

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität

Wrenzycki C

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2007; 4 (5), 234-239

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität

C. Wrenzycki

Techniken zur Analyse der mRNA-Expression stellen ein leistungsstarkes Werkzeug zum Nachweis der Häufigkeiten entwicklungsrelevanter Gentranskripte in Verbindung mit der Eizell- und/oder Embryonenqualität dar. Zahlreiche Bestrebungen zur Identifikation von Markergenen bezüglich der Entwicklungskompetenz der Eizellen und Embryonen des Rindes sind mittels verschiedenster Strategien durchgeführt worden. Der präimplantatorische Rinderembryo ist zunächst unter der Kontrolle maternalen genomischer Informationen, die während der Oogenese synthetisiert werden. Anschließend ist die Entwicklung von neuen Genprodukten abhängig, die vom embryonalen Genom nach dessen Aktivierung produziert werden.

Weiterhin können die frühen Entwicklungsprozesse wie Reifung, Befruchtung, Zeitpunkt der ersten Teilung, Aktivierung des embryonalen Genoms, Kompaktierung und Blastozoenbildung durch die verwendeten Kulturmedien und -bedingungen sowie durch die Manipulationsprozedur selbst beeinflusst werden. Diese Störungen wiederum können die Qualität der Blastozysten dramatisch verschlechtern und die Lebensfähigkeit der resultierenden Nachkommen beeinträchtigen.

Schlüsselwörter: Embryo, Qualität, Genexpressionsmuster

Analysis of Gene Expression Patterns to Assess Embryo Quality. MessengerRNA expression techniques have become a powerful tool to analyze the relative abundance of transcripts related to oocyte and/or embryo quality. Numerous efforts to identify candidate genes for the developmental competence of bovine oocytes and embryos have been made employing different strategies. The preimplantation bovine embryo is initially under the control of maternal genomic information that is accumulated during oogenesis. Soon the genetic program of development becomes dependent upon new transcripts derived from activation of the embryonic genome. The early steps in development including maturation, fertilization, timing of first cleavage, activation of the embryonic genome, compaction, and blastocyst formation can be affected by the culture media and conditions as well as the production procedure itself. These perturbations can possibly result in a dramatic decrease of the quality of the resulting blastocysts and may even affect the viability of offspring born after transfer. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2007; 4 (5): 234–9.**

Key words: embryo, quality, gene expression patterns

Genexpression während der frühen Embryonalentwicklung

Für eine ungestörte präimplantatorische Embryonalentwicklung ist die genau abgestimmte Expression entwicklungsrelevanter Gene des maternalen und/oder embryonalen Genoms erforderlich. Während die frühe Entwicklungsphase von Genprodukten abhängig ist, die während der Oogenese synthetisiert wurden (maternal), sind die späteren Stadien auf embryonale Genprodukte angewiesen. Die Aktivierung des embryonalen Genoms erfolgt in 2 Schritten, der ersten frühen und der folgenden Hauptaktivierung. Beim Rind findet der Übergang der Kontrolle vom maternalen zum embryonalen Genom („maternal-embryonic transition“, MET) im 8- bis 16-Zellstadium statt [1]. Neuere Untersuchungen mit sensitiveren Methoden haben gezeigt, daß eine erste frühe („kleine“) Aktivierung des embryonalen Rindergenoms bereits im 2-Zellstadium nachzuweisen ist [2]. Somit können die einzelnen Transkripte unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, die in Abbildung 1 dargestellt sind.

Mit der Verfügbarkeit einer sensitiven RT-PCR-Technologie und etablierten In-vitro-Produktions- (IVP-) und so-

matischen Kerntransfer- (sNT-) Systemen beim Rind ist es heute möglich, das embryonale Genexpressionsmuster im Detail zu untersuchen. Obwohl sich die Entwicklungsraten bis zum Blastozystenstadium in den verschiedenen Kultursystemen nur wenig unterscheiden, zeigen sich wesentliche kulturbedingte Unterschiede auf der Ebene der Transkription entwicklungsrelevanter Gene.

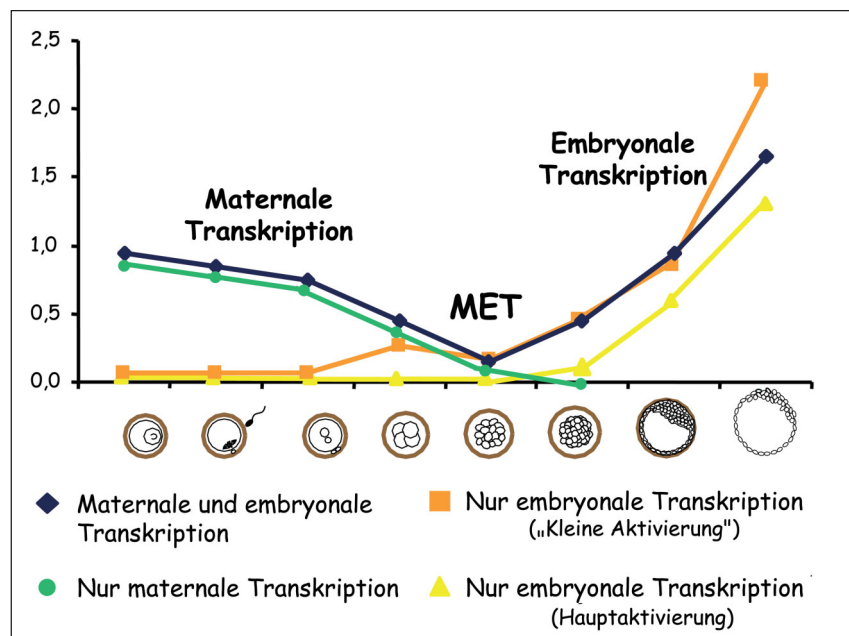


Abbildung 1: Transkriptionsverläufe während der frühen Embryonalentwicklung des Rindes.

Eingegangen am: 08.08.2007; akzeptiert nach Revision: 09.10.2007

Von der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Korrespondenzadresse: PD Dr. med. vet. Christine Wrenzycki, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, D-30173 Hannover, Bischofsholer Damm 15; E-Mail: christine.wrenzycki@tiho-hannover.de

Dieser Befund stellt das häufig verwendete Kriterium der maximal erzielten Anzahl an Blastozysten zur Beurteilung der Eignung eines Kultursystems in Frage. Auch die Morphologie läßt keine objektive Beurteilung der Embryonenqualität zu, da insbesondere IVP-Embryonen schwieriger zu evaluieren sind als solche, die in vivo gewonnen wurden [3]. Somit kann mit Hilfe des Expressionsmusters entwicklungsrelevanter Gene die Qualität von Embryonen aus IVP und nach sNT objektiver und besser evaluiert werden. Änderungen im physiologischen Genexpressionsmuster können als ein Versuch des Embryos angesehen werden, suboptimale Kulturbedingungen zu kompensieren [4–6].

Detaillierte Untersuchungen, inwieweit die beschriebenen Änderungen durch die einzelnen Teilschritte der IVP bedingt sind, haben gezeigt, daß das Reifungsprotokoll zwar die Blastozystenrate, aber nicht die Qualität der Embryonen auf mRNA-Ebene beeinflußt [7, 8].

Die Auswirkungen verschiedener Parameter auf die mRNA-Expression in Oozyten und Embryonen des Rindes sind in den Tabellen 1–3 dargestellt. Informationen über das Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gentranskripte während Eizellreifung und präimplantatorischer

Embryonalentwicklung sind somit essentiell, um die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen bei der Kontrolle der embryonalen Genexpression besser zu verstehen, verbesserte Kultursysteme zu entwickeln und die Technologien zur Erstellung transgener und geklonierter Tiere zu verfeinern.

In-vitro-Produktion von Rinderembryonen

Seit der Geburt des ersten IVP-Kalbes [48] hat die IVP boviner Embryonen enorme Fortschritte erfahren und wird bereits vielfach in der Praxis angewendet. Die IVP ist heute die Voraussetzung für den Einsatz weiterer Biotechniken, wie z. B. der Eizellgewinnung vom lebenden Tier durch transvaginale Follikelpunktion („ovum pick up“, OPU) und das Klonen durch somatischen Kerntransfer. Der Anteil an IVP-Kälbern erhöhte sich insbesondere nach der Praxiseinführung der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelpunktion. Durch die Kombination dieser beiden Biotechniken ist es möglich, auch den weiblichen Gametenpool verstärkt zu nutzen. Die aktuellen Zahlen der IETS (International Embryo Transfer Society) für das Jahr 2005 belegen dies eindrucksvoll. Insgesamt wurden weltweit mehr als 300.000 transfer-taugliche Embryonen in vitro kommerziell erstellt.

Die IVP setzt sich im wesentlichen aus 3 methodischen Schritten zusammen: der In-vitro-Reifung („in vitro maturation“, IVM), der In-vitro-Befruchtung („in vitro fertilization“, IVF) und der In-vitro-Kultur („in vitro culture“, IVC) [49].

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe für die IVM werden in der Regel aus den Ovarfollikeln geschlachteter Tiere gewonnen, wobei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Beim „Slicing“ wird die Oberfläche der Eierstöcke mit einem Vielklingenmesser längs und quer einige Millimeter tief eingeschnitten, dadurch werden die Eizellen aus den Follikeln freigesetzt. Bei der Aspiration wird aus allen sichtbaren Follikeln die Flüssigkeit samt Kumulus-Oozyten-Komplex (KOK) gewonnen. Eine Möglichkeit, die noch von Kumuluszellen umgebenen Oozyten von lebenden Tieren zu gewinnen, stellt die transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktion (OPU) dar. Die Reifungsdauer der KOK beträgt in geeigneten Medien mit Zusätzen, wie z. B. FSH (follikelstimulierendes Hormon) und EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) zwischen 18 und 27 Stunden [50].

Zur Bereitstellung einer möglichst großen Anzahl motiler Spermien für die IVF wird das „Swim-up“-Verfahren angewendet [51, 52] oder die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll eingesetzt [11, 53]. An die Kokultur der gereiften Eizellen und der Spermien, die durchschnittlich 20 Stunden beträgt, schließt sich die In-vitro-Kultur der befruchteten Eizellen bis zum gewünschten Entwicklungsstadium an. Beim Rind ist dies üblicherweise das Stadium der kompaktierten Morula oder Blastozyste am Tag 7 der Entwicklung, da erst diese Stadien unblutig auf entsprechend vorbereitete Empfängertiere übertragen werden können. Heute können bereits durchschnittliche Erfolgsraten von 85–95 % bei der IVM, 80–90 % bei der IVF und 25–40 % bei der Entwicklung bis zur Blastozyste erzielt werden, so daß bei einer Trächtigkeitsrate von 50 % 12–15 Kälber nach Transfer von IVP-Embryonen geboren werden können (unter der Maßgabe, daß mit 100 Eizellen für die IVM begonnen wurde).

Tabelle 1: Auswirkungen verschiedener Parameter auf das mRNA-Expressionsmuster in Oozyten und Embryonen des Rindes.

Parameter	Transkripthäufigkeit (Anstieg ↑ oder Abfall ↓)	Referenzen
Follikelgröße	RNApol1 ↓, PAP ↑	[9]
	CycA ↑, Dja4 ↑, Msx1 ↑, NDFIP1 ↑, Oct4 ↑, SLBP ↑, Trappc ↑, Znf198 ↑, GDF9 ↑	[10]
	DYNLL1 ↓, DYNC111 ↓	[11]
	PSNB2 ↑, SKIIP ↑, CDC5L ↑, RGS16 ↑, PROX1 ↑, H2A ↑, CKS1 ↑, PTTG1 ↑, CCNB2 ↑	[12]
Stadium des Follikelwachstums	HSP (während der In-vivo-Maturation)	[13]
	PARN ↓, MSY2 ↓, PAP ↑, eIF-4E ↑, IP3R ↑, YY1 ↓ (in Oozyten aus persistierenden Follikeln)	[14]
Stadium der In-vitro-Maturation (GVBD-MII)	VEGF ↓, Rezeptoren (flk-1 ↑ ↔ ↓; flt-1 ↑ ↔ ↓)	[15]
	PAT1 ↑ ↔ ↓, uPA ↑ ↔ ↓, MMP1 ↑ ↔ ↓, bFGF ↑ ↔ ↓, FGFR ↑ ↔ ↓, TIMP1 ↑, TGFβ1 ↑	[16]
	DYNLL1 ↓, DYNC111 ↓, PMSB1 ↓	[11]
	GPX ↑	[17]
	PGK ↓	[18]
	YY1 ↓, HMGA1 ↓, RY-1 ↓	[19]
	ZAR ↓, SUV39H1 ↓, G9A ↓	[20]
Reifung (in vitro vs. in vivo)	GDF9 ↓, Zyklin B1 ↑, G6PD1 ↑, SOX ↓, MnSOD ↓, CuSOD ↓	[17]
Supplementation des Reifungsmediums	HSP ↑, PolyA ↓	[21]
	Na/K α1 ↓, Zyklin A ↓	[22]
	FSHR ↓, Cx43 ↓, COX2 ↓, EP2 ↓, EP3 ↓	[23, 24]
	FAS ↑, FASLG ↑, STAT3 ↑	[25]
Qualität der KOK	EP3 ↑	[24]
Zeitpunkt der ersten Teilung	YEA ↑, IDH ↑, H2A ↑	[26]
	H3A ↑	[27]
	CCNB2 ↑, PTTG1 ↑	[28]
	FS ↑	[28]
Alter der Tiere	Glut1 ↓, eIF1A ↓	[29]
	Inhibinuntereinheiten (βA, βB) ↑, FS ↑	[28]

Tabelle 2: Auswirkungen verschiedener Parameter auf das mRNA-Expressionsmuster in Blastozysten des Rindes (IVM unter verschiedenen Bedingungen).

Parameter	Transkripthäufigkeit (Anstieg ↑ oder Abfall ↓)	Referenzen
Supplementation des Maturationsmediums	HSP ↑, IGF1R ↓, IGF2 ↓, IGF2R ↓	[30]
	LEPR ↑, STAT3 ↑, BAX ↓, BIRC4 ↑	[31]
	IGFBP6 ↑, HDCA1 ↑, HDAC2 ↑, Mash2 ↑, IFNτ ↑, HSP ↑, Oct4 ↑	[32]
Definiertes Follikelstadium	Cx43 ↓	[33]
Reifungsstadium	Keine Unterschiede	[34]

Für die Kultur boviner Embryonen ist eine Reihe von Medienformulierungen entwickelt worden [49]. Das am häufigsten genutzte Medium war lange das „tissue culture medium“ (TCM), ein Zellkulturmedium, das aber nicht auf die spezifischen Bedürfnisse der Embryonen abgestimmt ist. Es gehört in die Klasse der sogenannten komplex zusammengesetzten Medien. Speziell für die Kultur von Rinderembryonen wurde das SOF- („synthetic oviduct fluid“) Medium komponiert [54]. Ein wesentlicher Unterschied zum TCM bei diesem einfach zusammengesetzten Medium (SOF) ist u. a. die auf 5 % reduzierte Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre. Häufig sind die Kulturmedien mit Serum oder Serumalbumin als Proteinquelle versetzt, was ihnen einen undefinierten oder semi-definierten Charakter verleiht. Nur durch den Zusatz synthetischer Makromoleküle, wie z. B. Polyvinylalkohol, kann eine vollständig definierte Zusammensetzung gewährleistet und somit eine Standardisierung erzielt werden [49].

Somatisches Klonen

Obwohl die Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet des somatischen Klonens von Nutztieren nach der Geburt von Dolly, dem ersten Klonschaf [55], stark zugenommen haben, ist die Anzahl lebender Nachkommen noch begrenzt. Vielversprechende Anwendungsperspektiven für das Klonen liegen in der Forschung, der Biomedizin und der praktischen Tierzucht [56].

Die Grundlagen für das heute bekannte Klonen von Embryonen landwirtschaftlicher Nutztiere wurden bereits 1986 beschrieben. Mit dieser Technik konnten beim Schaf erstmals identische Nachkommen unter Verwendung embryonaler Zellen erzeugt werden [57]. Durch die Ergebnisse jüngerer Arbeiten ist gezeigt worden, daß auch ein somatisches Klonen möglich ist. Über längere Zeit in vitro kultivierte fetale und adulte Zellen können erfolgreich im Kerntransfer eingesetzt werden [56, 58, 59].

Der Vorgang des Kerntransfers gliedert sich in mehrere Schritte. Mit einer geeigneten Pipette wird die Spenderzelle in den perivitellinen Raum (d. h. in den Zwischenraum zwischen Eizelle und Zona pellucida) der Empfängerzelle eingesetzt, welcher vorher der eigene Chromosomensatz im Vorgang der sogenannten Enukleation entfernt worden ist. Unter der Voraussetzung, daß die Zellmembranen von Spenderzelle und Empfängerzelle in ausreichendem Umfang eng aneinanderliegen, kann durch Anlegen geeigneter elektrischer Pulse eine lokal begrenzte Fusion der beiden Membranen erreicht wer-

Tabelle 3: mRNA-Expressionsmuster in Blastozysten des Rindes unterschiedlicher Herkunft und in Relation zu anderen Qualitätsparametern.

Qualitätsmarker/ Herkunft	Transkripthäufigkeit (Anstieg ↑ oder Abfall ↓)	Referenzen
Respiration	GLUT1 ↑, G6PD ↑	[35]
Qualität der sNT-Blastozysten	GAPDH ↓, Tubulin ↓, DNMT ↓, GATA6 ↓, IFITM3 ↓	[36]
Geburtsgewicht	Glut3 ↑	[37]
Kryokonservierung	Survivin ↑, FAS ↑, Kaspase-3 ↑, HSP ↑	[38]
Trächtigkeitsrate nach Transfer	COX2 ↑, CDX2 ↑, ALOX15 ↑, BMP15 ↑, PLAU ↑, PLAC8 ↑	[39]
Spenderzelleffizienz (lebende Nachkommen)	HDAC1 ↓ ↑, HDAC2 ↑, DNMT3a ↓, Oct4 ↓	[40]
In vivo- vs. IVP- vs. sNT-Blastozysten	ACOX1 ↓, CD81 ↓, DNAJC10 ↑, HRH1 ↑, TFAP2A ↓	[41]
In vivo- vs. in vitro-kultivierte Blastozysten	Glut3 ↓, Glut4 ↓, Glut8 ↓	[42]
SOF supplementiert mit Hyaluronan	BAX ↓, SOX ↑, IGF2 ↑, Ecad ↓	[43]
Verwendung gesexten Spermias in der IVF	Glut3 ↓, G6PD ↓, Xist	[44]
Sauerstoffbedingungen während der Post-Kompaktierungskultur	Myotrophin ↓, APC1 ↓	[45]
In vivo- vs. IVP- vs. in vitro-kultivierte Blastozysten	FOXO3a ↓, REA ↓, HMG2 ↓, GNBL2 ↓, EEF1G ↓	[46]
Kultur im isolierten Mäuseeileiter	Glut1 ↓ ↑, Na/K ↓, Cx43 ↓ ↑, Oct4 ↑, SOX ↑, Sur ↑	[47]

den. Dadurch wird die Spenderzelle in das Zytoplasma der Empfängerzelle aufgenommen [60]. Vor, während oder nach der Fusion erfolgt die Aktivierung der Empfängerzelle durch geeignete chemische oder elektrische Stimuli. Nachdem die Spenderzelle in das Zytoplasma aufgenommen worden ist, sind eine Reihe molekularer und biochemischer Veränderungen erforderlich, um den Kern der Spenderzelle zurückzuprogrammieren (Reprogrammierung) und damit entwicklungsmäßig weitestgehend identisch mit dem Kern einer Zygote zu machen [61]. In den meisten Fällen kann man ein Anschwellen des übertragenen Kerns beobachten. Nach erfolgreicher Fusion erfolgt meist eine In-vivo- oder In-vitro-Kultur der erstellten Embryonen bis zum gewünschten Entwicklungsstadium.

Die Effizienz der einzelnen Schritte beträgt beim Rind für die Enukleation der Empfängereizelle 95–100 %, für die Fusion 80–90 % und für die Aktivierung 90–95 %. Durchschnittlich 20–30 % der Embryonen entwickeln sich bis zur Blastozyste, nach Transfer werden 10–14 % lebende Nachkommen geboren [62].

Unterschiede zwischen in vivo und in vitro produzierten Rinderembryonen

Trotz der vielen Verbesserungen, die die IVP in den vergangenen Jahren erfahren hat, unterscheiden sich in vitro produzierte Embryonen nach wie vor in zahlreichen Details von in vivo gewonnenen Embryonen (Tab. 4). Unterschiede wurden hinsichtlich der Morphologie [63], der

Tabelle 4: Unterschiede zwischen in vivo und in vitro produzierter Rinderembryonen.

	In vivo produzierte Embryonen	In vitro
<i>Morphologie</i>		
Farbe	hell	dunkel (insbesondere nach Kultur in serumhaltigen Medien)
Perivitelliner Raum	groß	klein
Kompaktierung	stark ausgeprägt	schwach ausgeprägt
Gesamtzellzahl (Expandierte Blastozyste)	140–160	höher, ähnlich, geringer
<i>ICM-Zellen</i>	40	weniger
<i>Gefriertauglichkeit</i>	gut	geringer
<i>Temperaturempfindlichkeit</i>	gering	hoch
<i>Trächtigkeitsraten</i>	Höhere fetale Verluste im letzten Drittel der Trächtigkeit nach Transfer von IVP-Embryonen	
<i>Metabolismus</i>		
ATP-, O ₂ -, Glukose- und Pyruvataufnahme	Niedrigere Aufnahmen in IVP-Embryonen pro Blastomere sowie gesteigerte Glykolyse- rate und Laktatproduktion in IVP-Embryonen	
<i>Chromosomale Abberationen</i> (Tag-5-Embryonen)	31 %	42 %
<i>Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene</i>	ungestört	erhöht, ähnlich, erniedrigt

Entwicklungsgeschwindigkeit [64], der Gefriertauglichkeit [65], metabolischer Parameter [66] sowie im Genexpressionsmuster [4–6] beschrieben.

Unterschiede zeigen sich auch bei den aus IVP-Embryonen resultierenden Kälbern im Vergleich zu solchen aus in vivo generierten Embryonen, die unter dem Begriff „Phänomen der übergroßen Kälber“ („large offspring syndrome“, LOS) zusammengefaßt werden [67, 68]. Neben der charakteristischen Übergröße treten Abweichungen in Form von erhöhten pränatalen Verlusten, Schweregeburten, verlängerten Trächtigkeiten, Atemproblemen, Saugschwierigkeiten sowie plötzlichem perinatalen Tod auf. Die Kälber weisen außerdem häufiger einen veränderten Energiestoffwechsel auf. Weiterhin sind Abnormalitäten verschiedener Organe beschrieben worden [69–71]. Oft wird auch von Veränderungen der Plazenta, wie z. B. Eihautwassersucht, berichtet [72]. Über die molekularen Mechanismen, die dem LOS zugrunde liegen, gibt es noch keine gesicherten Ergebnisse. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß Veränderungen im Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene während der frühen Embryonalphase bedingt durch unterschiedliche Kultursysteme etc. ursächlich beteiligt sind [37] und Störungen im Imprintingstatus wichtiger Gene dabei eine große Rolle spielen [4, 73–75].

Schlußfolgerungen

Das biotechnologische Verfahren der In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen wurde in den vergangenen Jahren bis zur Praxisreife entwickelt und stellt mittlerweile eine anerkannte Alternative zu den konventionellen Superovulationstechniken und Embryonenspülungen dar. Der vermehrte Einsatz der IVP hat gezeigt, daß nicht nur IVP-Embryonen unterschiedlich zu in vivo gewonnenen Embryonen sind, sondern daß auch die Kälber nach

Transfer von IVP-Embryonen Unterschiede im Vergleich zu Kälbern aus In-vivo-Embryonen aufweisen. Die beobachteten Abnormalitäten werden unter dem Begriff „large offspring syndrome“ (LOS) zusammengefaßt. Die Ursachen für dieses Phänomen, das auch nach Transfer von geklonten Embryonen gefunden wird, sind noch weitgehend unbekannt. Es wird davon ausgegangen, daß Störungen im Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen.

Durch die Analyse eines Sets an Markergenen, die in frühembryonalen Prozessen eine wichtige Rolle spielen, können Aussagen über die „Normalität“ der IVP- und sNT-Embryonen gemacht werden. Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation der RNA ebenso wie die Analyse der gebildeten Proteine und ihre Funktionalität werden weitere Erkenntnisse für die zugrundeliegenden Ursachen des LOS liefern.

Literatur:

- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90–100.
- Viuff D, Avery B, Greve T, King WA, Hyttel P. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 171–9.
- Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 1995; 44: 339–49.
- Niemann H, Wrenzycki C. Alteration of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000; 53: 21–34.
- Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 657–63.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 23–35.
- Knijff HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 2002; 124: 365–75.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization of early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 234–48.
- Baran V, Pavlok A, Bjerregaard B, Wrenzycki C, Herrmann D, Philimonenko VV, Lapathitis G, Hozak P, Niemann H, Motlik J. Immunolocalization of upstream binding factor and pocket protein p130 during final stages of bovine oocyte growth. *Biol Reprod* 2004; 70: 877–86.
- Donnison M, Pfeffer PL. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantification of their levels during development. *Biol Reprod* 2004; 71: 1813–21.
- Racedo S, Herrmann D, Wrenzycki C, Salamone D, Niemann H. Effects of follicle size and stage of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Mol Reprod Dev* 2007 (Epub ahead of print).
- Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1367–79.
- Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 1149–66.

14. Lingenfelter BM, Dailey RA, Inskeep EK, Vernon MW, Poole DH, Rhinehart JD, Yao J. Changes of maternal transcripts in oocytes from persistent follicles in cattle. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 265–72.
15. Einspanier R, Schönfelder M, Müller K, Stojkovic M, Kosmann M, Wolf E, Schams D. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 29–36.
16. Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R. Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1998; 59: 801–6.
17. Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Rizo D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 297–305.
18. Bettgowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 267–78.
19. Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 2004; 70: 1701–9.
20. Nowak-Imialek M, Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lagutina I, Lemme E, Lazzari G, Galli C, Niemann H. Messenger RNA expression patterns of histone associated genes in bovine preimplantation embryos derived of different origins. *Mol Reprod Dev* 2007 (akzeptiert).
21. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Alterations in the relative abundance of transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 8–18.
22. Watson AJ, de Sousa P, Caveny A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod* 2000; 62: 355–65.
23. Calder MD, Caveny AN, Sirard MA, Watson AJ. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. *Fert Steril* 2005; 83: 1077–85.
24. Calder MD, Caverney AN, Westhusin ME, Watson AJ. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* 2001; 65: 135–40.
25. Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 2007; 76: 532–41.
26. Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 288–97.
27. Fair T, Murphy M, Rizo D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 2004; 67: 136–44.
28. Patel OV, Bettgowda A, Ireland JJ, Coussens PM, Lonergan P, Smith GW. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 2007; 133: 95–106.
29. Oropeza A, Wrenzycki C, Herrmann D, Hädeler KG, Niemann H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol Reprod* 2004; 70: 1634–43.
30. Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 280–9.
31. Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2005; 73: 737–44.
32. Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1255–70.
33. Nemcova L, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular stage. *Theriogenology* 2006; 65: 1254–64.
34. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, Van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 2002; 124: 365–75.
35. Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Løvendahl P, Greve T, Callesen H. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology* 2007; 68: 223–36.
36. Smith C, Berg D, Beaumont S, Standley NT, Wells DN, Pfeffer PL. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* 2007; 133: 231–42.
37. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 2002; 67: 767–75.
38. Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 2006; 14: 125–31.
39. El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* 2006; 28: 84–96.
40. Beyhan Z, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 18–27.
41. Smith SL, Everts RE, Tian XC, Du F, Sung LY, Rodriguez-Zas SL, Jeong BS, Renard JP, Lewin HA, Yang X. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17582–7.
42. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJM, Vos PL, Zeinstra EC, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman S. In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fert Dev* 2005; 17: 775–84.
43. Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Brena P, Perez-Garnelo S, Martinez MF, Gutierrez-Adan A, De la Fuente J. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1503–11.
44. Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WM, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H, Wrenzycki C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 931–40.
45. Harvey AJ, Navarrete Santos A, Kirstein M, Kind KL, Fischer B, Thompson JG. Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 290–9.
46. Corcoran D, Rizo D, Fair T, Evans AC, Lonergan P. Temporal expression of transcripts related to embryo quality in bovine embryos cultured from the two-cell to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 972–7.
47. Rizo D, Pintado B, de la Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 716–23.
48. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilisation in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27: 147–58.
49. Bavister BD. Culture of pre-implantation embryos: facts and artefacts. *Hum Reprod Update* 2005; 1: 91–148.
50. Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 2001; 55: 1291–301.
51. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eystone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591–600.
52. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171–80.
53. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in

- in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44: 859–69.
54. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Dev* 1972; 30: 493–7.
 55. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810–3.
 56. Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 29–38.
 57. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63–5.
 58. Wilmut I, Young L, DeSousa P, King T. New opportunities in animal breeding and production – an introductory remark. *Anim Reprod Sci* 2000; 60–61: 5–14.
 59. Heyman Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45: 353–61.
 60. Bondioli KR, Westhusin ME, Looney CR. Production of identical offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165–74.
 61. Kono T. Nuclear transfer and reprogramming. *Rev Reprod* 1997; 2: 74–80.
 62. Colman A. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. *Cloning* 2000; 4: 185–200.
 63. Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R, Assey R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte quality in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 41–50.
 64. Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 47–56.
 65. Niemann H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. In: Enne G, Greppe GF, Lauria A (eds). *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategies*. Elsevier Biofutur, Paris, 1995; 117–28.
 66. Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 2000; 62: 847–56.
 67. Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 1996; 45: 111–20.
 68. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998; 3: 155–63.
 69. Wells DN. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 251–64.
 70. Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, Richard C, Issenman H, Laigre P, Heyman Y, Mialot JP. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 94–100.
 71. Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178–91.
 72. Kruip TAM, Den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 1997; 47: 43–52.
 73. Moore T, Reik W. Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Rev Reprod* 1996; 1: 73–7.
 74. Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, Efstratiadis A. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* 1997; 11: 3128–42.
 75. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genet* 2001; 27: 153–4.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

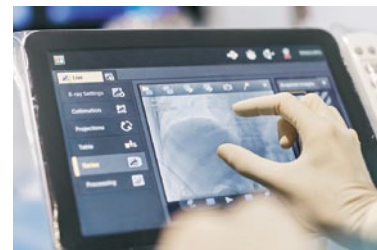
[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)