

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof Dr. med. T. Fehm

***In vitro* Kultur von Mausembryonen beeinflusst die mRNA-Expression
von *il-6*, Genen der Hedgehog-Familie und relevanter Gene bezüglich
ROS**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Pfeifer

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. Krüssel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Albers

Meiner Schwester Melina

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Scientific World Journal, 2012

N Pfeifer, DM Baston-Büst, J Hirchenhain, U Friebe-Hoffmann, DT Rein, JS Krüssel, AP Hess. Selection of the in vitro culture media influences mRNA expression of Hedgehog genes, Il-6, and important genes regarding reactive oxygen species in single murine preimplantation embryos, Scientific World Journal. 2012:479315. doi: 10.1100/2012/479315 (Paper).

4. DVR (Dachverband Reproduktionsbiologie und –medizin e.v.)-Kongress 2011 Berlin

DM Baston-Büst, D Ziegler, N Pfeifer, O Altergot, SJ Böddeker, JS Krüssel, AP Hess. Veränderte Expression der Hedgehog Gene Sonic und Indian in Mausembryonen in vitro, DVR-Kongress 2011, Berlin (Abstract).

1. Doktorandenkongress 2010 der HHU Düsseldorf

N Pfeifer, DM Baston-Büst, JS Krüssel, AP Hess. In Vitro Kultur von Mausblastozysten beeinflusst die mRNA-Expression relevanter Gene bezüglich Reaktiver Sauerstoffspezies, Gene der Hedgehog-Familie und des Cytokins IL-6, HHU Düsseldorf (Poster).

IVF Jahrestreffen LMU München

DM Baston-Büst, N Pfeifer, JS Krüssel, AP Hess. In vitro culture of murine embryos influences mRNA expression of hedgehog genes, Reprozentrum LMU München (Abstract).

9. Treffen des Arbeitskreises Molekularbiologie der Deutschen Gesellschaft für gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF)

D Ziegler, N Pfeifer, DM Baston-Büst, J Hirchenhain, AP Hess, JS Krüssel. Einfluss der in vitro Kultur auf Gene der Hedgehog-Familie für die frühe Entwicklung der Maus, Düsseldorf, 2009, J. Reproduktionsmed. Endokrinol (orale Präsentation).

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	IV
III.	Abbildungsverzeichnis	VII
IV.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
1	Einleitung	1
1.1	IVF.....	2
1.2	Physiologie der frühen Embryonalentwicklung und der embryonalen Implantation.....	5
1.2.1	Maus als Modellorganismus für Säuger	5
1.2.2	Präimplantationsentwicklung des Säugers	6
1.2.3	Implantation des Säugers.....	8
1.2.4	Zytokine	10
1.2.4.1	IL-6	10
1.2.5	HH.....	11
1.2.5.1	SHH	12
1.2.5.2	IHH	13
1.2.5.3	Signaltransduktionsweg von HH	14
1.3	ROS.....	16
1.3.1	Endogene Quellen von ROS	17
1.3.2	Exogene Quellen von ROS	19
1.3.3	Biologie von ROS	20
1.3.3.1	Physiologie von ROS während der Embryogenese	22
1.3.3.2	Pathologie von ROS.....	23
1.3.4	Antioxidative Abwehrmechanismen	24
1.3.4.1	Nichtenzymatische Antioxidantien	26
1.3.4.2	Enzymatische Antioxidantien	26
1.3.4.3	Redox-Systeme.....	27
1.4	Wissenschaftliche Fragestellung	29

2	Material und Methoden	30
2.1	Versuchstiere.....	30
2.2	Gewinnung der Embryonen	30
2.3	RT	33
2.4	PCR.....	34
2.5	Gelelektrophorese	37
2.6	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	mRNA-Expression von <i>il-6</i> in murinen Einzelblastozysten.....	41
3.2	mRNA-Expression von <i>shh</i> und <i>ihh</i> in murinen Einzelblastozysten	42
3.3	mRNA-Expression von <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> und <i>prdx2</i> in murinen Einzelblastozysten...	44
4	Diskussion	47
4.1	mRNA-Expression von <i>il-6</i> in murinen Einzelblastozysten.....	50
4.2	mRNA-Expression von <i>shh</i> und <i>ihh</i> in murinen Einzelblastozysten	51
4.2.1	<i>shh</i>	52
4.2.2	<i>ihh</i>	54
4.3	mRNA-Expression von <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> und <i>prdx2</i> in murinen Einzelblastozysten...	55
4.3.1	<i>nox</i>	56
4.3.2	<i>gpx</i>	56
4.3.3	<i>prdx</i>	57
4.4	<i>In vitro</i> Kultur verändert die mRNA-Expression muriner Einzelblastozysten	59
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Anhang	75
7.1	DNA-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen in der PCR.....	75
7.2	Ergebnisse der <i>in vivo</i> entwickelten Embryonen.....	75
7.3	Ergebnisse der <i>in vitro</i> in COOK® kultivierten Embryonen	78

7.4	Ergebnisse der <i>in vitro</i> in Vitrolife™ kultivierten Embryonen.....	80
8	Eidesstattliche Versicherung.....	83
9	Danksagung.....	84

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ART	<i>Assisted reproductive techniques</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β -HCG	Humanes Chorion Gonadotropin- β
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
Bp	Basenpaare
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CyPA	Cyclophilin A
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DIR	Deutsches IVF-Register
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
e^-	Elektronen
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ES	Endometrielles Stroma
ET	(Intrauteriner) Embryotransfer
Fe^{2+}	Zweiwertiges Eisenion
FGFs	<i>Fibroblast growth factors</i>
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
h	Stunde
H^+	Wasserstoffproton
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HH	<i>Hedgehog</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>

ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
IGF2	<i>Insulin growth factor 2</i>
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
IL-1, -6, -8	Interleukin-1, -6, -8
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IU	<i>International unit</i>
IVF	<i>In vitro Fertilisation</i>
kb	Kilobasen
M	Molarität
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mt	Mitochondrial
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxylanion
p	Relative Häufigkeit
p53	Tumorprotein 53
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
pc	<i>post coital</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PMSG	<i>Pregnant mare serum gonadotropin</i>
PRDX	Peroxiredoxin
Ptc	<i>Patched</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related peptide</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	<i>Reverse transcription</i>
SHH	Sonic Hedgehog

Smo	<i>Smoothened</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRX	Thioredoxin
UE	Untereinheiten
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZT	Zyklustag

III. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Der Weg des humanen Präimplantationsembryos -----	6
Abb.2: Die autoproteolytische Funktion des HH-Proteins -----	14
Abb.3: Der HH-Signaltransduktionsweg -----	15
Abb.4: Die Entstehung, ihre Entgiftung und die Auswirkungen von ROS -----	16
Abb. 5: Die Aktivierung der NOX -----	18
Abb.6: Physiologische Produktion von ROS bei der Ovulation und der Steroidhormonsynthese --	21
Abb.7: Auswirkungen und Abwehrmechanismen von oxidativem Stress auf zellulärer und extrazellulärer Ebene -----	25
Abb.8: Entgiftung von H ₂ O ₂ durch GPX -----	27
Abb.9: Überblick des experimentellen Zeitablaufs von der Stimulation der weiblichen Mäuse bis zur Entwicklung der Blastozyste -----	31
Abb.10: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von β -Aktin (407bp) muriner Blastozysten -----	39
Abb.11: Eigene mikroskopische Aufnahmen der murinen <i>in vitro</i> Blastozysten an d3,5. -----	40
Abb.12: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von <i>il-6</i> (226bp) muriner Blastozysten -----	41
Abb.13: Einfluss der <i>in vitro</i> Kultur auf die mRNA-Expression von <i>il-6</i> -----	42
Abb.14: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von <i>shh</i> (150bp) muriner Blastozysten -----	42
Abb.15: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von <i>ihh</i> (106bp) muriner Blastozysten -----	43
Abb.16: Einfluss der <i>in vitro</i> Kultur auf die mRNA-Expression von <i>shh</i> und <i>ihh</i> -----	44
Abb.17: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von <i>gpx4</i> (166bp) muriner Blastozysten -----	45
Abb.18: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von <i>prdx2</i> (179bp) muriner Blastozysten -----	46
Abb.19: Einfluss der <i>in vitro</i> Kultur auf die mRNA-Expression von <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> und <i>prdx2</i> -----	46
Abb.20: Quantitas DNA-Marker: 200bp-10kb (Biozym Scientific GmbH) -----	75

IV. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zusammensetzung des Cleavage (COOK®) und G-1™ PLUS (Vitrolife™) Mediums.-----	32
Tab.2: Zusammensetzung und Konzentration des RT-Reaktionsgemisches.-----	33
Tab.3: In der <i>nested</i> -PCR verwendete Sequenzen von Oligonukleotiden (äußeres und inneres Paar) und ihre <i>annealing</i> -Temperatur. -----	35
Tab.4: Reaktionsansatz der 1. und 2. PCR von <i>il-6</i> , <i>shh</i> , <i>ihh</i> , <i>nox</i> und <i>gpx1</i> . -----	36
Tab.5: Reaktionsansatz der 1. und 2. PCR von <i>gpx4</i> und <i>prdx2</i> . -----	36
Tab.6: Anzahl der Embryonen in Korrelation mit der β -Aktin-, <i>il-6</i> -, <i>shh</i> -, <i>ihh</i> -, <i>nox</i> -, <i>gpx4</i> -, <i>gpx1</i> - und <i>prdx2</i> -mRNA-Expression in der jeweiligen Gruppe. -----	40
Tab.7: Prozentuale Häufigkeit von β -Aktin-, <i>il-6</i> -, <i>shh</i> -, <i>ihh</i> -, <i>nox</i> -, <i>gpx4</i> -, <i>gpx1</i> - und <i>prdx2</i> -positiver mRNA-Expression in murinen Einzelblastozysten. -----	41
Tab.8: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von β -aktin, <i>il-6</i> , <i>shh</i> , <i>ihh</i> , <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> sowie <i>prdx2</i> der <i>in vivo</i> Blastozysten. -----	78
Tab.9: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von β -aktin, <i>il-6</i> , <i>shh</i> , <i>ihh</i> , <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> sowie <i>prdx2</i> der <i>in vitro</i> COOK® Blastozysten. -----	80
Tab.10: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von β -aktin, <i>il-6</i> , <i>shh</i> , <i>ihh</i> , <i>nox</i> , <i>gpx4</i> , <i>gpx1</i> sowie <i>prdx2</i> der <i>in vitro</i> Vitrolife™ Blastozysten. -----	82

1 Einleitung

Weltweit wurden rund fünf Millionen Kinder seit der Geburt des ersten *in vitro* entstandenen Menschen im Jahre 1978 nach ART geboren (Jahrestagung 2012 der European Society of Human Reproduction and Embryology, www.eshre.com). Somit stellt diese Technik den größten Erfolg in der Behandlung der Infertilität dar und bietet Paaren, die unter unerfülltem Kinderwunsch leiden, eine mögliche Behandlungsoption. Die Methoden umfassen einen weiten Bereich von der Beobachtung des menstruellen Zyklus mit Bestimmung des Ovulationszeitpunktes über milde Stimulationsbehandlungen mit intrauteriner Insemination der aufbereiteten Spermien nach medikamentös induzierter Ovulation bis hin zur künstlichen Befruchtung (IVF).

Die Anzahl der nach ART geborenen Kinder beträgt 1-3% der jährlichen Geburten in entwickelten Ländern (Manipalviratn *et al.*, 2009). Neben der Wichtigkeit, die Techniken der assistierten Reproduktion wissenschaftlich zu optimieren, ist es von großer Bedeutung, mit ART einhergehende Risiken sowie unbekannte potentielle Langzeit-Konsequenzen für die Kinder zu bedenken. Obwohl ART in den letzten zehn Jahren stetig von innovativen Weiterentwicklungen und neuen Erkenntnissen der Präimplantationsentwicklung in Bezug auf die embryo-maternale Kommunikation begleitet war, ist es letztlich noch nicht gelungen, die Techniken der *in vivo* Situation vollständig anzupassen (Lane & Gardner, 2007).

Das Verständnis der Faktoren, die bei der Regulation der Präimplantationsentwicklung sowie der Implantation des Embryos in den maternalen Uterus von Bedeutung sind, spielt in der Reproduktionsmedizin eine entscheidende Rolle. Morphologische und dynamische Veränderungen in der Umgebung sowie im Metabolismus des Embryos kennzeichnen und verändern die frühe Entwicklung des Embryos. Die molekularen Prozesse während der Reifung des Embryos, seiner Anhaftung an das mütterliche Endometrium und der nachfolgenden Invasion des Stromas werden von Genen reguliert, die an der Immunmodulation, Angiogenese sowie Zellproliferation des Embryos beteiligt sind (Chakraborty *et al.*, 1995, Krüssel *et al.*, 2003). Ein regelrechtes Expressionsmuster dieser Gene ist für die frühe Entwicklung des Präimplantationsembryos sowie seinen Metabolismus von Bedeutung.

Seitdem IVF mit einem erhöhten Risiko an spezifischen pathologischen Syndromen, wie z. B. das Beckwith-Wiedemann Syndrom, zu erkranken, assoziiert wird, werden Ursachen für diese Defekte im genomischen *imprinting* gesucht (deBaum *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher

et al., 2003). Neben Vermutungen, dass eine Fehlsteuerung im genomischen *imprinting* mit genetischer Prädisposition in Verbindung zu bringen ist, wird über einen Zusammenhang zwischen spezifischen Aspekten der IVF und epigenetischer Reprogrammierung während der frühen Embryonalentwicklung spekuliert (Williams *et al.*, 2009). Die *in vitro* Kultur wurde in vielen Tierexperimenten für eine veränderte Genexpression verantwortlich gemacht und zeigte in der Veterinärmedizin bei Schafen und Rindern Syndrome wie das *large-offspring* Syndrom, das ein verändertes *imprinting* im IGF2-Rezeptor-Gen aufweist (Young *et al.*, 1998, 2001).

Das Kulturmedium für die Befruchtung und Embryonalentwicklung der ersten Tage als auch der O₂-Gehalt, denen der Embryo während der *in vitro* Kultur ausgesetzt ist, beeinflussen die Genexpression der Präimplantationsembryonen (Rinaudo *et al.*, 2004, 2006).

1.1 IVF

1978 gaben der britische Physiologe Robert G. Edwards und der Gynäkologe Patrick Steptoe, die Geburt von Louise Brown, dem ersten durch IVF-Behandlung entstandenen Menschen, bekannt (Steptoe & Edwards, 1978). Nach laparoskopischer Eizellentnahme und Befruchtung der Eizelle durch Spermien des Ehemannes außerhalb des Mutterleibs, wurde die befruchtete Eizelle zweieinhalb Tage im Reagenzglas – *in vitro* – kultiviert und im 8-Zell-Stadium in den Uterus der Mutter transferiert. Die Exploration dieser Methode begann schon früh mit der Entdeckung der Spermatozoen (Hamm, 17. Jhd.) und der Eizelle (Van Baer, 1827) des Menschen und wurde deutlich später durch tierexperimentelle Untersuchungen erforscht, die letztendlich Grundlage für die heutigen ART sind.

Vorerst beschränkte sich die IVF-Behandlung auf Patientinnen, welche aufgrund von Verlust oder Verschluss der Eileiter nicht spontan konzipieren konnten. Seit mehreren Jahren wird die Indikation zur IVF-Methode auch bei anderen Sterilitätsursachen wie Endometriose und nach Einführung der ICSI (Palermo *et al.*, 1992) auch zunehmend bei reduzierter männlicher Infertilität gestellt.

Heute beginnt die IVF Therapie zumeist mit einer kontrollierten hormonellen ovariellen Stimulation, bevor die Eizellen mittels ultraschallgesteuerter, transvaginaler Follikelaspiration gewonnen werden. Danach wird die Eizelle mikroskopisch in der Punktionsflüssigkeit (Follikelflüssigkeit) aufgesucht und nach ihrem Reifegrad beurteilt. Nachdem sie in ein Kulturmedium überführt wird, findet nach 4- bis 5-stündiger Präinkubation die Insemination der Oozyte mit den Spermatozoen statt. Hierbei werden bei der klassischen IVF ca. 100.000

Spermatozoen zu einer Eizelle hinzugegeben, bei der ICSI ein einzelnes Spermatozoon in den Zellleib der Eizelle mit einem Mikromanipulator direkt injiziert. 16-20h nach der Insemination kann eine erfolgreiche Befruchtung durch das Vorhandensein von Vorkernen in der Eizelle festgestellt werden. Ist eine Fertilisierung eingetreten, entwickelt sich der Embryo in einem engen Zeitschema, wobei der Transfer in die Gebärmutter (intrauteriner Embryotransfer, ET) oder in den Eileiter (*embryo intrafallopian transfer*, EIFT) je nach Behandlungsmethode vom 2-Zell-Stadium (40-48h nach der Insemination) bis zum Blastozystenstadium (ca. 5 Tage nach Insemination) variiert.

Einen Hinweis auf die wechselseitige Beeinflussung von Embryo und *in vitro* Kultur liefert die signifikant langsamere Entwicklung von *in vitro* kultivierten Präimplantationsembryonen verglichen mit den Embryonen gleicher Stadien *in vivo* (Vanderhyden *et al.*, 1988). Diese in vielen IVF-Behandlungen beobachtete verzögerte Embryonalentwicklung lässt sich teilweise durch Kultivierung mehrerer Embryonen zusammen in einem geringeren Mediumvolumen beheben, wodurch sich eine gewisse parakrine Aktivität des Embryos vermuten lässt (Paria *et al.*, 1990). Durch das Prinzip der Kokultivierung von Embryonen zum Beispiel mit endometriellen Epithelzellen, Epithelzellen des Eileiters oder Vero-Zellen (Epithelkulturen von Affennieren) wird die *in vitro* Embryonalentwicklung der Physiologischen angeglichen (Prichard *et al.*, 1992; Simón *et al.*, 1997; Bongso *et al.*, 1989, 1992; Wiemer *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1997a, 1997b; Menezo *et al.*, 1990, 1992). Hierbei wird der Abhängigkeit zur Epithelart mehr Bedeutung zugeschrieben als der hormonellen Abhängigkeit sowie keine Spezies- oder Organspezifität festgestellt (Papaioannou & Ebert, 1986; Boland, 1984; Menezo *et al.*, 1990).

Allein in Deutschland wurden im Jahr 2011 9.524 Behandlungszyklen von IVF und 34.637 Behandlungszyklen von ICSI durchgeführt, wobei es bei IVF in 8.904 (93,49%) und bei ICSI in 33.170 (95,76%) Zyklen zum ET und bei IVF in 2.582 (30,48%/ET) und bei ICSI in 8.937 (28,33%/ET) Fällen zu einer klinischen Schwangerschaft – das heisst zum sonographischen Nachweis einer intrauterinen Embryoanlage – kam (Deutsches IVF Register, 2011). Somit zeigt sich, dass die *in vitro* Kultivierung bis zum ET gute Erfolge erzielt, dennoch die erfolgreichen Schwangerschaftsraten mit 30,48%/ET bei IVF und 28,33%/ET bei ICSI unzufriedenstellend gering sind. Letztlich gelingt es der *in vitro* Kultivierung nicht, die physiologische Umgebung des weiblichen Reproduktionstraktes vollständig zu imitieren und die Präimplantationsentwicklung im mütterlichen Organismus zu ersetzen.

Die Zusammensetzung des Mediums, in dem der Embryo kultiviert wird, als auch die O₂-Konzentration, der der Embryo ausgesetzt wird, spielen bei der Anpassung an den weiblichen Reproduktionstrakt eine wichtige Rolle und beeinflussen die Genexpression des

Präimplantationsembryos (Rinaudo *et al.*, 2004). Neben der eher seltenden Kokultivierung mit Epithelzellen gibt es seit einigen Jahren die sequenziellen Kulturmedien, die die Änderungen des Metabolismus der Präimplantationsembryonen in Bezug auf Glukosegehalt, Aminosäuren, pH-Wert während seiner Entwicklung zur Blastozyste berücksichtigen (Lane & Gardner, 2007).

Die unter physiologischen Bedingungen in einer Umgebung mit 5%igem O₂-Gehalt im Vergleich zu einem atmosphärischen O₂-Gehalt von 20% bei der *in vitro* Kultivierung stattfindende Entwicklung bis zur Blastozyste wird zunehmend bei der Optimierung von *in vitro* Kultursystemen in Betracht gezogen (Harvey, 2007).

1.2 Physiologie der frühen Embryonalentwicklung und der embryonalen Implantation

1.2.1 Maus als Modellorganismus für Säuger

Die Maus wird oft als Modellorganismus für die Säugetierentwicklung verwendet. Im Vergleich zu anderen Säugetieren benötigen Mäuse wenig Raum, Nahrung und Pflege und garantieren eine schnelle, Jahreszeiten-unabhängige Entwicklung, wobei pro Wurf viele Nachkommen generiert werden können. Ein wichtiges Kriterium stellt die kurze Generationszeit der Maus dar, welche lediglich 9 Wochen von der Fertilisation bis zum geschlechtsreifen Adulten umfasst. Dabei entwickelt sie sich 20d bis zur Geburt in utero. Säugetiere werden lebend geboren und charakteristischerweise an der weiblichen Brust mit Milch gesäugt, bis sie sich selbst ernähren können. Unverwechselbar macht diese Gruppe jedoch ihre innere Anatomie (Griffiths, 1978). Die Fortpflanzungsmethode der Säuger unterscheidet sich durch die Implantation – ein physiologischer Prozess, bei welchem der Embryo einen Kontakt mit dem Gewebe des Uterus eingeht, welcher die Fähigkeit besitzt, den Embryo mit Nährstoffen zu versorgen – von anderen Spezies.

In der Oogenese und der frühen Embryonalentwicklung unterscheidet sich das Schema der humanen und murinen Entwicklung kaum. Aufgrund der Schwierigkeit im Sinne ethischer Bedenken menschliche Embryonen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente an einzelnen Mausembryonen durchgeführt, welche aus den oben genannten Gründen in der Medizin oft als Modellorganismus für experimentelle Säugerembryologie dienen.

Dass die *in vitro* Kultur die Genexpression und den Metabolismus des Präimplantationsembryos beeinflusst, wurde in den meisten Untersuchungen an gepoolten RNA-Proben, die aus 50-100 Embryonen bestehen, festgestellt (Rinaudo *et al.*, 2004, 2006; Wang *et al.*, 2005). Einzelne Embryonen wurden nur in wenigen Studien auf eine durch *in vitro* Kultur veränderte Genexpression untersucht, obgleich die Individualität der Embryonen in Bezug auf ihre Morphologie und Entwicklung bekannt ist (Fauque *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 1991).

1.2.2 Präimplantationsentwicklung des Säugers

Mäuse verpaaren sich nachts und somit wird das Alter der Embryonen oft als d und ein halber ausgedrückt. Ein 3,5d alter Embryo wird am 4.d, nachdem die Mäuse sich verpaart haben, gewonnen. Die Nacht der Paarung lässt sich an einer soliden weißen Kruste der sogenannte vaginale Pfropf („*plug*“), der sich in der Vagina nach der Verpaarung bildet, bestimmen. Mäuse paaren sich lediglich in der Phase, wenn das Ei herangereift ist – im Östrus. Die Ovulation ereignet sich wenige Stunden nach der Verpaarung und die Fertilisation findet, vergleichbar mit dem Menschen, am oberen Ende des Ovidukts (ovarielles Ende) statt. Nach der Verpaarung steigt der Progesteronspiegel an.

Im ampullären Teil des Eileiters verschmilzt ein Spermium mit einer reifen Eizelle und wandert als Präimplantationsembryo während der nächsten Tage in Richtung Uterus, wobei es durch mitotische Zellteilungen (Furchungsteilung) zur Verdopplung der Zellzahl kommt (Abb.1). In dieser Zeit können die Embryonen operativ gesammelt werden, um *in vitro* kultiviert zu werden.

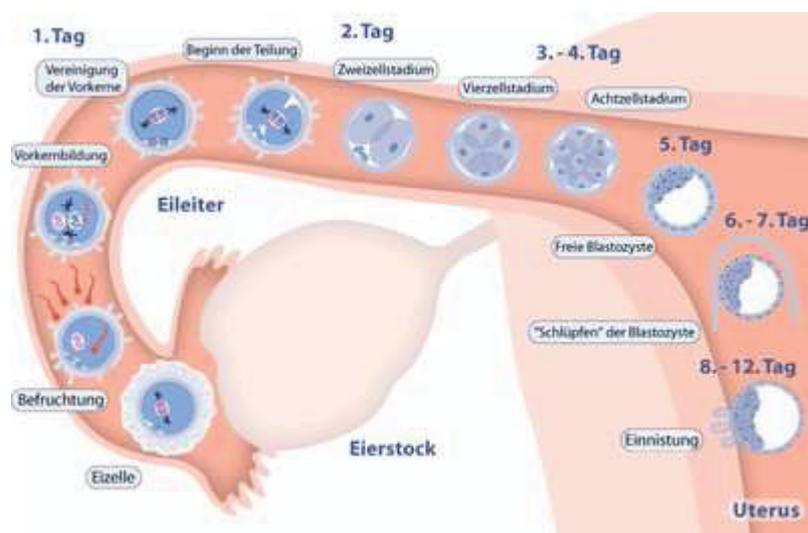


Abb.1: Der Weg des humanen Präimplantationsembryos

Nachdem zum Zeitpunkt der Ovulation eine Befruchtung (Fertilisation) der Eizelle im ampullären Teil des Eileiters stattgefunden hat, wandert die befruchtete Eizelle (Zygote) etwa eine Woche entlang des Eileiters in Richtung Uterus, wobei es durch mitotische Zellteilungen (Furchungsteilung) zur Verdopplung der Zellzahl kommt. Am 5.d bilden sich das Blastozöel, eine flüssigkeitsgefüllte Höhle, und zwei Zellgruppen, der Embryoblast und das Trophektoderm, die sich voneinander abgrenzen lassen. Ab diesem Zeitpunkt nennt sich der Präimplantationsembryo Blastozyste. Nach dem Schlüpfen (*hatching*) der Blastozyste beginnt die Implantation in der Gebärmutterschleimhaut.

Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Referenzzentrums für Ethik in den Biowissenschaften, Rubrik im Blickpunkt, Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen, Embryonalstadien (http://www.drze.de/im-blickpunkt/abbildungen/zygote/image_preview)

Die reife Eizelle befindet sich zum Zeitpunkt der Ovulation in der Metaphase der 2. Reifeteilung (Meiose) und schließt die meiotische Reifeteilung ab, nachdem das Spermium in den Zelleib der Eizelle – das Ooplasma – mit Hilfe spezifischer Mechanismen eingedrungen ist. Dabei wird das zweite Polkörperchen ausgestoßen. Der Nukleus des Spermiums dekondensiert und der Pronukleus (Vorkern) leitet die DNA-Replikation ein. Das Vorhandensein der beiden Pronuklei zeigt erstmals morphologisch den sich vollziehenden Prozess der Fertilisation.

Bei der Maus ist das embryonale Genom bereits im frühen 2-Zell-Stadium aktiviert, wohingegen beim Menschen dieser Prozess erst nach dem 4-Zell-Stadium stattfindet (Hogan *et al.*, 1994; Tesarik *et al.*, 1986; Braude *et al.*, 1988).

Im frühen 8-Zell-Stadium lässt sich die Form der individuellen Zellen noch deutlich voneinander abgrenzen. Diese sogenannten Blastomeren, die noch totipotent sowie voneinander getrennt sind, können 8 genetisch identische Mäuse hervorbringen und produzieren verschiedene Peptide und Proteine. Das IL-1 System konnte als solch ein frühes embryonales Signal auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Krüssel *et al.*, 1997). Nach dem Verlust der Totipotenz beginnen die Zellen, sich in den späteren embryonalen (Embryoblast) und plazentaren Anteil (Trophoblast) zu differenzieren. Beim Übergang zum 16-Zell-Stadium verdichten sich die Zellen (Blastomere) zu einem Verband (Morula Stadium). Bei diesem Prozess, der als Kompaktion (Verdichtung) bezeichnet wird, werden die einzelnen Zellen mit Hilfe von Zelladhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel Cadherin E, miteinander verklebt. Die Blastomeren verflachen und intrazelluläre Kontakte werden maximiert. In diesem Stadium polarisieren die Zellen; ihre äußere Oberfläche trägt Mikrovilli, wohingegen ihre Innenfläche glatt ist. Des Weiteren bilden sich *Gap junctions* (Zell-Zell Verknüpfungen) aus, womit die Diffusion von niedrig molekularen Stoffen im Embryo möglich ist (Medizinische Embryologie, Christ & Wachtler, 1998).

Ein besonderes Merkmal für die Säugerentwicklung ist die Differenzierung zweier verschiedener Zellgruppen – der inneren Zellmasse (Embryoblast) und des Trophektoderms. Die inneren Zellen bilden die innere Zellmasse (Embryoblast), wohingegen die äußeren Zellen das Trophektoderm darstellen, in welchem die extra-embryonalen Strukturen wie die Plazenta angelegt sind. In diesem Stadium (d3,5 bei der Maus) wird der Embryo als Blastozyste bezeichnet, für welche die Differenzierung der beiden Zelltypen kennzeichnend ist. Das Trophektoderm pumpt Flüssigkeit in das Innere der Blastozyste, wodurch sich ein mit Flüssigkeit gefülltes Vesikel – das Blastozoele – formt, welcher an einem Ende die innere Zellmasse enthält.

Während seiner Entwicklung produziert der Präimplantationsembryo viele verschiedene Faktoren, um seine Präsenz dem maternalen Gewebe zu signalisieren. Damit eine adäquate Interaktion zwischen Präimplantationsembryo und maternalem Endometrium gewährleistet wird, kontrollieren parakrin sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren diesen Prozess. Diese lassen sich auf mRNA-Ebene in der Blastozyste nachweisen (Krüssel *et al.*, 2003).

4,5d nach der Fertilisation löst sich die Blastozyste in der Maus aus ihrer Hülle (*hatching*) – der *Zona pellucida* – und ist bereit, sich in die Gebärmutter einzunisten.

1.2.3 Implantation des Säugers

Nach dem *hatching* der Blastozyste implantieren sich der humane und murine Embryo physiologischerweise in der Gebärmutterschleimhaut. Die murine Gebärmutter ist lediglich in einem kurzen Zeitraum um den 4.d nach der Fertilisation befähigt, den murinen Embryo zu empfangen. Eine erfolgreiche Implantation ist vom Entwicklungsstadium des Embryos sowie einem komplexen Zusammenspiel von molekularen und zellulären Prozessen parakriner und autokriner Regulatoren des vorbereiteten Uterus abhängig (Krüssel *et al.*, 2003). Der molekulare Dialog zwischen Embryo und Endometrium setzt Zell-Zell Kontakte oder Zell-zu-ECM voraus, die von Adhäsionsmolekülen, wie Integrinen, MMPs und ihren Inhibitoren sowie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und angiogenetischen Faktoren, gesteuert werden (Aplin, 1997; Graham & Lala, 1992; Harvey *et al.*, 1995; Krüssel *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 1995). Dabei lassen sich drei Hauptschritte der Implantation des Säugers unterscheiden: 1. die Apposition 2. die Adhäsion und 3. die Invasion.

Die Apposition stellt die initiale, instabile Positionierung der Blastozyste an der Uteruswand dar, wobei sich die Blastozyste so orientiert, dass sich die innere Zellmasse dem endometriellen Epithel zuwendet, wenngleich dieser Teil mit Trophektodermzellen überzogen ist. Dabei nähern sich die Mikrovilli des Präimplantationsembryos den Pinopodien des Endometriums an, wodurch die stabile Adhäsion eingeleitet wird (Nikas, 1999). Bei der Adhäsion des Embryos an das endometrielle Epithel spielen Adhäsionsmoleküle, wie L-Selektin und Integrine, eine wichtige Rolle. Die Expression von Integrinen im Embryo sowie auf dem Endometrium korreliert mit der Zeit der Implantation in Mensch und Maus, wobei $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen eine besondere Wichtigkeit zugeschrieben wird (Sutherland *et al.*, 1993, Campbell *et al.*, 1995; Lessey *et al.*, 1992; Tabibzadeh, 1992; Illera *et al.*, 2000). Eine veränderte Expression von α_4 -, α_v - und β_1 -Integrinen sei mit einer ausbleibenden Implantation und

veränderter Plazentaentwicklung assoziiert, beschrieb Aplin (1997).

Nach der Phase der Adhäsion beginnt die Invasion des maternalen Endometriums, wobei der humane Embryo (die Trophoblastzellen) zunächst die endometrielle Epithelschicht durchdringt, indem er eine lokal eng begrenzte Apoptose innerhalb der Epithelzellschicht induziert (Galaan *et al.*, 1999). Für die Implantation im ES spielen vom humanen Embryo selbst sowie vom ES sezernierte MMPs, zinkhaltige Endopeptidasen, welche enzymatisch ECM-Proteine verdauen können, und ihre zugehörigen Inhibitorsysteme, TIMPs, eine wichtige Rolle (Xu *et al.*, 2001). Die Regulation von MMPs wird durch Wachstumsfaktoren sowie Zytokine bestimmt und stellt sich zell-, gewebe- und MMP-spezifisch dar (Fini *et al.*, 1998). MMP-2 und MMP-9 bauen Kollagen 4 – einen wichtigen Membranbestandteil – ab und werden als Schlüsselenzyme des Implantationsprozesses betrachtet, indem sie das invasive Potential des humanen Embryos lokal an der Implantationsstelle steigern (Xu *et al.*, 2001, Staun-Ram *et al.*, 2004).

Die Versorgung des humanen Embryos in der ersten Phase der Implantation wird hauptsächlich durch Diffusion beziehungsweise Osmose zwischen Embryo und ECM des ES gewährleistet (Schmidt-Matthiesen, 1968). Damit die Implantation erfolgreich abgeschlossen werden kann, benötigt der Embryo den Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem, um von der Mutter mit Nährstoffen und O₂ versorgt zu werden. Die Angiogenese im ES des murinen und humanen Embryos wird induziert, wobei VEGF eine essentielle Rolle spielt (Chakraborty *et al.*, 1995; Krüssel *et al.*, 2001). Weiterhin differenziert sich der Trophoblastanteil in Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast. Der Zytotrophoblast umgibt den humanen Embryo direkt, wohingegen der Synzytiotrophoblast in das ES vordringt. Kurze Zeit später bilden sich lakunäre Hohlräume im Synzytiotrophoblasten, die mit maternalem Blut aus eröffneten Kapillaren gespeist werden. Mit der Zeit vereinen sich die Lakunen und bilden das plazentare Lakunensystem, durch das maternales Blut fließt, um die Versorgung des humanen Embryos zu gewährleisten. Hierbei entsteht der uteroplazentare Kreislauf.

Entscheidend für eine erfolgreiche Implantation der Maus sowie des Menschen sind einerseits die Blastozyste selbst mit den von ihr sezernierten Signalstoffen, andererseits das hormonell eingestellte und durch Zytokine regulierte Endometrium mit seinen Enzymen, seiner Integrinexpression und seinem Substratangebot (Sutherland *et al.*, 1993; Krüssel *et al.*, 2003; Staun-Ram & Shalev, 2005).

1.2.4 Zytokine

Zytokine (Griechisch: *cyto-*, Zelle; und *-kinos*, Bewegung) sind Proteine, Peptide oder Glykoproteine, die als Signalmoleküle an transmembranäre Rezeptoren binden und dort eine spezifische, intrazelluläre Antwort auslösen. Diese Gruppe löslicher Proteine wird in vom embryologischen Ursprung unterschiedlichsten Zellen überall im Körper gebildet (Gilman *et al.*, 2001). Zytokine agieren auf auto- oder parakriner Ebene und wirken als humorale Regulatoren im nano- und picomolaren Bereich auf die biologische Aktivität individueller Zellen oder Gewebe (Ibelgauf, 1995). Nahezu alle Zellen mit Kern, aber hauptsächlich epitheliale Zellen und im Gewebe angesiedelte Makrophagen, bilden potentiell die Zytokine IL-1, IL-6 sowie TNF- α . Zytokine wirken oftmals additiv, synergistisch oder antagonistisch. Nachdem ein Zytokin an seinen transmembranären Rezeptor bindet, werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und Zellfunktionen verändert, indem die jeweiligen Zielgene exprimiert oder supprimiert werden. Auf diesem Weg können Transkriptionsfaktoren gebildet werden, die für die Steigerung der Bildung bestimmter Rezeptoren oder anderer Mediatoren verantwortlich sind. Das Ausmaß der Signalantwort des jeweiligen Zytokins ist abhängig von seiner extrazellulären Menge, seiner Präsenz, der exprimierten Rezeptoren auf der Zelle und nachgeordneten Signalkaskaden, die durch die Rezeptorbindung ausgelöst werden.

Im Reproduktionssystem spielen Zytokine in vielen Prozessen wie der Ovulation, der Menstruation sowie der frühen Entwicklung und der Implantation des Embryos eine wichtige Rolle (Simon *et al.*, 1995; Krüssel *et al.*, 2000). Sowohl der Präimplantationsembryo als auch das Endometrium produzieren IL-1 in Mensch und Maus (Krüssel *et al.*, 1997).

1.2.4.1 IL-6

IL-6 ist ein multifunktionelles Protein, das eine wichtige Rolle in der Immunregulation, Entzündungsantwort und Hämatopoese spielt (Akira *et al.*, 1993; Taga & Kishimoto, 1997; Kamimura *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005). Es wird hauptsächlich in immunkompetenten Zellen wie T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen, aber auch in Endothel- sowie Epithelzellen gebildet und beeinflusst verschiedene Gewebearten und Zelllinien, indem es einerseits Zellwachstum und -differenzierung fördert und andererseits Apoptose einleitet (Van Snick, 1990; Hirano *et al.*, 1990; Sehgal, 1992).

IL-6 ist ein potentes pro-angiogenetisches Zytokin, das maßgeblich an der Angiogenese der

Tumorprogression, Wundheilung und Entwicklung der Hirngefäße beteiligt ist (Fee *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2008). Diesen Einfluss auf die Angiogenese vermittelt IL-6 indirekt, indem es die *vegf*-Expression induziert (Cohen *et al.*, 1995). Untersuchungen zeigten, dass die *in vivo* Expression von *il-6*-mRNA mit der Vaskularisierung im reproduktiven Gewebe der Maus einhergeht (Motro *et al.*, 1990). Des Weiteren steuert IL-6 die Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 des Trophoblasten (Meissner *et al.*, 1999). Die Wichtigkeit von VEGF während der frühen Präimplantationsentwicklung und der Implantation ist in vielen Studien belegt worden (Chakraborty *et al.*, 1995; Krüssel *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2008).

In murinen Präimplantationsembryonen konnte *il-6* bereits im 8-Zell-Stadium nachgewiesen werden und zählt somit zu einem sehr früh exprimierten Gen (Rothstein *et al.*, 1992, Gerwin *et al.*, 1995). Seine Wichtigkeit in der Reproduktion wird einer regulatorischen Funktion während der Implantation zugesprochen, da die humane IL-6 Synthese im Endometrium während der Zeit des *implantation window* stark erhöht ist (Tabibzadeh *et al.*, 1995). IL-6R ist sowohl im Embryo als auch im glandulären Epithel des Uterus beim Menschen zu finden (Tabibzadeh *et al.*, 1995; Sharkey, 1998). Weiterhin induziert IL-6 die Aktivierung von trophoblastischen MMP-2 und MMP-9 während der Implantation, wohingegen IL-6 von IL-1 aktiviert wird (Meissner *et al.*, 1999; Masuhiro *et al.*, 1991).

1.2.5 HH

Das *hh*-Gen wurde erstmals bei *Drosophila* während eines Screening für Mutanten identifiziert (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Bei *Drosophila* stellt *hh* ein Segmentpolaritätsgen dar, welches in den posterioren Zellen jedes Segments gebildet wird und in benachbarten, aber auch in den weiter entfernten anterioren Zellen die Expression seiner Zielgene hinsichtlich der Gliedmaßen-, Flügel- sowie Kopfdifferenzierung der Fliegen aktiviert. Hierbei wurde der Name *Hedgehog* (Igel, Stachelschwein) durch das Auftreten der stoppeligen, haarigen *Drosophila*-Larve der *hh*-Mutanten geprägt (Müller & Hassel, 2006). Bei den Mammalia sind drei Homologe der *hh*-Genfamilie: *shh*, *ihh* und *dhh* bekannt (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

HH ist ein sezerniertes Protein, das als lokales Morphogen fungiert und durch Diffusion im benachbarten Gewebe entlang eines Konzentrationsgradienten seine Zielgene aktiviert oder reprimiert. In Abhängigkeit von der Distanz zum Zielort reagieren die Zellen mit einer unterschiedlichen Differenzierungsantwort (Briscoe *et al.*, 2001). Während der Embryonalentwicklung ist der HH-Signalweg maßgeblich an der Regulation des

Zellwachstums sowie der Zelldifferenzierung (vieler Tierarten) beteiligt. Sowohl in Vertebraten als auch in Insekten weisen HH-Proteine Schlüsselfunktionen in der Morphogenese verschiedener Regionen des Körpers auf (Ingham & McMahon, 2001).

1.2.5.1 SHH

SHH ist das am besten untersuchte Protein des HH-Signalwegs, wobei davon ausgegangen werden kann, dass die Mechanismen sowohl zur Generierung der biologisch aktiven Form als auch der Signaltransduktion auch für die beiden anderen HH-Vertreter gelten (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Außerdem wird SHH im Vergleich zu IHH und DHH die kritischste Rolle in der Entwicklung zugesprochen. Die Expression von SHH beginnt kurz nach der Gastrulation (16., 17.d beim Menschen) im späteren Mittellinienmesoderm (Notochord, *floor plate*) und ist unter anderem in frühen Embryonalstadien für die Rechts-Links-Asymmetrie verantwortlich (Riddle *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994; Johnson RL *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001). In späteren Stadien spielt es eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Neuralrohres, der Gliedmaßen sowie der Somiten und reguliert die Bildung von Haarfollikeln und epithelialen Organen (Echelard *et al.*, 1993; Ekker *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1996; Bitgood & McMahon, 1995; St-Jacques *et al.*, 1998).

Das in der *Chorda dorsalis* exprimierte SHH kontrolliert die neuronale Entwicklung, wobei es sowohl die Bildung des Neuralrohrs als auch die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Progenitor Zellen induziert (Echelard *et al.*, 1993; Helms *et al.*, 1997; Ericson *et al.*, 1997). In *shh-knockout* Mäusen fehlen die Zellen der Flügelplatte, Motoneurone sowie verschiedene Klassen der Interneurone (Chiang *et al.*, 1996). Der Einfluss von SHH auf die Entwicklung des Vorderhirns sowie die Separation der Augenfelder in zwei Retinafelder erklärt den cyclopischen Phänotyp der *shh-knockout* Mäuse (Macdonald *et al.*, 1995; Hallonet *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 1996). Zusätzlich weisen diese Mäuse multiple Defekte wie Holoprosencephalie, aber auch Anomalien der Extremitäten, des Darms, des Axialskeletts, des Spinalkanals sowie des Gehirns auf (Chiang *et al.*, 1996). Der oftmals nach der Geburt eintretende Tod der *shh-knockout* Mäuse betont die Wichtigkeit der Signalfunktionen von SHH.

SHH wird eine Rolle in der Neovaskularisation zugesprochen, indem es unabhängig von VEGF die endotheliale Formation fördern soll (Fujita *et al.*, 2009). Obwohl festgestellt wurde, dass SHH die Expression von VEGF und Angiopoietin-1, -2 in kultivierten humanen pulmonalen Fibroblasten hochreguliert, wirkt exogenes SHH nicht auf die VEGF-Expression in

murinen Endothelzellen *in vitro* (Pola *et al.*, 2001; Vokes *et al.*, 2004).

1.2.5.2 IHH

IHH wird in der Embryonalentwicklung in den Knochenanlagen während der enchondralen Ossifikation gebildet und reguliert die Chondrozytenproliferation und -differenzierung (Iwasaki *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2001). Das von den prähypertrophen Chondrozyten als Signal fungierende IHH steuert die Chondrozytenreifung mit Hilfe einer Rückkopplungskontrolle eines zweiten sezernierten Faktors PTHrP an der Gelenkoberfläche (St-Jaques *et al.*, 1999). Des Weiteren stimuliert IHH die Angiogenese im Dottersack (extraembryonales Endoderm) (Byrd *et al.*, 2002). Sowohl SHH als auch IHH werden im Darm exprimiert, wobei sich mit der Differenzierung des Darms eine deutliche Trennung ihrer Aufgabenbereiche herausbildet (Bitgood & McMahon, 1995; Apelqvist *et al.*, 1997; Sukegawa *et al.*, 2000). *Ihh*-defiziente Mäuse weisen reduzierte Chondrozytenproliferation mit der Folge schwerer Missbildungen der Extremitäten sowie Malformationen des Thorax mit respiratorischem Versagen auf und sterben nach der Geburt (St-Jaques *et al.*, 1999).

Eine weitere Bedeutung wird IHH in der Regulation der T-Zelldifferenzierung im Thymus zugesprochen (Outram *et al.*, 2009). Zudem ist IHH an der Bildung oder Differenzierung folgender Gewebe beteiligt: der Brustdrüse, dem Ovar, dem Pankreas, der Retina sowie der Blutgefäße (Lewis *et al.*, 1999; Wijgerde *et al.*, 2005; Hebrok *et al.*, 2000; Perron *et al.*, 2003; Dyer *et al.*, 2001).

IHH wird im luminalen Epithel des Uterus und den endometriellen Drüsen zur Zeit der Präimplantationsstadien des murinen Embryos exprimiert. Seine Konzentration fällt mit einsetzender Implantation ab, wobei sich die Expression von IHH an Tag 6 der murinen Entwicklung auf das uterine Epithel über dem Embryo begrenzt (Paria *et al.*, 2001). Während wenig oder keine *ihh*-mRNA im Blastozystenstadium nachzuweisen ist, steigt die Expression während dem Auswuchs der Blastozyste an und wird mit der Entstehung des extraembryonalen Endoderms in Zusammenhang gebracht (Becker *et al.*, 1997).

1.2.5.3 Signaltransduktionsweg von HH

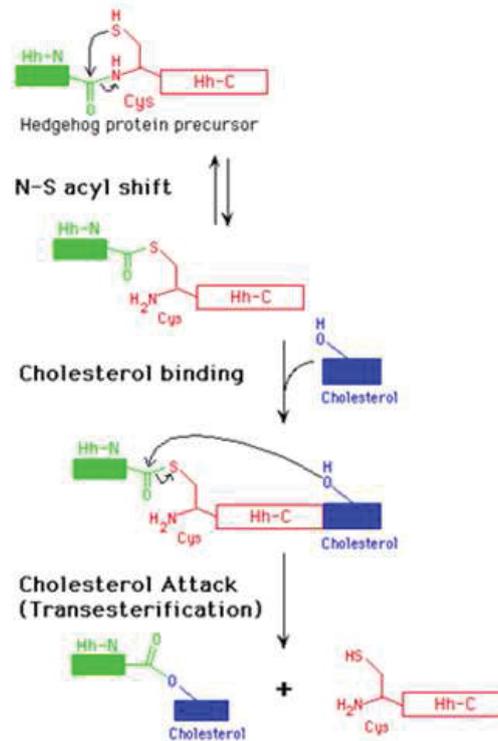


Abb.2: Die autoproteolytische Funktion des HH-Proteins

Das HH-Vorläuferprotein wird mittels der autoproteolytischen Funktion seiner C-terminalen Domäne in eine aktive N-terminale (HH-N) und eine inaktive C-terminale (HH-C) Domäne gespalten. Hierbei bindet die C-terminale Domäne ein Cholesterinmolekül, welches nach der Spaltung der beiden Domänen am C-Terminus des HH-N für die Permeabilität der Zellmembranen des aktiven HH-Liganden sorgt. Das HH-N fungiert als biologisch aktives Morphogen und bindet den HH-Rezeptorkomplex an seinen Zielzellen. Das als HH-N bezeichnete und auf diese Weise prozessierte Protein dient als Signaldomäne für den HH-Signalweg. (Hall et al., 1997)

Der HH-Signalweg ist gekennzeichnet durch die autoproteolytische Funktion des HH-Vorläuferproteins, welches in eine aktive N-terminale sowie eine inaktive C-terminale Domäne gespalten wird. Die C-terminale (HH-C) Domäne besitzt die autoproteolytische Funktion (Abb.2). Nach der Spaltung wird der N-terminale (HH-N) Teil in ein biologisch aktives Morphogen umgewandelt, indem Cholesterin- und Palmitinreste angehängen werden. Somit kann das biologisch aktive HH-Morphogen (HH-N) durch seine Lipophilie die Zellmembranen passieren und an den HH-Rezeptorkomplex seiner Zielzellen binden.

Der Rezeptorkomplex besteht aus zwei Proteinen, dem 12-TM-Rezeptor *Ptc* und dem 7-TM-Rezeptor *Smo*. *Ptc* ist konstant aktiv und unterdrückt die Aktivität von *Smo*. Wenn der Ligand HH an *Ptc* bindet, wird dieser inhibiert, wodurch dann wiederum die Hemmung des *Smo*-Rezeptors aufgehoben wird. Des Weiteren aktiviert *Smo* einen zytosolischen

Multiproteinkomplex bestehend aus *Fused*, *Costal-2* und dem Vorläuferprotein des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Gli* (Delattre *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2000). Der aktivierte *Gli*-Transkriptionsfaktor löst sich vom Proteinkomplex, diffundiert in den Nukleus und aktiviert die HH-Zielgene (Abb.3). In Abwesenheit von HH ist *Ptc* aktiv und *Smo* inaktiv, wodurch die Repressor-Form von *Gli* gebildet wird. Ein bekanntes direktes Zielgen für HH stellt *Ptc* selbst dar, welches in Untersuchungen verschiedener Gewebearten von Vertebraten durch HH-Signale hochreguliert wird (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

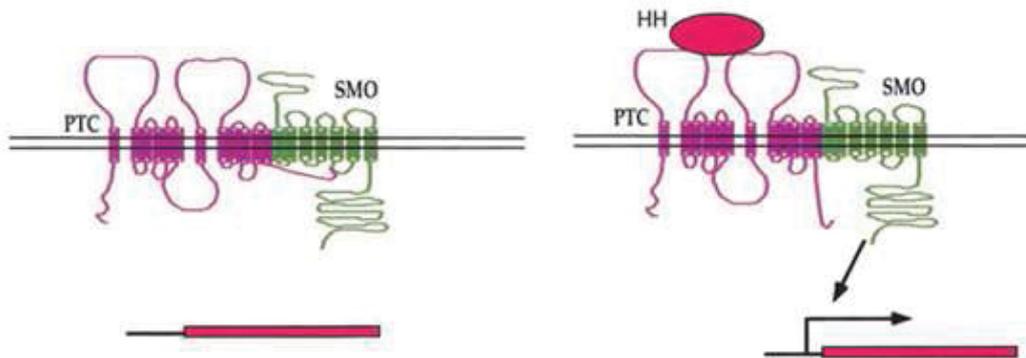


Abb.3: Der HH-Signaltransduktionsweg

Bindet der HH-Ligand an seinen Rezeptor *Ptc*, wird die Inhibition von *Smo* aufgehoben. *Smo* aktiviert die intrazelluläre Signalkaskade, welche die Induktion entsprechender Zielgene mittels Transkriptionsfaktoren steuert. (Ingham & McMahon, 2001)

1.3 ROS

O_2 ist essentiell für menschliches Leben. Der Körper benötigt O_2 für die Synthese des Energieäquivalents ATP. Bei der Umwandlung von ADP zu ATP in der Atmungskette fungiert O_2 als Elektronenakzeptor. Dabei unterstützt die hohe Reaktionsfähigkeit des O_2 einerseits seine Effektivität in der Atmungskette, ermöglicht andererseits aber auch die Bildung von potentiell toxischen Spezies – ROS (Burton *et al.*, 2002).

ROS können sowohl im aeroben Zellstoffwechsel als auch in der Umgebung der Zelle entstehen. Eine übermäßige Produktion von ROS sowie ein fehlender Abwehrmechanismus können zu einem unkontrollierten Ausmaß an ROS führen und im sogenannten oxidativen Stress der Zelle enden. Oxidativer Stress schädigt die Zelle auf, indem Lipide, Proteine und DNA durch ROS oxidiert werden. Zur Gruppe der ROS gehören sowohl freie Radikale (wie O_2^- , OH^\cdot) als auch nicht-Radikale O_2 -Derivate (stabile aktivierte O_2 -Derivate), die bei der Reduktion von O_2 entstehen. Freie Radikale sind reaktive, instabile Moleküle, bei denen ein oder mehrere e^- ungepaart sind. Zu den wichtigsten Vertretern der ROS gehören das O_2^- , H_2O_2 und das reaktionsfreudige OH^\cdot (Agarwal *et al.*, 2005) (Abb.4).

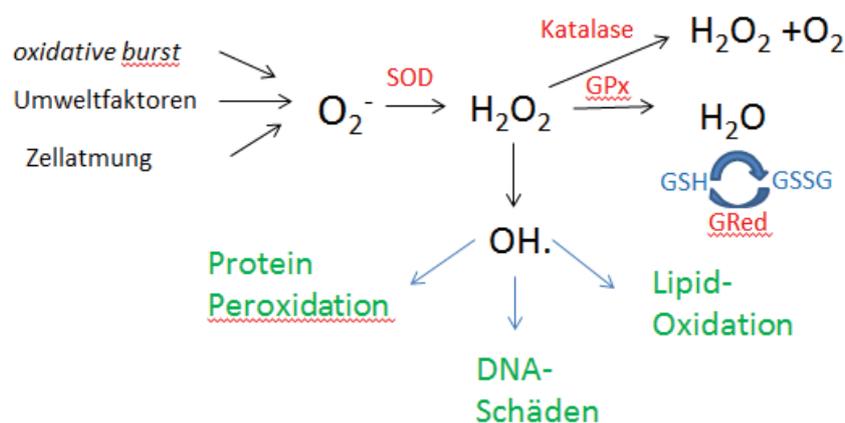


Abb.4: Die Entstehung, ihre Entgiftung und die Auswirkungen von ROS

Das aus der Umwelt sowie der Zellatmung entstehende O_2^- wird von der Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 entgiftet, welches entweder über die Katalase- oder GPX-Reaktion zu Wasser abgebaut oder in das reaktionsfreudige OH^\cdot umgewandelt wird. Ein Übermaß an ROS führt zur Protein- und Lipidperoxidation sowie zur DNA Schädigung.

1.3.1 Endogene Quellen von ROS

Immer wenn O_2 metabolisiert oder in hoher Konzentration vorhanden ist, können seine reaktiven Formen entstehen. ROS können in Stoffwechselwegen und bei verschiedenen, durch Enzyme katalysierten Reaktionen gebildet werden, aber die Hauptquellen sind die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette in Mitochondrien, die NOX und die Xanthin-Oxidase (Guérin *et al.*, 2001).

Die Atmungskette besteht aus einem H^+ - und e^- -Transport, der über drei Kaskaden mit Hilfe von Substraten wie Ubichinon und Cytochrom c abläuft und letztlich H^+ auf O_2 überträgt. In Komplex 1 (NADH+H-Ubichinon-Reduktase) wird Wasserstoff ($H^+ + e^-$) auf Ubichinon übertragen. Das Wasserstoff- e^- wird in Komplex 3 (Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Reduktase) auf das Cytochromsystem übertragen. Im Komplex 4 (Cytochrom-c-Oxidase) reagieren die in Komplex 1 und 3 entstandenen e^- mit O_2 , wodurch O_2^- entsteht. Der e^- -Transport in der Atmungskette ist über den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (H^+ -Gradienten) in der inneren Mitochondrienmembran an die Synthese von dem Energieäquivalent ATP gekoppelt.

Das entstehende O_2^- wird durch die SOD zu H_2O_2 entgiftet (Burton *et al.*, 2002). H_2O_2 wird entweder durch Katalase (in Peroxisomen) oder GPX zu H_2O abgebaut. Wenn die antioxidativen Abbauewege überlastet sind oder nicht funktionieren, führen zu hohe Konzentrationen von O_2^- und H_2O_2 zur Bildung des OH^- in der Fenton-Reaktion. In dieser Reaktion entsteht in Gegenwart von Fe^{2+} aus H_2O_2 das reaktionsfreudige OH^- .

OH^- ist die gefährlichste Form der ROS und besitzt im Gegensatz zu O_2^- und H_2O_2 keinen spezifischen Abbaueweg, so dass es ungehindert mit Proteinen, Lipiden und DNA reagieren kann.

Die NOX als weitere bedeutende endogene Quelle für ROS ist ein membrangebundener Multienzymkomplex, der endothelständig in der Plasmamembran und in der Membran der Phagosomen zu finden ist und einen körpereigenen Mechanismus zur Bildung von O_2^- -Radikalen zur Immunabwehr von Bakterien darstellt. Dieser Multienzymkomplex besteht aus zwei membrangebundenen (gp91PHOX, p22PHOX), einer regulatorischen (rac1 oder rac2) und drei zytosolischen (p47PHOX, p67PHOX, p40PHOX) Untereinheiten. Wenn das Enzym aktiviert wird, nähert sich die zytosolische der membrangebundenen Einheit und NADPH wird oxidiert, damit sich aus molekularem O_2 das reaktive O_2^- bilden kann. Das O_2^- kann zu H_2O_2 , $HOCl^-$ und OH^- reagieren, wodurch der Organismus die Möglichkeit hat, Fremdstoffe oder Erreger zu eliminieren (Abb.5).

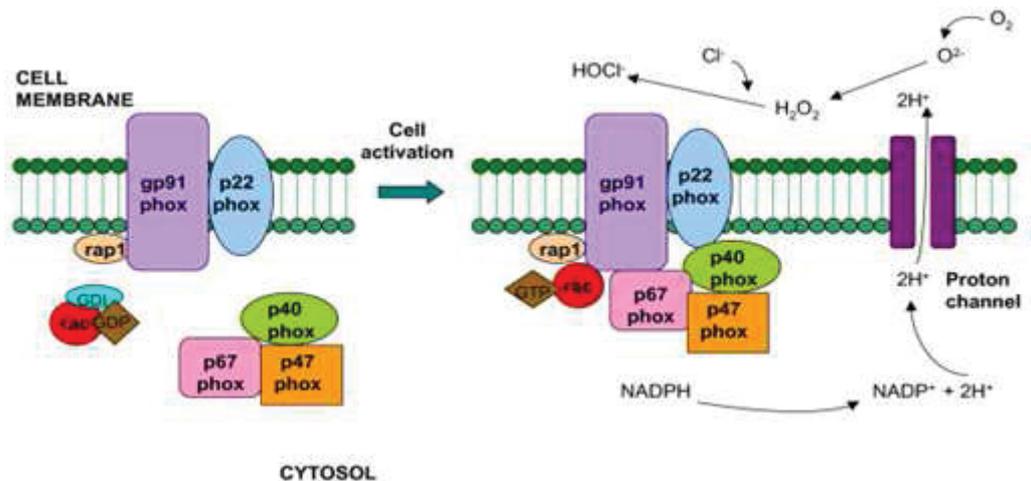


Abb. 5: Die Aktivierung der NOX

Die NOX, ein Multienzymkomplex, setzt sich aus zwei membrangebundenen (gp91PHOX, p22PHOX), einer regulatorischen (rac1 oder rac2) sowie drei zytosolischen (p47PHOX, p67PHOX, p40PHOX) Untereinheiten zusammen. In der aktivierten Form des Enzyms bindet die zytosolische an die membrangebundene Einheit und NADPH wird oxidiert. Die dabei entstehenden H⁺ binden sich mit aus molekularem O₂ gebildetem O₂⁻ zu H₂O₂ und mit Cl⁻ zu HOCl, um Fremdstoffe oder Erreger abzuwehren. (Assari, 2006)

Als *oxidative burst* wird die Freisetzung von ROS durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Phagozytose von Bakterien bezeichnet. Dies vollzieht sich mit Hilfe der NOX in der Membran der Phagosomen und ist für die Abwehr von Katalase-positiven Erregern essentiell. Defekte der NOX führen zu Einschränkung bakterizider Wirkung der Granulozyten. Dies wird klinisch durch das Krankheitsbild der septischen Granulomatose beschrieben und äußert sich in gehäuft auftretenden und schwer verlaufenden bakteriellen Infektionen.

Die endothelständige NOX wird von Wachstumsfaktoren aktiviert und spielt eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen der Hypertension und Arteriosklerose, wobei sie in Angiogenese und *remodeling* involviert ist (Munzel *et al.*, 1999; Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Meyer & Schmitt, 2000). Sowohl in maternalen als auch plazentaren Zellen wird eine erhöhte Aktivität von NOX mit Präeklampsie assoziiert (Matsubara & Sato, 2001; Lee *et al.*, 2003; Raijmakers *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2006). Manes hat auf trophoblastären Kaninchenzellen eine NOX, die sich von der phagozytären NOX in biochemischen Eigenschaften unterscheidet, entdeckt. Dieses Enzym sei in der frühen Phase der Interaktion zwischen Endometrium und Blastozyste aktiv (Manes & Lai, 1995; Manes, 2001). Zudem wurden Oxidase Aktivitäten in murinen Präimplantations-embryonen festgestellt (Filler & Lew, 1981). In 2-Zell Mausembryonen ließ sich eine konzentrationsabhängige Reduktion in der Produktion von H₂O₂ durch Inhibitoren der NOX erkennen (Nasr-Esfahani & Johnson, 1991).

Ein weiteres Enzym, welches an der Produktion von ROS mitbeteiligt ist, ist die Xanthin-Oxidase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure und ist am Purinabbau beteiligt. Im murinen Präimplantationsembryo stellt Xanthin das Endprodukt der Purine dar (Alexiou & Leese, 1992).

Monoxygenasen bauen ein Atom des O₂-Moleküls in ein Substrat ein, wodurch dieses Substrat mit einer OH-Gruppe versehen wird. Das zweite O₂-Atom wird mit Hilfe eines Wasserstoffdonators zu H₂O reduziert. Hierbei wird viel Energie frei und es besteht die Gefahr, dass sich ROS durch die Spaltung des O₂ bilden. Die Erzeugung von ROS durch CytochromP₄₅₀-Monoxygenasen ist bei metabolischen Prozessen der Steroidhormonsynthese aus Cholesterin (in den endokrinologischen Organen, wie Ovar oder Hoden) entscheidend.

1.3.2 Exogene Quellen von ROS

Die Entstehung von ROS in der Umgebung der Zelle oder des Präimplantationsembryos wird entscheidend von der O₂-Konzentration des Gewebes bestimmt. Der physiologische O₂-Gehalt in Ovar, Eileiter und Uterus entspricht 1-9% im Vergleich zu 20% atmosphärischem Gehalt, wobei der O₂-Partialdruck in Richtung Uterus immer weiter abnimmt (Mastroianni & Jones, 1965; Yedwab *et al.*, 1976; Fischer & Bavister, 1993). Somit finden die Fertilisation und die initialen Stadien der Entwicklung der Säuger *in vivo* in einer niedrigen O₂-Konzentration statt.

ROS werden in murinen sowie bovinen Embryonen verstärkt gebildet, wenn sie unter atmosphärischer O₂-Konzentration kultiviert werden (Goto *et al.*, 1993). Viele Studien haben demonstriert, dass bei unter atmosphärischen O₂-Konzentrationen kultivierten Embryonen sowohl die Entwicklung und die Zellzahl der Blastozysten als auch der Metabolismus beeinträchtigt sind (Whitten, 1971; Goto *et al.*, 1993; Gardner & Lane, 1996; Takahashi *et al.*, 1996; Fujitani *et al.*, 1997; Takahashi & Kanagawa, 1998; Bing *et al.*, 2003).

Sichtbares Licht kann die Bildung von ROS induzieren und zu erheblichen Zellschäden führen (Beehler *et al.*, 1992). Es reicht eine Exposition von mehr als 5min, um eine steigende H₂O₂-Konzentration in Mausembryonen zu messen (Goto *et al.*, 1993).

1.3.3 Biologie von ROS

ROS werden entscheidende Schlüsselrollen in biologischen Systemen zugeschrieben. Physiologische Konzentrationen von ROS sind notwendig, um homöostatische Mechanismen und intrazelluläre Signalwege zu regulieren.

ROS haben sowohl physiologische Aufgaben als auch ihren pathologischen Einfluss in der frühen Entwicklung (embryonal sowie maternal) und im Reproduktionstrakt. Ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen und Hormonen endet mit der Bildung von freien Radikalen. Freie Radikale greifen in die Regulierung von Genexpression und Transkriptionsfaktoren ein (Harvey *et al.*, 2002; Dennerly, 2004).

Der Einfluss von ROS auf die frühe Entwicklung des Embryos ist vielseitig. Einerseits zeigen Studien, dass experimentell induzierte ROS die frühe Entwicklung hemmen (Johnson & Nasr-Esfahani, 1994; Guérin *et al.*, 2001); andererseits zeigt die Zugabe von Antioxidantien in das Kulturmedium des Embryos unterschiedliche Resultate (Noda *et al.*, 1991, Payne *et al.*, 1992, Orsi & Leese, 2001). Noda *et al.* (1991) stellten eine signifikant erhöhte Blastulationsrate bei Mausembryonen fest, bei denen die *in vitro* Kultur Superoxiddismutase Zusatz enthielt. Eine Addition von 100U/ml Superoxiddismutase zur *in vitro* Kultur verbesserte die murine Embryonalentwicklung, wohingegen ein Zusatz von 1000U/ml Superoxiddismutase die murine Embryonalentwicklung nachteilig beeinflusste (Payne *et al.*, 1992).

Während des Entwicklungsstadiums, in dem das embryonale Genom von Rindern aktiviert wird (8-Zell-Stadium), hat ein kurzer Impuls von H₂O₂ einen positiven Einfluss auf die Entwicklung zum Blastozysten Stadium (Morales *et al.*, 1999). Ähnlich ist es mit dem *hatching* des murinen Embryos, womit eine spezifische Häufung von ROS Bildung assoziiert ist (Thomas *et al.*, 1997). Eine erhöhte Produktion von H₂O₂ wurde bei *in vitro* kultivierten Mausembryonen verglichen mit der *in vivo* Situation festgestellt (Goto *et al.*, 1993).

ROS wirken auf die weiblichen und männlichen Gameten. In Fortpflanzungsfunktionen wie der Eizellreifung, Follikulogenese, Lutealphase oder zyklischen Endometriumveränderungen stellen ROS entscheidende Signalmoleküle dar. Das Ovar als metabolisches Organ produziert während der Ovulation ROS, wobei die Follikelruptur in bestimmter Hinsicht einer Entzündungsreaktion gleicht (Espey, 1980). Zusätzlich werden ROS bei der Steroidhormonsynthese im *Corpus luteum* erzeugt (Abb.6). Neben diesen physiologischen Funktionen im Ovar werden ROS mit pathologischen

Mechanismen wie Infertilität oder Endometriose assoziiert (Wang *et al.*, 1997; Ngô *et al.*, 2009).

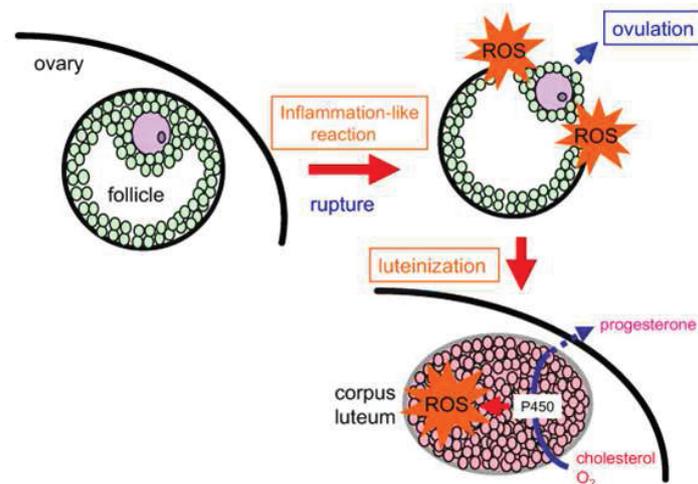


Abb.6: Physiologische Produktion von ROS bei der Ovulation und der Steroidhormonsynthese. Sowohl bei der Follikelruptur der Ovulation als auch bei der Steroidhormonsynthese entstehen im Ovar ROS. (Fujii *et al.*, 2005)

Die folliculäre Flüssigkeit in der Umgebung der Oozyte spielt eine entscheidende Rolle in der Fertilisation und der Embryonalentwicklung. Der Einfluss von ROS in der folliculären Flüssigkeit auf die Eizellreifung, Fertilisation und Schwangerschaft wurde untersucht, wobei niedrige Konzentrationen an ROS in der folliculären Flüssigkeit als potentieller Marker für prognostizierten Erfolg bei IVF Patienten erachtet wurde (Agarwal *et al.*, 2003).

In der Tube wird ein bestimmter Gehalt an H₂O₂ benötigt, um die Spermiumkapazitation, die Akrosom-Reaktion und die Oozyten-Fusion zu gewährleisten (de Lamirande & Gagnon, 1993; de Lamirande *et al.*, 1993). Die Fähigkeit von humanen Spermien, an die *Zona pellucida* zu binden, wird durch ROS gefördert (Aitken *et al.*, 1989). Obwohl eine niedrige Konzentration von ROS notwendig ist, damit Spermien ihre Fähigkeiten in der Fertilisation ausüben können, wird ein Übermaß an ROS mit männlicher Infertilität in Zusammenhang gebracht. Oxidativer Stress im männlichen Genitaltrakt geht mit Lipidperoxidation der Plasmamembran der Spermien und Motilitätseinschränkung der Spermien einher (Aitken & Fisher, 1994; Agarwal *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 1999).

1.3.3.1 Physiologie von ROS während der Embryogenese

Physiologische Konzentrationen von ROS sind essentiell für die Embryogenese, da sie intrazelluläre Signaltransduktionswege induzieren und Transkriptionsfaktoren steuern. ROS reagieren entweder direkt mit Protein Thiol-Gruppen oder beeinflussen indirekt Zellfunktionen über proinflammatorische Zytokine. Genexpression mittels Transkription zu kontrollieren, ist ein entscheidendes Hilfsmittel, um physiologische Funktionen und Entwicklungsprozesse zu regulieren. Eine Zelle reagiert auf extrazelluläre Signale oder Veränderungen der Umgebung, indem sich ihre Genexpression über kurze oder lange Zeit ändert. Mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren beantwortet die Zelle extrazelluläre Signale und passt ihre Gene diesen vorläufig an. Somit werden bei Änderungen der O₂-Konzentration Reaktionen in der Zelle ausgelöst, um sich an die abweichende O₂-Konzentration zu adaptieren. Zu den Faktoren, die durch die veränderte O₂-Situation aktiviert werden, gehören: HIF-1, NF-κB, AP-1 und p53 (Meyer *et al.*, 1994; Kretz-Remy *et al.*, 1998; Hensley *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 2001; Semenza, 2000, 2001).

Transkriptionsfaktoren aus der HIF-Familie werden direkt von der intrazellulären O₂-Konzentration beeinflusst und induzieren in Abhängigkeit von der jeweiligen O₂-Konzentration die Expression von Genen, welche in zahlreiche zelluläre Prozesse wie Angiogenese, Erythropoese, Glukose-Transport und Glykolyse involviert sind (Semenza, 1999; Wenger & Gassman, 1999; Wenger, 2000; Harvey *et al.*, 2002). Obwohl HIF-1 hauptsächlich über den O₂-Gehalt kontrolliert wird, gibt es andere Stimuli wie ROS, Wachstumsfaktoren oder Zytokine, die selbst unter normoxämischen Konditionen HIF aktivieren und im Umfeld des Reproduktionstraktes sowie während der frühen Embryonalentwicklung aufzufinden sind (Déry *et al.*, 2005). Die Aktivierung von HIF ist wichtig für *in vitro* Embryonen, um sich an die niedrigen O₂-Konzentrationen, die *in vivo* herrschen, zu gewöhnen (Harvey *et al.*, 2007).

Der Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert Zellproliferation, Immunantwort sowie Apoptose und steuert zahlreiche Gene, die an Zelladhäsion und -zyklus beteiligt sind (Janssen-Heininger *et al.*, 2000). Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α, Interleukinen (IL-1β, -6 und -8) und Wachstumsfaktoren, wie CyPA und PDGF, wird von NF-κB beeinflusst (Clemens, 2000). NF-κB ist bereits im 1-Zell-Stadium vorhanden und seine Aktivierung scheint Voraussetzung für die Entwicklung der Mausembryonen über das 2-Zell-Stadium hinaus zu sein (Parrott & Gay, 1998). Die Expression von NF-κB UE während der Embryonalentwicklung könnte für das Ansprechen auf Umweltfaktoren wie Stress erforderlich sein (Parrott & Gay, 1998). Weiterhin spielen ROS in verschiedenen

Signalwegen der Zellproliferation und -differenzierung eine wichtige Rolle und beeinflussen Proteinkinasen und G-Protein vermittelte Signalwege. Bei zahlreichen Wechselwirkungen zwischen Liganden und deren Rezeptoren wie zum Beispiel EGF werden ROS gebildet und leiten nachfolgende Signalwege ein (Dröge, 2002).

1.3.3.2 Pathologie von ROS

Wenn ein freies Radikal mit einem nicht-Radikal reagiert, wird eine Kettenreaktion ausgelöst, so dass Lipide, Proteine und DNA oxidiert und in Folge dessen in ihrer Struktur verändert werden. Als Konsequenzen entstehen mitochondriale Veränderungen, DNA-Mutationen, Lipide werden peroxidiert und Enzyme durch Änderungen der Konformation inaktiviert.

Zellmembranen und Organellen bestehen vorwiegend aus Phospholipiden, die mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren verknüpft sind. Deren Seitenketten sind anfällig für den Angriff freier Radikale (Burton *et al.*, 2002). Dies führt zum Rückgang der Membranfluidität, wodurch die Zellfunktion und der metabolische Transport beeinträchtigt werden.

Sowohl freie als auch in Proteinen gebundene AS können zum Angriffsziel von ROS werden. Besonders betroffen sind die schwefelhaltigen AS Methionin und Cystein, deren SH-Gruppen oxidiert werden können, wodurch Disulfidbrücken entstehen. Mit oxidativem Stress steigt die Anzahl der Disulfidbrücken in den Zellen und die Faltung der Proteine wird verändert.

DNA wird von OH^\cdot angegriffen, wodurch Moleküle mit der DNA-Base oder dem Zuckeranteil (Desoxyribose) reagieren können (Halliwell & Gutteridge, 1998). ROS induzieren DNA-Strangbrüche, wenn der zwischen den homologen Basen gelegene Wasserstoffbrücken-bildende Zuckeranteil geschädigt wird (Munné & Estop, 1991). Des Weiteren sind Mutationen in Form von Punktmutationen möglich, die die genetische Information abhängig von der Lage der Mutation verändern können. Außerdem kann die Oxidation von Histonen zu Querverbindungen führen, wodurch die Chromatinfaltung, die DNA-Reparatur sowie die Transkription beeinflusst werden können (Burton *et al.*, 2002). mtDNA ist besonders sensitiv gegenüber Angriffen von ROS, da in ihrer unmittelbaren Nähe O_2^- (in der Atmungskette) generiert wird. Zudem ist sie durch den fehlenden Schutz der Histone und ihre minimalen Reperaturmechanismen empfindlicher in Bezug auf Mutationen. Als Konsequenz zeigt sich unter normalen Bedingungen eine 5-10mal

höhere Rate an Mutationen im Vergleich zu nukleärer DNA (Richter *et al.*, 1988). Oxidativer Stress verursacht Schädigungen der mtDNA. Da mtDNA für mitochondriale Proteine wie die Enzyme der Atmungskette kodiert, führen Mutationen zu einer Schädigung des Zellmetabolismus.

H₂O₂ vermittelt Apoptose in Blastozysten (Pierce *et al.*, 1991). Des Weiteren scheint das Vorkommen von zytoplasmatischen Fragmenten in bovinen Blastozysten Apoptose zu induzieren (Yang & Rajamahendran, 2002). Ein direkter Zusammenhang wurde zwischen erhöhten H₂O₂-Konzentrationen und Apoptose in fragmentierten humanen Embryos festgestellt (Yang *et al.*, 1998). Der beobachtete Entwicklungsarrest bei murinen 2-Zell Embryonen während der *in vitro* Kultivierung wurde mit einem Anstieg an ROS sowie Lipidperoxidation assoziiert, welcher bei *in vivo* gesammelten Embryonen nicht beobachtet wurde (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990; Noda *et al.*, 1991). ROS werden mit der beeinträchtigten embryonalen Entwicklung der Säuger unter *in vitro* Konditionen in Verbindung gebracht (Johnson & Nasr-Esfahani, 1994). Versuchsweise wurden Spermien Xanthin-Oxidase generiertem O₂⁻ ausgesetzt, wodurch ein vierfacher Anstieg an nukleärer DNA-Fragmentation nachgewiesen wurde (Lopes *et al.*, 1998). Solche nukleären DNA-Läsionen werden mit dem beobachteten embryonalen Entwicklungsarrest unter *in vitro* Bedingungen in Verbindung gebracht (Guérin *et al.*, 2001).

1.3.4 Antioxidative Abwehrmechanismen

Unter physiologischen Bedingungen gibt es Schutzmechanismen, um die durch ROS entstehenden Schädigungen gering zu halten. Ein Abwehrmechanismus ist das antioxidative System, das zum einen niedrig molekulare Verbindungen wie Vitamine beinhaltet, zum anderen aus Enzymen besteht. Antioxidantien sind Radikale abfangende Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, ROS zu H₂O umzubauen, damit eine unbegrenzte Produktion von ROS verhindert wird (Fujii *et al.*, 2003).

Die nichtenzymatischen Antioxidantien versuchen, den oxidativen Stress, der in der Umgebung der Zelle entsteht, zu beherrschen; wohingegen die enzymatischen Antioxidantien vermehrt auf zellulärer Ebene die durch ROS entstehende Schädigung reduzieren. Enzymatische Entgiftung von ROS ist effizienter als nichtenzymatische (Halliwell & Gutteridge, 1998). Somit ist verständlich, dass am Ort des hauptsächlichen Ursprungs von ROS – in der Zelle – und der folgenreichsten Schäden, die

enzymatischen Antioxidantien im Vordergrund stehen (Abb.7). Guérin *et al.* (2001) hat im humanen und murinen weiblichen Reproduktionstrakt sowie im murinen Embryo Bestandteile der Abwehrmechanismen nachweisen können. Die mRNA-Expression von *sod* und *gpx* wurde in humanen und murinen Oozyten, in murinen Blastozysten und im Ovidukt des Menschen und der Maus festgestellt, wohingegen sich nichtenzymatische Antioxidantien wie Hypotaurin, Taurin und Vitamin C (Ascorbinsäure) in der folliculären und tubaren Flüssigkeit nachweisen ließen (Guérin *et al.*, 2001).

Einen weiteren Schutzmechanismus bietet das Redox-System (Reduktion-Oxidation-System), das nicht nur schädliche Oxidationsmittel entgiftet, sondern zusätzlich auch oxidierte Moleküle reduziert. Das Redox-System ist an der Regulation von zahlreichen physiologischen Funktionen der Zelle beteiligt, wie Signaltransduktion des Zellwachstums und -todes (Nakamura *et al.*, 1997).

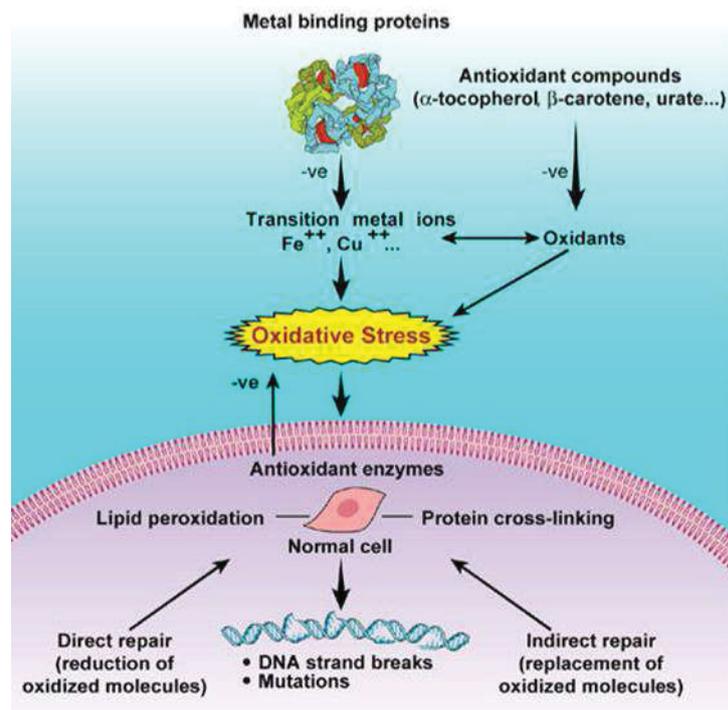


Abb.7: Auswirkungen und Abwehrmechanismen von oxidativem Stress auf zellulärer und extrazellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene schützen antioxidative Enzyme die Zelle vor durch ein Übermaß an ROS ausgelöster Lipidperoxidation, Protein- oder DNA-Schädigungen, indem sie entweder oxidierte Moleküle reduzieren oder ROS umbauen. Ausserhalb der Zelle dienen antioxidative Vitamine wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin C, schwefelhaltige Verbindungen wie Glutathion, Hypotaurin oder Cysteamin sowie metallische Chelatbildner als Radikalfänger und versuchen, die durch den oxidativen Stress verursachten Schäden zu minimieren. (Agarwal *et al.*, 2005)

1.3.4.1 Nichtenzymatische Antioxidantien

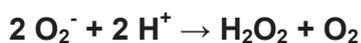
Nichtenzymatische Antioxidantien sind auch bekannt als synthetische Antioxidantien. Das komplexe antioxidative System im Körper ist abhängig von der Aufnahme von antioxidativen Vitaminen und Mineralstoffen, wie Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol), Vitamin A (Carotin, β -Carotin), Selen und Zink. Außerdem haben viele schwefelhaltige Verbindungen wie Glutathion, Hypotaurin und Taurin sowie Cysteamin antioxidative Funktionen. Metallische Chelatbildner und Metall-bindende Proteine, wie Transferrin, nehmen ebenso eine zentrale Wichtigkeit in der Kontrolle von potentiell Radikale erzeugenden Reaktionen ein (Guérin *et al.*, 2001).

Diese nichtenzymatischen Antioxidantien haben gemein, dass sie entweder ungepaarte e^- abfangen und somit selbst zu Radikalen werden, die als relativ stabile Radikale die Oxidationsketten durchbrechen oder die oxidierten Radikalfänger regenerieren können.

1.3.4.2 Enzymatische Antioxidantien

Enzymatische Antioxidantien werden auch natürliche Antioxidantien genannt. Sie neutralisieren ROS und verhindern, dass ROS zelluläre Strukturen schädigen, indem sie diese abbauen oder oxidierte Radikalfänger wieder reduzieren. Obgleich viele Enzyme als Antioxidantien fungieren können, gehören zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien die SOD, Katalase, GPX und GR.

Die SOD reagiert in ihrer oxidierten Form mit einem O_2^- unter Bildung von O_2 und ihrer reduzierten Form, wobei diese Form mit einem weiteren O_2^- und zwei H^+ zu H_2O_2 reagiert. Dann ist das Enzym wieder in seiner oxidierten Form.



Sod1-Defizienz wird mit weiblicher Infertilität assoziiert (Ho *et al.*, 1998; Matzuk *et al.*, 1998).

GPX entgiften zahlreiche Peroxide, indem die reduzierte Form von GSH als Elektronendonator fungiert. H_2O_2 wird auf diese Weise zu H_2O reduziert, indem GSH oxidiert wird (Abb.8). Viele Enzyme, die verschiedenen Gruppen von Proteinen zugeordnet werden, weisen eine GSH-abhängige Peroxidase Funktion auf. Die konventionelle GPX enthält in ihrem aktiven Zentrum Selenocystein und scheint eine lebenswichtige Rolle bei der Entgiftung von Peroxiden zu spielen.

Es werden vier Selenium enthaltende Unterformen von GPX in Säugern produziert (Fujii *et al.*, 2003; 2005), wobei in dieser Arbeit GPX1 und GPX4 von Bedeutung sind. GPX1, die zytosolische Form, ist in vielen Geweben zu finden. *Gpx1-knockout* Mäuse zeigen keine phänotypischen Veränderungen bezüglich ihrer Reproduktionsfähigkeit (Ho *et al.*, 1997). GPX4 verschlüsselt eine Unterform, die speziell Phospholipidhydroperoxid entgiftet und in großen Mengen im Hoden (Testis) exprimiert wird. Ein Defizit an Selenium wird mit männlicher Infertilität in Beziehung gebracht (Hansen & Deguchi, 1996). Ebenfalls wurde mehrfach von einer Korrelation zwischen männlicher Infertilität und einem Defekt von GPX4 berichtet (Foresta *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2009). *Gpx4-knockout* Mäuse zeigen einen frühzeitigen embryonalen Tod im Uterus (Imai *et al.*, 2003; Yant *et al.*, 2003).

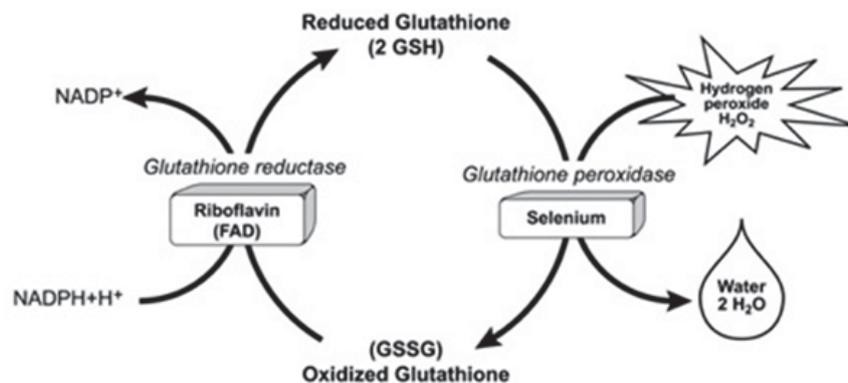


Abb.8: Entgiftung von H_2O_2 durch GPX

GPX entgiften Peroxide, indem die reduzierte Form von GSH als Elektronendonator fungiert. H_2O_2 wird zu H_2O reduziert, indem GSH oxidiert wird. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird von der GR reduziert. In dieser Reaktion sind sowohl Riboflavin als auch NADPH beteiligt.

Mit freundlicher Genehmigung des Micronutrient information Center, Linus Pauline Institute, Oregon State University (<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/riboflavin/gsh.html>)

1.3.4.3 Redox-Systeme

GSH ist ein aus den drei AS Glutaminsäure, Cystein und Glycin bestehendes Peptid, das entweder in seiner reduzierten (GSH) oder seiner oxidierten Form (GSSG), wobei eine Disulfidbrücke zwischen zwei GSH-Molekülen gebildet wird, zu finden ist. Da GSH eine reaktive Sulfhydrylgruppe besitzt, wird es intrazellulär in seiner reduzierten Form benötigt, um die Aufgabe des e^- -Donators von GPX zu übernehmen. GR katalysiert die Reduktion von GSSG zu GSH, um den Bestand an GSH sicherzustellen.

Reproduktionsmedizinisch spielt GSH im weiblichen Reproduktionstrakt eine

entscheidende Rolle in der Reduktion von oxidativem Stress, indem es direkt mit ROS reagiert oder als e^- -Donator von GPX fungiert (Fujii *et al.*, 2005). Die Wichtigkeit im männlichen Genitaltrakt erklärt sich mit der Expression von GR im epithelialen Gewebe dieses Traktes, wodurch GSH für die Spermien bereitgestellt wird (Fujii *et al.*, 2003). Außerdem reduziert eine Behandlung mit Komponenten, die den Gehalt von GSH erhöhen, die männliche Infertilität (Lenzi *et al.*, 1994; Irvine, 1996). Obwohl Embryonen im Präimplantationsstadium eine geringe Kapazität an GSH-Synthese aufweisen, sind bei Mäusen, Schweinen und Rindern steigende intrazelluläre Konzentrationen von reduziertem GSH sowohl mit verbesserter Fertilisation als auch nachfolgender Embryonalentwicklung *in vitro* assoziiert (Gardiner & Reed, 1995; Abeydeera *et al.*, 1999; de Matos & Furnus, 2000).

TRX ist ursprünglich als e^- -Donator für die Ribonukleotidreduktase identifiziert worden. Heute ist bekannt, dass TRX zahlreiche Enzyme sowie transaktivierende Faktoren von Genen reguliert und entscheidend an Zellwachstum, -differenzierung und -tod beteiligt ist (Nakamura *et al.*, 1997). Zudem übernimmt TRX die Rolle des e^- -Donators des PRDX – einer Gruppe von antioxidativen Proteinen und übt direkt eine Peroxidase Funktion aus (Fujii & Ikeda, 2002). Wenn TRX oxidiert wird, bildet sich eine intramolekulare Disulfidbrücke. Das oxidierte TRX kann mit Hilfe der TRX-Reduktase regeneriert werden, indem e^- von NADPH genutzt werden. PRDX besitzt eine TRX-abhängige Peroxidase Aktivität und übernimmt die Funktion des antioxidativen Systems, indem es in zwei Schritten reduziert wird, wobei H_2O_2 zu H_2O reagiert. Nach der ersten Reduktion kann sich H_2O abspalten (Hydrolyse) und eine Disulfidbrücke wird gebildet, welche mit Hilfe der Reduktase zu der Ausgangsform von PRDX reduziert wird.

Neben der Funktion als antioxidative Proteine besitzen PRDX zahlreiche Aufgaben in Zellproliferation und -differenzierung, intrazellulärer Signaltransduktion und Apoptose (Fujii & Ikeda, 2002). Es gibt 6 Isoformen von PRDX, wobei in dieser Arbeit die im Zytosol lokalisierte PRDX2 von Bedeutung ist (Kang *et al.*, 1998). In murinen Testis wurde eine Hochregulation von PRDX2 durch Bestrahlung festgestellt (Lee *et al.*, 2002). Eine Überproduktion von PRDX2 blockiert das von extrazellulär hinzugefügtes H_2O_2 oder TNF- α aktivierte NF- κ B (Kang *et al.*, 1998). Ein Grund der erhöhten Inzidenz von Apoptose, die bei kultivierten Embryonen verglichen mit der *in vivo* Gruppe beobachtet wird, könnte die Herunterregulation von PRDX2 sein (Brison & Schultz, 1997).

Durch die Funktion von TRX als e^- -Donator der Ribonukleotidreduktase – einem entscheidenden Enzym der DNA-Synthese – wird das Sterben der *trx-knockout* Mäuse in der frühen Embryonalentwicklung erklärt (Matsui *et al.*, 1996).

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung

Ein großer Forschungsbereich befasst sich mit der Zusammensetzung der Kulturmedien, um sie hinsichtlich ihrer Komponenten dem physiologischen Reproduktionstrakt anzugleichen, da die *in vitro* Kultur ein verändertes Genexpressionsmuster der Präimplantationsembryonen hervorrufen kann (Lonergan *et al.*, 2003, Rinaudo *et al.*, 2004, 2006; Lane & Gardner, 2007).

Diese Arbeit behandelt die Fragestellung, inwieweit sich das mRNA-Expressionsmuster bestimmter Gene von murinen Einzelembryonen in einem konventionellen humanen Kulturmedium (Cleavage Medium von COOK®) und einem neueren – vor ROS schützenden – Medium (G-1™ PLUS Medium von Vitrolife™) von der *in vivo* Situation unterscheidet. Die Auswahl der Gene setzt sich wie folgt zusammen: *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*.

In Bezug auf die Wichtigkeit von *il-6*, *shh* und *ihh* in der frühen Entwicklung und möglichen Veränderungen in der Angiogenese während der frühen Entwicklung, der Neuralrohr- oder Knochenentwicklung sowie im Hinblick auf die Relevanz von *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* bezüglich ROS und möglichen Modifikationen im antioxidativen System, ist das Wissen der mRNA-Expression dieser Gene in Einzelblastozysten und ein möglicher Einfluss der *in vitro* Kultur von Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss der oben genannten Kulturmedien auf die mRNA-Expression wichtiger Gene in murinen Embryonen während 3-tägiger *in vitro* Kultur festzustellen, um mögliche Beeinträchtigungen der frühen Embryonalentwicklung aufzudecken.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In Zusammenarbeit mit der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgte die Aufzucht und Superovulation der Mäuse unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes. Weibliche Mäuse des Stammes B6-129F1 im durchschnittlichen Alter von 8 Wochen wurden bei konstantem Luftdruck, konstanter Luftfeuchtigkeit und Temperaturen von 22-24°C in einem 12-stündigen Hell-/Dunkelzyklus in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien gehalten. Allen Tieren wurde eine Basisernährung von Pellets (Altromin Haltungsfutter für Mäuse und Ratten, Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum* der Stadt Düsseldorf gewährleistet. Die Mäuse wurden durch einmalige, intraperitoneale Injektion von 10IU PMSG (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) superovuliert. 48h später folgte die Ovulationsinduktion, indem 10IU hCG (Sigma-Aldrich) einmalig intraperitoneal verabreicht wurden. Die auf diese Weise vorbehandelten weiblichen Mäuse wurden mit fertilen männlichen Mäusen über Nacht verpaart, wobei das Vorhandensein eines Vaginalpfropfens (*plug*) am nächsten Morgen eine erfolgreiche Verpaarung bestätigte.

2.2 Gewinnung der Embryonen

Zur Gewinnung der Embryonen wurden die als erfolgreich verpaart identifizierten Weibchen nach inhalativer Narkotisierung mit Äther (Höchst AG, Frankfurt am Main, Deutschland) durch zervikale Dislokation (durchgeführt von Dr. rer. nat. J. Hirchenhain, Genehmigung zur Organentnahme mit Projektnr. O17/99) getötet.

Für die Embryonen der *in vitro* Gruppen wurden die befruchteten Eizellen 12h *post-β-HCG-injektionem* (durchgeführt von Dr. rer. nat. J. Hirchenhain, Genehmigung zur Organentnahme mit Projektnr. O17/99) entnommen. Dabei wurde eine Mikronadel unter Sicht in dem geschwollenen Anteil der Ampulle positioniert, um den Eileiter mit Medium durchzuspülen und die Cumulus-Zygoten-Komplexe zu entfernen. Später wurden die Cumulusanteile in IVF-Medium mit 80IU/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) durch vorsichtige Aspiration mittels einer Denudationspipette 140µl (Reproline Medical GmbH,

Rheinbach, Deutschland) abgetrennt. Eventuelle Hyaluronidase Reste wurden durch zweimaliges Waschen in Medium von den Cumulus-freien Zygoten gelöst. Die Cumulus-freien Zygoten wurden in einer mit 25µl des jeweiligen Mediums (1. Cleavage Medium von COOK®, 2. G-1™ PLUS Medium von Vitrolife™) versehenen Kulturschale (Nr. 3001, Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey) unter Öl im Inkubator in angefeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C aufbewahrt. Die Zusammensetzung des Cleavage Mediums (COOK®) sowie des G-1™ PLUS Mediums (Vitrolife™) sind in Tab.1 dargestellt.

Die Beobachtung der sich entwickelnden Embryonen wurde zu bestimmten Zeitpunkten sichergestellt: 36h nach HCG-Gabe (2-Zell-Stadium), 60h nach HCG-Gabe (8-Zell-Stadium), 75h nach HCG-Gabe (Morula Stadium) und 80h nach HCG-Gabe (frühes Blastozystenstadium) (Abb.9). In der Entwicklung stagnierende Embryonen wurden entfernt.

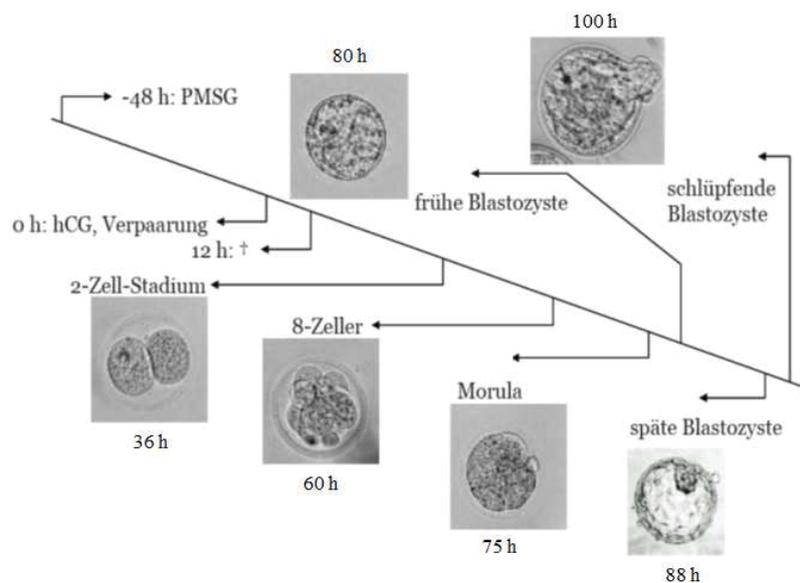


Abb.9: Überblick des experimentellen Zeitablaufs von der Stimulation der weiblichen Mäuse bis zur Entwicklung der Blastozyste

Nachdem die weiblichen Mäuse mit PMSG stimuliert und in h 0 verpaart wurden, vollzieht sich nach erfolgreicher Fertilisation (12.h) die Isolation der Embryonen. Die Embryonen werden in das entsprechende IVF-Medium in eine Kulturschale transferiert, in welchem sich die Entwicklung vom 2-Zell-Stadium (36.h) bis zur Blastozyste (80.-88.h) beobachten lässt. (modifiziert nach Krüssel *et al.*, 1997)

Hinsichtlich der *in vivo* Gruppe wurden die Blastozysten nach Entnahme der Uteri am d3,5 pc (84h *post*-HCG Gabe) mit Hilfe einer Spritze mit Injektionskanüle mit auf 37°C erwärmtem Medium herausgespült. Danach wurden die Blastozysten durch vorsichtige Aspiration mit einer Denudationspipette 140µl (Reproline Medical GmbH) zweimal im

Medium gewaschen und jeweils in ein vorbereitetes Gefäß (Multiply-Pro Gefäß 0,5ml, Polypropylen, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) zur RT überführt.

Cleavage Medium (COOK®)	G-1™ PLUS Medium (Vitrolife™)
augereinigtes Wasser	aufgereinigtes Wasser
Calciumlactat	Calciumchlorid
Calciumpantothenat	EDTA
EDTA	Gentamicin
Gentamicin	Glucose
Glucose	Glycin
Glutamin	Humanes Serum Albumin
Glycin	Hyaluronan
Humanes Serum Albumin	Kaliumchlorid
Kaliumchlorid	L- Alanyl-L-Glutamin
Kaliumphosphat	L- Asparagin
L- Alanin	L- Aspartat
L- Arginin	L- Methionin
L- Asparaginmonohydrat	L- Prolin
L- Aspartatsäure	L- Serin
L- Cystin	L- Taurin
L- Glutaminsäure	L-Alanin
L- Histidin	L-Glutamat
L- Isoleucin	Liponsäure
L- Leucin	Magnesiumsulfat
L- Lysin	Natriumbikarbonat
L- Methionin	Natriumchlorid
L- Phenylalanin	Natriumcitrat
L- Prolin	Natriumdihydrogenphosphat
L- Serin	Natriumlactat
L- Taurin	Natriumpyruvat
L- Threonin	
L- Tryptophan	
L- Tyrosin	
L- Valin	
Magnesiumchlorid	
Magnesiumsulfat	
Natriumbikarbonat	
Natriumchlorid	
Natriumpyruvat	

Tab.1: Zusammensetzung des Cleavage (COOK®) und G-1™ PLUS (Vitrolife™) Mediums
Die genauen Konzentrationen der einzelnen Reagenzien werden von den Herstellern nicht angegeben.

2.3 RT

Bei der RT synthetisiert die RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche auch als Reverse Transkriptase bezeichnet wird, aus einem als Matrize dienenden RNA-Einzelstrang einen komplementären DNA-Strang (cDNA). Heute werden veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren als Reverse Transkriptasen verwendet. Die hier verwendete Reverse Transkriptase des MMLV erreicht ihr Arbeitsoptimum bei 37°C.

Zunächst wurde für jeden Präimplantationsembryo ein PCR-Gefäß mit einem Ansatz von 18µl vorbereitet, welcher aus den in Tab.2 aufgeführten Reagenzien (High capacity cDNA Archive Kit 432217, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bestand.

Zusammensetzung der RT-Komponenten	Volumen	Konzentration
10× RT Puffer	2 µl	1×
25× dNTP-Mix (100 mM)	0,8 µl	1×
DEPC-dH ₂ O	13,2 µl	
10× RT Random Primer (1,0 mL)	2 µl	1×
Embryo (einschließlich Medium)	1 µl	
MMLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl	50 U
Gesamtvolumen	20 µl	

Tab.2: Zusammensetzung und Konzentration des RT-Reaktionsgemisches.

Ein einzelner Embryo wurde mit 1µl Medium zu dem mit oben abgebildeten Ansatz mit Ausnahme des Enzyms gefüllten Reagenzgefäß gegeben und anschließend in einen Thermocycler (UNOII, T-Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) für 1min auf 99°C zur Denaturierung der Proteine und Zerstörung der Zellmembranen erhitzt, um die intrazelluläre Gesamt-RNA zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit kompletten Einzelblastozysten und der aus ihnen freigesetzten RNA-Menge gearbeitet. Photometrisch lässt sich die Konzentration dieser RNA-Menge nicht messen. Als Negativkontrolle wurde anstatt des Embryos lediglich 1µl Medium dem Reaktionsgemisch zugefügt. Nachdem die Proben auf 4°C abgekühlt wurden, konnte das thermolabile Enzym MMLV Reverse Transkriptase 50U/µl (High capacity cDNA Archive Kit 432217) hinzugefügt werden.

Im Thermocycler wurde die RT-Reaktion nach folgendem Protokoll ausgeführt: 25°C für 10min, 37°C für 2h, 4°C als Haltetemperatur. Nach abgeschlossener RT-Reaktion wurden die Proben mit 30µl DEPC-dH₂O (sterilisiert, destiliert) aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.4 PCR

Die 1983 von Karry Mullis entdeckte PCR ist eine bewährte und sehr effektive Methode zur Amplifizierung von bekannten Nukleotidsequenzen. Das Prinzip beruht auf der Vervielfältigung kurzer DNA-Doppelstränge am freien 3`OH-Ende durch DNA-Polymerasen. Der sich wiederholende Reaktionszyklus der PCR lässt sich in drei Schritte gliedern:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 92-98°C
2. Primer-*annealing* bei einer für das jeweilige Oligonukleotid (Primer) spezifischen Temperatur an die Einzelstränge der denaturierten DNA
3. Elongation der Nukleotidkette bei einer dem entsprechenden Aktivitätsoptimum des Enzyms (DNA-Polymerase) angepassten Temperatur

Mit jedem Zyklus verdoppelt sich der von den Primern eingerahmte *template*-Abschnitt. In dieser Arbeit wurde die mittels RT in cDNA umgewandelte RNA der Einzelblastozysten als *template* verwendet.

Die ausgewählten Primer müssen bestimmten Anforderungen entsprechen, um eine einwandfreie PCR gewährleisten zu können, wie zum Beispiel ≥ 17 Nukleotide lang sein, ihren Schmelzpunkt zwischen 55 und 80 °C und einen ähnlichen Schmelzpunkt für beide Primer haben sowie keine Dimer-Bildung aufweisen. Die Bindung der Oligonukleotidsequenzen an die jeweilige Erkennungssequenz wird über die sogenannte *annealing*-Temperatur reguliert.

In dieser Arbeit wurde die *nested*- („verschachtelte“) PCR verwendet. Charakteristisch für die *nested*-PCR ist der Nachweis geringster *template*-Mengen. Bei dieser Form der PCR werden zwei ineinander verschachtelte PCRs durchgeführt, wobei das *template* der zweiten PCR das Produkt der Ersten darstellt. Es werden zwei PCRs mit unterschiedlichen Primern (*outer pair* und *inner pair*) nacheinander durchgeführt, wobei die Primer der zweiten PCR weiter innen als die Ersten liegen, so dass

dementsprechend ein kleineres Fragment des ersten PCR-Produktes amplifiziert wird. Dies erhöht die Sensitivität und Spezifität der Methode enorm.

Die in dieser Arbeit in der *nested*-PCR verwendeten Oligonukleotidsequenzen, die Fragmentgröße und die *annealing*-Temperatur der untersuchten Gene werden in Tab.3 zusammengefasst.

mRNA	<i>nested</i> -PCR	<i>annealing</i> -Temperatur	Amplikon-größe	3'-/5'-Ende	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>β-Aktin</i> X03672		54°C	407 bp	5'	CAA GGT GTG ATG GTG GGA ATG G
				3'	CAG GAT GGC GTG AGG GAG AGC A
<i>il-6</i> NM_031168	außen	56°C	339 bp	5'	GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA
				3'	GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA
	innen	56°C	226 bp	5'	TGT GCA ATG GCA ATT CTG AT
				3'	CTC TGA AGG ACT CTG GCT TTG
<i>shh</i> NM_009170	außen	55°C	530 bp	5'	GAG ACC CAA CTC CGA TGT GT
				3'	GAT GTC GGG GTT GTA ATT GG
	innen	56°C	150 bp	5'	CTG GCC AGA TGT TTT CTG GT
				3'	CTC GGC TAC GTT GGG AAT AA
<i>ihh</i> NM_010544	außen	58°C	438 bp	5'	CAC TTG TGG TGG AGA TGT G
				3'	TAC CAC ACG CTT GTC AGC TC
	innen	53°C	106 bp	5'	CTC TAA CCA CTG CCC TCC TG
				3'	AGA GGA CGG AGA CAA CCT CA
<i>nox</i> NM_172203	außen	59°C	683 bp	5'	GGG ATG ACC ATA AGG GGA GT
				3'	CCA GCC AGT GAG GAA GAG AC
	innen	59°C	216 bp	5'	TCC ATT TCC TTC CTG GAG TG
				3'	CCC AAC CAG TAC AGC CAC TT
<i>gpx4</i> NM_001037741	außen	58°C	410 bp	5'	AGT ACA GGG GTT TCG TGT GC
				3'	CGG CAG GTC CTT CTC TAT CA
	innen	57°C	166 bp	5'	CCG GCT ACA ACG TCA AGT TT
				3'	ACG CAG CCG TTC TTA TCA AT
<i>gpx1</i> NM_008160	außen	58°C	847 bp	5'	GTC CAC CGT GTA TGC CTT CT
				3'	TCG ATG TCG ATG GTA CGA AA
	innen	45°C	278 bp	5'	GGT TCG AGC CCA ATT TTA CA
				3'	GGG CAC GCG TCC ATG TCG GC
<i>prdx2</i> NM_011563	außen	56°C	946 bp	5'	TAG GGC TCT CTC GGT TTT GA
				3'	TTG ACT GTG ATC TGG CGA AG
	innen	56°C	179 bp	5'	GGT GCC TTC AAG GAA ATC AA
				3'	GCC TAG CTT TCG GAA GTC CT

Tab.3: In der *nested*-PCR verwendete Sequenzen von Oligonukleotiden (äußeres und inneres Paar) und ihre *annealing*-Temperatur.

Die für die PCR wichtigen Bestandteile sind $MgCl_2$, PCR-Puffer, Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und eine thermostabile DNA-Polymerase sowie die jeweiligen Primer. Der in dieser Arbeit benutzte 2×PCR-Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) enthielt $MgCl_2$, PCR-Puffer, 0,04mM dNTPs sowie 0,05U/μl *Taq*-DNA-Polymerase. Es mussten lediglich die Primer, DEPC-behandeltes H_2O sowie das *template* hinzugefügt werden. Als Positivkontrolle wurde Milz-cDNA verwendet. DEPC-behandeltes H_2O stellte die Negativkontrolle dar und bestätigte eine nicht kontaminierte PCR. Als *housekeeping*-Gen wurde β -Aktin verwendet. Alle β -Aktin positiven Blastozysten wurden mittels *nested*-PCR auf die Gene *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* untersucht. Die Reaktionsansätze der *nested*-PCR sind in Tab.4 und 5 zusammengefasst.

Zusammensetzung PCR	Volumen	Konzentration
PCR Master-Mix (2×) (K0171, Fermentas)	12,5 μl	1×
DEPC-dH ₂ O	ad 25 μl	
3' + 5' Primer-Mix	je 1,5 μl	0,3 μM
<i>Template</i>	5 μl	
Gesamtvolumen	25 μl	
Positivkontrolle: Milz-cDNA	2 μl	
Negativkontrolle: DEPC-dH ₂ O	2 μl	

Tab.4: Reaktionsansatz der 1. und 2. PCR von *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox* und *gpx1*.

Zusammensetzung PCR	Volumen	Konzentration
PCR Master-Mix (2×) (K0171, Fermentas)	12,5 μl	1×
DEPC-dH ₂ O	ad 25 μl	
3' + 5' Primer-Mix (je 5μl)	je 1,5 μl	0,3 μM
<i>Template</i>	2 μl	
Gesamtvolumen	25 μl	
Positivkontrolle: Milz-cDNA	2 μl	
Negativkontrolle: DEPC-dH ₂ O	2 μl	

Tab.5: Reaktionsansatz der 1. und 2. PCR von *gpx4* und *prdx2*.

Anschließend wurde die PCR im Thermocycler nach folgenden Parametern durchgeführt: Eine initiale Denaturierung von 1min bei 94°C, 35 (für *prdx2*) beziehungsweise 40 (für *β-Aktin*, *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1*) Zyklen bestehend aus Denaturierung von 30s bei 94°C, Primerhybridisierung von 45s bei der zugehörigen *annealing*-Temperatur und Elongation von 1min bei 72°C. Nach 35 oder 40 Zyklen mit diesen Parametern wurde die PCR bei 72°C für 10min komplettiert und durch Abkühlung auf 4°C beendet. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.5 Gelelektrophorese

Wenn in einem elektrischen Feld gelöste ionische Verbindungen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff wandern, wird dies als Elektrophorese bezeichnet. Die Gelelektrophorese stellt eine gängige Methode dar, um Nukleinsäurestränge anhand ihrer Größe aufzutrennen und somit nachzuweisen. Dabei bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäuren bei angelegter Spannung zur positiv geladenen Anode.

Als Trägermaterial wurde ein 2%iges Agarose-Gel hergestellt, indem Agarose in TBE-Pufferlösung in der Mikrowelle aufgeköcht und unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens auf 70°C abgekühlt wurde. Nach Zugabe von 5µl Ethidiumbromid wurde die Agarose in eine Elektrophoresekammer (BioRad PowerPac 300, BioRad Laboratories, Hercules, California) gegossen und zum Auspolymerisieren im Dunkeln abgekühlt. Das 2. (innere) PCR-Produkt wurde mit 5µl Ladungspuffer, der Bromphenolblau enthält, versehen und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurde 10µg/µl des Quantitas DNA Marker 200bp-10kb (Biozym Scientific GmbH) (Anhang) zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente auf jedes Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 45min bei 90V/cm in TBE-Pufferlösung durchgeführt.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele mit dem Programm GelDoc 1000 (BioRad Laboratories, Hercules, California) unter UV-Licht analysiert.

Da Ethidiumbromid durch die Bindung an DNA seine Fluoreszenz stark erhöht, können Fragmente im Agarosegel mit UV-Licht der Wellenlänge 300nm sichtbar dargestellt werden.

2.6 Statistische Analyse

Die embryonale mRNA-Expression der 7 untersuchten Gene jeder Einzelblastozyste wurde entweder als 0, nicht nachweisbar, oder 1, nachweisbar, klassifiziert. Zur Feststellung der statistischen Signifikanz der verschiedenen mRNA-Expressionen in den drei unterschiedlichen Gruppen wurde ein student t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dabei wurde die Signifikanz der Anzahl der mRNA-positiven Blastozysten der *in vivo* Gruppe jeweils gegen die beiden *in vitro* Gruppen untersucht sowie die beiden *in vitro* Kollektive gegeneinander. Es wurde signifikant mit $p < 0,01$ unterschieden.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 292 murine Einzelblastozysten vorerst auf die mRNA-Expression von β -Aktin und im Falle eines positiven Nachweises von β -Aktin-mRNA auf die mRNA-Expression von *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* untersucht. Das untersuchte Entwicklungsstadium war der Zeitpunkt der frühen Blastozyste (80h pc).

β -Aktin-mRNA konnte in 276 (94,52%) der 292 murinen Blastozysten mit mikroskopisch normaler Morphologie nachgewiesen werden, wobei 16 Präimplantationsembryonen aufgrund der fehlenden mRNA-Expression von β -Aktin als *housekeeping*-Gen ausgeschlossen wurden. Abb.10 illustriert repräsentativ die cDNA-Banden für 15 verschiedene Präimplantationsembryonen, die β -Aktin-mRNA mit einer Fragmentgröße von 407bp exprimierten und in die weitere Untersuchung einbezogen wurden.

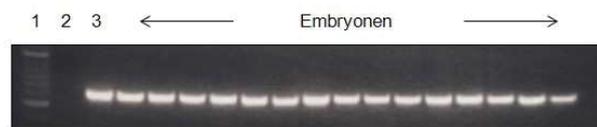


Abb.10: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von β -Aktin (407bp) muriner Blastozysten: 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz cDNA als Positivkontrolle.

Die murinen Einzelblastozysten wurden in drei unterschiedliche Kollektive eingeteilt: ein *in vivo* Kollektiv und zwei *in vitro* Kollektive, die jeweils in einem anderen Medium kultiviert wurden. Das *in vivo* Kollektiv, bestehend aus 106 Blastozysten, stellte die Kontrolle dar, um die mRNA-Expression der untersuchten Gene in den *in vitro* Kollektiven mit der physiologischen mRNA-Expression dieser Gene zu vergleichen. Die beiden anderen Kollektive wurden *in vitro* entweder in dem konventionellen Cleavage Medium von COOK® oder in dem neueren G-1TM PLUS Medium von VitrolifeTM, das speziell gegen Schädigungen durch ROS schützen soll, für drei Tage kultiviert. Dabei umfasste das Kollektiv des COOK® Mediums 92 Embryonen und das Kollektiv des VitrolifeTM Mediums 78 Embryonen. Lediglich die Embryonen, die eine regelrechte Morphologie aufwiesen, wurden in weitere Untersuchungen miteinbezogen. Täglich wurde der Entwicklungsstand der *in vitro* kultivierten Präimplantationsembryonen mikroskopisch kontrolliert und unmittelbar vor Durchführung der RT mittels eines inversen Mikroskopes begutachtet. Abb.11 zeigt *in vitro* kultivierte Mausblastozysten.

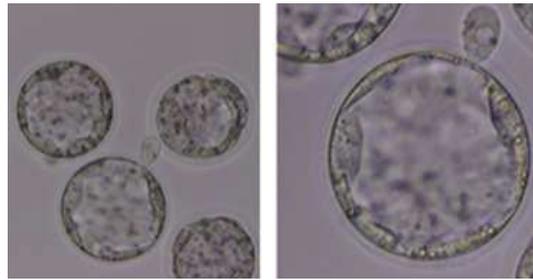


Abb.11: Eigene mikroskopische Aufnahmen der murinen *in vitro* Blastozysten an d3,5.

Nach der RT wurden β -Aktin-mRNA positive Einzelblastozysten auf die mRNA-Expression folgender Gene untersucht: *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2*. Diese Auswahl der Gene setzt sich einerseits aus dem Zytokin IL-6, dessen Wichtigkeit für die Implantation des Embryos in Experimenten (Motro *et al.*, 1990; Meissner *et al.*, 1999) bereits festgestellt wurde, sowie zwei Vertretern der HH-Familie, welche entscheidend für die regelrechte frühe Embryonalentwicklung sind und andererseits aus Genen, die bezüglich ROS von Bedeutung sind, zusammen. Tab.6 stellt zusammenfassend die Anzahl der aus den Zygoten entstandenen Embryonen sowie die jeweilige mRNA-Expression der untersuchten Gene im jeweiligen Kollektiv dar.

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> COOK®	<i>In vitro</i> Vitrolife™
Zygoten	Unbekannt	140	140
Blastozysten guter Qualität	106	92	78
mRNA-positive Blastozysten			
β -Aktin	106/106	92/92	78/78
<i>Shh</i>	8/106	12/92	17/78
<i>Ihh</i>	4/106	12/92	26/78
<i>il-6</i>	27/106	72/92	43/78
<i>Nox</i>	0/106	2/92	1/78
<i>gpx4</i>	98/106	92/92	77/78
<i>gpx1</i>	42/106	79/92	72/78
<i>prdx2</i>	39/106	91/92	76/78

Tab.6: Anzahl der Embryonen in Korrelation mit der β -Aktin-, *il-6*-, *shh*-, *ihh*-, *nox*-, *gpx4*-, *gpx1*- und *prdx2*-mRNA-Expression in der jeweiligen Gruppe.

Die jeweilige prozentuale Häufigkeit der mRNA-Expression der untersuchten Gene wird in Tab.7 zusammenfassend aufgezeigt.

mRNA-Expression (%)	β -Aktin	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>il-6</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
<i>In vivo</i>	100	8	4	25	0	92	40	37
<i>In vitro</i> COOK®	100	13	11	78	2	100	86	99
<i>In vitro</i> Vitrolife™	100	22	33	55	1	99	92	97

Tab.7: Prozentuale Häufigkeit von β -Aktin-, *il-6*-, *shh*-, *ihh*-, *nox*-, *gpx4*-, *gpx1*- und *prdx2*-positiver mRNA-Expression in murinen Einzelblastozysten.

3.1 mRNA-Expression von *il-6* in murinen Einzelblastozysten

Alle drei Kollektive der Mausblastozysten wurden auf die mRNA-Expression von *il-6* mittels *nested*-PCR untersucht. Einige ausgewählte Agarosegele stellen die *il-6*-Transkripte einzelner Mausblastozysten dar, die eine Fragmentgröße von 226bp aufweisen (Abb.12).

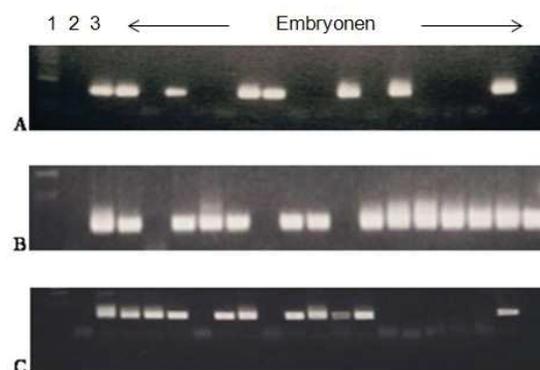


Abb.12: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von *il-6* (226bp) muriner Blastozysten: A *in vivo*, B *in vitro* COOK® Medium, C *in vitro* Vitrolife™ Medium, 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz-cDNA als Positivkontrolle.

In der *in vivo* Gruppe konnte in 27 von 106 Blastozysten das *il-6*-Transkript nachgewiesen werden und wurde somit in (auf ganze Zahlen gerundete) 25% (n=27/106) der Blastozysten der *in vivo* Gruppe exprimiert. In den *in vitro* Kollektiven fand sich eine höhere Anzahl an *il-6*-mRNA positiven Blastozysten. Im COOK® Kollektiv wiesen (auf ganze Zahlen gerundete) 78% (n=72/92) der Blastozysten eine positive *il-6*-mRNA-Expression auf, wohingegen im Vitrolife™ Kollektiv in (auf ganze Zahlen gerundete) 55% (n=43/78) der Blastozysten *il-6*-mRNA exprimiert wurde. Graphisch werden die Ergebnisse der *il-6*-Genexpression in Abb.13 zusammengefasst.

Die *in vitro* kultivierten Blastozysten haben quantitative Veränderungen im *il-6*-Expressionsmuster im Vergleich zu den *in vivo* Blastozysten aufgewiesen. Im t-Test hat

sich in jedem Kollektiv ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von *il-6* zu den jeweils anderen beiden Kollektiven mit $***p < 0,01$ verzeichnen lassen (Abb.13).

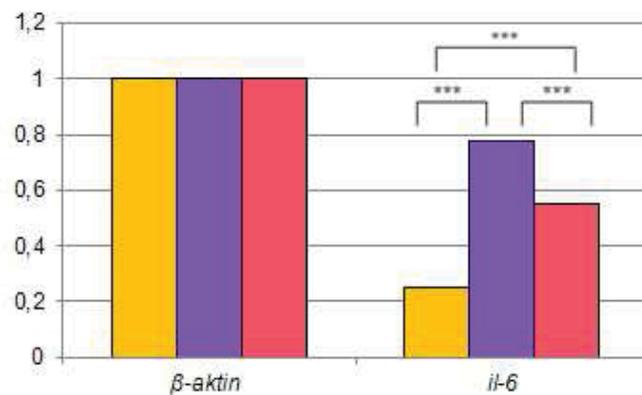


Abb.13: Einfluss der *in vitro* Kultur auf die mRNA-Expression von *il-6* als relative Häufigkeit gegenüber β -Aktin als Haushaltsgen in den drei Kollektiven *in vivo* (orange), *in vitro* Kultur in COOK® (violett) und in Vitrolife™ (rosa) Medium mit $***p < 0,01$.

3.2 mRNA-Expression von *shh* und *ihh* in murinen Einzelblastozysten

Die 276 Mausblastozysten der drei Kollektive wurden mittels *nested*-PCR auf die mRNA-Expression der beiden *hh*-Vertreter – *shh* und *ihh* – untersucht. In Abb.14 ließen sich Banden für *shh* erkennen. Diese ausgewählten Agarosegele aus jeder Gruppe wiesen jeweils in der dritten Spalte eine cDNA-Bande für *shh* mit einer Fragmentgröße von 150bp auf. Dies ist die Spalte der Positivkontrolle, für welche Milz-cDNA benutzt wurde.

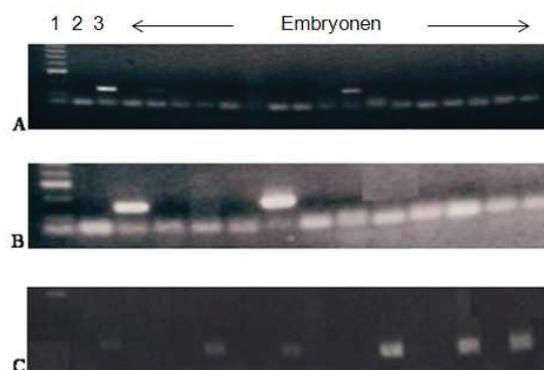


Abb.14: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von *shh* (150bp) muriner Blastozysten: A *in vivo*, B *in vitro* COOK® Medium, C *in vitro* Vitrolife™ Medium, 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz-cDNA als Positivkontrolle.

Auch für *ihh* haben ausgewählte Agarosegele die cDNA-Bande der *ihh*-mRNA-Expression repräsentiert (Abb.15). In diesen ausgewählten Agarosegelen ließen sich in A

und B der Abb.15 neben der Positivkontrolle jeweils zwei cDNA-Banden mit 106bp erkennen. Dagegen ließen sich im Agarosegel C der Abb.15 7 cDNA-Banden für *ihh* nachweisen.

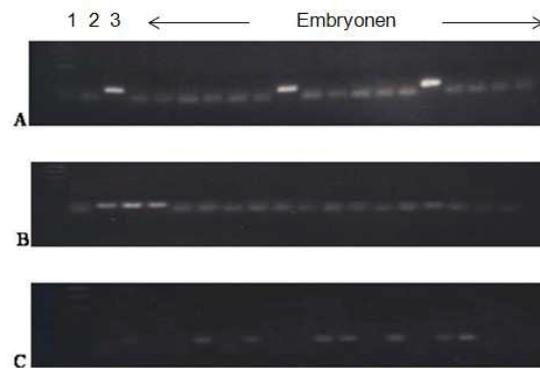


Abb.15: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von *ihh* (106bp) muriner Blastozysten: A *in vivo*, B *in vitro* COOK® Medium, C *in vitro* Vitrolife™ Medium, 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz-cDNA als Positivkontrolle.

Die Expression der Gene der *hh*-Vertreter zeigte in den *in vivo* Embryonen folgende Ergebnisse: bei (auf ganze Zahlen gerundete) 8% (n=8/106) der *in vivo* Blastozysten ließ sich *shh*-mRNA und bei (auf ganze Zahlen gerundete) 4% (n=4/106) der *in vivo* Blastozysten *ihh*-mRNA nachweisen. In den *in vitro* Kollektiven ließ sich eine höhere Anzahl an *hh*-mRNA positiven Blastozysten feststellen verglichen mit dem *in vivo* Kollektiv. In der COOK® Gruppe haben (auf ganze Zahlen gerundete) 13% (n=12/92) der Mausblastozysten *shh*-mRNA und (auf ganze Zahlen gerundete) 11% (n=10/92) der Blastozysten *ihh*-mRNA aufgewiesen. Das Vitrolife™ Kollektiv zeigte mit (auf ganze Zahlen gerundete) 22% (n=17/78) *shh*-mRNA positiven und (auf ganze Zahlen gerundete) 33% (n=26/78) *ihh*-mRNA positiven Mausblastozysten die höchste Anzahl der *hh*-mRNA positiven Blastozysten aller drei Kollektive. Graphisch werden die Ergebnisse der *hh*-mRNA-Expression in Abb.16 dargestellt.

Es wurden für *shh* und *ihh* quantitative Unterschiede in den *in vitro* kultivierten Blastozysten des Vitrolife™ Kollektivs festgestellt. Dies wurde im t-Test bestätigt, der einen signifikanten Unterschied der Vitrolife™ Gruppe zur *in vivo* Gruppe mit ***p<0,01 sowohl bei *shh* als auch *ihh* aufgezeigt hat. Das COOK® Kollektiv hat weder bei *shh* noch bei *ihh* eine signifikante Veränderung zur *in vivo* Gruppe aufgewiesen. Jedoch hat sich bei *ihh* ein signifikanter Unterschied mit ***p<0,01 zwischen den beiden *in vitro* Kollektiven herausgestellt, wobei in der Vitrolife™ Gruppe eine höhere Anzahl an Blastozysten *ihh*-mRNA exprimierten (Abb.16).

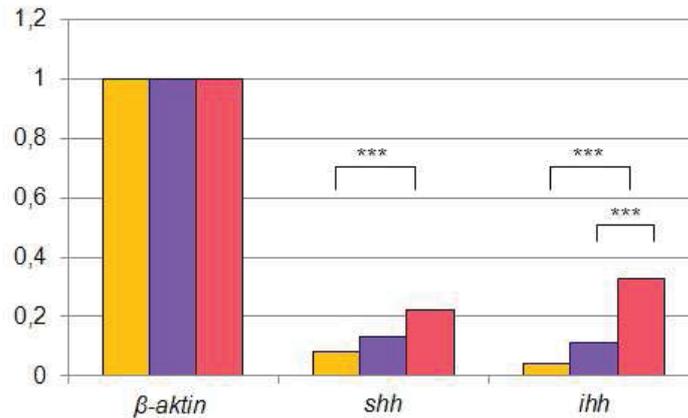


Abb.16: Einfluss der *in vitro* Kultur auf die mRNA-Expression von *shh* und *ihh* als relative Häufigkeit gegenüber β -Aktin als Haushaltsgen in den drei Kollektiven *in vivo* (orange), *in vitro* Kultur in COOK® (violett) und in Vitrolife™ (rosa) Medium mit *** $p < 0,01$.

3.3 mRNA-Expression von *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* in murinen Einzelblastozysten

Nox als endogene Quelle für ROS und *gpx4*, *gpx1* sowie *prdx2* als Bestandteile des antioxidativen Abwehrsystems stellen wichtige Gene bezüglich ROS dar. Besonders hinsichtlich ihrer mRNA-Expression im Vitrolife™ Kollektiv, welches einen Schaden durch ROS vermeiden soll, ist der Vergleich der mRNA-Expression dieser 4 Gene mit den jeweils anderen Kollektiven von Bedeutung. Alle 276 β -Aktin-mRNA positiven Mausblastozysten wurden mittels *nested*-PCR auf die mRNA-Expression dieser 4 Gene untersucht.

In Abb.17 werden die PCR-Banden einzelner Mausblastozysten am Beispiel einiger ausgewählter Agarosegele von *gpx4*-Transkripten (166bp) dargestellt. Bis auf eine Blastozyste in der *in vivo* Gruppe (Agarosegel A der Abb.17) waren alle Blastozysten der drei ausgewählten Agarosegele *gpx4*-mRNA positiv (repräsentativ für alle untersuchten Embryonen). *Gpx4*-Transkript konnte in allen Kollektiven in mehr als 90% der Blastozysten des jeweiligen Kollektivs detektiert werden. Jeweils auf ganze Zahlen gerundete 92% (n=98/106) der *in vivo* Blastozysten, 100% (n=92/92) des COOK® Kollektivs und 99% (n=77/78) des Vitrolife™ Kollektivs haben *gpx4*-mRNA exprimiert. Eine signifikante Korrelation mit ** $p < 0,02$ wurde zwischen den *gpx4*-mRNA positiven *in vivo* Blastozysten und denen des Vitrolife™ Kollektivs festgestellt, wobei sich die *gpx4*-Transkripte der *in vivo* Gruppe von der COOK® Gruppe signifikant mit *** $p < 0,01$

unterschieden. Die beiden *in vitro* Kollektive gegeneinander haben im t-Test keine signifikante Veränderung bezüglich der Anzahl an *gpx4*-mRNA positiven Blastozysten ergeben (Abb.19).

Gpx1-mRNA konnte in 42 der 106 *in vivo* Blastozysten nachgewiesen werden. Dies entspricht 40% (n=42/106). Dagegen haben sich in den *in vitro* Blastozysten in höherer Anzahl *gpx1*-Transkripte feststellen lassen. Im COOK® Medium waren 79 von 92 (auf ganze Zahlen gerundete 86%) Mausblastozysten und im Vitrolife™ Medium 72 von 78 (auf ganze Zahlen gerundete 92%) Mausblastozysten *gpx1*-mRNA positiv. Im t-Test zeigte die Anzahl der *gpx1*-mRNA positiven *in vivo* Blastozysten einen signifikanten Unterschied mit ***p<0,01 zu der beider *in vitro* Kollektive (Abb.19).

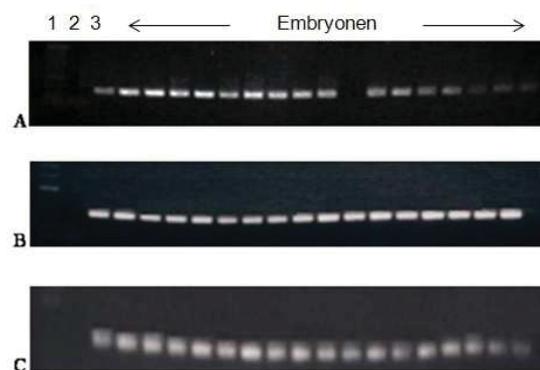


Abb.17: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von *gpx4* (166bp) muriner Blastozysten: A *in vivo*, B *in vitro* COOK® Medium, C *in vitro* Vitrolife™ Medium, 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz-cDNA als Positivkontrolle.

Weitere drei ausgewählte Agarosegele repräsentierten in Abb.18 Banden (179bp) der *prdx2*-mRNA positiven Blastozysten. Wohingegen im Agarosegel A der Abb.19 nur 5 cDNA-Banden auf *prdx2*-mRNA positive Blastozysten hinwiesen, wurde in den Agarosegelen B und C der Abb.18 Banden mit 179bp der positive Nachweis des *prdx2*-Transkripts in allen Blastozysten der ausgewählten Agarosegele bestätigt.

Eine ähnliche mRNA-Expression wie *gpx1* hat *prdx2* in allen Gruppen gezeigt. *Prdx2*-mRNA wurde in der *in vitro* Kultur in beiden Medien in fast allen Blastozysten festgestellt. Im COOK® Medium waren 91 der 92 (auf ganze Zahlen gerundete 99%) Mausblastozysten und im Vitrolife™ Medium 76 der 78 (auf ganze Zahlen gerundete 97%) Mausblastozysten *prdx2*-mRNA positiv, wobei das *in vivo* Kollektiv die *prdx2*-mRNA nur in 37% (n=39/106) der untersuchten Blastozysten enthielt. Dies hat sich im t-Test gezeigt: die Anzahl der *prdx2*-mRNA positiven *in vivo* Blastozysten hat einen signifikanten Unterschied mit ***p<0,01 zu der des jeweiligen *in vitro* Kollektivs aufgewiesen (Abb.19).

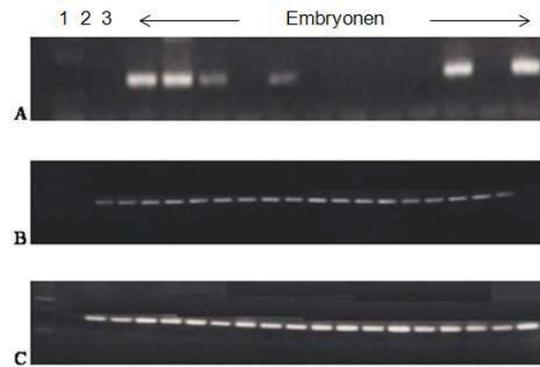


Abb.18: Repräsentative Gelelektrophorese der mRNA-Expression von *prdx2* (179bp) muriner Blastozysten: A *in vivo*, B *in vitro* COOK® Medium, C *in vitro* Vitrolife™ Medium, 1. Marker, 2. DEPC-dH₂O als Negativkontrolle, 3. Milz-cDNA als Positivkontrolle.

Der Nachweis des *nox*-Transkripts in den Blastozysten stellte sich in allen drei Kollektiven annähernd ähnlich dar. Die *in vivo* Gruppe hat *nox*-mRNA in keiner Blastozyste (n=0/106) exprimiert. Die *in vitro* Blastozysten haben in 2% (n=2/92) im COOK® Medium und in 1% (n=1/78) im Vitrolife™ Medium die mRNA-Expression von *nox* gezeigt. *Nox* wurde in allen Kollektiven annähernd gleich exprimiert, wobei die mRNA von *nox* in den Blastozysten kaum nachzuweisen war. Im t-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der *nox*-mRNA-Expression in allen drei Kollektiven.

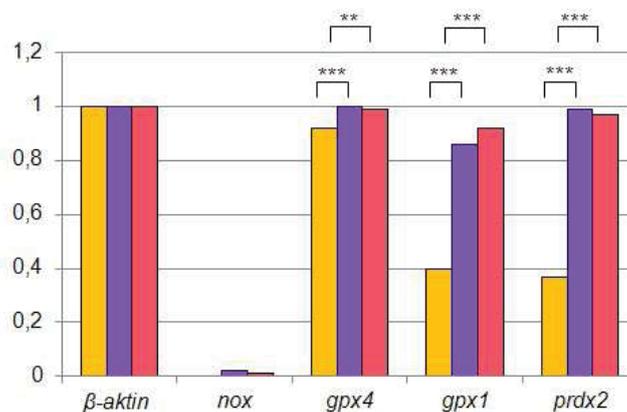


Abb.19: Einfluss der *in vitro* Kultur auf die mRNA-Expression von *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* als relative Häufigkeit gegenüber β -Aktin als Haushaltsgen in den drei Kollektiven *in vivo* (orange), *in vitro* Kultur in COOK® (violett) und in Vitrolife™ (rosa) Medium mit ***p<0,01.

4 Diskussion

Weltweit werden 1-3% aller Kinder in Industrienationen nach assistierter Reproduktion geboren (Manipalviratn *et al.*, 2009). Da die Anzahl der nach ART geborenen Kinder seit der ersten Geburt 1978 exponentiell gewachsen ist, ist es von Bedeutung, mögliche mit ART einhergehende Risiken sowie unbekannte potentielle Langzeit-Konsequenzen für die Kinder zu erforschen. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren viele große Studien veröffentlicht, die über die neonatale Periode hinaus die Entwicklung der nach ART geborenen Kinder im Hinblick auf kongenitale Malformationen, neurologische Entwicklung, vermehrte Tumoren im Kindesalter sowie Wachstumsdefekte oder Verhaltensauffälligkeiten untersucht haben (Bowen *et al.*, 1998; Pinborg *et al.*, 2003; Sutcliffe *et al.*, 2003; Bonduelle *et al.*, 2004; Basatemur & Sutcliffe, 2008; Williams & Sutcliffe; 2009). Seit 2002 haben einige Berichte die Bedenken erweckt, dass nach ART geborene Kinder eine erhöhte Inzidenz an *imprinting*-Defekten, wie dem Beckwith-Wiedemann Syndrom oder Angelman-Syndrom, im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen (DeBaum *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003). Diese Besorgnis erscheint biologisch plausibel, da im Mausmodell gezeigt wurde, dass die *in vitro* Kultur des Embryos Einfluss auf Gen *imprinting* nimmt (Doherty *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 2001; Zaitseva *et al.*, 2007). Die frühe Embryonalentwicklung stellt einen kritischen Zeitpunkt für epigenetische Regulation dar (Le Bouc *et al.*, 2010). Nachdem viele Daten darauf hinweisen, ART könne die Epigenetik der frühen Embryonalentwicklung beeinflussen und das Risiko von *imprinting*-Defekten, wie Beckwith-Wiedemann Syndrom oder Angelman-Syndrom erhöhen, ist es wichtig herauszufinden, inwieweit sich die Embryokultur auf das generelle Genexpressionsmuster des Präimplantationsembryos auswirkt (Cox *et al.*, 2002; Owen & Segars, 2009; Manipalviratn *et al.*, 2009).

Untersuchungen demonstrieren, dass die Embryokultur aufgrund verändert exprimierter Gene des Embryos Implikationen auf die Entwicklung der Blastozysten haben kann (Eckert & Niemand, 1998; Wrenzycki *et al.*, 1999, 2000, 2001; Doherty *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Lequarré *et al.*, 2001; Minami *et al.*, 2001; Natale *et al.*, 2001; Rief *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002, 2003). Dies scheint nicht nur im Vergleich zwischen der *in vitro* und der *in vivo* Situation aufzutreten, sondern auch unterschiedliche *in vitro* Kultursysteme zu betreffen.

Rinaudo und Schultz (2004) untersuchten die Auswirkungen der Embryokultur

unterschiedlicher Kulturmedien (KSOM/AA und Whitten's Medium) auf das generelle Genexpressionsmuster in murinen Präimplantationsembryonen, welche sich in beiden Kulturmedien der Embryokultur als verändert erwiesen. Viele in Proteinsynthese, Zellproliferation und Transporterfunktionen involvierte Gene wurden nach der *in vitro* Kultur im Mausmodell verändert exprimiert, wobei in dem Medium mit einem Zusatz an bestimmten Aminosäuren (KSOM/AA) die Genexpression mehr den *in vivo* Bedingungen glich als im Whitten's Medium (Rinaudo & Schultz, 2004).

Lazzari *et al.* (2002) haben das Phänomen des Large-offspring Syndroms (*imprinting*-Defekt des *igf2*-Gens), bei dem Rinder- und Schafembryonen eine veränderte Wachstumskontrolle mit einem erhöhten Geburtsgewicht nach *in vitro* Kultur aufwiesen, einer durch *in vitro* Kultur von Rinder- und Schafembryonen veränderten Genexpression zugeschrieben (Young *et al.*, 1998, 2001). Weiterhin haben Studien ein signifikant erhöhtes Risiko für ein niedriges Geburtsgewicht bei nach IVF entstandener Ein-Kind-Schwangerschaft im Vergleich zur Normalbevölkerung beschrieben (Helmerhorst *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2004; Sutcliffe & Ludwig, 2007; Ceelen *et al.*, 2008). Dumoulin *et al.* (2010) bestätigte dies dahingehend, dass die *in vitro* Kultur menschlicher Embryonen einen Einfluss auf das Geburtsgewicht der entstehenden Kinder nimmt. Im Rahmen der Studie wurde das perinatale Outcome von nach IVF Behandlung entstandenen Kindern (Ein-Kind Schwangerschaft), die entweder im K-SICM von Cook® oder im GI™ Version 3 von Vitrolife™ kultiviert wurden. Im Vergleich zeigte sich ein signifikant höheres Geburtsgewicht bei den Kindern der Vitrolife™ Gruppe. Somit kann die Auswahl des Mediums der *in vitro* Kultur eine Rolle in Bezug auf das Geburtsgewicht des entstehenden Kindes spielen (Dumoulin *et al.*, 2010).

Des Weiteren lassen sich auch heute noch unzufriedenstellend geringe Schwangerschaftsraten nach IVF oder ICSI verzeichnen. Für die niedrigeren Implantationsraten könnten die unphysiologischen Umgebungsbedingungen der *in vitro* Kultur während der frühen Entwicklung des Embryos, die dessen Genexpressionsmuster massgeblich beeinflussen, mitverantwortlich sein.

Die Umweltbedingungen des Präimplantationsembryos scheinen seine spätere Entwicklung zu bestimmen. Die Genexpression und der Metabolismus werden von Transkriptionsfaktoren kontrolliert, welche wiederum selbst von internen und externen Faktoren bestimmt werden. Diese Prozesse sind sensitiv gegenüber Umwelteinflüssen. Sowohl die Zusammensetzung des Kulturmediums als auch der O₂-Gehalt spielen hierbei eine wichtige Rolle.

O₂ und seine ROS regulieren verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege, wie HIF-1 und NF-κB, und metabolische Prozesse, wie Glukose Transport und Glykolyse. Unter physiologischen Bedingungen findet die Entwicklung bis zur Blastozyste in einer Umgebung mit 5%igem O₂-Gehalt statt im Vergleich zu einem atmosphärischen O₂-Gehalt von 20% bei der *in vitro* Kultivierung, welcher zunehmend bei der Optimierung von *in vitro* Kultursystemen in Betracht gezogen wird (Harvey, 2007). Rinaudo *et al.* (2006) wiesen nach, dass die murine Embryokultur in niedrigem O₂-Gehalt mit weniger Störungen der generellen Genexpression einhergeht und mehr der *in vivo* Kontrolle gleicht als unter atmosphärischen O₂-Verhältnissen. Längere *in vitro* Kultur in 20% O₂-Gehalt wird mit reduzierter Zellzahl und veränderter Morphologie der humanen und murinen Blastozysten sowie abnormer früher Embryonalentwicklung assoziiert (Dumoulin *et al.*, 1999; Gardner, 1999; Karagenc *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen haben gezeigt: hypoxische Konditionen der *in vitro* Kultur verbessern die murine, bovine und humane Embryonalentwicklung verglichen mit atmosphärischen O₂-Bedingungen (Umaoka *et al.*, 1992, Gardner & Lane, 1996; Fujitani *et al.*, 1997; Takahashi & Kanagawa, 1998; Van Soom *et al.*, 1996; Dumoulin *et al.*, 1999). Die verbesserte Embryonalentwicklung unter hypoxischen Bedingungen wird mit einer erniedrigten Produktion von ROS erklärt (Guérin *et al.*, 2001).

Ein anderer Versuch, das Gleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien aufrechtzuerhalten, besteht in der Zugabe von Antioxidantien in das Kulturmedium. Ali *et al.* (2003) zeigten, dass eine Ergänzung der *in vitro* Kultur mit Cystein als Radikalfänger die bovine Embryonalentwicklung verbesserte, wohingegen das Hinzufügen antioxidativer Enzyme wie Katalase oder SOD zur *in vitro* Kultur keine Veränderung erbrachte. Gonçalves *et al.* (2010) stellte eine Beeinträchtigung der Spermienqualität sowie der frühen Embryonalentwicklung bis zum Blastozystenstadium boviner Embryonen fest, nachdem diese mit Antioxidantien-Zusatz *in vitro* kultiviert wurden. Da die Zugabe von Antioxidantien in Kulturmedien unterschiedliche Resultate erbrachte, ist es von Bedeutung, weitere Erkenntnisse über Kulturmedien, die unterstützend Antioxidantien enthalten, zu gewinnen (Payne *et al.*, 1992; Van Soom *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1998). Inwieweit ein Medium mit Antioxidantien-Zusatz auf die mRNA-Expression muriner Einzelblastozysten Einfluss nimmt, wurde in den vorliegenden Ergebnissen demonstriert.

In den vorliegenden Untersuchungen wies die Mehrzahl der Gene (*il-6*, *shh*, *ihh*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*) ein verändertes mRNA-Expressionsmuster in den in VitrolifeTM Medium

kultivierten Blastozysten verglichen mit den *in vivo* Blastozysten auf. Obwohl die *in vitro* Blastozysten der COOK® Gruppe keine abweichenden *shh*- und *ihh*-mRNA-Profile verglichen mit der *in vivo* Gruppe exprimierten, zeigten die anderen Gene (*il-6*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*) ebenfalls eine veränderte mRNA-Expression in den in COOK® Medium kultivierten Blastozysten. Nur die *nox*-mRNA-Expression der *in vitro* Blastozysten ähnelte der *in vivo* Situation in beiden *in vitro* Kollektiven. Es konnte folglich im Mausmodell an Einzelblastozysten bestätigt werden, dass die *in vitro* Kultur die Genexpression einiger Gene verändert. Bisher wurden hauptsächlich Embryonen Pools auf von der *in vivo* Situation abweichend exprimierten Genen nach der *in vitro* Kultur untersucht (Rinaudo & Schultz, 2004; Wang *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dies auch bei murinen Einzelblastozysten und bestätigen die Untersuchungen von Rinaudo und Schultz (2004), dass nicht nur *in vitro* Blastozysten eine veränderte mRNA-Expression aufweisen, sondern auch der Gebrauch unterschiedlicher Kulturmedien zu einem veränderten Genexpressionsmuster führt.

4.1 mRNA-Expression von *il-6* in murinen Einzelblastozysten

Die Anzahl der *il-6*-mRNA exprimierenden murinen Blastozysten zeigte einen signifikanten Unterschied in beiden *in vitro* kultivierten Kollektiven verglichen mit der Anzahl der *il-6*-mRNA positiven Blastozysten in dem *in vivo* Kollektiv. Auffällig ist, dass lediglich ein Viertel der murinen Einzelblastozysten des *in vivo* Kollektivs *il-6*-mRNA enthielten, wobei im *in vitro* Kollektiv des konventionellen Mediums (Cleavage Medium von COOK®) dreimal und im vor ROS schützenden Medium (G-1™ PLUS Medium von Vitrolife™) zweimal so viele Blastozysten *il-6*-mRNA aufwiesen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen Rinaudo und Schultz (2004) dahingehend, dass verschiedene Kultursysteme die *il-6*-mRNA-Expression in unterschiedlichem Ausmaß verändern. Rinaudo und Schultz (2004) wiesen in den *in vitro* kultivierten Embryonen Pools verglichen mit den *in vivo* Embryonen eine reduzierte *il-6*-mRNA-Expression nach, wobei die *il-6*-mRNA-Expression der in KSOM/AA Medium *in vitro* kultivierten Embryonen mehr der *in vivo* Situation glich als die der in Whitten's Medium *in vitro* kultivierten Embryonen. Im Widerspruch zu der von Rinaudo und Schultz (2004) festgestellten Herunterregulation der *il-6*-mRNA-Expression in den *in vitro* kultivierten Embryonen steht die erhöhte Anzahl an *il-6*-mRNA exprimierenden Mausblastozysten in den *in vitro* Kollektiven im Vergleich zu dem *in vivo* Kollektiv der vorliegenden Ergebnisse. Letztlich muss die Individualität

der Einzelblastozysten und ihr jeweiliges Genexpressionsmuster betont werden, welche nicht mit Daten aus Embryonen Pools gleichgestellt werden können.

Eine wichtige Bedeutung findet IL-6 in seinem Einfluss auf die Angiogenese, wobei die *in vivo* Expression von *il-6* mit der Vaskularisierung im reproduktiven Gewebe der Maus einhergeht (Motro *et al.*, 1990; Fee *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2008). Unter Berücksichtigung der Funktion von IL-6 in der Regulation angiogenetischer Prozesse während der frühen Embryonalentwicklung und Implantation kann eine wie in den *in vitro* Gruppen festgestellte veränderte *il-6*-mRNA-Expression zu möglichen abweichenden angiogenetischen Prozessen während der frühen Embryonalentwicklung und Implantation führen.

Die veränderte *il-6*-mRNA-Expression der *in vitro* Kollektive kann durch mögliche umweltbedingte Faktoren der *in vitro* Kultursysteme bedingt sein. Zum Beispiel könnte die erhöhte Anzahl an *il-6*-mRNA positiv detektierten Mausblastozysten in den *in vitro* Kollektiven der vorliegenden Untersuchungen mit einer durch ROS induzierten *il-6*-mRNA-Expression, wie Kida *et al.* (2005) sie in murinen Lungenfibroblasten festgestellt haben, zu deuten sein.

Die Zugabe von Antioxidantien führt zu einer Hemmung der VEGF-induzierten NF- κ B Aktivierung und *il-6*-Expression in humanen glatten Muskelzellen (Wang *et al.*, 2001). Im Vergleich der beiden *in vitro* Gruppen zeigt sich die niedrigere Anzahl an *il-6*-mRNA positiv exprimierenden Blastozysten in dem *in vitro* Kollektiv mit Antioxidantien-Zusatz. Dies kann möglicherweise analog zu der von Wang *et al.* (2001) festgestellten Inhibition der *il-6*-Expression durch Antioxidantien in humanen glatten Muskelzellen erklärt werden.

4.2 mRNA-Expression von *shh* und *ihh* in murinen Einzelblastozysten

Die Gene der HH-Familie, *Shh* und *Ihh*, spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung der Säugetiere. Sie kodieren für Proteine, die vielfältige Prozesse während der Embryonalentwicklung und der Homoöstase adulter Gewebe steuern und kritische Signalfunktionen in der Organogenese besitzen (Ingham & McMahon, 2001).

In den letzten Jahren wurde ihre Bedeutung in der Onkogenese gefunden, wobei sie Signalwege für Tumorerhaltung und -wachstum in verschiedensten Tumoren wie gastrointestinalen Tumoren, dem Prostatakarzinom, hämatologischen Malignomen sowie Gliomen regulieren (Berman *et al.*, 2003; Thayer *et al.*, 2003; Oniscu *et al.*, 2004;

Qualtrough *et al.*, 2004; Monzo *et al.*, 2006; Karhadkar *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2004; Dierks *et al.*, 2007; Peacock *et al.*, 2007; Lindemann, 2008; Beachy *et al.*, 2004; Ruiz i Altaba *et al.*, 2007). Da sich keine Mutationen der *hh*-Gene oder Gene ihres Signalweges in diesen Tumoren finden, wird von einer autonomen Produktion der HH-Liganden vom Tumorgewebe selbst oder dem umliegenden Stroma ausgegangen (Jiang & Hui, 2008).

4.2.1 *shh*

Nguyen *et al.* (2009) stellte die mRNA-Expression von *shh* und die zu ihm in Beziehung stehenden Signalmoleküle *ptc*, *smo* und *gli1* in Cumulus-Oozyten Komplexen und Oozyten in porcinen Ovarien fest, welche die zytoplasmatische und nukleäre Reifung der Oozyten sowie die folgende *in vitro* Entwicklung fördern sollen. *Gli1* wurde bereits im 4-Zell-Stadium im Schwein nachgewiesen, in dem sich bekannterweise das embryonale Genom bildet, womit eine Aktivität des SHH-Signalweges bereits in diesem Stadium (Nguyen *et al.*, 2010) gezeigt werden konnte. Eine Studie untersuchte die Auswirkung von SHH-Zusatz im Kulturmedium auf die Entwicklung von parthenogenetischen Schweineembryonen. Wird SHH dem Kulturmedium hinzugefügt, resultieren erhöhte Blastozystenraten sowie eine verbesserte Embryoqualität in parthogenetisch entstandenen Schweineembryonen. Aufgrund einer erhöhten Zellproliferation sowie einer erniedrigten Apoptoserate während der Entwicklung der Embryonen nach Zugabe von SHH, wird SHH eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben. Diese Vermutung unterstützt eine verminderte Expression von PARPs in weiteren Untersuchungen unter dem Einfluss von SHH. PARPs sind nukleäre Proteine mit zentralen Signalfunktionen bezüglich DNA-Schäden oder Reparatur, die zum Beispiel durch ein Übermaß an ROS vermehrt exprimiert werden (Nguyen *et al.*, 2010). Dai *et al.* (2011) wies eine Aktivierung des SHH-Signalweges in kultivierten kortikalen Neuronen nach Exposition von H₂O₂ nach.

Da die vorliegenden Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der *shh*-mRNA exprimierenden Blastozysten zwischen dem COOK® und dem *in vivo* Kollektiv zeigten, aber die Anzahl von *shh*-mRNA positiven Mausblastozysten im Vitrolife™ Kollektiv verglichen mit dem *in vivo* Kollektiv erhöht war, lässt sich vermuten, dass gegebenenfalls Komponenten des G-1™ PLUS Medium von Vitrolife™ in der *in vitro* Kultur zu einer erhöhten Anzahl von *shh*-mRNA positiven Mausblastozysten führt.

Wird von einer anti-apoptischen Funktion von SHH, wie Nguyen *et al.* (2010) beschrieben, ausgegangen, könnte das Antioxidantien enthaltende *in vitro* Kulturmedium von Vitrolife™ möglichen Stress im murinen Embryo verursachen und über Transkriptionsfaktoren eine vermehrte *shh*-mRNA-Expression auslösen, um mögliche DNA-Strangbrüche zu verhindern. Dabei müsste ROS als Induktor von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB berücksichtigt werden und bei der erhöhten Anzahl an *shh*-mRNA positiven Blastozysten im Vitrolife™ Kollektiv (mit Antioxidantien-Zusatz) ein fehlender Effekt des Antioxidantien-Zusatzes, vor ROS zu schützen, bedacht werden. Die erhöhte Anzahl an *shh*-mRNA positiven Blastozysten im Vitrolife™ Kollektiv kann einen vom Embryo aktivierten Schutzmechanismus als Adaptationsprozess an die veränderte Umwelt darstellen. Zudem ließe sich die erhöhte Anzahl an *shh*-mRNA positiven Blastozysten im Vitrolife™ Kollektiv mit der protektiven Funktion von SHH hinsichtlich Oxidativem Stress, die Dai *et al.* (2011) in seinen Untersuchungen an kultivierten Neuronen feststellte, erklären und würde einen fehlenden Einfluss des der *in vitro* Kultur zugesetzten Antioxidans auf ROS betonen. Letztlich würden Untersuchungen eines dosisabhängigen Einflusses von ROS auf die *shh*-mRNA-Expression in murinen Blastozysten weitere Erkenntnisse bringen.

Mutationen im *ptc*-Gen wurden bei Patienten mit Basalzellnävus-Syndrom (Gorlin-Syndrom) gefunden (Johnson *et al.*, 1996). Dieses Syndrom geht mit Entwicklungsdefekten und Tumoren wie zum Beispiel Medulloblastomen, Basalzellkarzinomen und Rhabdomyosarkomen einher. Eine Fehlfunktion von *ptc* führt zur Aktivierung des HH-Signalweges, wodurch sich erklärt, dass eine Überproduktion von SHH eine Fehlregulation von *ptc* initiiert (Hahn *et al.*, 1999). Oro *et al.* (1997) berichten, eine Überproduktion von SHH in der Haut von Mäusen entwickle viele Merkmale vom Basalzellnävus-Syndrom.

Mögliche Implikationen aufgrund einer vermehrten Produktion von SHH nach der *in vitro* Kultur auf die Embryonen sind in Erwägung zu ziehen und sollten hinsichtlich vermehrter Entstehung von Tumoren oder Malformationen bei den durch IVF entstandenen Kindern in Langzeitstudien untersucht werden. Da Mausembryonen mit anorektalen Malformationen eine veränderte SHH-Expression aufweisen, sollte dieser Zusammenhang bedacht werden (Sasaki *et al.*, 2004).

4.2.2 *ihh*

Im Blastozystenstadium findet sich im murinen Embryo nur wenig *ihh*-mRNA, wohingegen in den darauffolgenden Tagen während des Blastozystenwachstums in der *in vitro* Kultur die *ihh*-mRNA stark erhöht ist. Dieser Anstieg von *ihh*-mRNA vollzieht sich simultan mit der Entstehung von extraembryonalem Endoderm und wird mit der Differenzierung des extraembryonalen Endoderm der Maus in Zusammenhang gebracht (Becker *et al.*, 1997). Zudem induziert IHH die endotheliale Zellproduktion in murinem Dottersackgewebe und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des frühesten hämatovaskulären Systems (Dyer *et al.*, 2001).

Obwohl IHH viele Schlüsselfunktionen hinsichtlich der frühen Embryonalentwicklung sowie der uterinen Interaktion während der Implantation zugesprochen werden, wurde der Einfluss der *in vitro* Kultur auf die *ihh*-mRNA-Expression verglichen mit der *in vivo* Situation noch nicht untersucht. In den vorliegenden Experimenten zeigten die untersuchten Mausblastozysten eine erhöhte Anzahl an *ihh*-mRNA positiven Blastozysten in der Vitrolife™ Gruppe verglichen mit den *in vivo* Blastozysten, ähnlich wie die Ergebnisse der *shh*-mRNA-Expression, wohingegen die Anzahl der *ihh*-mRNA positiven Blastozysten in der COOK® Gruppe keinen signifikanten Unterschied verglichen mit den *in vivo* Blastozysten aufwies.

Die signifikant erhöhte Anzahl an *ihh*-mRNA positiven Mausblastozysten in der Vitrolife™ Gruppe muss in Bezug auf mögliche Störungen der frühen Embryonalentwicklung mit einer gewissen Besorgnis zur Kenntnis genommen werden. Da *ihh-knockout* Mäuse sowie eine IHH Überexpression im Huhn ähnliche Wachstumsdefekte mit hypertrophen Chondrozyten und abnormen Extremitäten zeigten, muss die hier demonstrierte signifikant erhöhte Anzahl an *ihh*-mRNA positiven Mausblastozysten in der Vitrolife™ Gruppe hinsichtlich möglicher Wachstumsveränderungen bedacht werden (St-Jacques *et al.*, 1999; Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Weiterhin stellt sich die Frage, ob die signifikant erhöhte Anzahl an *ihh*-mRNA positiven Mausblastozysten nach der *in vitro* Kultur auch in humanen Blastozysten nachweisbar wäre und ob dies Implikationen auf die weitere Entwicklung des Embryos hat. Mögliche Veränderungen der frühen *ihh*-mRNA-Expression könnten ihr Expressionsmuster auch in späteren Entwicklungsphasen abwandeln.

Unter dem Einfluss von Progesteron wird IHH im Uterus im luminalen und glandulären Epithel gebildet und erfüllt die Funktion eines parakrinen Mediators in der epithelien-

stromalen Kommunikation während der frühen Embryonalentwicklung (Takamoto *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002). Vom Epithel gebildetes IHH stimuliert über seinen auf den uterinen Stromazellen vorhandenen Rezeptor *ptc* bestimmte Zielgene, um den Uterus auf die Implantation vorzubereiten (Lee *et al.*, 2006a, 2006b). Die Progesteron-abhängige IHH Produktion, die in den ersten Tagen der Schwangerschaft stetig zunimmt, stellt ein entscheidendes Signal im uterinen Zellumbau und in der Zellproliferation während der Implantation von Mäusen und Hamstern dar (Takamoto *et al.*, 2002; Khatua *et al.*, 2006). Ein möglicher Einfluss von embryonal produziertem IHH auf seinen im mesenchymalen Stroma des Uterus exprimierten Rezeptor *ptc* sollte erwogen werden und könnte einen wichtigen Mediator der embryo-maternalen Interaktion während der Implantation darstellen (Matsumoto *et al.*, 2002). Die signifikant erhöhte Anzahl an *ihh*-mRNA positiven Blastozysten in der Vitrolife™ Gruppe sollte hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf die embryo-maternale Interaktion bedacht werden und könnte den Prozess der Implantation massgeblich beeinflussen.

4.3 mRNA-Expression von *nox*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* in murinen Einzelblastozysten

Die frühe Embryonalentwicklung ist von dynamischen Veränderungen im Metabolismus und Energiehaushalt begleitet. O₂ als Energiesubstrat bildet ROS, die sowohl für physiologische Funktionen in der Zellproliferation und -differenzierung verantwortlich sind als auch pathologische Prozesse in der Zelle im Sinne von Lipidperoxidation oder DNA-Schädigung auslösen. ROS beeinflussen Spermien, Oozyten sowie den Embryo und seine Umgebung. Antioxidative Schutzmechanismen versuchen, das Gleichgewicht von physiologischen und pathologischen Funktionen von ROS aufrechtzuerhalten, um oxidativen Stress zu vermeiden. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass der atmosphärische O₂-Gehalt der *in vitro* Kultur die Embryonen in ihrer Entwicklung beeinträchtigt, da im physiologischen Reproduktionstrakt hypoxische O₂-Bedingungen existieren (Whitten, 1971; Goto *et al.*, 1993; Gardner & Lane, 1996; Takahashi *et al.*, 1996; Fujitani *et al.*, 1997; Takahashi & Kanagawa, 1998; Bing *et al.*, 2003). Das dadurch entstehende Übermaß an ROS führt zu metabolischen Störungen sowie veränderten Genexpressionsmustern des Embryos. Viele Studien haben die Entwicklung der *in vitro* kultivierten Embryonen in niedrigem O₂-Gehalt oder in Antioxidantien enthaltenen Kulturmedien untersucht. Rinaudo *et al.* (2006) stellten bei in 20% O₂ *in vitro* kultivierten

murinen Embryonen Pools ein weitaus mehr von der *in vivo* Situation abweichendes Genexpressionsmuster fest als bei in 5% O₂ *in vitro* kultivierten murinen Embryonen Pools. Die Auswirkungen von Antioxidantien in der *in vitro* Kultur werden kontrovers diskutiert (Noda *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1992; Orsi & Leese, 2001). Die positiven oder negativen Effekte von Antioxidantien auf die Embryonalentwicklung sind abhängig von der Konzentration und Auswahl der Antioxidantien sowie ihrer Kulturzeit und stellen somit eine Schwierigkeit in der Optimierung von Kulturmedien dar. Rinaudo *et al.* (2006) konnten keine signifikant veränderte Regulierung von antioxidativen Genen nach atmosphärischer *in vitro* Kultivierung von Mausembryonen nachweisen.

4.3.1 *nox*

Obwohl Nasr-Esfahani und Johnson (1991) im 2-Zell-Stadium muriner Embryonen Pools bestehend aus 10-20 Embryonen eine konzentrationsabhängige Reduktion in der Entstehung von H₂O₂ durch Inhibitoren der NOX demonstrierten und viele Studien einen Zusammenhang zwischen trophoblastären Zellen und NOX feststellten, konnte in allen drei untersuchten Kollektiven der Mausblastozysten annähernd keine *nox*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die 72-stündige *in vitro* Kultur scheint keinen Einfluss auf die *nox*-mRNA-Expression zu nehmen, da die *in vitro* Kollektive der Mausblastozysten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum *in vivo* Kollektiv aufwiesen. Die von Manes und Lai (1995) an d6 entdeckte NOX Aktivität auf den trophoblastären Zellen von Hasenblastozysten, konnte in den untersuchten Mausblastozysten an d3,5 nicht bestätigt werden.

4.3.2 *gpx*

GPX entgiften Peroxide und stellen einen wichtigen Bestandteil der antioxidativen Schutzfunktionen dar. Im Reproduktionstrakt schützt GPX die Oozyten sowie den Embryo vor ROS. Ihre Wichtigkeit wird durch ihre Präsenz sowohl im murinen und humanen Ovidukt sowie im Embryo selbst bereits im Blastozystenstadium deutlich (El Moutassim *et al.*, 1999, 2000). In der humanen Follikelflüssigkeit wurde der Aktivität von GPX eine Wichtigkeit bezüglich der Fertilität zugeschrieben (Paszkowski *et al.*, 1995). Oyawoye *et al.* (2003) berichteten, bei Frauen gehe ein Anstieg an antioxidativer

Kapazität in der Follikelflüssigkeit der Oozyten während einer IVF Therapie mit einer nachfolgenden erfolgreichen Fertilisation einher.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen El Mouatassim *et al.* (1999) dahingehend, dass *gpx*-mRNA bereits in murinen Einzelblastozysten zu finden ist. Es zeigte sich eine niedrigere Anzahl an *gpx4*-mRNA positiven Mausblastozysten im *in vivo* Kollektiv verglichen mit den *in vitro* Kollektiven. Insgesamt wurde *gpx4*-mRNA in mehr als 90% aller Blastozysten der drei Kollektive nachgewiesen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass *gpx4-knockout* Mäuse in frühzeitigen embryonalen Stadien im Uterus versterben, bekräftigen die Wichtigkeit von GPX4 in der frühen Embryonalentwicklung (Imai *et al.*, 2003; Yant *et al.*, 2003).

Obwohl lediglich in 40% der *in vivo* Blastozysten *gpx1*-mRNA detektiert wurde, wiesen die beiden *in vitro* Gruppen in mehr als 85% der untersuchten Blastozysten *gpx1*-mRNA auf. Ein möglicher Einfluss der *in vitro* Kultur auf die *gpx1*-mRNA-Expression der Mausblastozysten muss bedacht werden. Eine Erklärung für eine vermehrte Anzahl an *gpx1*-mRNA positiven Blastozysten in den *in vitro* Kollektiven findet sich in der Induktion von Transkriptionsfaktoren durch ROS in der *in vitro* Kultur. Dabei müssen HIF-1 sowie NF- κ B als Transkriptionsfaktoren in Betracht gezogen werden. HIF-1 wird hauptsächlich durch niedrige O₂-Konzentrationen aktiviert, wobei es den Organismus auf die veränderte metabolische Situation durch Heraufregulation bestimmter Gene vorbereitet (Semenza, 1999; Wenger & Gassman, 1999; Wenger, 2000). Da ROS als weiterer Stimulus für die Aktivierung von HIF-1 bekannt sind, muss ein Einfluss auf antioxidative Gene in atmosphärischen O₂-Gehalt in Erwägung gezogen werden (Déry *et al.*, 2005).

4.3.3 *prdx*

PRDX fungiert einerseits als TRX-abhängige Peroxidase im Sinne eines antioxidativen Schutzsystems, andererseits ist diese Proteinfamilie in zahlreiche Prozesse der Zellproliferation und -differenzierung, intrazelluläre Signaltransduktion sowie Apoptose involviert (Fujii & Ikeda, 2002). Leyens *et al.* (2003) demonstrierten das ubiquitäre Vorkommen von *prdx* und sprachen dieser Proteinfamilie eine Schlüsselrolle im zellulären Metabolismus Zellen zu. Die verschiedenen Isoformen von *prdx* wurden sowohl in bovinen Oozyten als auch in bovinen Embryonen nachgewiesen und sprechen für eine kritische Rolle in Eizellreifung und Embryonalentwicklung (Leyens *et al.*, 2004).

Zur näheren Analyse der antioxidativen Funktion von PRDX haben Leyens *et al.* (2004) die *prdx*-mRNA-Expression in bovinen Embryonen während der Entstehung des embryonalen Genoms unter 5% sowie 20% O₂-Gehalt untersucht. Dabei konnte keine veränderte *prdx*-mRNA-Expression in 20% O₂ detektiert werden. Rinaudo und Schultz (2004) berichteten von einer Herunterregulation von *prdx2* in murinen Embryonen Pools in der *in vitro* Kultur zweier verschiedener Kulturmedien. Diese Herunterregulation könne zu der erhöhten Inzidenz von Apoptose, die bei *in vitro* kultivierten Embryonen verglichen mit der *in vivo* Situation beobachtet wird, beitragen (Brison & Schultz, 1997; Rinaudo & Schultz, 2004).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine erhöhte Anzahl an *prdx2*-mRNA positiven Mausblastozysten in beiden *in vitro* Kollektiven verglichen mit der *in vivo* Kontrolle, wobei nahezu 100% der *in vitro* kultivierten Mausblastozysten *prdx2*-mRNA exprimierten. Dagegen wies die *in vivo* Kontrolle nur in 37% *prdx2*-mRNA positive Blastozysten auf. Damit widerlegen diese Ergebnisse die von Rinaudo und Schultz (2004) berichtete Herunterregulation von *prdx2* in der *in vitro* Kultur, wobei auch hier der Unterschied zwischen Embryonen Pools und Einzelblastozysten betont werden muss.

Yang *et al.* (2011) stellten eine wichtige Rolle von PRDX2 in der Inhibition der Apoptose in Granulosa Zellen fest, wobei PRDX2 Aktivität mit der Expression von NF- κ B in Verbindung gebracht wird. Im Hinblick darauf könnte die vermehrte Anzahl an *prdx2*-mRNA positiven Mausblastozysten in der *in vitro* Kultur als ein möglicher Adaptationsprozess der murinen Embryonen auf die veränderte Umweltsituation zu deuten sein, um der erhöhten Anfälligkeit bezüglich Apoptose auslösender Faktoren entgegenzuwirken. Dabei fungiere PRDX2 als anti-apoptotischer Faktor und diene dem Embryo als Schutz vor möglichen destruirenden Einwirkungen der veränderten Umgebung.

Kang *et al.* (1998) haben eine Korrelation zwischen der Aktivierung von NF- κ B, die durch extrazellulär zugeführte ROS gesteuert wurde, und der Überexpression von PRDX2 nachweisen können, so dass als möglicher Auslöser der erhöhten Anzahl an *prdx2*-mRNA positiven Mausblastozysten in den *in vitro* Kollektiven eine Induktion von NF- κ B durch ROS in Erwägung gezogen werden muss.

4.4 *In vitro* Kultur verändert die mRNA-Expression muriner Einzelblastozysten

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie betonen die in vielen Studien festgestellte Auswirkung der *in vitro* Kultur, die Genexpression des Embryos zu verändern. Bisherige Studien untersuchten dies häufig an Embryonen Pools, mit den vorliegenden Untersuchungen konnte eine durch die *in vitro* Kultur veränderte Genexpression in murinen Einzelblastozysten bestätigt werden. Obwohl demonstriert wurde, dass ein Gen (*nox*) nach der *in vitro* Kultur annähernd gleich wie *in vivo* exprimiert wurde, wies die Mehrzahl der Gene (*il-6*, *shh*, *ihh*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*) eine von der *in vivo* Kontrolle abweichende mRNA-Expression in den in Vitrolife™ Medium kultivierten Blastozysten auf. Die *in vitro* Blastozysten der COOK® Gruppe exprimierten keine abweichenden *shh*- und *ihh*-mRNA-Profile verglichen mit der *in vivo* Gruppe, zeigten dennoch eine veränderte mRNA-Expression von *il-6*, *gpx4*, *gpx1* und *prdx2* in den in COOK® Medium kultivierten Blastozysten. Mögliche weitere Erkenntnisse inwieweit die untersuchten Gene auf Proteinebene verändert sind, könnten einen interessanten Ansatz weiterer Studien darstellen. Diese Untersuchungen müssten an Embryonen Pools vollzogen werden, da murine Einzelblastozysten die nötige Proteinmenge für Immunhistochemie oder Western Blots nicht enthalten.

Trotz des ständigen Bemühens der Wissenschaft, die *in vitro* Kultursysteme der *in vivo* Situation anzugleichen, ist es letztlich noch nicht gelungen, die physiologischen Bedingungen des weiblichen Reproduktionstraktes zu imitieren. Ein wichtiger Aspekt bei der Optimierung der *in vitro* Kultursysteme stellt O₂ dar, wobei die Vermeidung eines Übermaßes an ROS entweder durch eine technische Anpassung des im Reproduktionstrakt herrschenden O₂-Gehaltes oder durch ein Kulturmedium, das suffiziente Antioxidantien enthält, anzustreben ist. Unterschiedliche *in vitro* Kulturmedien führen zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern, wie Rinaudo und Schultz (2004) bereits an Embryonen Pools feststellten. In den vorliegenden Untersuchungen ließen sich keine Vorteile in Bezug auf das neue Kulturmedium von Vitrolife™ verglichen mit dem konventionellen Medium von COOK® erkennen. Eine mögliche Beeinträchtigung des murinen Embryos hinsichtlich einer Schädigung durch die Komponenten des mit Antioxidantien ergänzten Mediums muss in Erwägung gezogen werden, da die mRNA-Expression im Vitrolife™ Kollektiv in einem größeren Ausmaß von der *in vivo* Situation abwich als im COOK® Kollektiv. Dies unterstützt die These von Gonçalves *et al.* (2010),

dass Antioxidantien-Zusatz bei IVF die frühe Embryonalentwicklung bis zum Blastozystenstadium beeinträchtigt. Weitere Daten von Kulturmedien mit Antioxidantien sind notwendig, um eindeutige Erkenntnis über positive oder negative Effekte von ihnen in der *in vitro* Kultur zu erhalten. Dabei sollte die Auswahl sowie die Konzentration der Antioxidantien bedacht und miteinander verglichen werden.

Letztlich steht hinter dem Versuch, die Kultursysteme zu optimieren und den *in vivo* Bedingungen anzugleichen der klinische Aspekt, mögliche Implikationen der *in vitro* Kultur auf den Embryo und sein späteres Leben zu vermeiden. Dabei muss eine Veränderung der Epigenetik mit möglichen Folgen von *imprinting*-Defekten berücksichtigt werden. Bekannte Syndrome aus der Veterinärmedizin wie das Large-offspring Syndrom, das mit einer von der *in vivo* Situation abweichenden Genexpression durch die *in vitro* Kultur in Verbindung gebracht wird (Lazzari *et al.*, 2002), sollten bedacht werden und rechtfertigen weitere Studien hinsichtlich möglicher Auswirkungen der *in vitro* Kultur auf die Genexpression. Das gegebenenfalls niedrigere Geburtsgewicht bei nach ART geborenen Kindern sollte bezüglich einer möglichen Korrelation mit einer veränderten Genexpression untersucht werden. Nur die Kenntnis der physiologischen Genexpression von für die frühe Embryonalentwicklung wichtigen Faktoren und ihr Vergleich mit der Genexpression nach der *in vitro* Kultur, macht es möglich, die Risiken der nach assistierter Reproduktion geborenen Kinder gering zu halten und mögliche Abweichungen aufzudecken, um diese verhindern zu können.

5 Zusammenfassung

Die Anzahl der nach ART geborenen Kinder ist seit der Geburt von Louise Brown, dem ersten durch IVF entstandenen Menschen, exponentiell gestiegen und beträgt 1-3% der jährlichen Geburten in entwickelten Ländern (Manipalviratn *et al.*, 2009).

Das Kulturmedium für Befruchtung und Embryonalentwicklung der ersten Tage als auch der O₂-Gehalt, dem der Embryo in der *in vitro* Kultur ausgesetzt ist, beeinflussen die Genexpression in der Präimplantationsentwicklung. Ein atmosphärischer O₂-Gehalt in der *in vitro* Kultur verglichen mit dem physiologischen hypoxischen Milieu im weiblichen Reproduktionstrakt verändert das Gleichgewicht der ROS und ihrer antioxidativen Schutzmechanismen (Burton *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2005; Rinaudo *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Mausmodell ein Einfluss der *in vitro* Kultur auf die mRNA-Expression von Einzelembryonen untersucht. Die mRNA-Expression bestimmter Gene eines *in vivo* Kollektivs muriner Einzelblastozysten wurde mit zwei *in vitro* kultivierten Kollektiven muriner Einzelblastozysten verglichen. Die Präimplantationsembryonen der *in vitro* Kollektive wurden von d0,5 bis d3,5 in zwei verschiedenen Kulturmedien (COOK® und Vitrolife™) inkubiert, wobei das COOK® Medium ein konventionelles Medium und das Vitrolife™ ein neueres Medium, das potentiell vor ROS schützen soll, darstellt.

Nach Reverser Transkription wurden die 276 β -Aktin-mRNA-positiven Mausblastozysten der drei Kollektive mittels *nested*-PCR auf die mRNA-Expression folgender Genen überprüft: *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*. In den vorliegenden Untersuchungen wies die Mehrzahl der Gene (*il-6*, *shh*, *ihh*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*) ein verändertes mRNA-Expressionsmuster in den im Vitrolife™ Medium kultivierten Blastozysten verglichen mit den *in vivo* Blastozysten auf. Obwohl die *in vitro* Blastozysten der COOK® Gruppe keine abweichenden *shh*- und *ihh*-mRNA-Profile verglichen mit der *in vivo* Gruppe exprimierten, zeigten die anderen Gene (*il-6*, *gpx4*, *gpx1*, *prdx2*) ebenfalls eine veränderte mRNA-Expression in den im COOK® Medium kultivierten Blastozysten. Nur die *nox*-mRNA-Expression der *in vitro* Blastozysten ähnelte der der *in vivo* Blastozysten in beiden *in vitro* Kollektiven.

Eine mögliche Beeinträchtigung des murinen Embryos hinsichtlich einer Schädigung durch das mit Antioxidantien ergänzte Medium kann in Erwägung gezogen werden, da die Genexpression im Vitrolife™ Kollektiv in einem größeren Ausmaß von der *in vivo* Situation abwich als im COOK® Kollektiv.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die *in vitro* Kultur die Genexpression von Einzelebryonen während der frühen murinen Embryonalentwicklung verändert. Trotz des ständigen Bemühens der Wissenschaft, die *in vitro* Kultursysteme zu optimieren, ist es letztlich noch nicht gelungen, die physiologischen Bedingungen des weiblichen Reproduktionstraktes zufriedenstellend zu imitieren. Ein wichtiger Aspekt bei der Optimierung der *in vitro* Kultursysteme stellt O₂ dar. Mögliche Implikationen der *in vitro* Kultur bezüglich einer veränderten Programmierung der Epigenetik sollten auch im Hinblick auf klinische Aspekte wie *imprinting*-Defekte oder das niedrigere Geburtsgewicht der nach IVF entstandenen Kinder bedacht und untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1999) "Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine." *Zygote*, 7 (3):203-10.
- Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR (1994) "Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen." *Arch Androl*, 33 (3):157-62.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003) "Role of reactive oxygen species in the human pathophysiology of human reproduction." *Fertil Steril*, 79 (4):829-43.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R (2005) "Role of oxidative stress in female reproduction." *Reprod Biol Endocrinol*, 3:28.
- Aitken J, Fisher H (1994) "Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk." *Bioessays*, 16 (4):259-67.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biol Reprod*, 41 (1):183-97.
- Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993) "Interleukin-6 in biology and medicine." *Adv Immunol*, 54:1-78.
- Alexiou M, Leese HJ (1992) "Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos." *Development*, 114 (1):185-92.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003) "Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development." *Theriogenology*, 59 (3-4):939-49.
- Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997) "Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas." *Curr Biol*, 7 (10):801-4.
- Aplin JD (1997) "Adhesion molecules in implantation." *Rev Reprod*, 2(2):84-93.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC (1999) "Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism." *Free Radic Biol Med*, 26 (7-8):869-80.
- Assari T (2006) "Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD." *Med Immun*, 5:4 doi:10.1186/1476-9433-5-4.
- Basatemur E, Sutcliffe A (2008) "Follow-up of children born after ART." *Placenta*, Suppl B:135-40.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM (2004) "Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis." *Nature*, 432:324-31.
- Becker S, Wang ZJ, Massey H, Arauz A, Labosky P, Hammerschmidt M, St-Jacques B, Bumcrot D, McMahon A, Gabel L (1997) "A role for Indian hedgehog in extraembryonic endoderm differentiation in F9 cells and the early mouse embryo." *Dev Biol*, 187 (2):298-310.
- Beehler BC, Przybyszewski J, Box HB, Kulesz-Martin MF (1992) "Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂." *Carcinogenesis*, 13 (11):2003-7.
- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA (2003) "Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours." *Nature*, 425 (6960):846-51.
- Bing YZ, Hirao Y, Takenouchi N, Che LM, Nakamura H, Yodoi J, Nagai T (2003) "Effects of thioredoxin on the preimplantation development of bovine embryos." *Theriogenology*, 59 (3-4):863-73.
- Bitgood MJ, McMahon AP (1995) "Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interactions in the mouse embryo." *Dev Biol*, 172 (1):126-38.
- Boland, MP (1984) "Use of rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs." *Theriogenology*, 21:126-37
- Bonduelle M, Bergh C, Niklasson A, Palermo GD, Wennerholm UB (2004) "Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children." *Reprod Biomed Online*, 9 (1):91-101.
- Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS (1989) "Establishment of human ampullary cell cultures." *Hum Reprod*, 4:486-94.

- Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandacumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S (1992) "Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture." *Fertil Steril*, 58:569-74.
- Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM (1998) "Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection." *Lancet*, 351 (9115):1529-34.
- Braude P, Bolton V, Moore S (1988) "Human gene expression first occurs between four- and eight cell stages of preimplantation development." *Nature*, 332:459-61.
- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G (2001) "A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of Sonic Hedgehog in the neural tube." *Mol Cell*, 7:1279-91.
- Brison DR, Schultz RM (1997) "Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha." *Biol Reprod*, 56 (5):1088-96.
- Burton G, Hempstock J, Jauniaux E (2002) "Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies." *Reprod BioMed Online*, 6 (1):84-96.
- Byrd N, Becker S, Maye P, Narasimhaiah R, St-Jacques B, Zhang X, McMahon J, McMahon A, Gabel L (2002) "Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis." *Development*, 129 (2):361-72.
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD (1995) "Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo." *Hum Reprod*; 10:1571-8.
- Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JPW, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA (2008) "Growth and development of children born after in vitro fertilization." *Fertil Steril*, 90:1662-73.
- Chakraborty I, Das SK, Dey SK (1995) "Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation." *J Endocrinol*, 147(2):339-52.
- Chang D, Lopez A, von Kessler D, Chiang C, Simandl B, Zhao R, Seldin M, Fallon J, Beachy P (1994) "Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene." *Development*, 120:3339-53.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic Hedgehog gene function." *Nature*, 383 (6599):407-13.
- Christ BEA, Wachtler F (1998) "Medizinische Embryologie: Molekulargenetik - Morphologie – Klinik" Urban & Fischer ISBN 978 3-86126-163-6.
- Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM (2001) "Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development." *J Clin Invest*, 107 (3):295–304.
- Clemens JA (2000) "Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants." *Free Radic Biol Med*, 28(10):1526-31.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi B-Z (1995) "Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor." *J Biol Chem*, 271 (2):736-41.
- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B (2002) "Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects." *Am J Hum Genet*, 71 (1):162-4.
- Cui XL, Brockman D, Campos B, Myatt L (2006) "Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia." *Placenta*, 27 (4-5):422-31.
- Dai RL, Zhu SY, Xia YP, Mao L, Mei YW, Yao YF, Xue YM, Hu B (2011) "Sonic hedgehog protects cortical neurons against oxidative stress." *Neurochem Res*, 36(1):67-75.
- DeBaum MR, Niemitz EL, Feinberg AP (2003) "Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19." *Am J Hum Genet*, 72 (1), 156-60.
- de Lamirande E, Gagnon C (1993) "Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process." *Free Radic Biol Med*, 14 (2):157-66.
- de Lamirande E, Eiley D, Gagnon C (1993) "Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids." *Int J Androl*, 16 (4):258-66.
- Delattre M, Briand S, Paces-Fessy M, Blanchet-Tournier MF (1999) "The suppressor of fused gene, involved in Hedgehog signal transduction in *Drosophila*, is conserved in mammals." *Dev Genes Evol*, 209 (5):294-300.

- de Matos DG, Furnus CC (2000) "The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cysteine." *Theriogenology*, 53 (3):761-71.
- Dennery PA (2004) "Role of redox in fetal development and neonatal diseases." *Antioxid Redox Signal*, 6 (1):147-53.
- Déry MA, Michaud MD, Richard DE (2005) "Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (3):535-40.
- Deutsches IVF Register (DIR) (2011) Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein, Bismarckallee 8-12, 23795 Bad Segeberg.
- Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF, Schultz P, Warmuth M (2007) "Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies." *Nat Med*, 13 (8):944-51.
- Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM (2000) "Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo." *Biol Reprod*, 62 (6):1526-35.
- Dröge W (2002) "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev*, 82 (1):47-95.
- Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL (1999) "Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture." *Hum Reprod*, 14 (2):465-9.
- Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP, Evers JL (2010) "Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns." *Hum Reprod*, 25(3):605-12.
- Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH (2001) "Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo." *Development*, 128 (10):1717-30.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, Mc Mahon AP (1993) "Sonic Hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." *Cell*, 75:1417-30.
- Eckert J, Niemann H (1998) "mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo." *Mol Hum Reprod*, 4 (10):957-65.
- Ekker S, Ungar A, Greenstein P, von Kessler D, Porter J, Moon R, Beachy P (1995) "Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain." *Curr Biol*, 5:944-55.
- El Mouatassim S, Guérin P, Ménéz Y (1999) "Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation." *Mol Hum Reprod*, 5 (8):720-5.
- El Mouatassim S, Guérin P, Ménéz Y (2000) "Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 89 (1):1-6.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzén E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell*, 107 (1):43-54.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM (1996) "Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity." *Cell*, 87 (4):661-73.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) "Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling." *Cell*, 90 (1):169-80.
- Espey LL (1980) "Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis." *Biol Reprod*, 22 (1):73-106.
- Fan L, Pepicelli CV, Dibble CC, Catbagan W, Zarycki JL, Laciak R, Gipp J, Shaw A, Lamm ML, Munoz A, Lipinski R, Thrasher JB, Bushman W (2004) "Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth." *Endocrinology*, 145 (8):3961-70.
- Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY (2008) "Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro." *J Cereb Blood Flow Metab*, 28 (1):90-8.
- Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoché MA, Dandolo L, Vaiman D, Jammes H (2007) "Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos." *BMC Dev Biol*, 18 (7):116.
- Fee D, Grzybicki D, Dobbs M, Clotfelter J, Macvilay S, Hart MN, Sandor M, Fabry Z (2000) "Interleukin 6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells." *Cytokine*, 12 (6):655-65.

- Filler R, Lew KJ (1981) "Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryos." *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 (11):6991-5.
- Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE (1998) "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." In *Matrix Metalloproteinases* edited by: Parks WC, Mecham RP. New York: Academic, 299-356.
- Fischer B, Bavister BD (1993) "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits." *J Reprod Fertil*, 99 (2):673-9.
- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M (2002) "Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." *Biol Reprod*, 67 (3):967-71.
- Fujii J, Ikeda Y (2002) "Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein." *Redox Rep*, 7:123-30.
- Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T (2003) "Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues." *Asian J Androl*, 5 (3):231-42.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F (2005) "Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system." *Reprod Biol Endocrinol*, 3:43.
- Fujita K, Miyamoto T, Saika S (2009) "Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization." *Mol Vis*, 15:1036-44.
- Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K (1997) "Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro – produced bovine embryos." *J Anim Sci*, 75 (2):483-9.
- Galaan A, Herrer R, Mercader A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, O'Connor JE, Simón C (1999) "Coordinated regulation of endometrial epithelia apoptosis induced by the human blastocyst as a crucial mechanism during human implantation." *Fertil Steril*, 72 (Suppl.1), S27.
- Gardiner CS, Reed DJ (1995) "Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo." *Arch Biochem Biophys*, 318 (1):30-6.
- Gardner DK, Lane M (1996) "Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters." *Hum Reprod*, 11 (12):2703-12.
- Gardner DK (1999) "Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability." *J Reprod Fertil Suppl*, 54:461-75.
- Gerwin N, Jia GQ, Kulbacki R, Gutierrez-Ramos JC (1995) "Interleukin gene expression in mouse preimplantation development." *Dev Immunol*, 4 (3):169-79.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y (2003) "In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene." *Am J Hum Genet*, 72 (5):1338-41.
- Gilman A, Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE (2001) "Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics." New York: McGraw-Hill. ISBN 0-07-135469-7.
- Gonçalves FS, Barretto LS, Arruda RP, Perri SH, Mingoti GZ (2010) "Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development." *Reprod Domest Anim* 45 (1):129-35.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M (1993) "Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro." *Free Radic Biol Med*, 15 (1):69-75.
- Graham CH, Lala PK (1992) "Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control." *Biochem Cell Biol*, 70 (10-11):867-74.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M (2000) "Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling." *Regul Pept*, 91:21-7.
- Griffiths M (1978) "The biology of monotremes." New York: Academic Press.
- Grillo M, Gamarre M, Lacroix O, Noizet A, Vitry G (1991) "Influence of the morphological aspect of embryos obtained by in vitro fertilization on their implantation rate." *J In Vitro Fert Embryo, Transfer* 8, 317-21.
- Guérin P, Mouatassim S and Ménézo Y (2001) "Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings." *Hum Reprod Update*, 7 (2):175-89.
- Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A (1999) "The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models." *J Mol Med*, 77 (6):459-68.

- Hall TM, Porter JA, Young KE, Koonin EV, Beachy PA, Leahy DJ (1997) "Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins." *Cell*, 91 (1):85-97.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1998) "Free Radicals in Biology and Medicine." Oxford Science Publications, Oxford.
- Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gmss P (1999) "Vaxl a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system." *Genes Dev* 13, 3106-14.
- Hammerschmidt M, Brook A, McMahon A (1997) "The world according to hedgehog." *Trends Genet* (in press).
- Hansen JC, Deguchi Y (1996) "Selenium and fertility in animals and man – a review." *Acta Vet Scand*, 37:19-30.
- Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002) "REDOX regulation of early embryo development." *Reproduction*, 123 (4):479-86.
- Harvey AJ (2007) "The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism." *Abim Reprod Sci*, 98 (1-2):113-28.
- Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA (1995) "Roles of growth factors during peri-implantation development." *Hum Reprod*, 10 (3):712-8.
- Hebrok M, Kim S, St Jacques B, McMahon AP, Melton D (2000) "Regulation of pancreas development by hedgehog signaling." *Development*, 127:4905-13.
- Helmerhorst FM, Perquin DAM, Donker D, Keirse MJNC (2004) "Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies." *Br Med J*, 328:261-5.
- Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G (1997) "Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid." *Dev Biol*, 187 (1):25–35.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000) "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." *Free Radic Biol Med*, 28 (10):1456-62.
- Hess AP, Schanz A, Baston-Buest DM, Hirchenhain J, Stoff-Khalili MA, Bielfeld P, Kruessel JS (2008) "Expression of the vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 in the human endometrium." *J Reprod Immunol.*; 79(2):129-36.
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) "Biological and clinical aspects of interleukin 6." *Immunol Today*, 11:443-9.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD (1997) "Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia." *J Biol Chem*, 272:16644-51.
- Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ (1998) "Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase." *J Biol Chem*, 273 (13):7765-9.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994) "Manipulating the mouse embryo – a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-109.
- Huang HY, Krüssel JS, Wen Y, Polan ML (1997a) "Use of reverse transcription/ polymerase chain reaction to detect embryonic interleukin-1 system messenger RNAs in individual preimplantation mouse embryos cocultured on Vero-cells." *Hum Reprod*, 12:1537-44.
- Huang HY, Wen Y, Valbuena D, Krüssel JS, Polan ML (1997b) Interleukin-1 β regulates Vero cell interleukin-1 receptor type I messenger ribonucleic acid expression." *Biol Reprod*, 57:783-90.
- Ibelgaufts H (1995) "Cytokines In: Dictionary of Cytokines." 186-92. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA (2000) "Blockade of the $\alpha_v\beta_3$ integrin adversely affects implantation in the mouse." *Biol Reprod*, 62:1285-90.
- Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y (2003) "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene." *Biochem Biophys Res Commun*, 305 (2):278-86.
- Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki J, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y (2009) "Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice." *J Biol Chem*, 284 (47):32522-32.
- Ingham PW, McMahon AP (2001) "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles." *Genes Dev*, 15:3059-87.
- Irvine DS (1996) "Glutathione as a treatment for male infertility." *Rev Reprod*, 1 (1):6-12.

- Iwasaki M, Le AX, Helms JA (1997) "Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis." *69* (1-2):197-202.
- Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M (1998) "Effects of antioxidants on the development of bovine IVF/IVF embryos in various concentrations of glucose." *Theriogenology*, *50* (3):365-75.
- Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS (2004) "Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis." *Obstet Gynecol*, *103*:551-63.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) "Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB." *Free Radic Biol Med*, *28* (9):1317-27.
- Jiang J, Hui CC (2008) "Hedgehog signaling in development and cancer." *Dev Cell*, *15* (6):801-12.
- Johnson MH, Nasr-Esfahani MH (1994) "Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro?" *Bioessays*, *16* (1):31-8.
- Johnson RL, Riddle RD, Laufer E, Tabin C (1994) "Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures." *Biochem Soc Trans*, *22* (3):569-74.
- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP (1996) "Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome." *Science*, *272* (5268):1668-71.
- Jones SA (2005) "Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6." *J Immunol*, *175* (6):34638.
- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998) "Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha." *J Biol Chem*, *273* (11):6297-302.
- Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) "IL-6 signal transduction and its physiological roles: the sinal orchestration model." *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *149*:1-38.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug, Bahceci M (2004) "Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes." *Reprod BioMed Online*, *9* (4):409-17.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004) "Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis." *Nature*, *431* (7009):707-12.
- Khatua A, Wang X, Ding T, Zhang Q, Reese J, DeMayo FJ, Paria BC (2006) "Indian hedgehog, but not histidine decarboxylase or amphiregulin, is a progesterone-regulated uterine gene in hamsters." *Endocrinology*, *147* (9):4079-92.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R (2001) "Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes." *Biol Reprod*, *64* (3):918-26.
- Kida H, Yoshida M, Hoshino S, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Kumagai T, Osaki T, Tachibana I, Saeki Y, Kawase I. (2005) "Protective effect of IL-6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *288* (2):L342-9.
- Kretz-Remy C, Bates EE, Arrigo AP (1998) "Amino acid analogs activate NF-kappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation." *J Biol Chem*, *273* (6):3180-91.
- Krüssel JS, Huang HY, Wen Y, Klodt A, Bielfeld P, Polan ML (1997) "Different patterns of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I (IL-1R tI) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages." *J Reprod Immunol*, *34*:103-20.
- Krüssel JS, Huang HY, Hirchenhain J, Bielfeld P, Cupisti S, Jeremias L, Polan ML (2000) "Is there a place for biochemical embryonic preimplantational screening?" *J Reprod Fertil, Suppl* *55*, 147-59.
- Krüssel JS, Behr B, Milki AA, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, Polan ML (2001) "Vascular endothelial growth factor (VEGF) - mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts." *Mol Hum Reprod*, *7*:57-63.
- Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C (2003) "Regulation of embryonic implantation." *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol*, *110*:2-9.
- Lane M, Gardner DK (2007) "Embryo culture medium: which is the best?" *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, *21*(1):83-100.
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM (1996) "PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth." *Science*, *273* (5275):663-6.

- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C (2002) "Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome." *Biol Reprod*, 67 (3):767-75.
- Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C (2010) "Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology." *Ann Endocrinol (Paris)*, 71 (3):237-8.
- Lee K, Park JS, Kim YJ, Soo Lee YS, Sook Hwang TS, Kim DJ, Park EM, Park YM (2002) "Differential expression of Prx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation." *Biochem Biophys Res Commun*, 296 (2):337-42.
- Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soegiarto DW, Toftgard R, Tsai MJ, Tsai S, Lydon JP, DeMayo FJ (2006a) "Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus." *Nat Genet*, 38 (10):1204-9.
- Lee K, Jeong J, Tsai MJ, Tsai S, Lydon JP, DeMayo FJ (2006b) "Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function." *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102 (1-5):41-50.
- Lee KF, Chow JF, Xu JS, Chan ST, Ip SM, Yeung WS (2001) "A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display." *Biol Reprod*, 64 (3):910-7.
- Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL (2003) "Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia." *J Hypertens*, 21:395-402.
- Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S, Dondero F (1994) "Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process." *Hum Reprod*, 9 (11):2044-50.
- Lequarré AS, Feugang JM, Malhomme O, Donnay I, Massip A, Dessy F, Van Langendonck A (2001) "Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture." *Mol Reprod Dev*, 58 (1):45-53.
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA (1992) "Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle." *J Clin Invest*, 90:188-95.
- Lewis MT, Ross S, Strickland PA, Sugnet CW, Jimenez E, Scott MP, Daniel CW (1999) "Defects in mouse mammary gland development caused by conditional haploinsufficiency of Patched-1." *Development*, 126 (22):5181-93.
- Leyens G, Donnay I, Knoops B (2003) "Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 136 (4):943-55.
- Leyens G, Knoops B, Donnay I (2004) "Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro." *Mol Reprod Dev*, 69 (3):243-51.
- Lindemann RK (2008) "Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma." *Cancer Res*, 68:961-4.
- Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP (2003) "Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies." *Reprod BioMed Online*, 7 (6):657-63.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998) "Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa." *Hum Reprod*, 13 (4):896-900.
- Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola L, Wilson SW (1995) "Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes." *Development*, 121:3267-78.
- Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM (2003) "Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)." *Am J Med Genet*, 40 (1):62-4.
- Manes C, Lai NC (1995) "Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals." *J Reprod Fertil*, 104 (1):69-75.
- Manes C (2001) "Human placental NAD(P)H oxidase: solubilization and properties." *Placenta*, 22:58-63.
- Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J (2009) "Imprinting disorders and assisted reproductive technology." *Fertil Steril*, 91 (2):305-15.
- Mastroianni L, Jones R (1965) "Oxygen tension within the rabbit fallopian tube." *J Reprod Fertil*, 9:99-102.
- Masuhiro K, Matsuzaki N, Nishino E, Taniguchi T, Kameda T, Li Y, Saji F, Tanizawa O (1991) "Trophoblast-derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6-receptor system in first trimester human trophoblasts." *J Clin Endocrinol Metab*, 72 (3):594-601.

- Matsubara S, Sato I (2001) "Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy." *Histochem Cell Biol*, 116:1-7.
- Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM (1996) "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene." *Dev Biol*, 178 (1):179-85.
- Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Hogan BL, Dey SK (2002) "Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus." *Dev Biol*, 245 (2):280-90.
- Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM (1998) "Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice." *Endocrinology*, 139 (9):4008-11.
- Meissner A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P (1999) "Effects of interleukin-6 on cytotrophoblastic cells." *Mol Hum Reprod*, 5(11):1055-8.
- Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC (1990) "Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells." *Bio Reprod*, 42:301-6.
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B (1992) "Coculture of embryos on Vero-cells and transfer of blastocysts in humans." *Hum Reprod*, 7:101-6.
- Meyer JW, Schmitt ME (2000) "A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis." *FEBS Lett*, 472:1-4.
- Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA (1994) "Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes." *Chem Biol Interact*, 91 (2-3):91-100.
- Minami N, Sasaki K, Aizawa A, Miyamoto M, Imai H (2001) "Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments." *Biol Reprod*, 64 (1):30-5.
- Monzo M, Moreno I, Artells R, Ibeas R, Navarro A, Moreno J, Hernandez R, Granell M, Pie J (2006) "Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients." *Cancer Lett*, 233 (1):117-23.
- Morales H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F, Van Langendonck A (1999) "Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos." *Mol Reprod Dev*, 52 (2):149-57.
- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E (1990) "Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:3092-6.
- Munné S, Estop A (1991) "The effect of in-vitro ageing on mouse sperm chromosomes." *Hum Reprod*, 6 (5):703-8.
- Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T (1999) "Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone." *Ann N Y Acad Sci*, 874:386-400.
- Müller WA, Hassel M (2006) „Entwicklungsbiologie.“ Springer-Verlag (4.Auflage), Kapitel 12.5.5., S.340.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997) "Redox regulation of cellular activation." *Annu Rev Immunol*, 15:351-69.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR and Johnson MH (1990) "Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo." *Development*, 109:501-7.
- Nasr-Esfahani MM, Johnson MH (1991) "The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro." *Development*, 113 (2):551-60.
- Natale DR, De Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ (2001) "Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR." *Reproduction*, 122 (5):687 – 93.
- Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F (2009) "Reactive oxygen species controls endometriosis progression." *Am J Pathol*, 175 (1):225-34.
- Nguyen NT, Lin DP, Yen SY, Tseng JK, Chuang JF, Chen BY, Lin TA, Chang HH, Ju JC (2009) "Sonic hedgehog promotes porcine oocyte maturation and early embryo development." *Reprod Fertil Dev*, 21 (6):805-15.
- Nguyen NT, Lin DP, Siriboon C, Lo NW, Ju JC (2010) "Sonic Hedgehog improves in vitro development of porcine parthenotes and handmade cloned embryos." *Theriogenology*, 74 (7):1149-60.
- Nikas G (1999) "Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice." *Human Reprod*, 2:99-106.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T (1991) "Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block." *Mol Reprod Dev*, 28 (4):356-60.

- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*", *Nature* 287:795 – 801.
- Oniscu A, James RM, Morris RG, Bader S, Malcomson RD, Harrison DJ (2004) "Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia." *J Pathol*, 203 (4):909-17.
- Orsi NM, Leese HJ (2001) "Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate." *Mol Reprod Dev*, 59 (1):44-53.
- Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP (1997) "Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog." *276 (5313):817-21*.
- Outram SV, Hager-Theodorides AL, Shah DK, Rowbotham NJ, Drakopoulou E, Ross SE, Lanske B, Dessens JT, Crompton T (2009) "Indian hedgehog (Ihh) both promotes and restricts thymocyte differentiation." *Blood*, 113 (10):2217-28.
- Owen CM, Segars JH (2009) "Imprinting disorders and assisted reproductive technology." *Semin Reprod Med*, 27 (5):417-28.
- Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P (2003) "Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome." *Hum Reprod*, 18 (11):2270-4.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) "Pregnancies after injection of a single spermatozoon into an oocyte." *Lancet*, 340:17-18.
- Papaioannou VE, Ebert KM (1986) "Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice." *J Reprod Fertil*, 76:603-8.
- Paria BC, Dey SK (1990) "Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors." *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:4756-60.
- Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Hogan BL (2001) "Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors." *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (3):1047-52.
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL (2000) "Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation." *Development*, 127 (8):1593-605.
- Parrott JN, Gay NJ (1998) "Expression and subcellular distribution of rel/NF kappaB transcription factors in the preimplantation mouse embryo: novel kappaB binding activities in the blastocyst stage embryo." *Zygote*, 6 (3):249-60.
- Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D (1995) "Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid." *Clin Chim Acta*, 236 (2):173-80.
- Payne SR, Munday R, Thompson JG (1992) "Addition of superoxide dismutase and catalase does not necessarily overcome developmental retardation of one-cell mouse embryos during in-vitro culture." *Reprod Fertil Dev*, 4 (2):167-74.
- Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W (2007) "Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma." *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (10):4048-53.
- Perron M, Boy S, Amato MA, Viczian A, Koebernick K, Pieler T, Harris WA (2003) "A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation." *Development*, 130 (8):1565-77.
- Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL (1991) "Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst." *Differentiation*, 46 (3):181-6.
- Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen AN (2003) "Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families." *Hum Reprod*, 18 (6):1234-43.
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM (2001) "The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors." *Nat Med*, 7 (6):706-11.
- Prichard JF, Thibodeaux JK, Pool SH, Blakewood EG, Menezo Y, Godke RA (1992) "In vitro co-culture of early stage caprine embryos with oviduct and uterine epithelial cells." *Hum Reprod*, 7:553-7.
- Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C (2004) "Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment." *Int J Cancer*, 110 (6):831-7.
- Raijmakers MT, Peters WH, Steegers EA, Poston L (2004) "NAD(P)H oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women." *Placenta*, 25 (Suppl A):S85-9.

- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (17):6465-7.
- Riddle R, Johnson R, Laufer E, Tabin C (1993) "Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA." *Cell*, 75:1401-16.
- Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspanier R, Wolf E, Prella K (2002) "Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro." *Reproduction*, 124 (4):543-56.
- Rinaudo P, Schultz RM (2004) "Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos." *Reproduction*, 128 (3):301-11.
- Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM (2006) "Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos." *Fertil Steril*, 86 (3):1252-65.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, de la Fuente J, Gutiérrez-Adán A (2002) "Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality." *Biol Reprod*, 66 (3):589-95.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2003) "Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression." *Biol Reprod*, 68 (1):236-43.
- Rothstein JL, Johnson D, DeLoia JA, Skowronski J, Solter D, Knowles B (1992) "Gene expression during preimplantation mouse development." *Genes Dev*, 6 (7):1190-201.
- Ruiz i Altaba A, Mas C, and Stecca B (2007) "The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer." *Trends Cell Biol*, 17:438-47.
- Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A (2004) "Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling." *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (34):12561-6.
- Sasaki Y, Iwai N, Tsuda T, Kimura O (2004) "Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 expressions in the hindgut region of murine embryos with anorectal malformations." *J Pediatr Surg*, 39 (2):170-3.
- Schmidt-Matthiesen H (1968) „Endometrium und Nidation beim Menschen.“ *Z Geburtsh Gynäkol*, 168: 113-25.
- Sehgal PB (1992) "Regulation of IL-6 gene expression." *Res Immunol*, 143:724-34.
- Semenza GL (1999) "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia – inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:551-8.
- Semenza GL (2000) "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." *J Appl Physiol*, 88 (4):1474-80.
- Semenza GL (2001) "HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus." *Cell*, 107 (1):1-3.
- Sharkey A (1998) "Cytokines and implantation." *Rev Reprod*, 3:52-61.
- Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J (2004) "Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer." *Mol Cancer*, 3:29.
- Simón C, Gimeno MJ, Frances A, Mercader A, Polan ML (1995) "Cytokines in implantation." *Sem Reprod Endocrinol*, 13:142-51.
- Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A (1997) "The interleukin-1 system in human implantation." *Am J Reprod Immunol*, 37:64-72.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E (2004) "Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion." *Reprod Biol Endocrinol*, 4:2:59.
- Staun-Ram E, Shalev E (2005) "Human trophoblast function during the implantation." *Reprod Biol Endocrinol*, 3:56.
- Steptoe PC, Edwards RG (1978) "Birth after re-implantation of a human embryo." *Lancet*, 2:366.
- St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, McMahon JA, Lewis PM, Paus R, McMahon AP (1998) "Sonic hedgehog signaling is essential for hair development." *Curr Biol*, 8 (19):1058-68.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) "Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation." *Genes Dev*, 13 (16):2072-86.

- Sukegawa A, Narita T, Kameda T, Saitoh K, Nohno T, Iba H, Yasugi S, Fukuda K (2000) "The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium." *Development*, 127 (9):1971-80.
- Sutcliffe AG, Saunders K, McLachlan R, Taylor B, Edwards P, Grudzinskas G, Leiberman B, Thornton S (2003) "A retrospective case-control study of developmental and other outcomes in a cohort of Australian children conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with a similar group in the United Kingdom." *Fertil Steril*, 79 (3):512-6.
- Sutcliffe AG, Ludwig M (2007) "Outcome of assisted reproduction." *Lancet*, 370:351-9.
- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH (1993) "Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo." *Development*, 119:1175-86.
- Tabibzadeh S (1992) "Patterns of expression of integrin molecules in human endometrium throughout the menstrual cycle." *Hum Reprod*, 7:876-82.
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT (1995) "Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window." *Hum Reprod*, 10 (10):2793-9.
- Taga T, Kishimoto T (1997) "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." *Annu Rev Immunol*, 15:797-819.
- Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H (1996) "Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere." *J Vet Med Sci*, 58 (9):897-902.
- Takahashi Y, Kanagawa H (1998) "Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro." *J vet Med Sci*, 60 (3):365-7.
- Takamoto N, Zhao B, Tsai SY, DeMayo FJ (2002) "Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus." *Mol Endocrinol*, 16 (10):2338-48.
- Tesarik J, Kopečný V, Plachnot M, Mandelbaum J (1986) "Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro." *J. Reprod Fertil*, 78:463-70.
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M (2003) "Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis." *Nature*, 425 (6960):851-6.
- Thomas M, Jain S, Kumar GP, Laloraya M (1997) "A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts." *J Cell Sci*, 110 (14):1597-602.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T (1992) "Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos." *Mol Reprod Dev*, 31 (1):28-33.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT (1988) "Decreased embryonic survival of in vitro fertilized oocytes in rats is due to retardation of preimplantation development." *J Reprod Fertil*, 83:851-57.
- Van Snick J (1990) "Interleukin-6: an overview." *Annu Rev Immunol*; 8:253-78.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A (1996) "Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition." *Theriogenology*, 57 (5):1453-65.
- Vokes SA, Yatskevych TA, Heimark RL, McMahon AP, Antin PB, Krieg PA (2004) "Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis." *Development*, 131 (17):4371-80.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." *Science*, 273 (5275):613-22.
- Wang S, Cowan CA, Chipperfield H, Powers RD (2005) "Gene expression in the preimplantation embryo: in vitro development changes." *Reprod BioMed Online*, 10 (5):607-16.
- Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A (1997) "Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility." *Fertil Steril*, 68(5):826-30.
- Wang Z, Castresana MR, Newman WH (2001) "Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 285 (3):669-74.
- Wenger RH (2000) "Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation." *J Exp Biol*, 203 (8):1253-63.

- Wenger RH, Gassman M (1999) "HIF-1 and the molecular response to hypoxia in mammals." In *Environmental Stress and Gene Regulation*, pp.25-45, Ed. KB Storey. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Whitten WK (1971) "Nutrient requirements for culture of preimplantation embryos in vitro." *Adv Biosci*, 6:129-139.
- Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M (1993) "Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells." *Hum Reprod*, 8:97-101.
- Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA (2005) "Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells." *Endocrinology*, 146 (8):3558-66.
- Williams C, Sutcliffe A (2009) "Infant outcomes of assisted reproduction." *Early Hum Dev*, 85 (11):673-7.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1999) "Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA." *Mol Reprod Dev*, 53 (1):8-18.
- Wrenzycki C, De Sousa P, Overström EW, Duby RT, Herrmann D, Watson AJ, Niemann H, O'Callaghan D, Boland MP (2000) "Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos." *J Reprod Fertil*, 118 (1):69-78.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A Jr, Sirisathien S, Brackett B, Niemann H (2001) "Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos." *Hum Reprod*, 16 (5):893-901.
- Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S, Zhuang L (2001) "Effects of Matrix Proteins on the Expression of Matrix Metalloproteinase-2, -9 and -14 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Human Cytotrophoblast Cells During the First Trimester." *Biol of Reprod*, 65:240-6.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) "Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos." *Hum Reprod*, 13 (4):998-1002.
- Yang MY, Rajamahendran R (2002) "Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro." *Anim reprod Sci*, 70 (3-4): 159-69.
- Yang S, Luo A, Hao X, Lai Z, Ding T, Ma X, Mayinuer M, Shen W, Wang X, Lu Y, Ma D, Wang S (2011) "Peroxiredoxin 2 Inhibits Granulosa Cell Apoptosis During Follicle Atresia Through the NFKB Pathway in Mice." *Biol Reprod*, 84 (6):1182-9.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA (2003) "The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults." *Free Radic Biol Med*, 34 (4):496-502.
- Yedwab GA, Paz G, Homonnai TZ, David MP, Kraicer PF (1976) "The temperature, pH, and partial pressure of oxygen in the cervix and uterus of women and uterus of rats during the cycle." *Fertil Steril*, 27 (3):304-9.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmot I (1998) "Large offspring syndrome in cattle and sheep." *Rev Reprod*, 3 (3):155-63.
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmot I, Sinclair KD (2001) "Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture." *Nat Genet*, 27(2):153-4.
- Zaitseva I, Zaitsev S, Alenina N, Bader M, Krivokharchenko A (2007) "Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro." *Mol Reprod Dev*, 74 (10):1255-61.
- Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP (2001) "Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node." *Cell*, 105:781-92.

7 Anhang

7.1 DNA-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen in der PCR

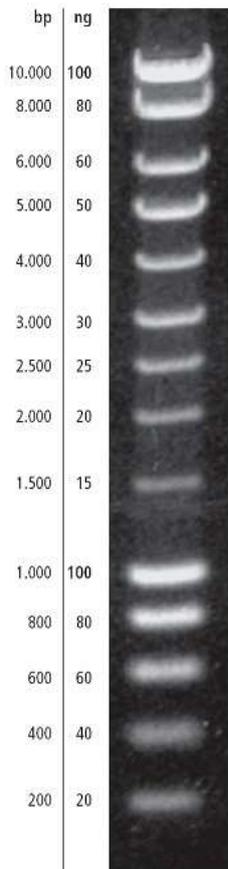


Abb.20: Quantitas DNA-Marker: 200bp-10kb (Biozym Scientific GmbH)

7.2 Ergebnisse der *in vivo* entwickelten Embryonen

<i>in vivo</i>	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
1	1	1	0	0	0	1	0	1
2	1	1	0	0	0	1	1	1
3	1	1	0	0	0	1	1	1
4	1	1	0	0	0	1	0	1
5	1	1	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	1	1	1
7	1	1	0	0	0	1	0	1
8	1	1	0	0	0	1	1	1
9	1	1	0	0	0	1	1	1
10	1	0	0	0	0	1	1	1
11	1	1	0	0	0	1	1	1
12	1	0	0	0	0	1	1	1
13	1	1	0	0	0	1	0	1

<i>in vivo</i>	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
14	1	1	0	0	0	1	0	1
15	1	1	0	0	0	1	1	1
16	1	1	0	0	0	1	0	1
17	1	0	0	0	0	1	0	1
18	1	1	1	0	0	1	0	1
19	1	1	0	0	0	1	1	1
20	1	1	0	0	0	1	1	1
21	1	1	0	0	0	1	0	0
22	1	0	0	0	0	0	0	0
23	1	1	0	0	0	1	1	1
24	1	0	0	0	0	1	1	0
25	1	0	0	1	0	1	1	0
26	1	1	0	0	0	1	0	0
27	1	1	0	0	0	0	1	0
28	0							
29	1	0	0	0	0	1	0	0
30	1	0	0	0	0	1	1	0
31	0							
32	1	1	0	0	0	1	1	1
33	1	0	0	0	0	1	0	0
34	1	1	0	0	0	1	1	0
35	1	0	0	0	0	1	1	0
36	0							
37	1	0	0	0	0	1	1	0
38	1	0	0	0	0	1	1	0
39	1	1	0	0	0	1	0	0
40	1	0	0	0	0	1	1	0
41	0							
42	1	1	0	0	0	1	0	0
43	1	0	0	0	0	1	0	1
44	1	0	1	0	0	1	0	0
45	1	0	0	0	0	1	0	0
46	1	0	0	0	0	1	0	0
47	1	0	0	0	0	1	0	0
48	0							
49	1	0	1	0	0	1	0	0
50	1	0	0	0	0	1	0	0
51	1	0	0	0	0	1	0	1
52	1	1	0	0	0	0	0	0
53	1	0	0	0	0	1	0	1
54	1	0	0	0	0	1	0	0
55	1	0	0	0	0	1	0	0
56	1	0	0	0	0	1	0	0
57	0							
58	1	0	0	0	0	1	0	0
59	1	0	0	0	0	1	0	0

<i>in vivo</i>	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
60	1	0	0	0	0	1	0	0
61	1	0	0	0	0	1	0	0
62	1	0	0	0	0	1	0	1
63	1	0	0	0	0	1	0	0
64	0							
65	0							
66	1	0	0	0	0	1	0	0
67	1	0	0	1	0	1	0	0
68	1	0	0	0	0	0	0	0
69	1	0	0	0	0	0	0	0
70	1	0	0	0	0	1	0	1
71	1	0	0	0	0	1	0	0
72	1	0	0	0	0	1	0	0
73	1	0	0	0	0	1	0	0
74	1	0	0	0	0	1	0	0
75	1	0	0	0	0	1	0	0
76	1	1	0	0	0	1	0	1
77	1	0	0	0	0	1	0	0
78	1	0	0	0	0	1	0	0
79	0							
80	1	0	0	0	0	1	0	0
81	1	0	0	0	0	1	0	0
82	1	0	0	0	0	1	0	0
83	1	0	1	0	0	1	0	0
84	1	0	0	0	0	1	0	0
85	1	0	0	0	0	0	0	0
86	1	0	0	0	0	1	0	1
87	1	0	0	0	0	0	1	0
88	1	0	0	0	0	1	0	1
89	0							
90	1	0	0	0	0	1	0	0
91	0							
92	1	0	1	0	0	1	1	0
93	1	0	0	0	0	1	0	0
94	1	0	0	0	0	1	1	0
95	1	0	0	1	0	1	1	1
96	1	0	0	0	0	1	0	0
97	1	0	0	0	0	0	1	0
98	1	0	0	0	0	1	1	0
99	1	0	0	0	0	1	1	0
100	1	0	1	0	0	1	0	0
101	1	0	0	1	0	1	1	1
102	1	0	0	0	0	1	1	1
103	1	0	0	0	0	1	1	0
104	1	0	0	0	0	1	1	1
105	1	0	0	0	0	1	1	0

<i>in vivo</i>	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
106	1	0	0	0	0	1	1	1
107	1	1	1	0	0	1	1	1
108	0							
109	1	0	0	0	0	1	1	1
110	1	0	0	0	0	0	0	0
111	0							
112	1	0	0	0	0	1	0	1
113	1	0	1	0	0	1	0	0
114	1	0	0	0	0	1	0	0
115	1	0	0	0	0	1	1	0
116	1	0	0	0	0	1	1	0
117	1	0	0	0	0	1	1	1
118	1	0	0	0	0	1	1	0
119	1	0	0	0	0	1	0	1
p	1	0,25	0,08	0,04	0	0,92	0,4	0,37

Tab.8: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von *β-aktin*, *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* sowie *prdx2* der *in vivo* Blastozysten (mit 1=positive mRNA-Expression, 0=keine detektierbare mRNA-Expression und p für die relative Häufigkeit).

7.3 Ergebnisse der *in vitro* in COOK® kultivierten Embryonen

COOK®	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
121	1	0	0	1	0	1	1	1
122	1	1	1	1	0	1	1	1
123	1	1	0	0	0	1	1	1
124	1	1	0	0	0	1	1	1
125	1	1	0	0	0	1	1	1
126	1	0	0	0	0	1	1	1
127	1	1	0	0	0	1	1	1
128	1	1	0	0	0	1	1	1
129	1	1	0	0	0	1	1	1
130	1	1	1	0	0	1	1	1
131	1	1	0	0	0	1	1	1
132	1	1	0	0	0	1	1	1
133	1	1	0	0	0	1	1	1
134	1	0	0	0	0	1	1	1
135	1	1	0	0	0	1	1	1
136	1	1	0	0	0	1	1	1
137	1	1	0	0	0	1	1	1
138	1	1	0	0	0	1	1	1
139	1	0	0	0	0	1	1	1
140	1	1	0	0	0	1	1	1
141	1	1	0	0	0	1	1	1

COOK®	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
142	1	1	0	0	0	1	1	1
143	1	0	0	1	0	1	1	1
144	0							
145	1	1	0	1	0	1	1	1
146	1	1	0	0	0	1	1	1
147	1	1	0	0	0	1	1	1
148	1	1	0	0	0	1	1	1
149	1	0	0	0	0	1	1	1
150	1	0	0	0	0	1	1	1
151	1	0	0	1	0	1	1	1
152	1	0	0	0	0	1	1	1
153	1	0	0	0	0	1	1	1
154	1	0	0	0	0	1	1	1
155	1	1	0	0	0	1	1	1
156	1	0	0	0	0	1	1	1
157	0							
158	1	1	0	0	0	1	1	1
159	1	0	0	1	0	1	1	1
160	1	1	0	1	0	1	1	1
161	1	1	0	0	0	1	1	1
162	1	1	0	0	0	1	1	1
163	1	1	1	0	0	1	0	1
164	1	1	1	0	0	1	1	1
165	1	1	0	0	0	1	1	1
166	1	1	0	0	0	1	1	1
167	1	0	0	0	0	1	1	1
168	1	0	0	0	0	1	0	1
169	1	1	0	0	0	1	1	1
170	1	1	0	0	0	1	0	1
171	1	1	0	0	0	1	1	1
172	1	1	0	1	0	1	1	1
173	1	1	0	0	0	1	1	1
174	1	1	0	0	0	1	0	1
175	1	1	1	0	0	1	0	1
176	1	1	0	0	0	1	0	1
177	1	0	0	0	0	1	1	1
178	1	1	0	0	0	1	1	1
179	1	1	0	0	0	1	1	1
180	1	1	0	1	0	1	1	1
181	1	1	0	0	0	1	1	1
182	1	1	0	0	0	1	1	1
183	1	1	0	0	0	1	0	1
184	1	1	0	0	0	1	0	1
185	1	1	0	0	0	1	1	1
186	1	0	0	0	0	1	1	1
187	1	1	0	0	0	1	1	1

COOK®	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
188	1	1	0	0	0	1	0	1
189	1	1	0	0	0	1	1	1
190	1	0	1	1	0	1	1	1
191	1	1	1	0	0	1	1	1
192	1	1	1	0	0	1	1	1
193	1	0	1	0	1	1	1	1
194	1	1	0	0	0	1	1	1
195	1	1	0	0	0	1	1	1
196	1	1	0	0	1	1	1	1
197	1	1	0	0	0	1	0	1
198	1	1	0	0	0	1	1	1
199	1	1	0	0	0	1	1	1
200	1	1	1	0	0	1	1	1
201	1	1	0	0	0	1	1	1
202	1	1	0	0	0	1	1	0
203	1	0	0	0	0	1	0	1
204	1	1	1	0	0	1	0	1
205	1	1	0	0	0	1	1	1
206	1	1	0	0	0	1	1	1
207	1	1	0	0	0	1	1	1
208	1	1	0	0	0	1	1	1
209	1	1	0	0	0	1	1	1
210	1	1	0	0	0	1	1	1
211	1	1	0	0	0	1	1	1
212	1	1	1	0	0	1	1	1
213	1	1	0	0	0	1	1	1
214	1	1	0	0	0	1	0	1
p	1	0,78	0,13	0,11	0,02	1	0,86	0,99

Tab.9: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von *β-aktin*, *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* sowie *prdx2* der *in vitro* COOK® Blastozysten (mit 1=positive mRNA-Expression, 0=keine detektierbare mRNA-Expression und p für die relative Häufigkeit).

7.4 Ergebnisse der *in vitro* in Vitrolife™ kultivierten Embryonen

Vitrolife™	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
215	1	1	0	0	0	1	1	1
216	1	1	0	1	0	1	1	1
217	1	1	0	0	0	1	1	1
218	1	0	0	1	0	1	1	1
219	1	1	1	0	0	1	0	1
220	1	1	0	0	0	1	1	1
221	1	0	0	1	0	1	1	1
222	1	1	0	0	0	1	1	1
223	1	1	0	0	0	1	1	1

Vitrolife™	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
224	1	1	0	0	0	1	1	1
225	1	1	0	1	0	1	1	1
226	1	0	0	0	0	1	1	1
227	1	0	1	0	0	1	0	1
228	1	0	0	0	0	1	1	1
229	1	0	0	0	0	1	1	1
230	1	0	0	1	0	1	0	1
231	1	1	0	0	0	1	1	1
232	1	1	0	0	0	1	1	1
233	1	0	1	0	0	1	1	1
234	1	1	1	0	0	1	1	1
235	1	0	0	0	0	1	1	1
236	1	1	0	0	0	1	1	1
237	1	0	0	0	0	1	1	1
238	1	1	0	0	0	1	1	1
239	1	1	0	1	0	1	1	1
240	1	1	0	1	0	1	1	1
241	1	1	0	1	0	1	1	1
242	1	0	0	0	0	1	1	1
243	1	0	1	0	0	1	1	1
244	1	1	0	1	0	0	1	1
245	1	0	0	0	0	1	1	1
246	1	0	0	1	0	1	1	1
247	1	0	0	0	0	1	1	1
248	1	1	0	0	0	1	1	1
249	1	1	0	1	0	1	1	1
250	1	0	1	0	0	1	1	1
251	1	0	0	1	0	1	1	1
252	1	0	0	0	0	1	1	0
253	1	0	1	0	0	1	1	1
254	1	0	0	1	0	1	1	1
255	1	0	0	1	0	1	1	1
256	1	1	0	0	0	1	1	1
257	1	1	1	1	0	1	1	1
258	1	1	0	0	0	1	1	1
259	1	0	0	1	0	1	1	1
260	1	0	1	1	0	1	1	1
261	1	0	0	0	0	1	1	1
262	1	0	1	0	0	1	1	0
263	1	1	0	0	0	1	1	1
264	1	0	1	1	0	1	1	1
265	1	0	0	1	0	1	1	1
266	1	0	0	1	0	1	0	1
267	1	0	0	0	0	1	1	1
268	1	1	0	0	0	1	1	1
269	1	1	1	0	0	1	1	1

Vitrolife™	<i>β-Aktin</i>	<i>il-6</i>	<i>shh</i>	<i>ihh</i>	<i>nox</i>	<i>gpx4</i>	<i>gpx1</i>	<i>prdx2</i>
270	1	0	0	0	0	1	1	1
271	1	0	0	0	1	1	1	1
272	1	1	1	0	0	1	1	1
273	1	1	1	0	0	1	1	1
274	1	1	0	0	0	1	1	1
275	1	1	1	1	0	1	1	1
276	1	0	0	1	0	1	1	1
277	1	1	0	0	0	1	1	1
278	1	1	0	0	0	1	1	1
279	1	1	0	0	0	1	1	1
280	1	0	0	0	0	1	1	1
281	1	1	0	1	0	1	1	1
282	1	1	0	1	0	1	1	1
283	1	0	1	1	0	1	1	1
284	1	1	0	0	0	1	1	1
285	1	1	0	0	0	1	1	1
286	1	1	0	0	0	1	1	1
287	1	1	0	1	0	1	0	1
288	1	0	0	0	0	1	0	1
289	1	1	0	0	0	1	1	1
290	1	1	0	0	0	1	1	1
291	1	1	1	0	0	1	1	1
292	1	1	0	0	0	1	1	1
p	1	0,55	0,22	0,33	0,01	0,99	0,92	0,97

Tab.10: Darstellung aller Ergebnisse der mRNA-Expression von *β-aktin*, *il-6*, *shh*, *ihh*, *nox*, *gpx4*, *gpx1* sowie *prdx2* der *in vitro* Vitrolife™ Blastozysten (mit 1=positive mRNA-Expression, 0=keine detektierbare mRNA-Expression und p für die relative Häufigkeit).

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist

Düsseldorf, den 30.03.2015,

Nadine Pfeifer

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jan-Steffen Krüssel, Koordinator des Universitären Kinderwunschzentrums Düsseldorf (UniKiD) der Frauenklinik. Sowohl seine fachliche Kompetenz als auch seine stetige Ermutigung und Unterstützung schätze ich sehr und stellen eine gute Grundlage, die vorliegende Arbeit fertigzustellen.

Frau PD Dr. Alexandra Hess danke ich für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe des Endokrिनologischen Labors der Frauenklinik. Ihre Aufgeschlossenheit und ihr Enthusiasmus gegenüber der aktuellen Forschung haben mich stets motiviert.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Jens Hirchenhain, Leiter des reproduktionsmedizinischen Labors der Frauenklinik, für seine Unterstützung meiner Experimente danken.

Ein besonders herzliches Dankeschön gebührt Frau Dr. rer. nat. Dunja Baston-Büst für die kompetente Betreuung meiner Arbeit sowie die aufgebraachte Geduld und Hilfsbereitschaft. Ihre ausdauernde Ansprechbarkeit, ihre zahlreichen kritischen Anregungen und Diskussionen haben massgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Mein grösstes Merci geht an meinen Freund Thomas für seine Loyalität, seine bedingungslose Unterstützung und seine Liebe der letzten 10 Jahre.