle	914	46.2
14	Kontrolle	916	38.0
14	Kontrolle	917	50.0
14	trächtig	901	13.1
14	trächtig	903	43.8
14	trächtig	905	50.0
14	trächtig	907	19.4
14	trächtig	911	25.2
14	trächtig	913	43.4
14	trächtig	915	49.9
14	trächtig	918	40.7

## Anhang

Weitere Anhänge siehe Daten-CD:

### **Excel Arbeitsblatt 1: DESeq results all genes D 12**

#### **Tabellenblatt all genes D12 12.11.2012**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle detektierten Transkripte für Tag 12 (mind. 10 Reads pro Transkript in 3 von 4 Proben in wenigstens einer Gruppe)

#### **Tabellenblatt HSA symbol nr**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet eine nicht redundante Liste der exprimierten Gene Tag 12 anhand der humanen Entrez Gene ID

#### **Tabellenblatt differential transcripts FDR 1%**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle differentiell exprimierten Transkripte für Tag 12 bei einer False Discovery Rate (FDR) von 1%

### **Excel Arbeitsblatt 2: DESeq results all genes D 14**

#### **Tabellenblatt all genes D14 12.11.2012**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle mit DESeq detektierbaren Transkripte für Tag 14 (mind. 10 Reads pro Transkript in 3 von 4 Proben in wenigstens einer Gruppe)

#### **Tabellenblatt HSA symbol nr**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet eine nicht redundante Liste der exprimierten Gene Tag 14 anhand der humanen Entrez Gene ID

#### **Tabellenblatt differential transcripts FDR 1%**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle differentiell exprimierten Transkripte für Tag 14 mit einer False Discovery Rate (FDR) von 1%

### **Excel Arbeitsblatt 3: DAVID 2012\_11.xlsx**

#### **Tabellenblatt D12 down**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle mit DAVID identifizierten „Functional Annotation Cluster“ für die herunter-regulierten Gene Tag 12

#### **Tabellenblatt D12 up**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle mit DAVID identifizierten „Functional Annotation Cluster“ für die hoch-regulierten Gene Tag 12

#### **Tabellenblatt D14 down**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle mit DAVID identifizierten „Functional Annotation Cluster“ für die herunter-regulierten Gene Tag 14

#### **Tabellenblatt D14 up**

Dieses Tabellenblatt beinhaltet alle mit DAVID identifizierten „Functional Annotation Cluster“ für die hoch-regulierten Gene Tag 14

#### **GTF-File: Ssc10\_2\_EntrezGene.gtf**

Das für Cufflinks (1.2.1) verwendete Annotationsfile für das Genomassembly (Sscrofa 10.2) als GTF-File.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
μ	mikro (x10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
B	Basen
<i>BAALC</i>	brain and acute leukemia, cytoplasmic
Bp/bp	Basenpaare („base pairs“)
bzw.	beziehungsweise
c	Kontrolle
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
<i>CD24</i>	signal transducer CD24-like
<i>CDH17</i>	cadherin 17, LI cadherin
cDNA	Desoxyribonucleinsäure-Kopie („copy desoxyribonucleic acid“)
<i>CLDN10</i>	claudin 10
<i>CLDN11</i>	claudin 11
cm	Zentimeter
CT	cycle number
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integratet Discovery
DEG	differentially expressed genes
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonucleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonucleotide-Triphosphate

## Abkürzungsverzeichnis

E2	Östrogen
<i>EPS8L3</i>	EPS8-like 3
ER $\alpha$	Östrogen-Rezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogen-Rezeptor $\beta$
et al.	Et alii
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FC	Fold Change
FDR	Fehlergrenze („false discovery rate“)
<i>FGF9</i>	fibroblast growth factor 9
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
<i>FXRD4</i>	FXRD domain containing ion transport regulator 4
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung: 1 <i>g</i> = 9,81 m/s <sup>2</sup> ; RCF („relative centrifugal force“) (= 1,119 x 10 <sup>-5</sup> x rpm <sup>2</sup> x r)
GO	Gene Ontology
<i>GPR83</i>	G protein-coupled receptor 83
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
h	„hora“ (lateinisch: Stunde)
H <sub>2</sub> O	Wasser
<i>HPGD</i>	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
<i>IDO1</i>	indoleamine-2,3-dioxygenase 1
IFN $\delta$	interferon delta
IFN $\gamma$	interferon alpha
IFN $\tau$	interferon tau
<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta

## Abkürzungsverzeichnis

<i>IL24</i>	interleukin-24-like
<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 1
<i>IRG1</i>	immunoresponsive 1 homolog
kb	kilo Basenpaare („kilo base pairs“)
kg	Kilogramm
l	Liter
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
mm	Millimeter
<i>MPP3</i>	membrane protein, palmitoylated member 3
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
n	nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar (nmol/l)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
<i>OSTN</i>	osteocrin
P4	Progesteron
<i>PARQR5</i>	membrane progestin receptor gamma-like
<i>PBD-2</i>	beta-defensin 2
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
p-wert	p-Wert; Überschreitungs-/Irrtumswahrscheinlichkeit

## Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin-F2 $\alpha$
pH	potentia hydrogenii
<i>PLP1</i>	proteolipid protein 1
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure („ribosomal ribonucleic acid“)
RNA-Seq	deep sequencing of the Transcriptome
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9
<i>SERPINB7</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B
<i>SLC16A1</i>	solute carrier family 16, member 1
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1
<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1
<i>STC1</i>	stanniocalcin 1
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TM	Trademark
V	Volt
V/cm	Volt pro Zentimeter
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 10 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Mechanismen der Interaktion von Spermium und Eizelle .....	7
Abbildung 2: Frühe Embryogenese in Säugetieren .....	9
Abbildung 3: Das Illumina "Sequencing-by-Synthesis" System .....	23
Abbildung 4: Proben-Identifikationsnummer.....	34
Abbildung 5: Kugelförmiger und filamentöser Konzeptus .....	47
Abbildung 6: Übersicht der Probenentnahme.....	49
Abbildung 7: Gelähnliches Bild 2100 Bioanalyzer isolierter Gesamt-RNA.....	51
Abbildung 8: Elektropherogramm isolierter Gesamt-RNA.....	51
Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese für die Kandidatengene <i>S100A9</i> , <i>SLC16A1</i> und <i>IL24</i> .....	53
Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese für die Kandidatengene <i>CD24</i> , <i>SERPINB7</i> und <i>DEFB1</i> .....	54
Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese für das Kandidatengen <i>S100A9</i> .....	55
Abbildung 12: Fermentas GeneRuler™ Low Range Marker .....	55
Abbildung 13: qPCR-Analyse für das Kandidatengen <i>S100A9</i> .....	57
Abbildung 14: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyzer Analyse der amplifizierten cDNA-Fragmente .....	58
Abbildung 15: Elektropherogramm eines isolierten cDNA Amplifikates.....	59
Abbildung 16: Vulkanplot der durchschnittlichen Expression (baseMean) gegen den log <sub>2</sub> FC von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 14 der frühen Trächtigkeit .....	61
Abbildung 17: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in trächtigen und nicht trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 14 der Trächtigkeit.....	62
Abbildung 18: Amplifizierungsplot der quantitativen real-time RT-PCR von <i>S100A9</i> .....	63
Abbildung 19: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyzer Analyse der qPCR Fragmente nach Mikrodialyse .....	65
Abbildung 20: Enrichment plot für die in der Affymetrix-Microarray-Analyse am Tag 14 hochregulierten Gene im Vergleich mit dem Tag 14 RNA-Seq-Datensatz.....	67
Abbildung 21: Drei Beispiele von Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression im trächtigen Endometrium an Tag 14 .....	69



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 22: Zwei Beispiele von Datensätzen mit einer starken Anreicherung in Richtung von Genen mit erhöhter Genexpression in trächtigen Tieren Tag 14.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 23: Enrichment plot Vergleich Datensatz RNA-Seq-Analyse Tag 14 mit hoch-regulierten Genen Tag 18 im bovinen Endometrium .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 24: Gelähnliches Bild der DNA 1000 Bioanalyzer Analyse der isolierten cDNA Templates .....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 25: Vulkanplot der Expressionswerte von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 12 der Trächtigkeit .....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 26: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in trächtigen und nicht-trächtigen Tieren zum Zeitpunkt Tag 12 der frühen Trächtigkeit .....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 27: Enrichment plots Tag 12 mit drei Tag 14 Datensätzen .....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 28: Enrichment plots der Vergleiche mit hoch-regulierten Genen Tag 12 Pferd und herunter-regulierten Genen Tag 18 Rind der Trächtigkeit .....</b>	<b>78</b>
<b>Abbildung 29: Enrichment plots der GSEA von Datensätzen zur Reaktion auf Östradiol und auf ein Antigen .....</b>	<b>78</b>

## 11 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Oligonukleotide für qPCR Validierung Tag 12.....	31
Tabelle 2: Oligonukleotide für qPCR Validierung Tag 14.....	32
Tabelle 3: Verwendete Kandidatengene mit für die Auswahl der Proben zur RNA-Seq-Analyse. ....	36
Tabelle 4: Zusammensetzung des Master Mix für die RT-PCR.....	36
Tabelle 5: Programm des Thermocycler für die RT-PCR.....	37
Tabelle 6: Programm des Thermocycler für die Erst-Strang-cDNA-Synthese.....	39
Tabelle 7: Mastermix für die Reparatur der Enden der cDNA Fragmente.....	40
Tabelle 8: Mastermix für die Anreicherung der cDNA .....	41
Tabelle 9: Programm des Thermocycler zur Anreicherung der cDNA.....	42
Tabelle 10: Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 14 mit entsprechender RIN und den 28s/18s Ratio ..	52
Tabelle 11: Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 12 mit entsprechender RIN und den 28s/18s Ratio ..	52
Tabelle 12: Verwendete Kandidatengene für die Auswahl der Proben zur RNA-Seq-Analyse.....	52
Tabelle 13: Delta C(T)-Werte der getesteten Proben für RNA-Seq-Analyse Tag 12 .....	57
Tabelle 14: Konzentrationen der isolierten cDNA Templates .....	59
Tabelle 15: Übersicht der Anzahl der Sequenzen vor und nach dem Filtern mit dem FASTQ-Filter .	60
Tabelle 16: Mittels quantitativer Real-time RT-PCR validierte Gene .....	64
Tabelle 17: Vergleich von Genen aus der qPCR Validierung, RNA-Seq und Affymetrix.....	66
Tabelle 18: GO-Analyse der hoch-regulierten Gene Tag 14 .....	68
Tabelle 19: GO-Analyse der herunter-regulierten Gene Tag 14 der frühen Trächtigkeit.....	68
Tabelle 20: Konzentrationen der isolierten cDNA Templates .....	72
Tabelle 21: Übersicht der Anzahl der Sequenzen vor und nach dem Filtern mit dem FASTQ-Filter .	72
Tabelle 22: Validierte Gene mittels quantitativer real time RT-PCR .....	75
Tabelle 23: GO-Analyse der hoch-regulierten Gene Tag 12 der frühen Trächtigkeit .....	76
Tabelle 24: GO-Analyse der herunter-regulierten Gene Tag 12 der frühen Trächtigkeit.....	76

**12 Literaturverzeichnis**

- ADAMS, J. M. & CORY, S. (1975) Modified nucleosides and bizarre 5'-termini in mouse myeloma mRNA. *Nature*, 255, 28-33.
- AINSWORTH, L., BAKER, R. D. & ARMSTRONG, D. T. (1975) Pre-ovulatory changes in follicular fluid prostaglandin F levels in swine. *Prostaglandins*, 9, 915-25.
- AINSWORTH, L., TSANG, B. K., DOWNEY, B. R. & MARCUS, G. J. (1990) The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl*, 40, 137-50.
- ALBERTS, B. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science.
- ALLAN, J., HARTMAN, P. G., CRANE-ROBINSON, C. & AVILES, F. X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, 288, 675-9.
- ALLAN, J., MITCHELL, T., HARBORNE, N., BOHM, L. & CRANE-ROBINSON, C. (1986) Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *J Mol Biol*, 187, 591-601.
- ANDERS, S. & HUBER, W. (2012) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 11, R106.
- ARNOULT, C., CARDULLO, R. A., LEMOS, J. R. & FLORMAN, H. M. (1996) Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13004-9.
- ASHKENAS, J. (1997) Gene regulation by mRNA editing. *Am J Hum Genet*, 60, 278-83.
- AUSTIN, C. R. (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. & MCCARTY, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med*, 79, 137-58.
- BARB, C. R., KRAELING, R. R., RAMPACEK, G. B. & PINKERT, C. A. (1984) Luteinizing hormone receptors and progesterone content in porcine corpora lutea after prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *Biol Reprod*, 31, 913-9.
- BAUERSACHS, S., ULBRICH, S. E., GROSS, K., SCHMIDT, S. E., MEYER, H. H., WENIGERKIND, H., VERMEHREN, M., SINOWATZ, F., BLUM, H. & WOLF, E. (2006) Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, 132, 319-31.
- BAUERSACHS, S., ULBRICH, S. E., REICHENBACH, H. D., REICHENBACH, M., BUTTNER, M., MEYER, H. H., SPENCER, T. E., MINTEN, M., SAX, G., WINTER, G. & WOLF, E. (2012) Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biol Reprod*, 86, 46.
- BAZER, F. W., BURGHARDT, R. C., JOHNSON, G. A., SPENCER, T. E. & WU, G. (2008) Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod Biol*, 8, 179-211.
- BAZER, F. W., SPENCER, T. E. & JOHNSON, G. A. (2009a) Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med*, 27, 90-102.
- BAZER, F. W., SPENCER, T. E., JOHNSON, G. A., BURGHARDT, R. C. & WU, G. (2009b) Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, 138, 195-209.

## Literaturverzeichnis

- BAZER, F. W. & THATCHER, W. W. (1977) Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, 14, 397-400.
- BAZER, F. W., VALLET, J. L., ROBERTS, R. M., SHARP, D. C. & THATCHER, W. W. (1986) Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil*, 76, 841-50.
- BENTLEY, D. R. (2006) Whole-genome re-sequencing. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 545-52.
- BLANKENBERG, D., GORDON, A., VON KUSTER, G., CORAOR, N., TAYLOR, J. & NEKRUTENKO, A. (2010) Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26, 1783-5.
- BLANKENBERG, D., VON KUSTER, G., CORAOR, N., ANANDA, G., LAZARUS, R., MANGAN, M., NEKRUTENKO, A. & TAYLOR, J. (2010) Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 19, Unit 19 10 1-21.
- BLASCHUK, O. W., MUNRO, S. B. & FAROOKHI, R. (1995) Cadherins, steroids and cancer. *Endocrine*, 3, 83-9.
- BLEIL, J. D. & WASSARMAN, P. M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol*, 76, 185-202.
- BLEIL, J. D. & WASSARMAN, P. M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol*, 95, 317-24.
- BLEIL, J. D. & WASSARMAN, P. M. (1988) Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6778-82.
- BLOMBERG, L., HASHIZUME, K. & VIEBAHN, C. (2008) Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction*, 135, 181-95.
- BRAILEANU, G. T., HU, J. & MIRANDO, M. A. (2000) Directional secretion of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha by polarized luminal epithelial cells from pig endometrium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 60, 167-74.
- BRAND, A. H., BREEDEN, L., ABRAHAM, J., STERNGLANZ, R. & NASMYTH, K. (1985) Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*, 41, 41-8.
- BRENNER, S., JACOB, F. & MESELSON, M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190, 576-581.
- BROWN, T. A. (1999) *Moderne Genetik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- BUHI, W. C., ALVAREZ, I. M. & KOUBA, A. J. (1997) Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl*, 52, 285-300.
- BULMER, D. (1964) The Histochemistry of Ovarian Macrophages in the Rat. *J Anat*, 98, 313-9.
- BURGHARDT, R. C., BURGHARDT, J. R., TAYLOR, J. D., 2ND, REEDER, A. T., NGUEN, B. T., SPENCER, T. E., BAYLESS, K. J. & JOHNSON, G. A. (2009) Enhanced focal adhesion assembly reflects increased mechanosensation and mechanotransduction at maternal-conceptus interface and uterine wall during ovine pregnancy. *Reproduction*, 137, 567-82.
- BURTON, G. J., JAUNIAUX, E. & CHARNOCK-JONES, D. S. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol*, 54, 303-12.

## Literaturverzeichnis

- BUTTE, A. J., DZAU, V. J. & GLUECK, S. B. (2001) Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiol Genomics*, 7, 95-6.
- CAMAIONI, A., SALUSTRI, A., YANAGISHITA, M. & HASCALL, V. C. (1996) Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys*, 325, 190-8.
- CARSON, D. D. (2002) The glycobiology of implantation. *Front Biosci*, 7, d1535-44.
- CARTER, A. M. & ENDERS, A. C. (2004) Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 46.
- CATALANO, R. D., JOHNSON, M. H., CAMPBELL, E. A., CHARNOCK-JONES, D. S., SMITH, S. K. & SHARKEY, A. M. (2005) Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8585-90.
- CENCIC, A., GUILLOMOT, M., KOREN, S. & LA BONNARDIERE, C. (2003) Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? *Placenta*, 24, 862-9.
- CENCIC, A. & LA BONNARDIERE, C. (2002) Trophoblastic interferon-gamma: current knowledge and possible role(s) in early pig pregnancy. *Vet Res*, 33, 139-57.
- CHADA, S., SUTTON, R. B., EKMEKCIOGLU, S., ELLERHORST, J., MUMM, J. B., LEITNER, W. W., YANG, H. Y., SAHIN, A. A., HUNT, K. K., FUSON, K. L., POINDEXTER, N., ROTH, J. A., RAMESH, R., GRIMM, E. A. & MHASHILKAR, A. M. (2004) MDA-7/IL-24 is a unique cytokine--tumor suppressor in the IL-10 family. *Int Immunopharmacol*, 4, 649-67.
- CHAN, E. Y. (2005) Advances in sequencing technology. *Mutat Res*, 573, 13-40.
- CHAN, P. P., HOLMES, A. D., SMITH, A. M., TRAN, D. & LOWE, T. M. (2012) The UCSC Archaeal Genome Browser: 2012 update. *Nucleic Acids Res*, 40, D646-52.
- CHATTERJEE-KISHORE, M., WRIGHT, K. L., TING, J. P. & STARK, G. R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J*, 19, 4111-22.
- CHEN, B., ZHANG, D. & POLLARD, J. W. (2003) Progesterone regulation of the mammalian ortholog of methylcitrate dehydratase (immune response gene 1) in the uterine epithelium during implantation through the protein kinase C pathway. *Mol Endocrinol*, 17, 2340-54.
- CHOI, J. C., HOLTZ, R., PETROFF, M. G., ALFAIDY, N. & MURPHY, S. P. (2007) Dampening of IFN-gamma-inducible gene expression in human choriocarcinoma cells is due to phosphatase-mediated inhibition of the JAK/STAT-1 pathway. *J Immunol*, 178, 1598-607.
- CONLEY, A. J., HOWARD, H. J., SLANGER, W. D. & FORD, J. J. (1994) Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol Reprod*, 51, 655-61.
- CORBIN, C. J., MORAN, F. M., VIDAL, J. D., FORD, J. J., WISE, T., MAPES, S. M., NJAR, V. C., BRODIE, A. M. & CONLEY, A. J. (2003) Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol Reprod*, 69, 390-7.
- CROY, B. A., WESSELS, J. M., LINTON, N. F., VAN DEN HEUVEL, M., EDWARDS, A. K. & TAYADE, C. (2009) Cellular and molecular events in early and mid gestation porcine implantation sites: a review. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 66, 233-44.
- DANTZER, V. (1985) Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol (Berl)*, 172, 281-93.

## Literaturverzeichnis

- DENNIS, G., JR., SHERMAN, B. T., HOSACK, D. A., YANG, J., GAO, W., LANE, H. C. & LEMPICKI, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 4, P3.
- DER, S. D., ZHOU, A., WILLIAMS, B. R. & SILVERMAN, R. H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15623-8.
- DESPLAN, C., THEIS, J. & O'FARRELL, P. H. (1988) The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell*, 54, 1081-90.
- DIEKMAN, M. A., O'CALLAGHAN, P. O., NETT, T. M. & NISWENDER, G. D. (1978) Validation of methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod*, 19, 999-1009.
- DOWNEY, B. R. (1980) Regulation of the estrous cycle in domestic animals-- a review. *Can Vet J*, 21, 301-6.
- DUTERTRE, M., GRATADOU, L., DARDENNE, E., GERMANN, S., SAMAAN, S., LIDEREAU, R., DRIOUCH, K., DE LA GRANGE, P. & AUBOEUF, D. (2010) Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Res*, 70, 3760-70.
- DZIUK, P. (1985) Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J Reprod Fertil Suppl*, 33, 57-63.
- EICKBUSH, T. H. & MOUDRIANAKIS, E. N. (1978) The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, 17, 4955-64.
- EISENBERG, E. & LEVANON, E. Y. (2003) Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet*, 19, 362-5.
- EPPIG, J. J., O'BRIEN, M. & WIGGLESWORTH, K. (1996) Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev*, 44, 260-73.
- ERIKSON, D. W., BURGHARDT, R. C., BAYLESS, K. J. & JOHNSON, G. A. (2009) Secreted phosphoprotein 1 (SPP1, osteopontin) binds to integrin alpha v beta 6 on porcine trophectoderm cells and integrin alpha v beta 3 on uterine luminal epithelial cells, and promotes trophectoderm cell adhesion and migration. *Biol Reprod*, 81, 814-25.
- ESBENSHADE, K. L., ZIECIK, A. J. & BRITT, J. H. (1990) Regulation and action of gonadotrophins in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 40, 19-32.
- EVANS, G., DOBIAS, M., KING, G. J. & ARMSTRONG, D. T. (1983) Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. *Biol Reprod*, 28, 322-8.
- EVANS, J. P., SCHULTZ, R. M. & KOPF, G. S. (1995) Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 10), 3267-78.
- FAINSOD, A., BOGARAD, L. D., RUUSALA, T., LUBIN, M., CROTHERS, D. M. & RUDDLE, F. H. (1986) The homeo domain of a murine protein binds 5' to its own homeo box. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 9532-6.
- FARIN, C. E., MOELLER, C. L., MAYAN, H., GAMBONI, F., SAWYER, H. R. & NISWENDER, G. D. (1988) Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 38, 413-21.

## Literaturverzeichnis

- FARIN, C. E., MOELLER, C. L., SAWYER, H. R., GAMBONI, F. & NISWENDER, G. D. (1986) Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*, 35, 1299-308.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, R., RAMIREZ, M. A., BILBAO, A., DE FONSECA, F. R. & GUTIERREZ-ADAN, A. (2007) Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev*, 74, 1149-56.
- FISCHER, H. E., BAZER, F. W. & FIELDS, M. J. (1985) Steroid metabolism by endometrial and conceptus tissues during early pregnancy and pseudopregnancy in gilts. *J Reprod Fertil*, 75, 69-78.
- FITZ, T. A., MAYAN, M. H., SAWYER, H. R. & NISWENDER, G. D. (1982) Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 27, 703-11.
- FLOOD, P. F. (1974) Steroid-metabolizing enzymes in the early pig conceptus and in the related endometrium. *J Endocrinol*, 63, 413-4.
- FLOYD-SMITH, G., WANG, Q. & SEN, G. C. (1999) Transcriptional induction of the p69 isoform of 2',5'-oligoadenylate synthetase by interferon-beta and interferon-gamma involves three regulatory elements and interferon-stimulated gene factor 3. *Exp Cell Res*, 246, 138-47.
- FORD, S. P., CHRISTENSON, R. K. & FORD, J. J. (1982) Uterine blood flow and uterine arterial, venous and luminal concentrations of oestrogens on days 11, 13 and 15 after oestrus in pregnant and non-pregnant sows. *J Reprod Fertil*, 64, 185-90.
- FRASER, L. R. (1982) p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J Reprod Fertil*, 65, 185-94.
- GAITSKHOKI, V. S. (1979) [Molecular organization of eukaryotic informational RNA]. *Mol Biol (Mosk)*, 13, 725-51.
- GALWAY, A. B., LAPOLT, P. S., TSAFRIRI, A., DARGAN, C. M., BOIME, I. & HSUEH, A. J. (1990) Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 127, 3023-8.
- GAMA, A. & SCHMITT, F. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int*, 2012, 357187.
- GAO, C. & WANG, Y. Global impact of RNA splicing on transcriptome remodeling in the heart. (2012) *J Zhejiang Univ Sci B*, 13, 603-8.
- GAO, J., MAZELLA, J. & TSENG, L. (2002) Hox proteins activate the IGFBP-1 promoter and suppress the function of hPR in human endometrial cells. *DNA Cell Biol*, 21, 819-25.
- GAO, Y., JAMMES, H., RASMUSSEN, M. A., OESTRUP, O., BEAUJEAN, N., HALL, V. & HYTTEL, P. Epigenetic regulation of gene expression in porcine epiblast, hypoblast, trophectoderm and epiblast-derived neural progenitor cells. *Epigenetics*, 6, 1149-61.
- GARCIA-FERNANDEZ, J. (2005) Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity (Edinb)*, 94, 145-52.
- GARLOW, J. E., KA, H., JOHNSON, G. A., BURGHARDT, R. C., JAEGER, L. A. & BAZER, F. W. (2002) Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod*, 66, 718-25.
- GEHRING, W. J. & HIROMI, Y. (1986) Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet*, 20, 147-73.
- GEISERT, R. D., BROOKBANK, J. W., ROBERTS, R. M. & BAZER, F. W. (1982a) Establishment of pregnancy in the pig: II. Cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biol Reprod*, 27, 941-55.

## Literaturverzeichnis

- GEISERT, R. D., RENEGAR, R. H., THATCHER, W. W., ROBERTS, R. M. & BAZER, F. W. (1982b) Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biol Reprod*, 27, 925-39.
- GEISERT, R. D., ZAVY, M. T., MOFFATT, R. J., BLAIR, R. M. & YELLIN, T. (1990) Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 40, 293-305.
- GODKIN, J. D., ROBERTS, M. P., ELGAYYAR, M., GUAN, W. & TITHOF, P. K. (2008) Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production. *Reprod Biol Endocrinol*, 6, 44.
- GOECKS, J., NEKRUTENKO, A. & TAYLOR, J. (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*, 11, R86.
- GOLDRATH, A. W., LUCKEY, C. J., PARK, R., BENOIST, C. & MATHIS, D. (2004) The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16885-90.
- GRAHAM, C. F. & DEUSSEN, Z. A. (1978) Features of cell lineage in preimplantation mouse development. *J Embryol Exp Morphol*, 48, 53-72.
- GRANT, S. A., HUNTER, M. G. & FOXCROFT, G. R. (1989) Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J Reprod Fertil*, 86, 171-83.
- GRAY, C. A., BARTOL, F. F., TARLETON, B. J., WILEY, A. A., JOHNSON, G. A., BAZER, F. W. & SPENCER, T. E. (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*, 65, 1311-23.
- GREEN, D. P. (1997) Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*, 2, 147-56.
- GREER, S., HONEYWELL, R., GELETU, M., ARULANANDAM, R. & RAPTIS, L. (2010) Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J Immunol Methods*, 355, 76-9.
- GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, C. G., RISEBROUGH, R. W. & WATSON, J. D. (1961) Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli. *Nature*, 190, 581-5.
- GUMBINER, B. M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84, 345-57.
- GUTHRIE, H. D., BARBER, J. A., LEIGHTON, J. K. & HAMMOND, J. M. (1994) Steroidogenic cytochrome P450 enzyme messenger ribonucleic acids and follicular fluid steroids in individual follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod*, 51, 465-71.
- GUTHRIE, H. D., BOLT, D. J. & COOPER, B. S. (1990) Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J Anim Sci*, 68, 3719-26.
- GUTHRIE, H. D., GRIMES, R. W., COOPER, B. S. & HAMMOND, J. M. (1995) Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci*, 73, 2834-44.
- GUTHRIE, H. D., PURSEL, V. G., BOLT, D. J. & COOPER, B. S. (1993) Expression of a bovine growth hormone transgene inhibits pregnant mare's serum gonadotropin-induced follicle maturation in prepuberal gilts. *J Anim Sci*, 71, 3409-13.
- GUTHRIE, H. D. & REXROAD, C. E., JR. (1980) Progesterone secretion and prostaglandin F release in vitro by endometrial and luteal tissue of cyclic pigs. *J Reprod Fertil*, 60, 157-63.



## Literaturverzeichnis

- HAFEZ, E. S. & WHITE, I. G. (1967) Endometrial and embryonic enzymes in relation to implantation of the rabbit blastocyst. *Anat Rec*, 159, 273-9.
- HALBERT, S. A., SZAL, S. E. & BRODERSON, S. H. (1988) Anatomical basis of a passive mechanism for ovum retention at the ampulloisthmic junction. *Anat Rec*, 221, 841-5.
- HALL, J. A., DAILEY, R. A., INSKEEP, E. K. & LEWIS, P. E. (1993) Influence of the corpus luteum of pregnancy on ovarian function in postpartum ewes. *J Anim Sci*, 71, 3067-72.
- HARVEY, R. P., TABIN, C. J. & MELTON, D. A. (1986) Embryonic expression and nuclear localization of *Xenopus* homeobox (Xhox) gene products. *EMBO J*, 5, 1237-44.
- HECHT, D., ZIMMERMAN, N., BEDFORD, M., AVIVI, A. & YAYON, A. (1995) Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth Factors*, 12, 223-33.
- HEHNKE, K. E., CHRISTENSON, L. K., FORD, S. P. & TAYLOR, M. (1994) Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. *Biol Reprod*, 50, 10-5.
- HERRMANN, H. (1969) Mechanisms of cell specialization. *Invest Ophthalmol*, 8, 17-25.
- HINSCH, E., HAGELE, W., SCHILL, W. B. & HINSCH, K. D. (1997) The zona pellucida "receptors". *Adv Exp Med Biol*, 424, 313-28.
- HINSCH, K. D. & HINSCH, E. (1999) The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3. *Andrologia*, 31, 320-2.
- HSUEH, A. J., ADASHI, E. Y., JONES, P. B. & WELSH, T. H., JR. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5, 76-127.
- HUANG, L. P., YU, Y. H., SHENG, C. & WANG, S. H. (2012) Up-regulation of cadherin 17 and down-regulation of homeodomain protein CDX2 correlate with tumor progression and unfavorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22, 1170-6.
- HUMPHRIES, M. J. (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28, 311-39.
- HUNTER, R. H. (1974) Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anat Rec*, 178, 169-85.
- IKAWA, M., INOUE, N., BENHAM, A. M. & OKABE, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest*, 120, 984-94.
- IRITANI, A., SATO, E. & NISHIKAWA, Y. (1974) Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci*, 39, 582-8.
- IVANOV, P. D., KOMSA-PENKOVA, R. S., KONOVA, E. I., TSVYATKOVSKA, T. M., KOVACHEVA, K. S., SIMEONOVA, M. N. & TANCHEV, S. Y. (2012) Polymorphism A1/A2 in the cell surface integrin subunit beta3 and disturbance of implantation and placentation in women with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 94, 2843-5.
- JIA, X. C., KESSEL, B., WELSH, T. H., JR. & HSUEH, A. J. (1985) Androgen inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 117, 13-22.
- JOHNSON, G. A., BAZER, F. W., BURGHARDT, R. C., SPENCER, T. E., WU, G. & BAYLESS, K. J. (2009) Conceptus-uterus interactions in pigs: endometrial gene expression in response to estrogens and interferons from conceptuses. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 66, 321-32.
- JOHNSON, G. A., BURGHARDT, R. C., BAZER, F. W. & SPENCER, T. E. (2003) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod*, 69, 1458-71.

## Literaturverzeichnis

- JONES, D. H., LOONEY, R. J. & ANDERSON, C. L. (1985) Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength. *J Immunol*, 135, 3348-53.
- JOYCE, M. M., BURGHARDT, J. R., BURGHARDT, R. C., HOOPER, R. N., JAEGER, L. A., SPENCER, T. E., BAZER, F. W. & JOHNSON, G. A. (2007a) Pig conceptuses increase uterine interferon-regulatory factor 1 (IRF1), but restrict expression to stroma through estrogen-induced IRF2 in luminal epithelium. *Biol Reprod*, 77, 292-302.
- JOYCE, M. M., BURGHARDT, R. C., GEISERT, R. D., BURGHARDT, J. R., HOOPER, R. N., ROSS, J. W., ASHWORTH, M. D. & JOHNSON, G. A. (2007b) Pig conceptuses secrete estrogen and interferons to differentially regulate uterine STAT1 in a temporal and cell type-specific manner. *Endocrinology*, 148, 4420-31.
- JOYCE, M. M., WHITE, F. J., BURGHARDT, R. C., MUNIZ, J. J., SPENCER, T. E., BAZER, F. W. & JOHNSON, G. A. (2005) Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. *Endocrinology*, 146, 675-84.
- KAJIKAWA, M., BABA, T., TOMARU, U., WATANABE, Y., KOGANEI, S., TSUJI-KAWAHARA, S., MATSUMOTO, N., YAMAMOTO, K., MIYAZAWA, M., MAENAKA, K., ISHIZU, A. & KASAHARA, M. (2006) MHC class I-like MILL molecules are beta2-microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. *J Immunol*, 177, 3108-15.
- KELLY, S. J., MULNARD, J. G. & GRAHAM, C. F. (1978) Cell division and cell allocation in early mouse development. *J Embryol Exp Morphol*, 48, 37-51.
- KENNEDY, C. R., XIONG, H., RAHAL, S., VANDERLUIT, J., SLACK, R. S., ZHANG, Y., GUAN, Y., BREYER, M. D. & HEBERT, R. L. (2007) Urine concentrating defect in prostaglandin EP1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F868-75.
- KESSEL, B., LIU, Y. X., JIA, X. C. & HSUEH, A. J. (1985) Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod*, 32, 1038-50.
- KEYS, J. L. & KING, G. J. (1988) Morphological evidence for increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig. *Biol Reprod*, 39, 473-87.
- KHOSRAVI, S., ALAVIAN, S. M., ZARE, A., DARYANI, N. E., FERESHTEHNEJAD, S. M., KERAMATI, M. R., ABDOLLAHZADE, S. & TABA TABA VAKILI, S. Non-alcoholic fatty liver disease and correlation of serum alanin aminotransferase level with histopathologic findings. *Hepat Mon*, 11, 452-8.
- KIM, E., YAMASHITA, M., KIMURA, M., HONDA, A., KASHIWABARA, S. & BABA, T. (2008) Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol*, 52, 677-82.
- KIM, M. K., LESOON-WOOD, L. A., WEINTRAUB, B. D. & CHUNG, J. H. (1996) A soluble transcription factor, Oct-1, is also found in the insoluble nuclear matrix and possesses silencing activity in its alanine-rich domain. *Mol Cell Biol*, 16, 4366-77.
- KNOX, R. V. (2005) Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest Anim Endocrinol*, 29, 385-97.
- KNUDSEN, K. A. & WHEELOCK, M. J. (2005) Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem*, 95, 488-96.
- KONDRASHOV, A. S. (1993) Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *J Hered*, 84, 372-87.

## Literaturverzeichnis

- KOTENKO, S. V. (2002) The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 223-40.
- KURASAWA, S., SCHULTZ, R. M. & KOPF, G. S. (1989) Egg-induced modifications of the zona pellucida of mouse eggs: effects of microinjected inositol 1,4,5-trisphosphate. *Dev Biol*, 133, 295-304.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-8.
- LAUGHON, A. & SCOTT, M. P. (1984) Sequence of a Drosophila segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature*, 310, 25-31.
- LEE, D. Y., HAYES, J. J., PRUSS, D. & WOLFFE, A. P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72, 73-84.
- LEE, N. P., POON, R. T., SHEK, F. H., NG, I. O. & LUK, J. M. (2010) Role of cadherin-17 in oncogenesis and potential therapeutic implications in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1806, 138-45.
- LEI, Z. M., CHEGINI, N. & RAO, C. V. (1991) Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod*, 44, 1148-56.
- LEWIS, E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*, 276, 565-70.
- LEWIS, G. S. & WATERMAN, R. A. (1983) Metabolism of arachidonic acid in vitro by porcine blastocysts and endometrium. *Prostaglandins*, 25, 871-80.
- LI, C. B., HU, L. L., WANG, Z. D., ZHONG, S. Q. & LEI, L. (2009) [Regulation of compaction initiation in mouse embryo]. *Yi Chuan*, 31, 1177-84.
- LIU, J., ARONOW, B. J., WITTE, D. P., POPE, W. F. & LA BARBERA, A. R. (1998) Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol Reprod*, 58, 648-58.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LUGER, K., MADER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. & RICHMOND, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-60.
- MAGLI, M. C., LARGMAN, C. & LAWRENCE, H. J. (1997) Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol*, 173, 168-77.
- MARDIS, E. R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 387-402.
- MARGULIES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W. E., ATTIYA, S., BADER, J. S., BEMBEN, L. A., BERKA, J., BRAVERMAN, M. S., CHEN, Y. J., CHEN, Z., DEWELL, S. B., DU, L., FIERRO, J. M., GOMES, X. V., GODWIN, B. C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C. H., IRZYK, G. P., JANDO, S. C., ALLENQUER, M. L., JARVIE, T. P., JIRAGE, K. B., KIM, J. B., KNIGHT, J. R., LANZA, J. R., LEAMON, J. H., LEFKOWITZ, S. M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K. L., LU, H., MAKHIJANI, V. B., MCDADE, K. E., MCKENNA, M. P., MYERS, E. W., NICKERSON, E., NOBILE, J. R., PLANT, R., PUC, B. P., RONAN, M. T., ROTH, G. T., SARKIS, G. J., SIMONS, J. F., SIMPSON, J. W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K. R., TOMASZ, A., VOGT, K. A., VOLKMER, G. A., WANG, S. H., WANG, Y., WEINER, M. P., YU, P., BEGLEY, R. F. & ROTHBERG, J. M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-80.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 560-4.

## Literaturverzeichnis

- MBURU, J. N., EINARSSON, S., DALIN, A. M. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1995) Ovulation as determined by transrectal ultrasonography in multiparous sows: relationships with oestrous symptoms and hormonal profiles. *Zentralbl Veterinarmed A*, 42, 285-92.
- MCGHEE, J. D., FELSENFELD, G. & EISENBERG, H. (1980) Nucleosome structure and conformational changes. *Biophys J*, 32, 261-70.
- MCGINNIS, W., HART, C. P., GEHRING, W. J. & RUDDLE, F. H. (1984a) Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell*, 38, 675-80.
- MCGINNIS, W., LEVINE, M. S., HAFEN, E., KUROIWA, A. & GEHRING, W. J. (1984b) A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308, 428-33.
- MCGUIRE, W. J., JUENGEL, J. L. & NISWENDER, G. D. (1994) Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol Reprod*, 51, 800-6.
- MCLAUGHLIN, C. S., WARNER, J. R., EDMONDS, M., NAKAZATO, H. & VAUGHAN, M. H. (1973) Polyadenylic acid sequences in yeast messenger ribonucleic acid. *J Biol Chem*, 248, 1466-71.
- MCLESKEY, S. B., DOWDS, C., CARBALLADA, R., WHITE, R. R. & SALING, P. M. (1998) Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol*, 177, 57-113.
- MERKL, M., ULBRICH, S. E., OTZDORFF, C., HERBACH, N., WANKE, R., WOLF, E., HANDLER, J. & BAUERSACHS, S. (2010) Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. *Biol Reprod*, 83, 874-86.
- MILLER, J., MCLACHLAN, A. D. & KLUG, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 4, 1609-14.
- MIYAKAWA, K., HATSUZAWA, K., KUROKAWA, T., ASADA, M., KUROIWA, T. & IMAMURA, T. (1999) A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem*, 274, 29352-7.
- MORBECK, D. E., ESBENSHADE, K. L., FLOWERS, W. L. & BRITT, J. H. (1992) Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol Reprod*, 47, 485-91.
- MUELLER, A., SIEMER, J., RENNER, S., HOFFMANN, I., MALTARIS, T., BINDER, H., BECKMANN, M. W. & DITTRICH, R. (2006) Perfused non-pregnant swine uteri: a model for evaluating transport mechanisms to the side bearing the dominant follicle in humans. *J Reprod Dev*, 52, 617-24.
- MULLER, M. M., GERSTER, T. & SCHAFFNER, W. (1988) Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem*, 176, 485-95.
- MURPHY, S. P., TAYADE, C., ASHKAR, A. A., HATTA, K., ZHANG, J. & CROY, B. A. (2009) Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod*, 80, 848-59.
- 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 Fertil*, 106, 173-83.
- NICKERSON, J. A., KROCHMALNIC, G., WAN, K. M. & PENMAN, S. (1989) Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 177-81.
- NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., MCGUIRE, W. J., BELFIORE, C. J. & WILTBANK, M. C. (1994) Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod*, 50, 239-47.

## Literaturverzeichnis

- NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., SILVA, P. J., ROLLYSON, M. K. & MCINTUSH, E. W. (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev*, 80, 1-29.
- NOGUCHI, M., YOSHIOKA, K., ITOH, S., SUZUKI, C., ARAI, S., WADA, Y., HASEGAWA, Y. & KANEKO, H. (2010) Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction*, 139, 153-61.
- NOTHIAS, J. Y., MAJUMDER, S., KANEKO, K. J. & DEPAMPHILIS, M. L. (1995) Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem*, 270, 22077-80.
- OGBOURNE, S. & ANTALIS, T. M. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*, 331 ( Pt 1), 1-14.
- OSTRUP, E., BAUERSACHS, S., BLUM, H., WOLF, E. & HYTTEL, P. (2010) Differential endometrial gene expression in pregnant and nonpregnant sows. *Biol Reprod*, 83, 277-85.
- PADGETT, R. A., KONARSKA, M. M., AEBI, M., HORNIG, H., WEISSMANN, C. & SHARP, P. A. (1985) Nonconsensus branch-site sequences in the in vitro splicing of transcripts of mutant rabbit beta-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8349-53.
- PALERMO, G. D., COLOMBERO, L. T. & ROSENWAKS, Z. (1997) The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod*, 2, 19-27.
- PICTON, H. M., MILLER, A. T. & HUNTER, M. G. (1999) Effect of FSH infusion on follicle development in GnRH agonist-treated gilts. *J Reprod Fertil*, 117, 249-57.
- POINDEXTER, N. J., WALCH, E. T., CHADA, S. & GRIMM, E. A. (2005) Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*, 78, 745-52.
- POLGE, C., ROWSON, L. E. & CHANG, M. C. (1966) The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil*, 12, 395-7.
- POPE, W. F. (1988) Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol Reprod*, 39, 999-1003.
- PRATHER, R. S. & FIRST, N. L. (1988) A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. *J Anim Sci*, 66, 2626-35.
- PUSATERI, A. E., ROTHSCHILD, M. F., WARNER, C. M. & FORD, S. P. (1990) Changes in morphology, cell number, cell size and cellular estrogen content of individual littermate pig conceptuses on days 9 to 13 of gestation. *J Anim Sci*, 68, 3727-35.
- REVEST, J. M., DEMOERLOOZE, L. & DICKSON, C. (2000) Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem*, 275, 8083-90.
- REYNOLDS, L. P., BOROWICZ, P. P., VONNAHME, K. A., JOHNSON, M. L., GRAZUL-BILSKA, A. T., REDMER, D. A. & CATON, J. S. (2005a) Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol*, 565, 43-58.
- REYNOLDS, L. P., BOROWICZ, P. P., VONNAHME, K. A., JOHNSON, M. L., GRAZUL-BILSKA, A. T., WALLACE, J. M., CATON, J. S. & REDMER, D. A. (2005b) Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, 26, 689-708.
- RICKE, W. A., REDMER, D. A. & REYNOLDS, L. P. (1999) Growth and cellular proliferation of pig corpora lutea throughout the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*, 117, 369-77.
- ROBERTS, R. M., XIE, S. & MATHIALAGAN, N. (1996) Maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod*, 54, 294-302.

## Literaturverzeichnis

- ROSS, J. W., ASHWORTH, M. D., STEIN, D. R., COUTURE, O. P., TUGGLE, C. K. & GEISERT, R. D. (2009) Identification of differential gene expression during porcine conceptus rapid trophoblastic elongation and attachment to uterine luminal epithelium. *Physiol Genomics*, 36, 140-8.
- RUBIO, M. A. & HOPPER, A. K. Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2, 802-17.
- SAITO, S. (2001) Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol*, 52, 15-33.
- SANA, T. R., JANATPOUR, M. J., SATHE, M., MCEVOY, L. M. & MCCLANAHAN, T. K. (2005) Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine*, 29, 256-69.
- SANGER, F. & COULSON, A. R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-8.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SANTORO, C., MERMOD, N., ANDREWS, P. C. & TJIAN, R. (1988) A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature*, 334, 218-24.
- SAVINKOVA, L. K., PONOMARENKO, M. P., PONOMARENKO, P. M., DRACHKOVA, I. A., LYSOVA, M. V., ARSHINOVA, T. V. & KOLCHANOV, N. A. (2009) TATA box polymorphisms in human gene promoters and associated hereditary pathologies. *Biochemistry (Mosc)*, 74, 117-29.
- SCHNURRBUSCH, U., ELZE, K. & ERICES, J. (1977) [Histological findings on the uterus of gilts following synchronized ovulation]. *Arch Exp Veterinarmed*, 31, 905-12.
- SCOTT, M. P. & O'FARRELL, P. H. (1986) Spatial programming of gene expression in early Drosophila embryogenesis. *Annu Rev Cell Biol*, 2, 49-80.
- SEGERER, S., KAMMERER, U., KAPP, M., DIETL, J. & RIEGER, L. (2009) Upregulation of chemokine and cytokine production during pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 67, 145-50.
- SHERWIN, J. R., FREEMAN, T. C., STEPHENS, R. J., KIMBER, S., SMITH, A. G., CHAMBERS, I., SMITH, S. K. & SHARKEY, A. M. (2004) Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol*, 18, 2185-95.
- SIMEONE, A., PANNESE, M., ACAMPORA, D., D'ESPOSITO, M. & BONCINELLI, E. (1988) At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucleic Acids Res*, 16, 5379-90.
- SIMÕES, C. C., MELO, J. O., MAGALHAES, J. V. & GUIMARAES, C. T. (2012) Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. *Genet Mol Res*, 11, 1949-57.
- SINOWATZ, F., TOPFER-PETERSEN, E., KOLLE, S. & PALMA, G. (2001) Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol*, 30, 257-63.
- SLOMCZYNSKA, M. & WOZNIAK, J. (2001) Differential distribution of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the porcine ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109, 238-44.
- SMITH, A. G. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 435-62.
- SMITH, H. C. & SOWDEN, M. P. (1996) Base-modification mRNA editing through deamination--the good, the bad and the unregulated. *Trends Genet*, 12, 418-24.
- SOEDE, N. M., LANGENDIJK, P. & KEMP, B. (2011) Reproductive cycles in pigs. *Anim Reprod Sci*, 124, 251-8.

## Literaturverzeichnis

- SPENCER, T. E., BARTOL, F. F., BAZER, F. W., JOHNSON, G. A. & JOYCE, M. M. (1999) Identification and characterization of glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1-like protein expression in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 60, 241-50.
- SPENCER, T. E., BURGHARDT, R. C., JOHNSON, G. A. & BAZER, F. W. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 537-50.
- SPENCER, T. E., HAYASHI, K., HU, J. & CARPENTER, K. D. (2005) Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol*, 68, 85-122.
- SPENCER, T. E., JOHNSON, G. A., BAZER, F. W., BURGHARDT, R. C. & PALMARINI, M. (2007) Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19, 65-78.
- SPENCER, T. E., SANDRA, O. & WOLF, E. (2008) Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135, 165-79.
- STAMBAUGH, R. & BUCKLEY, J. (1969) Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 19, 423-32.
- STANDAERT, F. E., ZAMORA, C. S. & CHEW, B. P. (1991) Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am J Reprod Immunol*, 25, 163-8.
- STONE, B. A. & SEAMARK, R. F. (1985) Steroid hormones in uterine washings and in plasma of gilts between days 9 and 15 after oestrus and between days 9 and 15 after coitus. *J Reprod Fertil*, 75, 209-21.
- STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J. & FUTREAL, P. A. (2009) The cancer genome. *Nature*, 458, 719-24.
- STROBAND, H. W. & VAN DER LENDE, T. (1990) Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 40, 261-77.
- SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V. K., MUKHERJEE, S., EBERT, B. L., GILLETTE, M. A., PAULOVICH, A., POMEROY, S. L., GOLUB, T. R., LANDER, E. S. & MESIROV, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15545-50.
- TABIN, C. J. (1992) Why we have (only) five fingers per hand: hox genes and the evolution of paired limbs. *Development*, 116, 289-96.
- TAKEICHI, M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, 59, 237-52.
- TAKEICHI, M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-5.
- TALBOT, P. & DANDEKAR, P. (2003) Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech*, 61, 349-57.
- TOKYOL, C., AKTEPE, F., HUSNIYE DILEK, F. & YILMAZER, M. (2008) Comparison of placental PTEN and beta1 integrin expression in early spontaneous abortion, early and late normal pregnancy. *Ups J Med Sci*, 113, 235-42.
- TOPFER-PETERSEN, E., DOSTALOVA, Z. & CALVETE, J. J. (1997) The role of carbohydrates in sperm-egg interaction. *Adv Exp Med Biol*, 424, 301-10.
- TSAI, S. J., WU, M. H., CHEN, H. M., CHUANG, P. C. & WING, L. Y. (2002) Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology*, 143, 2715-21.

## Literaturverzeichnis

- TSANG, B. K., AINSWORTH, L., DOWNEY, B. R. & ARMSTRONG, D. T. (1979) Pre-ovulatory changes in cyclic AMP and prostaglandin concentrations in follicular fluid of gilts. *Prostaglandins*, 17, 141-8.
- TSANG, B. K., ARODI, J., LI, M., AINSWORTH, L., SRIKANDAKUMAR, A. & DOWNEY, B. R. (1988) Gonadotropic regulation of prostaglandin production by ovarian follicular cells of the pig. *Biol Reprod*, 38, 627-35.
- TULSIANI, D. R., YOSHIDA-KOMIYA, H. & ARAKI, Y. (1997) Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*, 57, 487-94.
- USHEVA, A., MALDONADO, E., GOLDRING, A., LU, H., HOUBAVI, C., REINBERG, D. & ALONI, Y. (1992) Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell*, 69, 871-81.
- VAN BOXEL-DEZAIRE, A. H., RANI, M. R. & STARK, G. R. (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*, 25, 361-72.
- VANARSALL, A. L., RYCKMAN, B. J., CHASE, M. C. & JOHNSON, D. C. (2008) Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *J Virol*, 82, 11837-50.
- WACLAWIK, A. Novel insights into the mechanisms of pregnancy establishment: regulation of prostaglandin synthesis and signaling in the pig. *Reproduction*, 142, 389-99.
- WACLAWIK, A., BLITEK, A., KACZMAREK, M. M., KIEWISZ, J. & ZIECIK, A. J. (2009a) Antiluteolytic mechanisms and the establishment of pregnancy in the pig. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 66, 307-20.
- WACLAWIK, A., JABBOUR, H. N., BLITEK, A. & ZIECIK, A. J. (2009b) Estradiol-17beta, prostaglandin E2 (PGE2), and the PGE2 receptor are involved in PGE2 positive feedback loop in the porcine endometrium. *Endocrinology*, 150, 3823-32.
- WACLAWIK, A., RIVERO-MULLER, A., BLITEK, A., KACZMAREK, M. M., BROKKEN, L. J., WATANABE, K., RAHMAN, N. A. & ZIECIK, A. J. (2006) Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology*, 147, 210-21.
- WACLAWIK, A. & ZIECIK, A. J. (2007) Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig. *J Endocrinol*, 194, 499-510.
- WALKER, C. G., MEIER, S., LITTLEJOHN, M. D., LEHNERT, K., ROCHE, J. R. & MITCHELL, M. D. (2010) Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics*, 11, 474.
- WANG, L. J., PASCOE, V., PETRUCCO, O. M. & NORMAN, R. J. (1992) Distribution of leukocyte subpopulations in the human corpus luteum. *Hum Reprod*, 7, 197-202.
- WARD, C. R., STOREY, B. T. & KOPF, G. S. (1994) Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem*, 269, 13254-8.
- WATSON, J. D. & CRICK, F. H. (1953a) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-8.
- WATSON, J. D. & CRICK, F. H. (1953b) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18, 123-31.
- WHELOCK, M. J., SOLER, A. P. & KNUDSEN, K. A. (2001) Cadherin junctions in mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6, 275-85.



## Literaturverzeichnis

- WHITE, F. J., ROSS, J. W., JOYCE, M. M., GEISERT, R. D., BURGHARDT, R. C. & JOHNSON, G. A. (2005) Steroid regulation of cell specific secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) expression in the pregnant porcine uterus. *Biol Reprod*, 73, 1294-301.
- WHITEHEAD, M. W., HAWKES, N. D., HAINSWORTH, I. & KINGHAM, J. G. (1999) A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin. *Gut*, 45, 129-33.
- WICKENS, M. (1990) How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci*, 15, 277-81.
- WIESAK, T. (1989) Effect of pregnancy, injection of oestradiol benzoate or hCG on steroid concentration and release by pig luteal cells. *J Reprod Fertil*, 86, 247-54.
- WIESAK, T., HUNTER, M. G. & FOXCROFT, G. R. (1992) Effect of prostaglandins on luteal function during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil*, 95, 831-40.
- WILDMAN, D. E., CHEN, C., EREZ, O., GROSSMAN, L. I., GOODMAN, M. & ROMERO, R. (2006) Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3203-8.
- XIA, P., RUTLEDGE, J., WATSON, A. J. & ARMSTRONG, D. T. (1996) Effect of estrogen-treated porcine ampulla oviductal epithelial cells on early embryonic development in vitro and characterization of their protein synthetic activity. *Anim Reprod Sci*, 45, 217-29.
- XIE, M. H., AGGARWAL, S., HO, W. H., FOSTER, J., ZHANG, Z., STINSON, J., WOOD, W. I., GODDARD, A. D. & GURNEY, A. L. (2000) Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem*, 275, 31335-9.
- YANG, P. L., ALTHAGE, A., CHUNG, J., MAIER, H., WIELAND, S., ISOGAWA, M. & CHISARI, F. V. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 798-802.
- YELICH, J. V., POMP, D. & GEISERT, R. D. (1997) Ontogeny of elongation and gene expression in the early developing porcine conceptus. *Biol Reprod*, 57, 1256-65.
- YUAN, W., CONNOR, M. L. & BUHR, M. M. (1993) Responsiveness of porcine large and small luteal cells to luteotropic or luteolytic hormones and cell morphologic changes during the estrous cycle and pregnancy. *J Anim Sci*, 71, 481-91.
- ZAHLER, A. M. (2012) Pre-mRNA splicing and its regulation in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-21.
- ZHANG, J. Z., CHEN, D. Y., WU, S., HARKE, H. R. & DOVICH, N. J. (1991) High-sensitivity laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 37, 1492-6.
- ZERNICKA-GOETZ, M. (2005) Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 919-28.
- ZHENG, F., MA, L., SHAO, L., WANG, G., CHEN, F., ZHANG, Y. & YANG, S. (2007) Envelope glycoproteins of hantavirus can mediate cell-cell fusion independently. *New Microbiol*, 30, 101-7.
- ZIECIK, A., SHAW, H. J. & FLINT, A. P. (1980) Luteal LH receptors during the oestrous cycle and early pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil*, 60, 129-37.
- ZIECIK, A. J. (2002) Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig. *Domest Anim Endocrinol*, 23, 265-75.

## **13 Danksagung:**

Am Ende meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre.

Herrn PD Dr. Stefan Bauersachs für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit und die Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie die immer hilfreichen Erklärungen und die unendliche Geduld bei allen Fragen.

Frau Univ.-Prof. A. Schnieke für das Vertreten der Arbeit vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Wolf für die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Herrn Dr. Blum für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die vielen hilfreichen Tipps und Diskussionen.

Herrn Dr. Stefan Krebs für die engelhafte Geduld bei allen Fragen und die stete Hilfsbereitschaft.

Alexander Graf für alle hilfreichen Tipps und Tricks rund um den Computer und das weite Feld der Bioinformatik.

Ich danke auch Karin Groß für die Freundschaft, wie auch tatkräftige Hilfe und Rat in allen Fragen.

Frau Sylvia Mallock und Frau Andrea Klanner für die Einführung in die Laborarbeitstechniken, die stete Geduld und die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Ich danke Dr. Susanne Ulbrich für die vielen informativen Gespräche, die Unterstützung bei der Probennahme und für ihr offenes Ohr bei allen Fragen.

Frau Dr. Barbara Kessler und Herrn Christian Erdle danke ich sehr für die Vorbereitung der Tiere.

Dr. Myriam Reichenbach und Dr. Horst-Dieter Reichenbach für die freundschaftliche bei der Probennahme.

Ich danke dem Team des Versuchsschlachthauses der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Abteilung Versuchsstationen (AVS), in Grub und natürlich allen Mitarbeitern des Tierstalls am Lehrstuhl für molekulare Tierzucht für die Vorbereitung und Betreuung der Tiere.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Genzentrum. Sie haben mich in der Zeit meiner Dissertation immer mit Rat und Tat begleitet.

Ich bedanke mich sehr bei meinen Eltern, für die Liebe und Geduld, die finanzielle Unterstützung und dass sie immer an mich geglaubt haben.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Freund Mike. Ohne dessen Geduld, auch in schwierigen Situationen, das alles nicht zu meistern gewesen wäre und der immer an das Gelingen dieser Dissertation geglaubt hat und mich mit allen Mitteln unterstützt hat.

Den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern und Mike, möchte ich diese vorliegende Arbeit widmen.