

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des  
Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie, Dummerstorf

**Phosphorylierungsstatus und Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin in bovinen  
Embryonen um den Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Heidi Leitner  
Tierärztin  
aus Gunzenhausen

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3532

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Dritter Gutachter: PD Dr. Joachim Weitzel

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

embryonic development, preimplantation period, Bovidae, transactivation,  
gene expression, in vitro production

Tag der Promotion: 19.01.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-117-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*„Imagination is more important than knowledge.  
For knowledge is limited to all we now know and understand,  
while imagination embraces the entire world,  
and all there ever will be to know and understand.“*

(Albert Einstein)



**Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis.....IV

Abkürzungsverzeichnis.....VII

1 Einleitung.....1

2 Literatur.....3

    2.1 Präimplantatorische Embryonalentwicklung.....3

        2.1.1 Überblick/Ablauf.....3

        2.1.2 Erste Differenzierungsereignisse.....4

        2.1.3 Zellkontakte und Zellkommunikation.....5

        2.1.4 Genexpression während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung .....6

    2.2 Aktivierung des embryonalen Genoms.....7

        2.2.1 Definition und Bedeutung .....7

        2.2.2 Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms.....8

        2.2.3 Charakteristika der embryonalen Genomaktivierung .....8

        2.2.4 Regulation der Aktivierung des embryonalen Genoms.....11

    2.3  $\beta$ -Catenin .....14

        2.3.1 Die Familie der Catenine.....14

        2.3.2 Struktur von  $\beta$ -Catenin.....14

        2.3.3 Funktionen und Verteilung von  $\beta$ -Catenin.....15

            2.3.3.1 Überblick.....15

            2.3.3.2 Zelladhäsion.....16

            2.3.3.3 Signaltransduktion.....19

            2.3.3.4 Genexpression.....21

            2.3.3.5 Subzelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin .....23

            2.3.3.6 Wechselwirkungen zwischen Signaltransduktion/Genexpression und Zelladhäsion.....24

        2.3.4  $\beta$ -Catenin während der Embryonalentwicklung.....26

3 Material und Methoden.....28

    3.1 Versuchsaufbau und Untersuchungsmaterial.....28

    3.2 In-vitro-Produktion boviner Embryonen.....31

        3.2.1 Spendertiere.....31

        3.2.2 Entnahme der Ovarien.....31

        3.2.3 Gewinnung und Aufsuchen der Cumulus-Oozyten-Komplexe .....31

        3.2.4 Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe.....32

        3.2.5 In-vitro-Maturation.....32

        3.2.6 In-vitro-Fertilisation.....33

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.6.1	Aufbereitung der Spermien/Swim-up-Verfahren.....	33
3.2.6.2	Befruchtung.....	33
3.2.7	In-vitro-Kultivierung.....	34
3.3	Versuchsabschnitt 1 bis 4: Behandlung und Entnahme der Embryonen sowie weitere Auswertungen.....	35
3.3.1	Zugabe des GSK3-Inhibitors .....	35
3.3.2	Entnahmezeitpunkt der einzelnen Entwicklungsstadien.....	35
3.3.3	Elektrophorese und Westernblot.....	37
3.3.4	Immunhistochemische Färbung und Auswertung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie.....	38
3.4	Versuchsabschnitt 5: Live Cell Imaging und FRAP-Analysen von YFP-Catenin.....	39
3.4.1	Transformation und Präparation der Plasmid-DNA.....	40
3.4.2	Mikroinjektion.....	41
3.4.3	Konfokale Bildaufnahme und FRAP-Analysen.....	41
3.5	Statistische Auswertung.....	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	In-vitro-Produktion der Embryonen.....	43
4.2	Entnahme der Embryonen und Einteilung der Entwicklungsstadien.....	43
4.3	Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. .	44
4.3.1	Proteinlevels im Westernblot.....	44
4.3.2	Mittlere Fluoreszenzintensität im LSM.....	46
4.4	Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	47
4.5	Einfluss des GSK3-Inhibitors auf die Entwicklungskompetenz der Embryonen.....	53
4.6	Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration.....	54
4.6.1	Proteinlevels im Westernblot.....	54
4.6.2	Mittlere Fluoreszenzintensität im LSM.....	58
4.7	Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration.....	60
4.8	Translokationsprozesse von $\beta$ -Catenin .....	71
5	Diskussion.....	74
5.1	Embryonenerzeugung.....	74
5.2	Proteinlevel und Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin im bovinen Präimplantationsembryo.....	75
5.3	Bindungsepitope der eingesetzten Antikörper und Varianten von $\beta$ -Catenin.....	77
5.4	Lokalisation und Funktionen von $\beta$ -Catenin im bovinen Präimplantationsembryo.....	79

---

5.4.1 $\beta$ -Catenin in Zellmembran und Zytoplasma.....	79
5.4.2 $\beta$ -Catenin im Zellkern.....	82
5.5 Perinukleäre Verdichtung und Translokationsprozesse von $\beta$ -Catenin .....	86
5.6 Effekte eines GSK3-Inhibitors.....	88
5.6.1 Zytotoxizität des GSK3-Inhibitors.....	89
5.6.2 Einfluss des GSK3-Inhibitors auf Proteinlevel und Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin .....	89
6 Zusammenfassung.....	93
7 Summary.....	95
8 Anhang.....	97
8.1 Medien für die In-vitro-Produktion.....	97
8.2 Medien zum Waschen entnommener Embryonen.....	102
8.3 Medien für Gelelektrophorese und Westernblot.....	103
8.4 Medien für die Immunhistochemie.....	106
9 Literaturverzeichnis.....	108
10 Danksagung.....	134
11 Selbständigkeitserklärung.....	136

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Transkriptionsverläufe um den Zeitpunkt der maternal-embryonic transition (MET) beim Rind.....	9
Abb. 2:	Klassisches Modell der Cadherin-Catenin-Aktin-Achse.....	17
Abb. 3:	Modelle zur dynamischen Interaktion zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und Aktin.....	17
Abb. 4:	Übersicht über den Wnt-Signalweg.....	21
Abb. 5:	Nukleäre TCF- $\beta$ -Catenin-Koaktivorkomplexe.....	22
Abb. 6:	Versuchsplan.....	30
Abb. 7:	Inhibitorzugabe und Embryonenentnahme in Versuchsabschnitt 3 und 4.....	36
Abb. 8:	Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK2 .....	45
Abb. 9:	Westernblot: Abundanz von GBC in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	45
Abb. 10:	Westernblot: Abundanz von N-PBC1 in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	46
Abb. 11:	Westernblot: Abundanz von NIP in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	46
Abb. 12:	LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von GBC im Gesamtembryo in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	47
Abb. 13:	LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von SHEP im Gesamtembryo in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	47
Abb. 14:	LSM: Fluoreszenzverteilung von GBC im Entwicklungsverlauf.....	48
Abb. 15:	LSM: Fluoreszenzintensität von GBC in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium.....	49
Abb. 16:	LSM: Häufigkeit des Auftretens einer Corona im perinukleären Bereich des Zytoplasmas bei GBC in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	50
Abb. 17:	LSM: Fluoreszenzverteilung von SHEP im Entwicklungsverlauf.....	51
Abb. 18:	LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium.....	52
Abb. 19:	LSM: Häufigkeit des Auftretens von zonaler Verteilung im Zellkern und von nuclear bodies bei SHEP in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	53
Abb. 20:	Entwicklungsrate in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration.....	54
Abb. 21:	Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK3 unter Inhibitoreinfluss.....	55
Abb. 22:	Westernblot: Abundanz von GBC in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration.....	55
Abb. 23:	Westernblot: Bandenmuster von AK2 unter Inhibitoreinfluss.....	56

Abb. 24:	Westernblot: Abundanz von N-PBC1 in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	56
Abb. 25:	Westernblot: Abundanz von NIP in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	57
Abb. 26:	Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK4 unter InhibitorEinfluss.....	57
Abb. 27:	Westernblot: Abundanz von C-PBC in Bezug auf Tubulin in Gruppe 0 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	58
Abb. 28:	LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von GBC im Gesamtembryo in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	59
Abb. 29:	LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von SHEP im Gesamtembryo in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	59
Abb. 30:	LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von C-PBC im Gesamtembryo in Gruppe 0 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	60
Abb. 31:	LSM: Fluoreszenzintensität von GBC in Gruppe 500 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium.....	62
Abb. 32:	LSM: Fluoreszenzintensität von GBC in der Zellmembran in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	63
Abb. 33:	LSM: Fluoreszenzintensität von GBC im Zytoplasma in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	63
Abb. 34:	LSM: Fluoreszenzintensität von GBC im Zellkern in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	63
Abb. 35:	LSM: Häufigkeit des Auftretens einer Corona im perinukleären Bereich des Zytoplasmas bei GBC in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	64
Abb. 36:	LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP in Gruppe 500 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium.....	65
Abb. 37:	LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP in der Zellmembran in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	66
Abb. 38:	LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP im Zytoplasma in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	66
Abb. 39:	LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP im Zellkern in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.....	67
Abb. 40:	LSM: Häufigkeit des Auftretens einer zonalen Verteilung von SHEP im Zellkern in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration...	68
Abb. 41:	LSM: Häufigkeit des Auftretens von nuclear bodies bei SHEP in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration.....	68

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 42: LSM: Fluoreszenzverteilung von C-PBC (spätes 8-Zellstadium).....	69
Abb. 43: LSM: Fluoreszenzintensität von C-PBC in Gruppe 0 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium.....	70
Abb. 44: LSM: Häufigkeit des Auftretens von zonaler Verteilung im Zellkern und nuclear bodies bei C-PBC in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.....	71
Abb. 45: FRAP-Analyse gesamter Embryo.....	72
Abb. 46: FRAP-Analyse Zellkern.....	73

**Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	adenomatous polyposis coli
arm	armadillo
Arp	Actin-related protein
BCL9	B-cell CLL/lymphoma 9
BIO	(2'Z, 3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime (GSK3-Inhibitor)
BRG1	brahma-related gene 1
BSA	bovines Serumalbumin
C-PBC	an Ser552 phosphoryliertes $\beta$ -Catenin
CBP	CREB-binding protein
CKI	Casein Kinase I
CKII	Casein Kinase II
COK	Cumulus-Oozyten-Komplex(e)
CtBP	C-terminales Bindeprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dvl	Dishevelled
ECL	enhanced chemiluminescence
ECS	estrus cow serum
ER	endoplasmatisches Retikulum
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FSH	follikelstimulierendes Hormon
Fz	Frizzled
f 8	frühes 8-Zellstadium
GBC	Gesamt- $\beta$ -Catenin
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
HDAC	Histondeacetylase
HMG	high mobility group
hpi	hours post inseminationem
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IVP	In-vitro-Produktion
LB	lysogeny broth
LEF	lymphoid enhancer-binding factor

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
LSM	Laserscanningmikroskop
MET	maternal-embryonic transition
MGA	mid-preimplantation gene activation
mD-PBS	modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (zur COK-Gewinnung)
mPBS	modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung (Waschpuffer für Immunhistochemie)
mRNA	messenger RNA
N-PBC	an Ser33/Ser37/Thr41 phosphoryliertes $\beta$ -Catenin
NIP	nicht identifiziertes Protein
OPU	Ovum Pick Up
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RBP	RNA-binding protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SHEP	Summe homologer Epitope aufweisender Phosphoproteine, Summe aus N-PBC1, N-PBC2 und NIP
SOF	synthetic oviduct fluid (Kultivierungsmedium)
s 8	spätes 8-Zellstadium
TBP	TATA-binding protein
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween (Waschpuffer für Westernblot)
TCF	T-cell factor
TCM 199	tissue culture medium (Maturationsmedium)
TLE	transducin-like enhancer of split
YFP	yellow fluorescent protein
ZO-1	zonula occludens-1
$\beta$ -Trecp	$\beta$ -transducin repeat-containing protein

## **1 Einleitung**

Seit der Geburt des ersten in vitro erzeugten Kalbes am 9.6.1981 (BRACKETT et al. 1982) wurde die Technologie der In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen stetig weiterentwickelt und verbessert, so dass sie heute als etablierter Bestandteil der praktischen Rinderzucht betrachtet werden kann. Durch Eizellgewinnung vom lebenden Tier mittels Ovum Pick Up (OPU) bzw. Eizellgewinnung von Schlachtkühen und anschließender IVP ist es möglich, den weiblichen Gametenpool verstärkt zu nutzen. OPU kann alternativ zu herkömmlichen Superovulationstechniken und anschließender Embryonenspülung verwendet werden (WRENZYCKI 2007), die Eizellgewinnung von Schlachtkühen stellt die letzte Gelegenheit dar, Nachkommen genetisch hochwertiger Tiere zu erzeugen.

Neben seiner Praxisrelevanz hat die IVP auch Bedeutung für die Grundlagenforschung oder für den Einsatz weiterer Biotechniken wie beispielsweise dem somatischen Kerntransfer (WRENZYCKI 2007).

Wegen ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist diese Technik bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Doch obwohl in den letzten Jahren enorme Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt wurden, sind die Erfolgsraten der IVP noch weit vom Ideal entfernt (BETTEGOWDA et al. 2008). Trotz intensiver Bemühungen kommt es bei in vitro produzierten Embryonen nach wie vor häufig zu einer Entwicklungsarretierung noch vor Erreichen des Blastozystenstadiums, so dass die erzielten Blastozystenraten, von einigen Ausnahmen abgesehen, in der Regel 30-40% nicht überschreiten (ALM et al. 1998; BONI et al. 1999; RIZOS et al. 2002; BHOJWANI et al. 2005). Nur in seltenen Fällen wird von einer Ausbeute transfertauglicher Blastozysten von über 50% berichtet (HOLM et al. 1999, 2002).

Bei bovinen Embryonen aus IVP findet besagte Entwicklungsarretierung im 8- bis 16-Zellstadium statt und steht somit in enger zeitlicher Assoziation mit der Aktivierung des embryonalen Genoms und dem Einsetzen erster Differenzierungsprozesse. Diese ersten Differenzierungsprozesse werden wiederum durch die Ausbildung interzellulärer Kontakte eingeleitet, wodurch eine funktionierende interzelluläre Kommunikation gewährleistet wird. Die genauen Ursachen für die embryonale Entwicklungsarretierung sind noch nicht vollständig geklärt (BETTEGOWDA et al. 2008). Es wäre möglich, dass ein kausaler Zusammenhang mit einer gestörten embryonalen Genomaktivierung einerseits (BETTEGOWDA et al. 2008) und einer eventuell damit zusammenhängenden gestörten interzellulären Kommunikation und daraus resultierenden mangelnden Differenzierungsfähigkeit dieser Embryonen andererseits (BHOJWANI et al. 2007) besteht.

In vorausgehenden Studien fand man Hinweise darauf, dass Anomalien im Zytoskelett, insbesondere eine Störung des Aktin-Catenin-Cadherin-Systems, zu einer reduzierten Differenzierungsfähigkeit und Entwicklungskompetenz von Embryonen führen können (POEHLAND et al. 2008). Darüber hinaus ist es denkbar, dass das multifunktionelle Protein  $\beta$ -Catenin auch im Zellkern eine für die Entwicklungsfähigkeit von Embryonen relevante Funktion übernehmen und somit eventuell eine Rolle bei der Aktivierung des embryonalen Genoms spielen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten von  $\beta$ -Catenin während der frühen präimplantatorischen Embryonalentwicklung, insbesondere während des kritischen 8-Zellstadiums, näher zu analysieren, um gegebenenfalls Hinweise auf eine mögliche Funktion von  $\beta$ -Catenin während dieser Entwicklungsphase zu erhalten. Im ersten Versuchsabschnitt wurde untersucht, ob es während der frühen Embryonalentwicklung zu nachweisbaren Veränderungen im Phosphorylierungsstatus und somit in der Aktivität von  $\beta$ -Catenin kommt und falls ja, wann genau diese Veränderungen auftreten. Der zweite Versuchsabschnitt beinhaltete eine Betrachtung des Verteilungsmusters von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. In zwei weiteren Experimenten wurde analysiert, wie sich der Einsatz eines Inhibitors der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) in unterschiedlichen Konzentrationen auf den Phosphorylierungsstatus und das Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin auswirkt und schließlich sollten mittels YFP (yellow fluorescent protein)-markiertem  $\beta$ -Catenin und FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)-Analysen etwaige Translokationsprozesse von  $\beta$ -Catenin dargestellt werden.

Auf diese Weise sollte das Wissen bezüglich der grundlegenden Mechanismen, die während der ersten Differenzierungsprozesse, der embryonalen Genomaktivierung und der Entwicklungsarretierung im 8- bis 16-Zellstadium eine Rolle spielen könnten, verbessert werden.

Langfristig könnte durch eine Erweiterung dieses Wissens die Möglichkeit für eine weitere Verbesserung der Technik der In-vitro-Produktion boviner Embryonen geschaffen werden.

## **2 Literatur**

### **2.1 Präimplantatorische Embryonalentwicklung**

#### **2.1.1 Überblick/Ablauf**

Die erste Phase der Embryogenese von Säugetieren wird als präimplantatorische Embryonalentwicklung bezeichnet (WATSON und BARCROFT 2001). Sie reicht von der Fertilisation bzw. dem daraus resultierenden Zygotenstadium bis zur Implantation (AGOSTONI 1993; BELL et al. 2008).

Unmittelbar nach der Verschmelzung der beiden Vorkerne und der daraus resultierenden Entstehung der diploiden Zygote kommt es zu einer Reihe von mitotischen Zellteilungen, den Furchungsteilungen (MICHEL 1995; WATSON und BARCROFT 2001). Dabei wird das Zytoplasma der Eizelle auf die neu entstehenden Blastomeren aufgeteilt, so dass diese im Verlauf der Furchung mit jedem Teilungsschritt kleiner werden, während der Gesamtembryo seine Größe beibehält (LEHTONEN 1980; RÜSSE und SINOWATZ 1998; WATSON und BARCROFT 2001). Die komplette Phase der Furchung vollzieht sich innerhalb der Zona pellucida (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Die Anfangsphase ist geprägt von symmetrischen Zellteilungen, aus einer Blastomere entstehen somit jeweils zwei morphologisch identische Tochterzellen (GUETH-HALLONET und MARO 1992). Die einzelnen Blastomeren eines Embryos teilen sich hierbei allerdings nicht exakt zum gleichen Zeitpunkt, sondern sie weisen ein asynchrones Teilungsverhalten auf (LEHTONEN 1980), so dass neben den klassischen Entwicklungsstadien des 2-, 4-, 8- oder 16-Zellembryos auch Zwischenstadien wie beispielsweise 3-, 6- oder 12-Zellembryonen zu finden sind.

Ist eine gewisse, tierartlich unterschiedliche Anzahl von Furchungsteilungen abgeschlossen, kommt es zum ersten morphogenetischen Ereignis der präimplantatorischen Embryonalentwicklung, der Kompaktierung des Embryos. Weitläufig versteht man hierunter die Kompaktierung während der Morulabildung, die bei der Maus im 8-Zellstadium, beim Rind hingegen erst im 32- bis 64-Zellstadium stattfindet (WATSON 1992; WATSON und BARCROFT 2001; BELL et al. 2008). Zu diesem Zeitpunkt wird der Kontakt zwischen den einzelnen Blastomeren maximiert, wodurch die ursprünglichen Zellgrenzen nicht mehr eindeutig abgegrenzt werden können und der Embryo schließlich wie eine uniforme Masse erscheint, die als Morula bezeichnet wird (GUETH-HALLONET und MARO 1992; WATSON und BARCROFT 2001; JOHNSON und MCCONNEL L 2004). Allerdings ist die Kompaktie-

rung des Präimplantationsembryos nicht allein auf das Morulastadium beschränkt, sie läuft vielmehr in mehreren Phasen ab. Beim Rind findet man eine erste Phase der Kompaktierung bereits im 8-Zellstadium.

In enger zeitlicher Assoziation mit der Kompaktierung steht die Polarisierung der Blastomeren (JOHNSON und MCCONNEL L 2004). Sie betrifft sowohl die Zellmembranen, deren apikale und basolaterale Domänen sich nun bezüglich ihrer Oberflächeneigenschaften unterscheiden, als auch die Organisation des Zytoskeletts und damit die Verteilung der Zellorganellen (FLEMING et al. 2001; WATSON und BARCROFT 2001). Im Anschluss an die Polarisierung kommt es erstmals zu asymmetrischen Zellteilungen, was zur Entstehung von zwei verschiedenen Zellpopulationen führt: einer äußeren Schicht von polarisierten Zellen, die später überwiegend an der Bildung des Trophektooderms beteiligt sind, und einer inneren Masse von apolaren Zellen, die den Embryoblasten bilden (GUETH-HALLONET und MARO 1992).

Das nächste morphogenetische Ereignis ist die Blastozystenbildung (WATSON 1992; WATSON und BARCROFT 2001). Mit Hilfe von Ionentransportsystemen wie beispielsweise der Natrium-Kalium-ATPase werden Ionen entgegen ihres Konzentrationsgradienten über das Trophektooderm in das Innere der Morula transportiert, osmotisch bedingt strömt Wasser nach (PRATHER und FIRST 1988; WATSON und BARCROFT 2001). Dadurch werden die Interzellularräume vergrößert und vereinigen sich schließlich, so dass ein zusammenhängender Hohlraum, das Blastozoen, entsteht (MICHEL 1995; RÜSSE und SINOWATZ 1998). Durch weitere Flüssigkeitsaufnahme kommt es zur Expansion der Blastozyste und schließlich zu ihrem Schlüpfen aus der Zona pellucida. Die geschlüpfte Blastozyste nistet sich im Endometrium ein und beginnt mit der Gastrulation (RÜSSE und SINOWATZ 1998).

### **2.1.2 Erste Differenzierungsereignisse**

Während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung kommt es zu einer Reihe von kritischen Ereignissen, deren korrekter Ablauf Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation ist. In diesem Zusammenhang sind neben der embryonalen Genomaktivierung, auf die in Kapitel 2.2 näher eingegangen wird, vor allem erste Differenzierungsvorgänge im Embryo zu nennen (WATSON und BARCROFT 2001; SAGIRKAYA et al. 2006; BELL et al. 2008).

Der genaue Beginn der Zelldifferenzierung lässt sich nicht eindeutig definieren. Bereits während der ersten Furchungsteilungen deutet sich eine gewisse, zellkontaktinduzierte Spezifikation der Blastomeren an, die jedoch noch vollständig reversibel ist (GRAHAM und DEUSSEN 1978; FUJIMORI et al. 2003; YAMANAKA et al. 2006). Mit der Kompaktierung der Morula bzw. der damit assoziierten Polarisierung der Blastomeren beginnt dann der erste

morphologisch offensichtliche Differenzierungsschritt, der in der Entstehung von zwei unterschiedliche Zelltypen, den Vorläufern von Trophektoderm und Embryoblast, resultiert (GUETH-HALLONET und MARO 1992; WATSON und BARCROFT 2001; MORGAN et al. 2005; BELL et al. 2008). Doch trotz der nun deutlichen phänotypischen Unterschiede sind diese Differenzierungsprozesse nach wie vor nicht irreversibel fixiert, so dass dem Embryo eine gewisse Flexibilität erhalten bleibt, die es ihm ermöglicht, auf etwaige Störungen zu reagieren. Erst im Verlauf oder spätestens nach der Blastozystenexpansion erlischt diese Adaptationsfähigkeit und die Blastomeren verlieren ihre Totipotenz (HANDYSIDE 1978; CHISHOLM et al. 1985; GUETH-HALLONET und MARO 1992; AGOSTONI 1993; JOHNSON und MCCONNELL 2004).

### **2.1.3 Zellkontakte und Zellkommunikation**

Zellkontakte und die damit verbundene Zellkommunikation spielen während der gesamten präimplantatorischen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle und sind insbesondere für die Zelldifferenzierung von großer Bedeutung (LEHTONEN 1980; JOHNSON und MCCONNELL 2004). Dies deutet sich bereits bei den frühesten Furchungsstadien an. Obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine ausgereiften Zellverbindungen bestehen, sondern die Blastomeren lediglich locker miteinander verbunden sind (LEHTONEN 1980; CAVENEY 1985), reichen diese interzellulären Kontakte aus, um die Entwicklungsrichtung der Blastomeren bereits in gewisser Weise vorherzubestimmen. So wurde nachgewiesen, dass diejenigen Blastomeren, die sich früher teilen und deren Tochterzellen dadurch mehr Kontaktflächen zu ihren Nachbarzellen aufweisen, vermehrt Zellen zum Embryoblasten beisteuern (GRAHAM und DEUSSEN, 1978; SURANI und BARTON 1984; JOHNSON und MCCONNELL 2004).

Im weiteren Verlauf der präimplantatorischen Embryonalentwicklung wird die Bedeutung von Zellverbindungen immer offensichtlicher. Beim Rind zeigt sich dies erstmals im 8-Zellstadium, dem Zeitpunkt der ersten Kompaktierung. Liegt hier eine mangelhafte Ausbildung interzellulärer Kontaktzonen und somit eine Beeinträchtigung der interzellulären Kommunikation vor, kann sich dies negativ auf die Weiterentwicklung der betroffenen Embryonen auswirken (BHOJWANI et al. 2007).

Auch bei der Maus hat das 8-Zellstadium, das bei dieser Spezies jedoch im Gegensatz zum Rind bereits dem frühen Morulastadium entspricht, in diesem Zusammenhang große Bedeutung. Hier kommt es erstmals zur Aktivierung der E-Cadherin medierte Zelladhäsion und somit zur Ausbildung von Adhaerens junctions, was in engem Zusammenhang mit der nach-

folgenden Kompaktierung und Polarisierung und somit mit der ersten phänotypisch offensichtlichen Differenzierung steht (JOHNSON et al. 1988; FLEMING et al. 2001; YAMANAKA et al. 2006).

Das weitere Verhalten von polaren und apolaren Zellen wird ebenfalls durch interzelluläre Kontakte beeinflusst. Sind rund um die Blastomere interzelluläre Kontakte vorhanden, wie dies bei den apolaren inneren Zellen der Morula der Fall ist, wird bei der Teilung ein apolarer Phänotyp aufrecht erhalten (JOHNSON und ZIOMEK 1981; GUETH-HALLONET und MARO 1992). Polare Zellen können sich, je nach Lage und Form, symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Liegt ein relativ großer Anteil der polaren Zelle an der Oberfläche des Embryos, existieren also wenige interzelluläre Kontaktflächen, entstehen bevorzugt zwei polare Tochterzellen; ist der polare Pol der Blastomere kleiner, entstehen bevorzugt eine polare und eine apolare Tochterzelle (GUETH-HALLONET und MARO 1992; BELL et al. 2008).

Vermittelt durch die vorangegangene Bildung von Adhaerens junctions entstehen im Verlauf der weiteren Entwicklung schließlich Tight junctions. Diese liegen direkt apikal der Adhaerens junctions und sind durch die Regulation des parazellulären Flüssigkeitstransports essentiell für die Expansion der Blastozyste (FLEMING et al. 2000; WATSON und BARCROFT 2001).

Die Rolle von Gap junctions während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung wird kontrovers diskutiert. Ursprünglich wurde ihnen eine relativ große Bedeutung beigemessen, was durch neuere Studien aber inzwischen teilweise in Frage gestellt wird (CAVENEY 1985; FLEMING et al. 2000; KIDDER und WINTERHAGER 2001).

### **2.1.4 Genexpression während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung**

Für die frühe Embryogenese sind sowohl maternale als auch embryonale Genprodukte essentiell (TESARIK 1989; KIDDER 1992; WRENZYCKI 2007). Während die maternalen Transkripte und Proteine im Laufe der präimplantatorischen Embryonalentwicklung weitgehend abgebaut werden, steigt der Anteil an embryonalen Genprodukten an (NATALE et al. 2000). Hierbei lassen sich zwei größere Wellen der de-novo-Transkription erkennen, eine zum Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung, auf die in Kapitel 2.2 ausführlich eingegangen wird, und eine Zweite zum Zeitpunkt der MGA (mid-preimplantation gene activation), die mit der Blastozystenbildung assoziiert ist (HAMATANI et al. 2004; BELL et al. 2008). Viele der aktivierten Gene werden relativ schnell wieder downreguliert, so dass das charakteristische Bild einer stadienspezifischen Genexpression entsteht (HAMATANI et al. 2004). Diese stadienspezifischen Veränderungen im Genexpressionsmuster können mit den morphogenetischen Veränderungen, die während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung

auftreten, beispielsweise der Kompaktierung, Kavitation oder Blastozystenexpansion, in kausalem Zusammenhang gebracht werden (SCHULTZ et al. 1999). Jedoch sind häufig Transkription und Translation der benötigten Gene schon lange Zeit vor Eintritt des zugehörigen morphogenetischen Ereignisses abgeschlossen, was darauf schließen lässt, dass für das genaue Timing dieses Ereignisses dann posttranslationale Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle spielen (KIDDER und MCLACHLIN 1985; KIDDER 1992; JOHNSON und MCCONNELL 2004). Die im Rahmen von Polarisierung und anschließender differenzieller Zellteilung entstandenen ersten beiden Zellpopulationen des Präimplantationsembryos unterscheiden sich bezüglich ihres Genexpressionsmusters. Diese transkriptionischen Unterschiede sind jedoch nicht als Ursache, sondern vielmehr als Folge der Zelldifferenzierung zu betrachten und spielen deshalb vermutlich eher bei der Aufrechterhaltung als bei der Entstehung des Differenzierungszustandes eine Rolle (JOHNSON und MCCONNELL 2004; YAMANAKA et al. 2006).

## **2.2 Aktivierung des embryonalen Genoms**

### **2.2.1 Definition und Bedeutung**

Früheste Embryonalstadien sind in ihrer Entwicklung überwiegend von maternalen Genprodukten abhängig, die bereits während der Oogenese gebildet und in der Oozyte gespeichert werden (BARNES und EYESTONE 1990; TELFORD et al. 1990; SCHULTZ 1993; NOTHIAS et al. 1995). Die oozytäre Transkriptionsaktivität ist auf das Eizellwachstum beschränkt und wird noch vor Wiederaufnahme der Meiose eingestellt, so dass sich hier eine bis über die Befruchtung hinausreichende transkriptionisch inaktive Phase anschließt, in der es lediglich zu Translation oder posttranslationalen Modifikationen der gespeicherten maternalen Genprodukte kommt (BACHVAROVA 1985, 1992; FIRST und BARNES 1989; BARNES und EYESTONE 1990; NOTHIAS et al. 1995). Dieser maternale Speicher ist ausreichend, um die Entwicklung des frühen Embryos zumindest so lange zu gewährleisten, bis das embryonale Genom aktiviert wird (SCHULTZ 1993; NOTHIAS et al. 1995). Nun kommt es zu einer deutlichen, aktiven Transkription durch den Embryo, Genprodukte der Eizelle werden durch embryonale Genprodukte ersetzt und die Kontrolle geht vom maternalen auf das embryonale Genom über (MET, maternal-embryonic transition) (TELFORD et al. 1990; WRENZYCKI 2007). Die im weiteren Verlauf der Entwicklung folgenden Ereignisse wie beispielsweise Kompaktierung, Kavitation und Schlüpfen der Blastozyste sind dann überwiegend von der Expression embryonaler Gene abhängig (KIDDER und MCLACHLIN 1985; WATSON und BARCROFT 2001). Die MET wird deshalb häufig auch als Ausgangspunkt der

zellulären Differenzierung der Blastomeren betrachtet (PRATHER und FIRST 1988; POEHLAND et al. 2008). Alles in allem ist sie ein überaus wichtiger Schritt während der frühen Embryogenese und ihr korrekter Ablauf Voraussetzung für eine erfolgreiche Weiterentwicklung (SCHULTZ et al. 1999).

### **2.2.2 Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms**

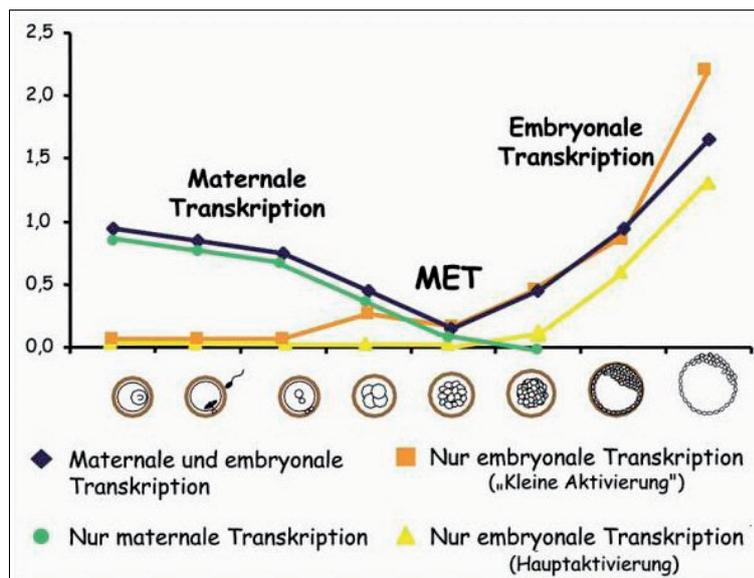
Der Übergang der Kontrolle vom maternalen auf das embryonale Genom erfolgt speziesabhängig in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (TELFORD et al. 1990), so beispielsweise bei der Maus im 2-Zellstadium (FLACH et al. 1982; BOLTON et al. 1984), bei Mensch und Schwein im 4- bis 8-Zellstadium (BRAUDE et al. 1988; TOMANEK et al. 1989), bei Schaf und Rind hingegen erst im 8- bis 16-Zellstadium (CAMOUS et al. 1986; CROSBY et al. 1988; FREI et al. 1989; VIGNEAULT et al. 2009b). Allerdings ist beim Rind bereits in früheren Entwicklungsstadien eine gewisse, wenn auch geringe, embryonale Genomaktivität nachweisbar. Mehrere Studien belegen, dass bovine Embryonen im 4-Zell- (BARNES und FIRST 1991), 2-Zell- (PLANTE et al. 1994; HYTTEL et al. 1996; MEMILI et al. 1998) und sogar schon im Zygotenstadium (MEMILI und FIRST 1999; HAY-SCHMIDT et al. 2001) in gewissem Umfang transkriptorisch und auch translatorisch aktiv sind. Jedoch sind diese frühesten embryonalen Transkripte im Gegensatz zu den im 8- bis 16-Zellstadium entstehenden Genprodukten noch nicht essentiell für die unmittelbar anschließende Weiterentwicklung des Embryos, da hier noch die maternale Kontrolle im Vordergrund steht (PLANTE et al. 1994; MEMILI et al. 1998). Der Beginn der embryonalen Transkription deckt sich also nicht mit dem Zeitpunkt, ab dem die weitere Entwicklung von der embryonalen Transkription abhängig wird (MEMILI und FIRST 2000). Somit kann die embryonale Genomaktivierung als ein eher graduell ablaufendes Ereignis betrachtet werden, das sich in zwei Schritten gliedern lässt – in eine frühe bzw. kleine Aktivierung im 1- bis 4-Zellstadium und eine Hauptaktivierung mit Übergang der Kontrolle vom maternalen auf des embryonale Genom im 8- bis 16-Zellstadium (MEMILI und FIRST 1999; WRENZYCKI 2007).

### **2.2.3 Charakteristika der embryonalen Genomaktivierung**

Die Aktivierung des embryonalen Genoms ist ein sehr komplexes Ereignis, in dessen Verlauf der Embryo eine Reihe von charakteristischen Veränderungen durchläuft.

So kommt es in diesem Zeitraum zu einer drastischen Veränderung des Genexpressionsmusters (ZENG et al. 2004). Während die in den frühesten Embryonalstadien dominierende und nun größtenteils nicht mehr benötigte maternale messenger RNA (mRNA) sukzessive und

selektiv abgebaut wird, steigt, zeitlich verzögert, durch die Aktivierung der embryonalen Transkription der Anteil embryoeigener mRNA stark an (FLACH et al. 1982; FIRST und BARNES 1989; TELFORD et al. 1990; NATALE et al. 2000). Quantitativ betrachtet kommt es also zunächst zu einem Abfall, gefolgt von einem neuerlichen Anstieg des mRNA-Levels, wobei sich der Übergang mit der MET deckt ( NATALE et al. 2000; WRENZYCKI 2007) (Abb.1).



**Abb. 1: Transkriptionsverläufe um den Zeitpunkt der maternal-embryonic transition (MET) beim Rind**

(WRENZYCKI 2007, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. Christine Wrenzycki sowie von Krause & Pachernegg GmbH)

Qualitativ betrachtet zeigen sich folgende Veränderungen: Lediglich ein kleiner Anteil der maternalen Genprodukte bleibt über die MET hinaus erhalten (DE SOUSA et al. 1998a; BELL et al. 2008), der Großteil wird entweder ersatzlos abgebaut oder durch entsprechende embryonale Genprodukte ersetzt (SCHULTZ 2002). Da durch Einsetzen der embryonalen Genomaktivität zusätzlich völlig neue Transkripte erzeugt werden, die bisher noch nicht exprimiert wurden, entsteht ein völlig neues mRNA-Expressionsmuster (SCHULTZ 2002).

Parallel hierzu zeigen sich auch entsprechende Veränderungen im Proteinsynthesemuster. So sinkt die Proteinsyntheserate vom Zygoten- bis zum 8-Zellstadium sukzessive, um danach wieder progressiv anzusteigen. Auf qualitativer Ebene kommt es im 8- bis 16-Zellstadium ebenfalls zu merklichen Veränderungen (FREI et al. 1989).

Auch die Aktivierung von ribosomalen RNA (rRNA)-Genen und die damit verbundene Bildung von Nukleoli, die für die Synthese von Ribosomen und somit für eine funktionierende embryonal gesteuerte Translation verantwortlich sind, kann als Bestandteil der mit der MET verbundenen Prozesse betrachtet werden (HYTTEL et al. 2000). Hierbei ist die Transkription von rRNA beim Rind in gewissem Umfang bereits im 3. Zellzyklus nachweisbar (VIUFF et al. 1998; HAY-SCHMIDT et al. 2001). Zur Hauptaktivierung der rRNA-Gene sowie zur Bil-

dung funktioneller, strukturell erkennbarer Nukleoli kommt es allerdings erst gegen Ende des 4. Zellzyklus, also in etwa zeitgleich mit der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms (KING et al. 1988; KOPECNY et al. 1989; LAURINCIK et al. 2003; JAKOBSEN et al. 2006).

Ein ebenfalls zeitlich mit der Aktivierung des embryonalen Genoms assoziiertes Phänomen, das allerdings nur bei in vitro produzierten und geklonten Embryonen auftritt, ist der sogenannte „in vitro developmental block“ (FIRST und BARNES 1989; BHOJWANI et al. 2007). Bereits in den 60er Jahren erkannte man, dass beim Rind das 8- bis 12-Zellstadium eine kritische Phase darstellt, in deren Verlauf viele in vitro produzierte Embryonen ihre Entwicklung einstellen (THIBAUT 1966). Auch später durchgeführte Studien belegen, dass es zwischen dem 8- und 16-Zellstadium häufig zu einer stadienspezifischen und irreversiblen Entwicklungsarretierung kommt (CAMOUS et al. 1984; EYESTONE und FIRST 1986), die jedoch primär nicht auf embryonalen Tod zurückzuführen ist (EYESTONE und FIRST 1991). Die genauen Ursachen und Zusammenhänge sind noch nicht eindeutig nachgewiesen (BETTEGOWDA et al. 2008). Ausgangspunkt sind vermutlich Mängel in den hier angewendeten assistierten Reproduktionstechnologien. Bedingt durch den Kerntransfer (BHOJWANI et al. 2007) oder durch nicht optimale In-vitro-Kulturbedingungen (CAMOUS et al. 1984; LEQUARRE et al. 2003) könnte es zu einer negativen Beeinflussung des zytoplasmatischen und nukleären Umfeldes der Eizelle bzw. des frühen Embryos kommen, was eine Störung des normalen Ablaufs der MET und somit eine Beeinträchtigung der weiteren Embryonalentwicklung zur Folge hätte (BETTEGOWDA et al. 2008).

Oft findet man bei in vitro produzierten Embryonen auch einen im Vergleich zu den vorausgehenden Zellzyklen verlängerten vierten Zellzyklus, ohne dass es zwangsweise zu einer endgültigen Entwicklungsarretierung kommen muss. Diese Entwicklungsverzögerung ist vermutlich auf das Einsetzen der embryonalen Transkription zurückzuführen (FIRST und BARNES 1989; DE SOUSA et al. 1998a; LEQUARRE et al. 2003). Ein direkter Vergleich der Zellzykluslängen mit in vivo produzierten Embryonen ist schwer durchzuführen, jedoch scheinen sich in vitro produzierte Embryonen vor allem ab dem 8-Zellstadium langsamer zu entwickeln (BARNES und EYESTONE 1990; GRISART et al. 1994). Man findet aber auch in der In-vitro-Produktion Embryonen mit einem kurzen vierten Zellzyklus, wobei diese das Blastozystenstadium mit einer höheren Wahrscheinlichkeit erreichen als die sich langsamer entwickelnden Embryonen (LEQUARRE et al. 2003). Somit bleibt offen, ob die beschriebene Entwicklungsverzögerung eher ein Problem der IVP oder doch ein physiologischer Zustand zum Zeitpunkt der MET ist.

#### 2.2.4 Regulation der Aktivierung des embryonalen Genoms

Die genauen molekularen Mechanismen, die der Aktivierung des embryonalen Genoms zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig bekannt und Gegenstand intensiver Forschung (NATALE et al. 2000, MCGRAW et al. 2007). Die meisten bisherigen Erkenntnisse stammen aus Studien an Mäusen. Obwohl viele der hier erforschten Mechanismen unter Säugetieren breit konserviert zu sein scheinen (DE SOUSA et al. 1998b), muss dies in Anbetracht der großen speziespezifischen Unterschiede bezüglich des Zeitpunkts der MET nicht bei allen Mechanismen zwangsweise der Fall sein (BETTEGOWDA et al. 2008). Im Folgenden soll dies so weit wie möglich berücksichtigt werden. Insgesamt scheint eine Vielzahl sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Prozesse an der Steuerung der embryonalen Genomaktivierung beteiligt zu sein (PRATHER und FIRST 1988; LATHAM et al. 1992; LATHAM und SCHULTZ 2001).

Epigenetisch gesteuertes Chromatinremodelling stellt einen der Hauptmechanismen der embryonalen Genomaktivierung dar (BELL et al. 2008). Durch Histonacetylierung und Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Demethylierung wird eine Auflockerung der Chromatinstruktur bewirkt, so dass die DNA nun zugänglich für Transkriptionsfaktoren wird (MEMILI und FIRST 1999; BELL et al. 2008). Diese Veränderung der Chromatinstruktur ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung der embryonalen Transkription (MEMILI und FIRST 1999).

Von nicht minderer Bedeutung ist die Anwesenheit einer funktionierenden Transkriptionsmaschinerie (MEMILI und FIRST 2000). Die hierfür benötigten Transkriptionsfaktoren sind maternalen Ursprungs und stehen dem Embryo entweder als fertiges Protein oder in Form von maternalen mRNA zur Verfügung (LATHAM und SCHULTZ 2001). Dementsprechend unterschiedlich wird ihre Aktivität gesteuert: Im Falle der bereits fertig synthetisiert vorliegenden Transkriptionsfaktoren findet man eine posttranslationale Regulation in Form von Proteinphosphorylierung (SCHULTZ 1993), im anderen Fall wird die Verfügbarkeit der Transkriptionsfaktoren auf translationaler Ebene gesteuert, d.h. erst zum benötigten Zeitpunkt kommt es zur Translation der entsprechenden maternalen mRNA (LATHAM und SCHULTZ 2001; VIGNEAULT et al. 2004, 2009b). Somit spielen maternale Genprodukte insgesamt eine wichtige Rolle bei der Regulation der embryonalen Genexpression (BETTEGOWDA et al. 2008).

Neben der stadienspezifischen Translation maternaler mRNA scheint auch deren zeitgerechter Abbau für die MET und eine weitere ungestörte Embryonalentwicklung essentiell zu sein (BETTEGOWDA et al. 2008). Beides, Translation und Abbau, wird über die Stabilität der mRNA reguliert, weshalb diese einen bedeutenden Kontrollmechanismus zur Steuerung des

Transkriptionsbeginns darstellt (BARNES und EYESTONE 1990). Die Stabilität maternaler mRNA kann durch mehrere verschiedene Mechanismen kontrolliert werden. So können beispielsweise RBPs (RNA-binding proteins) an regulatorische Strukturen innerhalb der entsprechenden mRNA binden und dadurch deren Stabilität und Translation positiv oder negativ beeinflussen (EVSIKOV et al. 2004; VIGNEAULT et al. 2009b). Darüber hinaus spielen sogenannte microRNAs, kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Turnovers maternaler Transkripte, indem sie an ihre Ziel-RNA binden und dadurch die Proteinsynthese verhindern und/oder die entsprechende mRNA für ihren Abbau markieren (TANG et al. 2007; BELL et al. 2008; BETTEGOWDA et al. 2008). Bis zum Einsetzen der MET ist dann, bedingt durch die eben beschriebenen Mechanismen, ein Großteil der maternalen mRNA abgebaut (BETTEGOWDA et al. 2008).

Im Zusammenhang mit einer Analyse des bovinen Transkriptom zum Zeitpunkt der MET wurde nachgewiesen, dass es kurz vor der eigentlichen Hauptaktivierung des embryonalen Genoms zur Expression von Genen kommt, die großenteils für Gentranskription, RNA-Processing und Proteinbiosynthese zuständig sind. Diese frühen Transkripte spielen vermutlich eine Schlüsselrolle beim Initiieren der eigentlichen MET (VIGNEAULT et al. 2009a). Eine vergleichbare Situation liegt auch bei Mäusen vor (ZENG et al. 2004; LATHAM und SCHULTZ 2001).

Kurz bevor die embryonale Genomaktivierung beginnt, entwickelt sich zumindest bei Mäusen, verursacht durch eine epigenetisch bedingte Verdichtung der Chromatinstruktur, ein transkriptorisch repressiver Status. Durch entsprechend starke Enhancer kann dieser dann für bestimmte Gene wieder aufgehoben werden. Dadurch wird sichergestellt, dass bei der sich anschließenden Transkriptionsaktivierung nur ausgewählte Gene exprimiert werden, die für die Weiterentwicklung wirklich nötig sind. Die Funktion dieser vorübergehenden Transkriptionsrepression besteht also darin, die Entstehung eines korrekten und mit der weiteren Entwicklung kompatiblen Genexpressionsmusters zu gewährleisten (NOTHIAS et al. 1995; LATHAM und SCHULTZ 2001; SCHULTZ 2002).

In teils enger Beziehung hierzu scheint bei Mäusen die Replikation der DNA zu stehen. Durch die mit der ersten Replikationsrunde verbundene Entfernung von Nukleosomen wird die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren maternalen Ursprungs, wodurch eine initiale embryonale Transkription ermöglicht wird (SCHULTZ et al. 1999). Die zweite Runde der DNA-Replikation hingegen trägt vermutlich zur Etablierung des transkriptorisch repressiven Status bei, indem produktive Transkriptionskomplexe von ihren Promotoren entfernt werden (SCHULTZ et al. 1999). Auch beim Rind scheint die DNA-Replikation während des ersten und zweiten Zellzyklus wichtig zu sein für die embryonale Transkription und Regulation der

Genexpression (MEMILI und FIRST 1999). Eine Beteiligung an einer etwaigen Etablierung eines transkriptionell repressiven Status ist hier jedoch nicht nachgewiesen (MEMILI und FIRST 1999).

Bei Mäusen scheint die embryonale Genomaktivierung eher durch einen zeitabhängigen als durch einen zellzyklusabhängigen Mechanismus reguliert zu werden, d.h. sie erfolgt zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Befruchtung, unabhängig vom Zellzyklus. Man spricht in diesem Zusammenhang von der sogenannten „zygotischen Uhr“ (SCHULTZ 1993; NOTHIAS et al. 1995; MEMILI und FIRST 2000). Diese „innere Uhr“ ist jedoch nicht als reine Zeitspanne zwischen Befruchtung und Genomaktivierung zu betrachten, sondern vielmehr als ein Mechanismus, der die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert und dadurch die Genomaktivierung so lange verzögert, bis das ursprünglich kondensierte Chromatin für die Transkription umstrukturiert werden kann (NOTHIAS et al. 1995; MEMILI und FIRST 2000). Ob beim Rind ein ähnlicher zeitabhängiger Mechanismus von Bedeutung ist, wird kontrovers diskutiert (IWASAKI et al. 1997; MEMILI und FIRST 2000).

Welche Rolle die Regulation des Zellzyklus im Zusammenhang mit dem embryonalen Transkriptionsbeginn einnimmt, ist nicht eindeutig geklärt. Zumindest bei in vitro produzierten Embryonen scheint ein Zusammenhang zwischen einer Verlängerung der Zellzyklusdauer und dem Einsetzen der embryonalen Transkription zu bestehen (BARNES und EYESTONE 1990; MEMILI und FIRST 2000). Was jedoch Ursache und was Folge ist, wird unterschiedlich beurteilt: Laut BARNES und EYESTONE (1990) ist die Verlängerung des Zellzyklus Voraussetzung für den Transkriptionsbeginn, LEQUARRE et al. (2003) dagegen betrachten das Einsetzen der embryonalen Transkription als Ursache für den Anstieg der Zellzyklusdauer. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass manche in vitro produzierten Embryonen auch kürzere Zellzyklen aufweisen und sich sogar besser bis zum Blastozystenstadium weiter entwickeln (LEQUARRE et al. 2003).

Insgesamt stellt die embryonale Genomaktivierung einen sehr komplexen Prozess dar, der durch multiple molekulare Mechanismen auf mehreren Kontrollebenen gesteuert wird. Eine gute Koordination zwischen diesen verschiedenen Mechanismen ist hierbei unabdingbar (LATHAM und SCHULTZ 2001).

## 2.3 $\beta$ -Catenin

### 2.3.1 Die Familie der Catenine

Die Entdeckung der Catenine erfolgte im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Zelladhäsion. OZAWA et al. (1989) wiesen drei voneinander unabhängige zytoplasmatische Proteine mit unterschiedlicher Molekularmasse (102, 88 und 80 kDa) nach, die im Bereich von Adhaerens junctions Komplexe mit dem Zelladhäsionsmolekül Uvomorulin (E-Cadherin) bilden und in verschiedenen Spezies strukturell verwandt sind. Sie bezeichneten diese Proteine als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin.  $\alpha$ -Catenin weist strukturelle Ähnlichkeit zu Vinculin, einem Protein, das als Bestandteil von fokalen Adhäsionen Integrine an Aktinfilamente koppelt und auch am Aufbau von Adhaerens junctions beteiligt ist, auf (ABERLE et al. 1996; MARRS und NELSON 1996; WEISS et al. 1998). Analog zu dessen Funktion stellt  $\alpha$ -Catenin eine Verbindung zwischen dem Cadherin-Adhäsionssystem und dem Aktinzytoskelett her (JIANG 1996). Zusätzlich scheint es eine Rolle im Zellkern zu spielen (GIANNINI et al. 2000).  $\beta$ -Catenin zeigt strukturelle und funktionelle Homologie zu armadillo (arm), dem Produkt des Segmentpolaritätsgens von *Drosophila*, und  $\gamma$ -Catenin ist identisch mit Plakoglobin (PEIFER et al. 1992; PEIFER 1993; ABERLE et al. 1996). Daneben weisen auch  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin untereinander einen hohen Grad an Homologie auf, sind aber trotz dieser strukturell engen Verwandtschaft nicht identisch (BUTZ et al. 1992; PEIFER et al. 1992). Beide sind Bestandteil von Adhaerens junctions, Plakoglobin ist darüber hinaus auch am Aufbau von Desmosomen beteiligt (BUTZ et al. 1992; MILLER und MOON, 1996),  $\beta$ -Catenin übernimmt eine zusätzliche Funktion in Zytoplasma und Zellkern (WILLERT und NUSSE 1998). Ein weiteres, erst später entdecktes Mitglied der Catenin-Familie ist p120 (REYNOLDS et al. 1994). Es ist sowohl in Adhaerens junctions als auch in Desmosomen zu finden und scheint darüber hinaus auch eine Funktion im Zellkern einzunehmen (ANASTASIADIS und REYNOLDS 2000).

### 2.3.2 Struktur von $\beta$ -Catenin

Die Primärstruktur von  $\beta$ -Catenin lässt sich in ein aminoterminal Ende, eine hoch konservierte zentrale Region, sowie ein carboxyterminales Ende gliedern (WILLERT und NUSSE 1998). Letzteres übernimmt die Funktion einer Transaktivierungsdomäne (VAN DE WETERING et al. 1997). Das N-terminale Ende hat mehrere Funktionen: Als Zielpunkt für Phosphorylierungsprozesse ist es an der Regulation der Stabilität von  $\beta$ -Catenin beteiligt (YOST et al. 1996; BARTH et al. 1997b). Darüber hinaus wurde auch hier eine Transaktivie-

rungsdomäne identifiziert, die die Aktivität der C-terminalen Domäne steigert (HSU et al. 1998; BARKER et al. 2000). Am Übergang zur zentralen Region findet schließlich die Bindung von  $\alpha$ -Catenin statt (HUELSKEN et al. 1994; ABERLE et al. 1996; ORSULIC und PEIFER 1996). Die zentrale Region besteht aus zwölf unvollständigen arm repeats (MARRS und NELSON 1996; WILLERT und NUSSE 1998). Sie vermittelt die Bindung zahlreicher, in Signaltransduktion und/oder Zelladhäsion involvierter Proteine, unter anderem die von TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer-binding factor), APC (adenomatous polyposis coli) und E-Cadherin (HUELSKEN et al. 1994; HUBER et al. 1996; MOLENAAR et al. 1996; ORSULIC und PEIFER 1996). In einigen Fällen überlappen sich die Bindungsstellen für verschiedene Moleküle, so dass jene miteinander konkurrieren und die Bindung des einen Proteins die eines anderen ausschließen kann (HUELSKEN et al. 1994; ORSULIC und PEIFER 1996; ORSULIC et al. 1999).

Dreidimensional gesehen bildet jeder arm repeat drei  $\alpha$ -Helices aus, die durch kurze Loops miteinander verbunden sind. Insgesamt stellen die individuellen repeats keine separaten Domänen, sondern eine kompakte Einheit dar. Die komplette zentrale Region besteht somit aus einer Reihe von dicht gepackten, miteinander interagierenden  $\alpha$ -Helices, die zu einer rechtsdrehenden Superhelix angeordnet sind (WILLERT und NUSSE 1998).

### **2.3.3 Funktionen und Verteilung von $\beta$ -Catenin**

#### *2.3.3.1 Überblick*

$\beta$ -Catenin ist ein multifunktionelles Protein, das in den drei Zellkompartimenten Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern vorkommt und dort unterschiedliche Funktionen innehat: Membrangebundenes  $\beta$ -Catenin spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion im Bereich von Adhaerens junctions, im Zytoplasma wirkt es als Signalübertragungsmolekül und im Zellkern ist es an der Regulation der Genexpression beteiligt (MILLER und MOON 1996; WILLERT und NUSSE 1998). Die beiden letztgenannten Funktionen sind über den Wnt-Signalweg, auf den später noch ausführlicher eingegangen wird, eng miteinander verknüpft (MILLER und MOON 1996). Alle  $\beta$ -Catenin-Pools stehen in einer dynamischen Wechselwirkung zueinander (GOTTARDI und GUMBINER 2001).

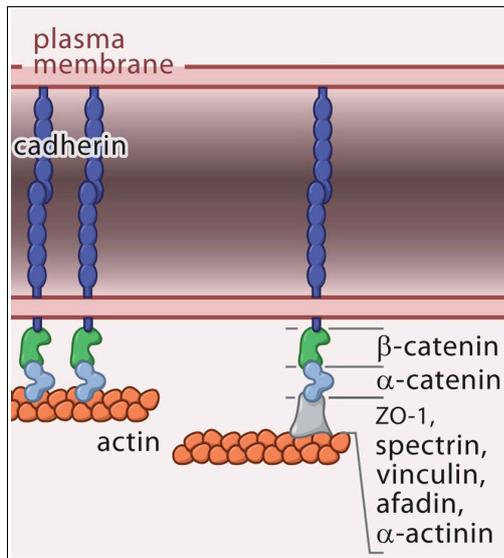
### 2.3.3.2 Zelladhäsion

Eine der vielfältigen Funktionen von  $\beta$ -Catenin ist seine Beteiligung an Adhaerens junctions. Adhaerens junctions sind Zellverbindungen, die in Epithelien sowohl eine adhäsive als auch eine architektonische Funktion ausüben, indem sie eine Verbindung zwischen Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und dem Zytoskelett herstellen. An ihrer Bildung sind Cadherine und Catenine beteiligt (MILLER und MOON 1996).

Als Cadherine bezeichnet man eine Gruppe von kalziumabhängigen Zelladhäsionsmolekülen. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen, die sich bezüglich ihrer Struktur, Funktion und subzellulären Verteilung unterscheiden: Protocadherine, desmosomale Cadherine und klassische Cadherine. Letztere sind für den Aufbau von Adhaerens junctions von Bedeutung. Sie bestehen aus einer extrazellulären, einer intrazellulären sowie einer einmal die Zellmembran durchspannenden Transmembrandomäne. Über ihre extrazelluläre Domäne gehen sie homotypische Interaktionen mit Cadherinen auf benachbarten Zellen ein und gewährleisten dadurch die Zelladhäsion. Die zytoplasmatische Domäne stellt die Verbindung zu den Cateninen und dadurch letztendlich zum Zytoskelett her (MARRS und NELSON 1996). Eines der in diesem Zusammenhang am besten charakterisierten klassischen Cadherine ist das in Epithelien vorkommende E-Cadherin, auch bekannt als Uvomorulin (JIANG 1996), auf das im Folgenden Bezug genommen wird.

Catenine sind von großer Bedeutung für ein normal funktionierendes E-Cadherin (JIANG 1996), sie mediiere dessen zytoplasmatische Funktion (GUMBINER und MCCREA 1993).

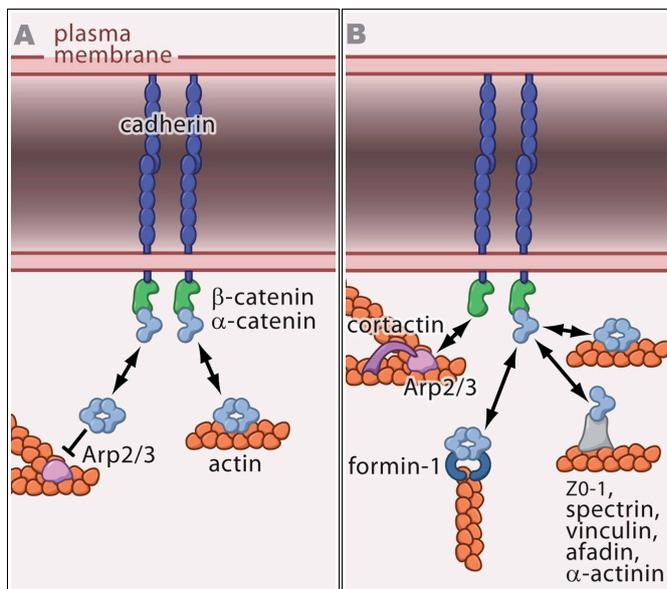
$\beta$ -Catenin bindet einerseits mit seiner zentralen Region an den intrazellulären Abschnitt von E-Cadherin und andererseits mit seinem aminoterminalen Ende an  $\alpha$ -Catenin (ABERLE et al. 1994; ORSULIC und PEIFER 1996). Letzteres wiederum stellt die Verbindung zum Aktinzytoskelett her, entweder durch direkte Bindung an Aktin (RIMM et al. 1995), oder indirekt unter Zwischenschaltung von beispielsweise  $\alpha$ -Actinin (KNUDSEN et al. 1995) oder Vinculin (WEISS et al. 1998). Allerdings kann  $\alpha$ -Catenin nicht gleichzeitig mit dem E-Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplex einerseits und Aktin andererseits interagieren, so dass davon auszugehen ist, dass hier keine starre Verbindung, sondern vielmehr ein sehr dynamischer Prozess vorliegt, bei dem  $\alpha$ -Catenin als Regulator der Aktindynamik fungiert (DREES et al. 2005; GATES und PEIFER 2005; YAMADA et al. 2005). Dieses dynamische Modell steht im Einklang mit den Bedürfnissen während der Zell- und Gewebeentwicklung. Eine gewisse Dynamik der Zelladhäsion ist essentiell, um die hier stattfindenden morphogenetischen Veränderungen zu ermöglichen (MUELLER et al. 1999; YAMADA et al. 2005). Abb. 2 zeigt das klassische Modell einer starren E-Cadherin-Catenin-Aktin-Achse, Abb. 3 zeigt verschiedene dynamische Modelle.



**Abb. 2: Klassisches Modell der Cadherin-Catenin-Aktin-Achse**

(GATES und PEIFER 2005, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

β-Catenin bindet an die zytosolische Domäne von E-Cadherin sowie an α-Catenin. α-Catenin bindet direkt oder indirekt unter Zwischenschaltung von Proteinen wie zonula occludens-1 (ZO-1), Spectrin, Vinculin, Afadin oder α-Actinin an Aktin.



**Abb. 3: Modelle zur dynamischen Interaktion zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und Aktin**

(modifiziert nach GATES und PEIFER 2005, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

A) α-Catenin-Monomere binden an β-Catenin; von Cadherin-Catenin-Komplexen freigesetzte α-Catenin-Homodimere binden an Aktin, antagonisieren Arp (Actin-related protein)2/3 und fördern dadurch die Bildung eines unverzweigten Aktinringels

B) Die Verbindung zwischen den Adhärenzjunctions und Aktin wird mediiert durch den kumulativen Effekt mehrerer schwacher transienter Interaktionen zwischen Adhärenzjunctions-Komponenten und verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen (ZO-1, Spectrin, Vinculin, Afadin, α-Actinin)

Neben β-Catenin kann auch Plakoglobin an die zytosolische Domäne von E-Cadherin binden, wobei die Bindung des einen Catenins die des anderen ausschließt. Somit existieren also zwei verschiedene Cadherin-Catenin-Komplexe, bestehend aus E-Cadherin, α-Catenin sowie β-Catenin oder Plakoglobin (BUTZ und KEMLER 1994; HINCK et al. 1994a). Allerdings ist die Bindung zwischen E-Cadherin und Plakoglobin weniger stabil (GUMBINER und MCCREA 1993; SALOMON et al. 1997).

Die Bildung dieser beiden Komplexe läuft nach demselben Muster ab. Bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) bindet β-Catenin bzw. Plakoglobin an neu synthetisiertes E-Cadherin und unterstützt dessen Transport an die Zellmembran, wo schließlich auch α-Ca-

tenin in den Komplex aufgenommen wird (HINCK et al. 1994a; CHEN et al. 1999). Ein weiterer Bestandteil des Cadherin-Catenin-Komplexes ist p120 (REYNOLDS et al. 1994). Es bindet an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin, ohne mit  $\beta$ -Catenin oder Plakoglobin um die Bindung zu konkurrieren und ohne wie diese mit  $\alpha$ -Catenin zu assoziieren (DANIEL und REYNOLDS 1995). Vermutlich ist es an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt (ANASTASIADIS und REYNOLDS 2000).

Die Organisation und Funktion des Cadherin-Catenin-Komplexes wird auf posttranslacionalem Level reguliert, wobei der Phosphorylierung verschiedener beteiligter Proteine an verschiedenen Aminosäureresten eine große Bedeutung zukommt (LILIEN et al. 2002):

Serin-/Threoninphosphorylierungen erhöhen im Allgemeinen die Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes. So verstärkt die durch Casein Kinase II (CKII) und GSK3 medierte Phosphorylierung von E-Cadherin an seiner zytoplasmatischen Domäne die Affinität zu  $\beta$ -Catenin (LICKERT et al. 2000) und  $\beta$ -Catenin, das durch CKII an seinem aminoterminalen Ende phosphoryliert wurde, bindet wiederum stärker an  $\alpha$ -Catenin (BEK und KEMLER 2002). Im Gegensatz dazu bewirkt die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Tyrosinresten durch verschiedene Tyrosinkinase eine Verminderung seiner Bindungsaffinität sowohl zu E-Cadherin als auch zu  $\alpha$ -Catenin und führt somit zum Zerfall des Cadherin-Catenin-Komplexes (MUELLER et al. 1999; ROURA et al. 1999; PIEDRA et al. 2003). Als Antagonisten der Tyrosinkinase dephosphorylieren Proteintyrosinphosphatasen Tyrosinreste von  $\beta$ -Catenin und erhalten so den Kontakt zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett aufrecht (BALSAMO et al. 1998; MUELLER et al. 1999). Insgesamt sind an der Regulation der Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes abhängig von Gewebetyp und Entwicklungszeitpunkt viele verschiedene Kinasen und Phosphatasen beteiligt (LILIEN et al. 2002).

In diesem Zusammenhang spielt auch p120 eine Rolle, da es je nach Situation die Zelladhäsion positiv oder negativ beeinflussen kann. Welche dieser beiden Wirkungen es ausübt, wird vermutlich wiederum durch Phosphorylierung des p120 Moleküls gesteuert (ANASTASIADIS und REYNOLDS 2000). p120 fungiert hierbei als eine Art „Andockprotein“, das mehrere Kinasen bindet und dadurch deren Interaktion mit dem Cadherin-Catenin-Komplex erleichtert (PIEDRA et al. 2003).

Auf gewisse Weise ist  $\beta$ -Catenin auch unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus an der Steuerung der Zelladhäsion beteiligt – und zwar in seiner Rolle als Transporter für E-Cadherin auf dessen Weg aus dem ER an die Zellmembran. Ist  $\beta$ -Catenin nicht in ausreichendem Maß vorhanden, gelangt E-Cadherin nicht an die Zellmembran, was zu einer Verringerung der Zelladhäsion führt. Somit stellt auch der  $\beta$ -Catenin medierte Export von E-Cadherin aus dem ER einen regulatorischen Punkt für die Funktion der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion dar (CHEN et al. 1999).

Alles in allem ist  $\beta$ -Catenin für die E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion von großer Bedeutung, da es einerseits unter Beteiligung von  $\alpha$ -Catenin die Verbindung zwischen E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett herstellt und andererseits in seiner Rolle als Zielpunkt verschiedener Phosphorylierungsereignisse sowie als Transporter für E-Cadherin an der Regulation der Stabilität der Cadherin-Catenin-Komplexe stark beteiligt ist.

### 2.3.3.3 *Signaltransduktion*

Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin fungiert primär als Signalübertragungsmolekül. Es ist eine zentrale Komponente des kanonischen Wnt-Signalwegs (WILLERT und NUSSE 1998). Dieser Signalweg ist durch Regulation der Genexpression an diversen biologischen Prozessen wie beispielsweise Determination, Proliferation, Migration und Differenzierung beteiligt und somit sowohl für die Embryogenese als auch für die Homöostase im adulten Organismus von Bedeutung (VERHEYEN und GOTTARDI 2010). Abb. 4 gibt einen Überblick über den Ablauf der Wnt-Signalkaskade.

In Abwesenheit eines Wnt-Signals (Abb. 4A) wird das Level an zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin durch dessen Phosphorylierung und anschließenden Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System gering gehalten (ABERLE et al. 1997; ORFORD et al. 1997). Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin erfolgt durch einen zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, bestehend aus den Hauptkomponenten Axin, APC, Casein Kinase I (CKI) und GSK3 sowie zahlreichen weiteren Kinasen, Proteasen und zum Teil noch nicht genau definierten Molekülen (KISHIDA et al. 1998; SALIC et al. 2000; MACDONALD et al. 2009).  $\beta$ -Catenin wird an seiner aminoterminalen Domäne zunächst durch  $CKI\alpha$  an Serin 45 und anschließend durch GSK3 an Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 phosphoryliert, wobei CKI die Rolle einer „priming kinase“ übernimmt (AMIT et al. 2002; LIU et al. 2002). Das so phosphorylierte  $\beta$ -Catenin wird dann durch das  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -Trcp), einer Untereinheit der E3 Ubiquitin Ligase, erkannt, was seine Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung zur Folge hat (HART et al. 1999; KITAGAWA et al. 1999; LIU et al. 1999).

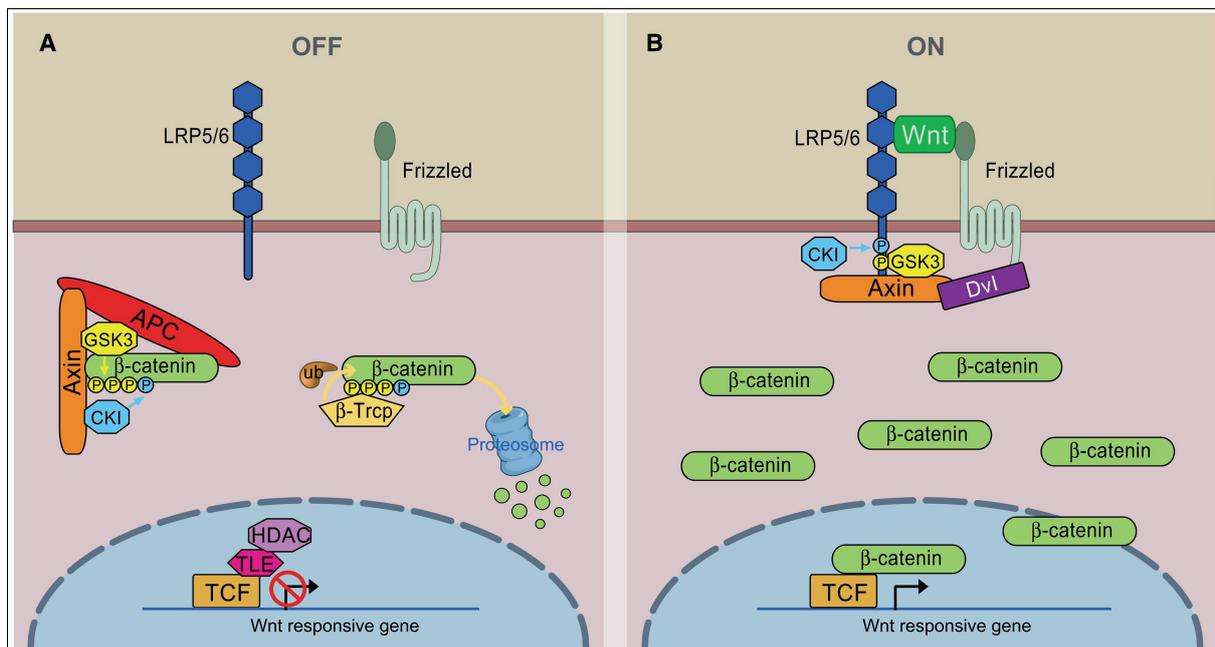
Die Interaktionen der einzelnen Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes sind sehr komplex und sollen im Folgenden näher betrachtet werden: Axin fungiert als eine Art Gerüstprotein, es interagiert über separate Domänen mit  $CKI\alpha$ , GSK3,  $\beta$ -Catenin und APC, bringt diese Moleküle in räumliche Nähe zueinander und koordiniert dadurch die sequenzielle Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch  $CKI\alpha$  und GSK3, wobei es selbst ebenfalls durch GSK3 phosphoryliert wird (HART et al. 1998; IKEDA et al. 1998; ITOH et al. 1998; KISHIDA et al. 1998; AMIT et al. 2002; LIU et al. 2002). Auch APC wird unter Vermittlung von Axin phosphoryliert, und zwar durch  $CKI\epsilon$  und GSK3, was seine Affinität zu  $\beta$ -Catenin erhöht (RUBINFELD et al. 1996, 2001; SALIC et al. 2000). Möglicherweise entfernt Phospho-APC

nun das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin von Axin, um es der Degradierungsmaschinerie zuzuführen. Axin wäre dann wieder bereit für eine neue Runde der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung (XING et al. 2003).

In Anwesenheit eines Wnt-Signals (Abb. 4B) wird die Phosphorylierung von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin inhibiert. Hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin ist für die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau unzugänglich, so dass sich die auf diese Weise stabilisierte Form im Zytoplasma anreichern kann (VAN LEEUWEN et al. 1994; ABERLE et al. 1997).

Die Wnt-Signalkaskade beginnt an der Zellmembran, indem ein Wnt-Protein an die extrazelluläre Domäne eines transmembranären Frizzled (Fz)-Rezeptors bindet (BHANOT et al. 1996; YANG-SNYDER et al. 1996). Als Korezeptor fungiert bei Vertebraten das low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5 bzw. 6 (TAMAI et al. 2000; MAO et al. 2001). Nach Bildung des Wnt-Fz-LRP5/6-Komplexes wird das Signal auf das zytoplasmatische Protein Dishevelled (Dvl) übertragen (KRASNOW et al. 1995; WONG et al. 2003). Durch Phosphorylierung aktiviertes Dvl wird an die Plasmamembran transloziert und interagiert dort mit Fz (YANAGAWA et al. 1995; ROTHBÄCHER et al. 2000; WONG et al. 2003). Dvl rekrutiert nun Axin und mit ihm den gesamten  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex an die Membran und initiiert dadurch die Phosphorylierung von LRP5/6 (SCHWARZ-ROMOND et al. 2007; ZENG et al. 2008). Diese Wnt induzierte Phosphorylierung von LRP5/6 durch CKI und GSK3 ist ein Schlüsselereignis bei der Rezeptoraktivierung (MACDONALD et al. 2009) und Voraussetzung dafür, dass Axin nun an LRP5/6 binden kann (MAO et al. 2001; TAMAI et al. 2004; ZENG et al. 2005). Wie nun diese Rezeptoraktivierung zur Inhibierung der GSK3 vermittelten Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin führt, ist noch unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Nach wie vor umstritten ist, ob LRP5/6 oder Fz/Dvl hierbei die Schlüsselrolle zukommt. Eventuell ist auch der Beitrag von beiden nötig, um der Phosphorylierung und Degradierung von  $\beta$ -Catenin entgegen zu wirken (MACDONALD et al. 2009; WU et al. 2009). Folgende biochemische Mechanismen werden diskutiert: Die Wnt induzierte Interaktion zwischen Dvl und Axin könnte eine Konformationsänderung von Axin bzw. den Zerfall des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes bewirken, was zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führen würde (KISHIDA et al. 1999; LI et al. 1999; LIU et al. 2005; SCHWARZ-ROMOND et al. 2007). Alternativ wäre auch eine direkte, von Axin unabhängige Hemmung von GSK3 durch phosphoryliertes LRP5/6 denkbar, eine Möglichkeit, die gerade durch neuere Studien immer mehr in den Vordergrund rückt (PIAO et al. 2008; WU et al. 2009).

Die aus der Hemmung der Phosphorylierung resultierende Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma ist Voraussetzung für dessen Transport in den Zellkern, wo es als Transkriptionskoaktivator wirksam werden kann (SALOMON et al. 1997; HSU et al. 1998).



**Abb. 4:** Übersicht über den Wnt-Signalweg

(MACDONALD et al. 2009, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

A) In Abwesenheit eines Wnt-Signals bildet zytoplasmatisches β-Catenin einen Komplex mit Axin, APC, GSK3 und CKI, wird phosphoryliert und unter Vermittlung von β-Trcp im Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Im Zellkern bildet TCF einen Komplex mit Mitgliedern der Groucho/TLE-Familie und Histondeacetylasen (HDAC), wodurch die Expression von Wnt-Zielgenen unterdrückt wird.

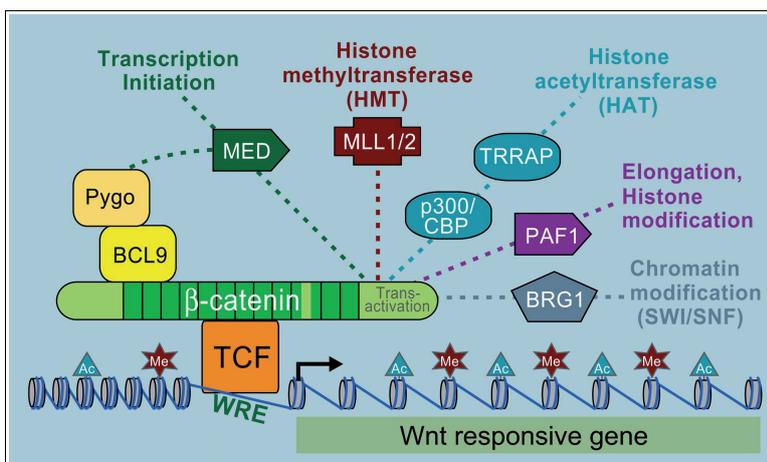
B) In Anwesenheit eines Wnt-Signals bildet sich ein Rezeptorkomplex zwischen Fz und LRP5/6. Dvl wird durch Fz an die Zelloberfläche rekrutiert, was wiederum die Rekrutierung von Axin mitsamt der übrigen Mitglieder des β-Catenin-Abbauflexes sowie die Phosphorylierung von LRP5/6 zur Folge hat. Dies alles führt zur Inhibierung der Phosphorylierung von β-Catenin durch den Abbauflex, so dass sich nicht phosphoryliertes β-Catenin im Zytoplasma anreichert und schließlich in den Zellkern gelangen kann. Hier kommt es zur Transkription von Wnt-Zielgenen.

### 2.3.3.4 Genexpression

Auf welche Weise stabilisiertes zytoplasmatisches β-Catenin in den Zellkern gelangt, ist noch relativ unklar (HENDERSON und FAGOTTO 2002; WU et al. 2008). Früher ging man davon aus, dass β-Catenin unter Vermittlung von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie in den Zellkern transportiert wird (BEHRENS et al. 1996; HUBER et al. 1996; MOLENAAR et al. 1996). Neueren Studien zufolge fungieren diese Faktoren jedoch nicht als aktive Transporter von zytoplasmatischem β-Catenin, sondern sie halten nukleäres β-Catenin lediglich im Zellkern zurück (KRIEGHOFF et al. 2006). Vermutlich bindet zytoplasmatisches β-Catenin direkt an die Nukleoporine des Kernporenkomplexes und gelangt auf diese Weise unabhängig von TCF/LEF in den Zellkern (FAGOTTO et al. 1998; PRIEVE und WATERMAN 1999; YOKOYA et al. 1999). Möglicherweise spielt beim Import auch die Aktivierung der GTPase

Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) eine Rolle, indem sie zur Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Serin 191 und Serin 605 beiträgt. Jedoch sind die molekularen Details für diesen Mechanismus noch nicht bekannt (WU et al. 2008).

Im Kern angelangt, wirkt  $\beta$ -Catenin als Transkriptionskoaktivator (RIESE et al. 1997). Es bindet über seine zentrale arm-Region an die aminoterminal Domäne von TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren, diese binden dann wiederum über ihre HMG (high mobility group)-Box sequenzspezifisch an die DNA von Zielgenen (MOLENAAR et al. 1996; RIESE et al. 1997; FAGOTTO et al. 1998). Über seine Transaktivierungsdomänen interagiert  $\beta$ -Catenin mit dem TATA-binding Protein (TBP) und rekrutiert so die basale Transkriptionsmaschinerie an die Promotorregion von Zielgenen (HECHT et al. 1999). Der  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF-Komplex allein ist jedoch nicht ausreichend für die Aktivierung der Genexpression, weshalb noch zusätzliche Transkriptionsaktivatoren benötigt werden (BRANNON et al. 1997). Diese sind überwiegend an der Regulation der Chromatinstruktur und der RNA-Polymerase II beteiligt und erleichtern dadurch die Transkriptionsaktivierung (MOSIMANN et al. 2009). Zu den beteiligten Hilfsfaktoren gehören unter anderem BRG1 (brahma-related gene 1) (BARKER et al. 2001), p300/CBP (CREB-binding protein) (HECHT et al. 2000; TAKEMARU und MOON 2000) und BCL9 (B-cell CLL/lymphoma 9)/Pygopus (KRAMPS et al. 2002; PARKER et al. 2002). BCL9 bindet an die aminoterminal Region von  $\beta$ -Catenin, die meisten anderen Kofaktoren interagieren mit dessen carboxyterminaler Domäne (MACDONALD et al. 2009).  $\beta$ -Catenin kann somit als eine Art „Andock-Molekül“ betrachtet werden, das essentielle Koaktivatoren an Zielgenpromotoren rekrutiert (BARKER et al. 2001). Vermutlich binden all diese Faktoren nicht gleichzeitig, sondern in einem gut abgestimmten Wechsel an  $\beta$ -Catenin, so dass es sich hier um einen hochdynamischen, sich selbst unterhaltenden Prozess handelt (MOSIMANN et al. 2009). Abb. 5 zeigt eine Übersicht über einige dieser Hilfsfaktoren.



**Abb. 5: Nukleäre TCF- $\beta$ -Catenin-Koaktivator-Komplexe**

(modifiziert nach MACDONALD et al. 2009, abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Gestrichelte Linien repräsentieren die Interaktionen der Hilfsfaktoren mit  $\beta$ -Catenin oder untereinander. Beschrieben sind ebenfalls die Funktionen der einzelnen Hilfsfaktoren.

TCF/LEF-Moleküle sind keine klassischen Transkriptionsfaktoren, sie können allein die Transkription nicht aktivieren, sondern sind auf eine Komplexbildung mit  $\beta$ -Catenin angewiesen (MOLENAAR et al. 1996; ROOSE und CLEVERS 1999). In Abwesenheit von nukleärem  $\beta$ -Catenin wirken sie als Transkriptionsrepressoren (BRANNON et al. 1997; CAVALLO et al. 1998). Hierbei bilden sie Komplexe mit verschiedenen Korepressoren, wie beispielsweise Mitgliedern der Groucho/TLE (transducin-like enhancer of split)-Familie (ROOSE et al. 1998; CAVALLO et al. 1998; MACDONALD et al. 2009), der Histondeacetylase 1 (HDAC1) (BILLIN et al. 2000) (Abb. 4A) oder auch dem C-terminalen Bindeprotein (CtBP) (BRANNON et al. 1999). Kommt es infolge eines Wnt-Signals zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern, kann dieses die Korepressoren verdrängen und selbst an TCF/LEF binden (BARKER et al. 2000) (Abb. 4B). Somit wird die Expression von Zielgenen durch die Balance zwischen  $\beta$ -Catenin und dem Korepressor reguliert (ROOSE et al. 1998).

Neben der oben beschriebenen Aktivierung ist auch eine durch  $\beta$ -Catenin mediierte Repression mancher Wnt-Zielgene möglich (MACDONALD et al. 2009). So bewirkt beispielsweise die Bindung des TCF/LEF- $\beta$ -Catenin-Komplexes an den E-Cadherin-Promotor ein Herunterregulieren der E-Cadherin-Transkription (HUBER et al. 1996).

Viele Gene, die direkt oder indirekt durch den Wnt-Signalweg reguliert werden, codieren für Transkriptionsfaktoren oder Signalmoleküle (WODARZ und NUSSE 1998). Auch viele Komponenten des Wnt-Signalwegs selbst werden durch TCF/ $\beta$ -Catenin positiv oder negativ reguliert, so dass es hier viele verschiedene positive und negative Feedbackmechanismen gibt (MACDONALD et al. 2009).

### 2.3.3.5 *Subzelluläre Verteilung von $\beta$ -Catenin*

Die unterschiedlichen Funktionen von  $\beta$ -Catenin sind eng mit seiner subzellulären Verteilung verknüpft (ORSULIC et al. 1999).  $\beta$ -Catenin tritt in den drei Kompartimenten Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern auf (MILLER und MOON 1996). Diese drei Pools stehen in einer dynamischen Wechselwirkung zueinander, ihre relative Größe wird vermutlich über konkurrierende Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin reguliert, die das Molekül in den verschiedenen Kompartimenten zurückhalten können (ORSULIC et al. 1999; GOTTARDI und GUMBINER 2001; HENDERSON und FAGOTTO 2002). An der Zellmembran übernimmt E-Cadherin diese Rolle, im Zellkern mediierten TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die Retention von  $\beta$ -Catenin und im Zytoplasma wird es durch APC und Axin zurückgehalten (ORSULIC et al. 1999; KRIEGHOFF et al. 2006). Mit welchem der Konkurrenten  $\beta$ -Catenin jeweils assoziiert, wird vermutlich durch posttranslationale Modifikationen von  $\beta$ -Catenin selbst oder seiner Bindungspartner gesteuert (MILLER und MOON 1997; GOTTARDI und GUMBINER 2001).

Die Verteilung von  $\beta$ -Catenin variiert je nach Typ und Funktionsstand der Zelle. In unstimulierten Zellen ist das  $\beta$ -Catenin-Level insgesamt oft niedrig. Der Großteil des  $\beta$ -Catenins ist an der Plasmamembran lokalisiert, nur wenig liegt frei in Zytoplasma oder Zellkern vor (HENDERSON und FAGOTTO 2002; RESTUCCI et al. 2009). Nukleäres  $\beta$ -Catenin transloziert selbständig oder unter Vermittlung von APC aus dem Zellkern und wird entweder dem zytoplasmatischen Abbaukomplex oder Adhaerens junctions zugeführt (HENDERSON 2000). Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin wird kontinuierlich abgebaut (ABERLE et al. 1997). In Anwesenheit eines Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert und akkumuliert in Zytoplasma und Zellkern. Im Zellkern ist deshalb die dephosphorylierte Form von  $\beta$ -Catenin prominenter und transkriptionell aktiver als die phosphorylierte Form (HENDERSON und FAGOTTO 2002).

### *2.3.3.6 Wechselwirkungen zwischen Signaltransduktion/Genexpression und Zelladhäsion*

Zwischen der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg existieren eine Reihe von Verknüpfungspunkten. Zwar sind die genauen Mechanismen, über die die Interaktionen zwischen Zelladhäsion und Genexpression gesteuert werden, sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint  $\beta$ -Catenin hierbei eine entscheidende Komponente und die Regulation seiner Stabilität und Verfügbarkeit ein Schlüsselereignis zu sein (NELSON und NUSSE 2004).

E-Cadherin kann zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin sequestrieren und an der Plasmamembran verankern. Dadurch steht es dem Wnt-Signalweg nicht mehr bzw. nicht mehr vollständig zur Verfügung (FAGOTTO et al. 1996; ORSULIC et al. 1999; GOTTARDI und GUMBINER 2001). Eine ähnliche Wirkung zeigt auch das mit dem Cadherin-Catenin-Komplex assoziierte Caveolin-1: Es rekrutiert  $\beta$ -Catenin an Caveolae-Membranen, verringert dadurch dessen zytoplasmatisches Level und könnte somit die  $\beta$ -Catenin mediierte Transkription blockieren (GALBIATI et al. 2000; JI et al. 2007). Allerdings ist anzunehmen, dass E-Cadherin in endogenen Konzentrationen keine vollständig blockierende, sondern lediglich eine dämpfende Wirkung auf die Wnt-Signaltransduktion hat, indem es aktives  $\beta$ -Catenin abpuffert (SANSON et al. 1996).

Eine weitere Methode der negativen Regulation des Wnt-Signalwegs durch Cadherine wiesen HAY et al. (2009) nach. Demnach interagiert N-Cadherin, ein Mitglied der Familie der klassischen Cadherine, mit Axin und LRP5 und verhindert dadurch vermutlich die Destabilisierung des Abbaukomplexes, wodurch wiederum die Degradierung von  $\beta$ -Catenin gefördert und somit die Wnt-Signaltransduktion herunterreguliert wird. Hier wird also ein neuer Verbindungsmechanismus zwischen dem Wnt-Signalweg und der Zelladhäsion beschrieben, der nicht auf der Sequestrierung von  $\beta$ -Catenin, sondern auf dessen verstärktem Abbau beruht.

Eine gegensätzliche Wirkung zu den bisher beschriebenen Mechanismen kann durch Spaltung des Cadherin-Catenin-Komplexes erzielt werden. Infolge des durch Wachstumsfaktorrezeptoren (NELSON und NUSSE 2004) oder Tyrosinkinase bewirkten Zerfalls des Cadherin-Catenin-Komplexes wird  $\beta$ -Catenin in das Zytoplasma freigesetzt, reichert sich an und transloziert in den Zellkern, wo es seine Funktion als Transkriptionskoaktivator ausüben kann (MUELLER et al. 1999; DANILKOVITCH-MIAGKOVA et al. 2001). Neben dem Zerfall des Cadherin-Catenin-Komplexes kann die Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -Catenin gleichzeitig dessen Interaktion mit TBP erhöhen und dadurch die transkriptionelle Aktivität des  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF-Komplexes noch steigern. Somit könnte unter bestimmten Bedingungen eine gesteuerte Dissoziation von Cadherin-Catenin-Komplexen zu einer gesteigerten  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF mediierten Gentranskription führen (LILIE et al. 2002). Allerdings muss das zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin dennoch vorher stabilisiert werden, ansonsten gelangt  $\beta$ -Catenin nicht in den Zellkern, sondern wird proteasomal abgebaut (JAMORA und FUCHS 2002; NELSON und NUSSE 2004).

Durch Wnt-Signale selbst und auch durch einige Wachstumsfaktorrezeptoren kann die Expression von E-Cadherin auf verschiedenen Wegen unterdrückt werden, was ebenfalls eine Verminderung der Zelladhäsion sowie einen Anstieg des zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin-Niveaus zur Folge hat. Zwar ist dieser Anstieg allein nicht ausreichend für eine Transkriptionsaktivierung (vgl. oben), doch könnte dadurch der Schwellenwert für die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion schneller erreicht werden (CIRUNA und ROSSANT 2001; NELSON und NUSSE 2004).

Demgegenüber gibt es aber auch Studien, die von einer positiven Beeinflussung der Zelladhäsion durch Wnt-Signale berichten. So scheinen jene in bestimmten Zelltypen die Cadherin-Expression auch aktivieren zu können (BARTH et al. 1997a; YANAGAWA et al. 1997). Darüber hinaus scheint stabilisiertes zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin unter bestimmten Umständen nicht nur in den Zellkern zu wandern, sondern auch in Adhärenz junctions eingebaut werden zu können, was dann eine Verstärkung der Zelladhäsion zur Folge hat (HINCK et al. 1994b; JAMORA und FUCHS 2002).

Insgesamt können also Veränderungen der Cadherin-Expression die Wnt-Signaltransduktion beeinflussen, während wiederum Wnt-Signale die Zelladhäsion beeinflussen können (DALE 1998).

Gerade während der Embryogenese ist eine koordinierte Regulation von Genexpression und interzellulären Interaktionen unerlässlich. Um ein ungestörtes Ablaufen von Differenzierungsprozessen zu gewährleisten, müssen Veränderungen im Genexpressionsmuster sowie dynamische Veränderungen der Zelladhäsion und Zellmigrationsprozesse genau aufeinander

abgestimmt sein.  $\beta$ -Catenin scheint hierbei von zentraler Bedeutung zu sein, indem es als Verknüpfungspunkt zwischen der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion und dem Wnt-Signalweg und somit der Genexpression fungiert (NELSON und NUSSE 2004).

### 2.3.4 $\beta$ -Catenin während der Embryonalentwicklung

$\beta$ -Catenin spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese, sowohl als Vermittler der E-Cadherin medierten Zelladhäsion als auch als Komponente des Wnt-Signalwegs (PAUKEN und CAPCO 1999; HUELSKEN et al. 2000).

$\beta$ -Catenin ist in allen Entwicklungsstadien von Präimplantationsembryonen zu finden, es stammt somit aus maternaler und embryonaler Genaktivität (OHSUGI et al. 1996; BARCROFT et al. 1998). Für die Kontrolle der Zelladhäsion bis zum Blastozystenstadium scheint maternales  $\beta$ -Catenin ausreichend zu sein, es mediiert vermutlich zusammen mit maternalem E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin die schwache interzelluläre Adhäsion der frühen Blastomeren (OHSUGI et al. 1996; DE VRIES et al. 2004) und kann auch eine ordnungsgemäße Kompaktierung gewährleisten, obwohl hier unter physiologischen Bedingungen auch embryonales  $\beta$ -Catenin beteiligt ist (HAEGEL et al. 1995; OHSUGI et al. 1996). Sowohl Kompaktierung als auch Polarisierung werden durch E-Cadherin in Verbindung mit den Cateninen vermittelt (JOHNSON und MCCONNELL 2004). Da die Komponenten des Cadherin-Catenin-Komplexes schon lange vor der Kompaktierung exprimiert werden, werden sie bis zu ihrem Bedarf zum Großteil in einer nicht funktionellen Form gespeichert (OHSUGI et al. 1996). Die Aktivierung der Adhäsionskomplexe zum Zeitpunkt der Kompaktierung erfolgt vermutlich durch posttranslationale Mechanismen, wie beispielsweise durch Proteinkinase C mediierte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Serin- und Threoninresten (PAUKEN und CAPCO 1999; FLEMING et al. 2001). Gleichzeitig ändert sich auch das Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin. Während die beiden Proteine in den inneren Zellen der Morula nach wie vor gleichmäßig über die Zellmembranen verteilt bleiben, beschränken sie sich in den äußeren Blastomeren zunehmend auf den Bereich der interzellulären Kontaktzonen an basolateralen Membranflächen (BARCROFT et al. 1998; PAUKEN und CAPCO 1999). Auf diese Weise wird nicht nur die für die Kompaktierung wichtige Zelladhäsion gewährleistet, sondern auch die Polarisierungsachse der Blastomeren festgelegt und die Voraussetzung für die Entstehung weiterer Zellverbindungen wie Tight junctions geschaffen (BARCROFT et al. 1998; FLEMING et al. 2001). Insgesamt spielt  $\beta$ -Catenin also eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion zum Zeitpunkt der Differenzierung (PAUKEN und CAPCO 1999).

Inwieweit der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung schon aktiv ist, wird kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu GOVAL et al. (2000) sowie LI et al. (2005) konnten PAUKEN und CAPCO (1999)  $\beta$ -Catenin bereits während der frühen murinen bzw. bovinen präimplantatorischen Embryonalentwicklung im Zellkern nachweisen, wobei noch unklar ist, welche Rolle es zu diesem Zeitpunkt im Zellkern spielt. Auch Wnt-Transkripte sowie zahlreiche weitere Komponenten des Wnt-Signalwegs wurden bei Mäusen zum Teil schon in sehr frühen Furchungsstadien nachgewiesen, so dass es durchaus denkbar wäre, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg hier bereits eine Rolle spielt (LLOYED et al. 2003; WANG et al. 2004), was jedoch von anderer Seite wiederum angezweifelt wird (DE VRIES et al. 2004). Spätestens ab der Kompaktierung bzw. Blastozystenbildung scheinen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signale dann involviert zu sein (LLOYED et al. 2003; LI et al. 2005).

Im Postimplantationsembryo ist  $\beta$ -Catenin unter anderem an der Körperachsenbildung (ZENG et al. 1997; HUELSKEN et al. 2000), der Gastrulation (HAEGEL et al. 1995; LI et al. 2005) und der Differenzierung verschiedener Gewebetypen und Organe (GRIGORYAN et al. 2008; KLAUS und BIRCHMEIER 2008) beteiligt. Insgesamt spielt es somit eine wichtige Rolle bei zahlreichen Differenzierungsprozessen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchsaufbau und Untersuchungsmaterial**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in fünf Abschnitte. Als Untersuchungsmaterial dienten für jeden dieser Versuchsabschnitte bovine in vitro produzierte Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Zielobjekt aller durchgeführten Untersuchungen waren jeweils an den N-terminalen Aminosäureresten Ser33/Ser37/Thr41 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (N-PBC) sowie Gesamt- $\beta$ -Catenin (GBC). Anhand einer geringeren Embryonenanzahl wurde zusätzlich am C-terminalen Aminosäurerest Ser552 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (C-PBC) betrachtet.

##### ***Versuchsabschnitt 1:***

*Vergleichende Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin im 4-, frühen 8-, späten 8- und 16-Zellstadium*

In diesem Versuchsabschnitt sollte nachgewiesen werden, ob es während der frühen Embryonalentwicklung zu nachweisbaren Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin kommt und falls ja, wann genau diese Veränderungen auftreten. Hierzu wurde mittels Westernblot bei je 25 gepoolten Embryonen pro Entwicklungsstadium jeweils das Level an N-PBC und GBC bestimmt. Der Versuch wurde insgesamt vier mal durchgeführt. Die benötigte Embryonenanzahl belief sich somit auf 400.

##### ***Versuchsabschnitt 2:***

*Vergleichende Untersuchung des Verteilungsmusters von GBC und N-PBC im 4-, 6-, frühen 8-, späten 8-, 10/12/14- und 16/18-Zellstadium mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie*

Mittels Immunhistochemie und konfokaler Laserscanningmikroskopie wurde untersucht, ob bei den betrachteten Entwicklungsstadien Unterschiede bezüglich der Lokalisation von N-PBC bzw. GBC in den drei Zellkompartimenten Zellkern, Zytoplasma und Zellmembran auftreten, wobei dem Zellkern besondere Aufmerksamkeit galt. Für diesen Versuchsabschnitt wurden insgesamt 388 Embryonen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien auf N-PBC oder GBC untersucht.

**Versuchsabschnitt 3:**

*Untersuchung des Einflusses eines GSK3-Inhibitors auf den Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin im 4-, frühen 8-, späten 8- und 16-Zellstadium mittels Westernblot*

Es sollte nachgewiesen werden, ob durch Einsatz eines GSK3-Inhibitors in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 50 nM, 100 nM und 500 nM) das Proteinlevel von N-PBC bzw. GBC in einem oder mehreren der untersuchten Entwicklungsstadien beeinflusst werden kann. Hierzu wurden die Embryonen analog zu den einzusetzenden Hemmstoffkonzentrationen in vier sogenannte Inhibitorkonzentrationsgruppen eingeteilt: Gruppe 0 (Kontrollgruppe), Gruppe 50, Gruppe 100 und Gruppe 500. Pro Entwicklungsstadium, Inhibitorkonzentrationsgruppe und Versuchsdurchgang wurden jeweils 25 Embryonen analog zu Versuchsabschnitt 1 auf N-PBC und GBC untersucht. Zusätzlich wurde an dieser Stelle das Proteinlevel von C-PBC betrachtet. Insgesamt wurden drei Versuchsdurchgänge durchgeführt. Die Gesamtanzahl der verwendeten Embryonen betrug somit 1200.

**Versuchsabschnitt 4:**

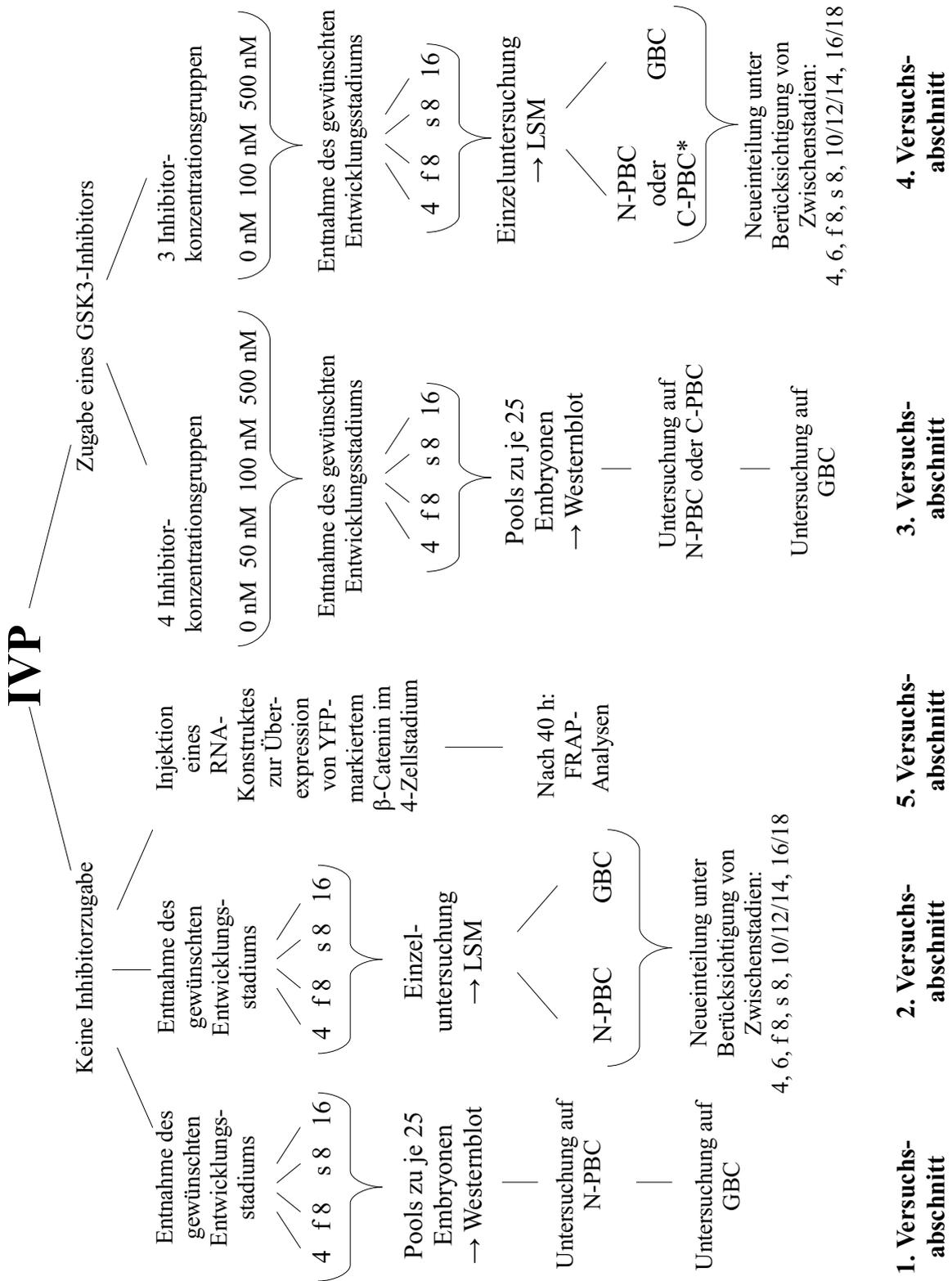
*Untersuchung des Einflusses eines GSK3-Inhibitors auf das Verteilungsmuster von N-PBC und GBC im 4-, 6-, frühen 8-, späten 8-, 10/12/14- und 16/18-Zellstadium mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie*

In diesem Versuchsabschnitt sollte analysiert werden, wie sich der Einsatz des GSK3-Inhibitors in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 100 nM und 500 nM) auf die Lokalisation von GBC und N-PBC im Embryo auswirkt. Pro Entwicklungsstadium wurden dementsprechend drei unterschiedliche Inhibitorkonzentrationsgruppen mittels Immunhistochemie und konfokaler Laserscanningmikroskopie untersucht: Gruppe 0 (Kontrollgruppe), Gruppe 100 und Gruppe 500. Insgesamt wurden hier die Daten von 953 Embryonen ausgewertet. Anhand von 114 weiteren Kontrollembryonen wurde an dieser Stelle zusätzlich das Verteilungsmuster von C-PBC betrachtet.

**Versuchsabschnitt 5:**

*Untersuchung von Translokationsprozessen von  $\beta$ -Catenin vom 4- bis zum 16-Zellstadium mittels Live Cell Imaging*

Mittels YFP-markiertem  $\beta$ -Catenin und FRAP-Analysen sollte eine aktive Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern nachgewiesen werden. Für diesen Versuchsabschnitt wurden insgesamt 42 Embryonen verwendet.



**Abb. 6: Versuchsplan**

\*4. Versuchsabschnitt: C-PBC: nur bei Kontrollembryonen (Gruppe 0)  
f 8: frühes 8-Zellstadium, s 8: spätes 8-Zellstadium

## **3.2 In-vitro-Produktion boviner Embryonen**

### **3.2.1 Spendertiere**

Als Spendertiere dienten überwiegend geschlachtete Kühe und Jungrinder der Rasse Deutsches Fleckvieh. In geringem Anteil waren auch die Rassen Deutsche Schwarzbunte und Gelbvieh vertreten. Es erfolgte keine Selektion der Spendertiere in Bezug auf Alter, Gewicht, Zyklusstand oder Gesundheitszustand.

### **3.2.2 Entnahme der Ovarien**

Zur Gewinnung der für die In-vitro-Produktion benötigten Oozyten wurden Eierstöcke von Schlachttieren aus dem Schlachthof Erlangen und in geringem Anteil (für Versuchsabschnitt 5) aus dem Schlachthof Teterow verwendet. Die Entnahme der Ovarien aus dem Schlachttierkörper erfolgte unmittelbar nach Öffnung der Bauchhöhle, ca. 20 Minuten nach dem Tod des Tieres, mit Hilfe einer chirurgischen Schere unter möglichst hygienischen Bedingungen. Es wurden nur Eierstöcke verwendet, die keine erkennbaren pathologischen Veränderungen aufwiesen. In unmittelbarem Anschluss an die Entnahme wurden die Ovarien in ein Thermogefäß mit ca. 35°C warmer physiologischer Kochsalzlösung gegeben und innerhalb von drei Stunden zur weiteren Verarbeitung in das IVP-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch e.V. bzw. des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf gebracht.

### **3.2.3 Gewinnung und Aufsuchen der Cumulus-Oozyten-Komplexe**

Die Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) erfolgte mittels Follikelpunktion. Hierbei wurden alle Follikel mit einem Durchmesser von ca. 2 mm bis 10 mm mit 5 ml Spritzen und 1,2 x 40 mm Kanülen punktiert und die gewonnene Follikelflüssigkeit in ein 50 ml fassendes, frei stehendes Zentrifugenröhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) gegeben. Die auf diese Weise gefüllten Röhrchen wurden im Anschluss an die Punktion ca. 10 Minuten stehen gelassen, damit die gewonnenen COK sedimentieren können. Anschließend wurde das Sediment mit Hilfe einer 7 ml Pasteur-Pipette (Fa. VWR, Darmstadt) aus den Röhrchen entnommen (4 Entnahmen von jeweils ca. 3,5 ml pro Röhrchen), in gerasterte Petrischalen (Durchmesser 94 mm; Fa. Greiner, Frickenhausen) gegeben und mit 35°C warmer modifizierter phosphatgepufferter Salzlösung nach Dulbecco (mD-PBS, siehe Anhang) aufgeschwemmt. Unter dem Stereomikroskop (SMZ 800; Fa. Nikon, Düsseldorf) wurden die COK bei 15facher Vergrößerung aufgesucht und in eine kleinere (35 mm Durchmesser), mit

35°C warmer mD-PBS-Lösung gefüllte Petrischale (Sammelschale; Fa. Greiner, Frickenhausen) überführt. Zum Umsetzen der COK wurde hierbei wie auch bei allen nachfolgenden Schritten die Pipettierhilfe MicroClassic (Fa. Brand, Wertheim) in Kombination mit 20 µl Mikropipetten (Fa. VWR, Darmstadt) verwendet. Sowohl die Rasterschalen als auch die Sammelschale befanden sich während des Aufsuchens der COK auf einer auf 33°C eingestellten Wärmeplatte.

### 3.2.4 Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe

Die Klassifizierung der gewonnenen COK erfolgte unter dem Stereomikroskop bei 30facher Vergrößerung. Unter Modifikation der von LEIBFRIED UND FIRST (1979) aufgestellten Kriterien wurden die COK nach der morphologischen Beschaffenheit von Ooplasma und Cumuluszellen in 4 Klassen eingeteilt:

Klasse 1	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und kompaktem Cumulus oophorus
Klasse 2	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und leicht aufgelockertem Cumulus oophorus
Klasse 3	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und expandiertem Cumulus oophorus
Klasse 4	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und geringem oder fehlenden Cumulus oophorus

COK der Klasse 1 und 2 wurden selektiert und in die erste Waschschale (siehe unten) überführt. COK der Klassen 3 und 4 wurden nicht verwendet.

### 3.2.5 In-vitro-Maturation

Im Anschluss an die Klassifizierung wurden die Eizellen dreimal gewaschen und schließlich in das Maturationsmedium überführt. Die Vorbereitung sowohl der Wasch- als auch der Maturationschalen mit den entsprechenden Medien erfolgte am Morgen vor der Gewinnung der Ovarien. Für die ersten beiden Waschgänge wurde je eine Petrischale (Durchmesser 35 mm; Fa. Greiner, Frickenhausen) mit sterilfiltriertem Maturationsmedium (tissue culture medium, TCM 199, siehe Anhang), dem zuvor 10% ECS (estrous cow serum, siehe Anhang) zugesetzt worden war, gefüllt. Als Waschschale für den dritten Waschgang sowie als Maturationschale dienten 4-Well-Multischalen (Fa. Nunc, Wiesbaden), in deren Wells jeweils 400 µl TCM 199 + 10% ECS und 15 µl FSH (follikelstimulierendes Hormon)-Lösung (Ovagen®, Fa. Bondico, Alkmaar, Holland, siehe Anhang) gegeben wurden. Das Medium in der Maturationschale

wurde zudem mit Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet. Die auf diese Weise vorbereiteten Schalen wurden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert, um Temperatur und pH-Wert zu äquilibrieren.

Die Reifung der in das Maturationsmedium überführten Eizellen erfolgte ebenfalls im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit über eine Dauer von 24 Stunden.

### 3.2.6 In-vitro-Fertilisation

#### 3.2.6.1 *Aufbereitung der Spermien/Swim-up-Verfahren*

Die Aufbereitung der Spermien erfolgte nach dem von PARRISH et al. (1986) etablierten Swim-up-Verfahren unter Verwendung des Kapazitationsmediums (siehe Anhang). Für alle Versuche wurde tiefgefrierkonserviertes Sperma des Bullen „Romel“ (Hb-Nr. 10/169052, Ejakulatnummer 04406) verwendet, wobei eine Samenportion (0,25 ml Paillette, 11,6 x 10<sup>6</sup> Spermien) für die Befruchtung von bis zu 200 Eizellen ausreichend war.

Zunächst wurden zwei sterile Kryoröhrchen (1,8 ml, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit je 1 ml Kapazitationsmedium gefüllt und in einem Winkel von 45° positioniert. Das Sperma wurde für 10 Sekunden bei 37°C aufgetaut, jedes Kryoröhrchen mit einer halben Samenportion (125 µl) unterschichtet, leicht bedeckt, so dass ein Gasaustausch noch stattfinden konnte, und im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer Stunde wurden aus jedem Kryoröhrchen 800 µl Spermien suspension aus dem oberen Drittel in ein ebenfalls im Brutschrank vorgewärmtes Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) überführt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen, das Spermienpellet mit 1 ml Kapazitationsmedium resuspendiert und ein zweites Mal bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und das verbliebene Spermienpellet mit 60 µl Befruchtungsmedium (siehe Anhang) resuspendiert. Anschließend wurde die Spermiedichte in einer Zählkammer nach Thoma bestimmt und das für die Befruchtung benötigte Volumen an Spermien suspension berechnet. Pro Befruchtungstropfen (60 µl) sollten ca. 100.000 Spermien eingesetzt werden.

#### 3.2.6.2 *Befruchtung*

Die Koinkubation von gereiften COK und Spermien erfolgte in Befruchtungstropfen. Vorbereitend hierzu wurden in eine Petrischale (Durchmesser 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen) vier Tropfen von jeweils 60 µl Befruchtungsmedium pipettiert und komplett mit Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet. Zusätzlich wurde eine viergeteilte Waschschale (Durch-

messer 35 mm, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit je 200 µl Befruchtungsmedium pro Vertiefung vorbereitet. Die Befruchtungstropfen und die Waschschale wurden für mindestens 4 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit äquilibriert.

Nach 24-stündiger Reifungszeit wurden die COK aus der Maturationschale entnommen, unter Beibehaltung der Gruppen in der Waschschale gewaschen und in die Befruchtungstropfen umgesetzt. Anschließend wurde das berechnete Volumen der Spermiasuspension zugegeben.

Die Koinkubation von COK und Spermien erfolgte im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit für 18-22 Stunden. Die nun leere Maturationschale wurde für diese Zeit ebenfalls im Brutschrank aufbewahrt.

### **3.2.7 In-vitro-Kultivierung**

Die Kultivierung der befruchteten Oozyten lässt sich in zwei Schritte gliedern, eine 24-stündige Kokultivierung der Oozyten mit ihren Cumuluszellen im Maturationsmedium und eine anschließende Kultivierung der von ihren Cumuluszellen befreiten Oozyten im Kultivierungsmedium SOF (synthetic oviduct fluid, siehe Anhang).

Nach Ablauf der Fertilisationszeit wurden die befruchteten COK gruppenweise aus den Befruchtungstropfen direkt zurück in ihre Maturationschalen gesetzt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für die zweite Phase der Kultivierung wurden pro Versuchsansatz drei 4-Well-Multischalen (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 400 µl sterilfiltriertem Kultivierungsmedium pro Well vorbereitet, wobei zwei Schalen als Waschschalen und eine als Kultivierungsschale dienten. Das benötigte Kultivierungsmedium wurde am Abend vor Gebrauch hergestellt und im Brutschrank unter Stickstoffatmosphäre bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Mindestens zwei Stunden vor Gebrauch wurde das Kultivierungsmedium sterilfiltriert, in die Schalen pipettiert und diese wiederum im Brutschrank gelagert. Nach der 24-stündigen Kokultivierungszeit wurden die COK gruppenweise aus der Maturations- in die erste Waschschale überführt und mit Hilfe einer auf 75 µl eingestellten Eppendorf-Pipette von ihren Cumuluszellen befreit. Die nun denudierten Oozyten wurden nochmals gewaschen, anschließend in die Kultivierungsschale umgesetzt und im Brutschrank unter Stickstoffatmosphäre bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit bis zu ihrer Entnahme (siehe Kapitel 3.3.2) kultiviert.

### **3.3 Versuchsabschnitt 1 bis 4: Behandlung und Entnahme der Embryonen sowie weitere Auswertungen**

#### **3.3.1 Zugabe des GSK3-Inhibitors**

Als GSK3-Inhibitor wurde für Versuchsabschnitt drei und vier (2'Z, 3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO) (GSK3-Inhibitor IX, Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Die Embryonen eines Ansatzes wurden jeweils in vier (Gruppe 0, 50, 100 und 500) bzw. drei (Gruppe 0, 100 und 500) Gruppen eingeteilt und der der jeweiligen Gruppenbezeichnung entsprechenden Konzentration des Inhibitors ausgesetzt (Abb. 6). Vorbereitend hierfür wurde der pulverförmige Inhibitor in Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Serva, Heidelberg) gelöst und derart weiter verdünnt, dass bei Zugabe von 0,2% verdünnter Inhibitorlösung die gewünschten Endkonzentrationen von 50 nmol/l, 100 nmol/l bzw. 500 nmol/l im Kulturmedium erreicht wurden. Gruppe 0 diente als Kontrollgruppe, ihr wurde lediglich 0,2% DMSO zugesetzt, so dass der Anteil von DMSO am Kulturmedium in allen Gruppen vergleichbar war. Die drei unterschiedlich konzentrierten Gebrauchslösungen des Inhibitors sowie das DMSO für die Kontrollgruppe wurden in Portionen zu je 10 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) eingefroren und jeweils kurz vor Gebrauch aufgetaut. Ihre Zugabe erfolgte für die 4-Zeller 25 Stunden, für die restlichen Entwicklungsstadien 30 Stunden vor deren erster Entnahme (Entnahmezeitpunkte siehe Kapitel 3.3.2), im Falle der 4- und frühen 8-Zeller also 20 hpi (hours post inseminationem), im Falle der späten 8-Zeller 32 hpi und im Falle der 16-Zeller 40 hpi (Abb. 7). Da sich die Embryonen zu diesem Zeitpunkt noch in der Phase der Kokultivierung und somit in TCM 199 befanden, wurde kurz vor deren Umsetzen in das Kulturmedium den hierfür vorbereiteten SOF-Wasch- und Kulturschalen ebenfalls Inhibitor bzw. DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt.

#### **3.3.2 Entnahmezeitpunkt der einzelnen Entwicklungsstadien**

Für Versuchsabschnitt 1 bis 4 wurden jeweils 4-Zeller, frühe 8-Zeller, späte 8-Zeller und 16-Zeller entnommen. In Versuchsabschnitt 1 und 2 wurde der Entnahmezeitpunkt der einzelnen Embryonalstadien an deren Entwicklungsgeschwindigkeit, die zu diesem Zweck regelmäßig kontrolliert wurde, angepasst. So variierte der Erstentnahmezeitpunkt bei den 4-Zellern von 42,5 bis 46 hpi, bei den frühen 8-Zellern von 47 bis 51,5 hpi, bei den späten 8-Zellern von 57 bis 64 hpi und bei den 16-Zellern von 58 bis 70 hpi. Pro Versuchsansatz wurden bis zu drei

## MATERIAL UND METHODEN

mal im Abstand von drei bis vier Stunden Embryonen gewonnen. Die entnommenen 4-, frühen 8- und 16-Zeller waren maximal vier Stunden, die späten 8-Zeller zehn bis fünfzehn Stunden alt.

Im dritten Versuchsabschnitt erfolgte nur eine Entnahme von Embryonen pro Versuchsgruppe. Hierbei wurde der Entnahmezeitpunkt für die 4-Zeller auf 45 hpi, für die frühen 8-Zeller auf 50 hpi, für die späten 8-Zeller auf 62 hpi sowie für die 16-Zeller auf 70 hpi festgelegt (Abb. 7). Bei der Entnahme waren die frühen 8-Zeller maximal sechs Stunden, die späten 8-Zeller zwölf bis achtzehn Stunden alt. Das Alter der 4- und 16-Zeller ist unbekannt.

Im vierten Versuchsabschnitt wurden pro Versuchsgruppe zwei mal Embryonen im Abstand von vier Stunden entnommen, wobei die Erstentnahmezeitpunkte und somit das maximale Alter der einzelnen Entwicklungsstadien denen aus Versuchsabschnitt 3 entsprachen. Bei der zweiten Entnahme waren alle entnommenen Entwicklungsstadien jeweils maximal vier Stunden alt und die Einwirkzeit des Inhibitors dementsprechend jeweils um vier Stunden verlängert (Abb. 7).

Der Entwicklungsstand der entnommenen Embryonen aus Versuchsabschnitt 2 und 4 wurde bei der anschließenden Untersuchung unter dem Laserscanningmikroskop (LSM) nochmals überprüft. Unter Berücksichtigung von Zwischenstadien erfolgte eine erweiterte Einteilung dieser Embryonen in die Gruppen 4-Zeller, 6-Zeller, frühe 8-Zeller, späte 8-Zeller, 10/12/14-Zeller und 16/18-Zeller (siehe auch Abb. 6 sowie Kapitel 4.2).

Abb. 7 zeigt eine Übersicht über die Zeitpunkte von Inhibitorzugabe und Embryonenentnahme bei den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in Versuchsabschnitt 3 und 4.

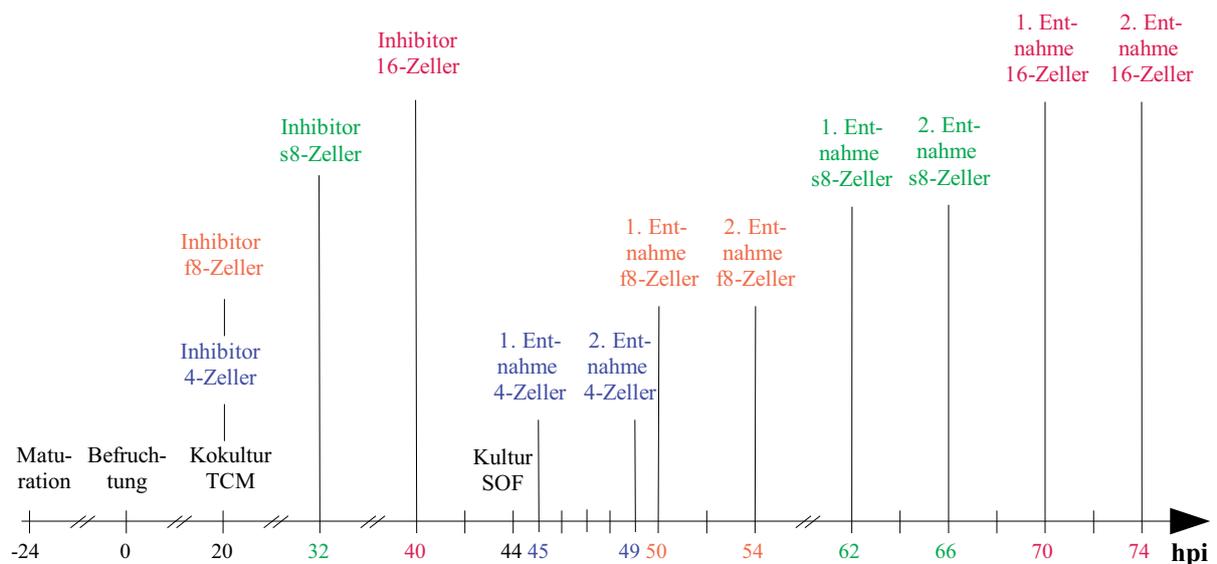


Abb. 7: Inhibitorzugabe und Embryonenentnahme in Versuchsabschnitt 3 und 4

### 3.3.3 Elektrophorese und Westernblot

Für Versuchsabschnitt 1 und 3 wurden die entnommenen Embryonen in Polyvinyl-Alkohol (Fa. Sigma, Steinheim) sowie zweimal in proteinfreier PBS (Phosphate Buffered Saline/phosphatgepufferte Salzlösung, Fa. Sigma, Steinheim, siehe Anhang) gewaschen, um alle Proteinreste zu entfernen. Anschließend wurden je 25 Embryonen gepoolt und in 3-8 µl proteinfreier PBS in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Untersuchung mittels Westernblot auf GBC, N-PBC und C-PBC wurde am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf durchgeführt. Der Transport erfolgte auf Trockeneis (Fa. Cleanas, Willingen).

Zur Durchführung der Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970; SDS-PAGE) wurden die Proben in SDS Loading-Puffer (Blue Loading Buffer Pack, Fa. Cell Signaling Technology®, USA) gemäß Herstellerangaben lysiert, zur Denaturierung für 2 Minuten bei 95° C gekocht, anschließend zentrifugiert und auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der unterschiedlichen Proteine wurde ein Marker (ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa), New England BioLabs) aufgetragen. Als Sammelgel diente ein 5%iges, als Trenngel ein 10%iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel (30:0,8). Die Herstellungsvorschriften für Sammelgel, Trenngel und Elektrophorese-Laufpuffer finden sich im Anhang. Die Elektrophorese wurde für den Vorlauf mit 20 mA gestartet und nach Erreichen des Trenngels bei 30 mA weitergeführt. Die Elektrophoresedauer betrug ca. 80 Minuten.

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine gemäß der Methode nach TOWBIN et al. (1979) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Sandwich-Blot (Elektroblotter Fa. Thermo Scientific; Schichtung von 3 Lagen Blotpapier, Elektrophoresegel, PVDF-Membran, 3 Lagen Blotpapier) bei 1 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche für eine Stunde unter Verwendung des Transferpuffers nach Towbin (siehe Anhang). Das anschließende Blocken der Membran sowie die Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern erfolgte unter dem Einsatz des SNAP i.d.-Systems der Firma Millipore. Die genaue Vorgehensweise wurde den Herstellerangaben entnommen, eine Übersicht findet sich im Anhang. Zum Blocken wurde 0,5% fettfreie Trockenmilch (Firma Roth, Karlsruhe) verwendet.

Folgende Antikörper (AK) kamen als Erstantikörper zum Einsatz:

## MATERIAL UND METHODEN

	Produktbezeichnung	Zielprotein und Bindungsstellen
AK1	$\beta$ -Catenin Antibody 9562 (Fa. Cell Signaling Technology®, USA)	GBC; Bindung in der Region um Ser37
AK2	Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41) Antibody 9561 (Fa. Cell Signaling Technology®, USA)	N-PBC; Bindung in der Region um Ser33 bis Thr41
AK3	$\beta$ -Catenin Antibody (Amino-terminal Antigen) 9581 (Fa. Cell Signaling Technology®, USA)	GBC; Bindung in der Region um Asp56
AK4	Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser552) Antibody 9566 (Fa. Cell Signaling Technology®, USA)	C-PBC; Bindung in der Region um Ser552

Als Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler Anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper (monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody, Fa. Sigma, Steinheim) verwendet. Als zweiter Antikörper für alle Zielproteine diente ein Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugiertes Ziegen-anti-Kaninchen Immunglobulin G (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 7074, Fa. Cell Signaling Technology®, USA). Für die jeweiligen Waschgänge vor und nach dem Blocken sowie nach der Inkubation mit dem ersten und zweiten Antikörper wurde Tris Buffered Saline-Tween (TBS-T) als Waschpuffer verwendet (siehe Anhang).

Mit Hilfe eines ECL (enhanced chemiluminescence)-Detektionsreagenzes wurden die Proteinbanden anschließend auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, Fa. GE Healthcare) exponiert und entwickelt (Entwickler und Fixierer Fa. Kodak). Herstellung und Anwendung des ECL-Detektionsreagenzes sind ebenfalls im Anhang beschrieben. Die Digitalisierung der Filme erfolgte mit dem Camilla Camera System (Fa. Raytest, Straubenhardt). Die optische Dichte der Banden wurde mit Hilfe der Aida 1D Software der Firma Raytest evaluiert.

Zur Aufarbeitung der verschiedenen spezifischen Antikörper wurden die Membranen jeweils nach dem Entwickeln mit einem Stripping Buffer (Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer, Fa. Thermo Scientific) nach Herstellervorschrift für 6-8 Minuten gestrippt, bevor sie erneut geblockt und mit den neuen Antikörpern inkubiert wurden.

### 3.3.4 Immunhistochemische Färbung und Auswertung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie

Für die in Versuchsabschnitt 2 und 4 durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden die entnommenen Embryonen in proteinfreier PBS gewaschen, in 3%igem Paraformaldehyd mit Zusatz von 2% Saccharose bei 4°C fixiert, nach zweimaligem Waschen in proteinfreier PBS für 5 Minuten bei 0°C permeabilisiert und nach zweimaligem Waschen im

Waschpuffer mPBS (modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1:50 mit destilliertem Wasser (Fa. Sigma, Steinheim) verdünnter Roti®-ImmunoBlock Blockierungsreagenz (Fa. Roth, Karlsruhe) geblockt. Die Herstellungsvorschriften des Paraformaldehyds, des Permeabilisierungspuffers, des Waschpuffers mPBS sowie der verdünnten Roti®-ImmunoBlock Blockierungsreagenz finden sich im Anhang. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Zum Einsatz kamen hierbei AK1, AK2 oder AK4 (siehe Kapitel 3.3.3). Nach viermaligem Waschen in mPBS erfolgte eine fünfstündige Inkubation mit Alexa Fluor® 546 markiertem Ziegen anti-Kaninchen-IgG-Fragment (Alexa Fluor® 546 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L), Fa. Molecular Probes, USA) als Zweitantikörper im Dunkeln bei Raumtemperatur. Ein Teil der Embryonen wurde jeweils nur mit dem Zweitantikörper inkubiert und diente als Kontrolle für dessen Spezifität. Alle Antikörper wurden vor ihrer Verwendung 1:100 mit „Roti 1:100“ (= 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnte Roti®-ImmunoBlock Blockierungsreagenz, siehe Anhang) verdünnt. Nach viermaligem Waschen in mPBS erfolgte die Kerngegenfärbung mit 1:300 mit „Roti 1:100“ verdünntem SYBR® Green I nucleic acid gel stain (Fa. Molecular Probes, USA) über zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach nochmaligem viermaligem Waschen in mPBS und anschließender Fixierung in 2%igem Paraformaldehyd über Nacht bei 4°C wurden die Embryonen einzeln in Glyceringelantine eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte mittels eines konfokalen Laserscankopfes (LSM 5 Pascal, Fa. Zeiss, Jena) am inversen Mikroskop (Axiovert 200M, Fa. Zeiss, Jena). Zur Fluoreszenzanregung wurden zwei verschiedene Laser verwendet: ein Argon-Laser bei 488 nm (30 mW) und ein HeNe-Laser bei 543 nm (1mW). Die Bildstapel (3D-Stacks,  $\Delta z=2 \mu\text{m}$ ) wurden mit Hilfe eines Objektivs 40x (Öl) und der Software Zen 2007 sp1 (Fa. Zeiss, Jena) aufgenommen. Die Scanauflösung betrug 1024x1024 Pixel. Die 3D-Verteilungsanalyse und Intensitätsmessung erfolgte teilautomatisiert mit Hilfe der Software AnalySIS 3.2 (Fa. Soft-Imaging-Systems (SIS), Münster) mit einem selbst angepassten Software Plug-In (Macro) (POEHLAND et al. 2008).

### **3.4 Versuchsabschnitt 5: Live Cell Imaging und FRAP-Analysen von YFP-Catenin**

Um das Translokationsverhalten von  $\beta$ -Catenin innerhalb des Embryos analysieren zu können, wurde im 5. Versuchsabschnitt eine Überexpression von YFP-markiertem  $\beta$ -Catenin durch Injektion eines entsprechenden Plasmids erzeugt. Die YFP-Lokalisation wurde während der Entwicklung vom 4- zum 16-Zellembryo mittels Live Cell Imaging beobachtet. FRAP-Analysen dienen zum Nachweis des zeitlichen Verlaufs der Translokationsprozesse.

### 3.4.1 Transformation und Präparation der Plasmid-DNA

Das für diesen Versuchsabschnitt verwendete YFP-Catenin-Plasmid wurde uns von Prof. Dieter Weiss und Dr. Benjamin Bader (Biowissenschaften, Universität Rostock) zur Verfügung gestellt. Zum Zweck der Plasmid-Vermehrung wurde die Plasmid-DNA zunächst in für eine Aufnahme kompetente E.coli-Zellen transformiert. Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA basierend auf einer von BIRNBOIM und DOLY (1979) publizierten Präparationstechnik.

Zum Zweck der Transformation wurde das Plasmid zu einer bei Raumtemperatur aufgetauten und anschließend auf Eis gestellten E.coli-Zellsuspension gegeben (max. 20 µg auf 200 µl) und kurz gemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis sowie eine 90-minütige Inkubation bei 42°C. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder auf Eis gestellt, mit 400 µl lysogeny broth (LB)-Medium (Fa. Sigma, Steinheim) versehen und für ca. 25 Minuten bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation der Zellen bei 7000 rpm in der Eppendorfszentrifuge wurden 500 µl Medium abgenommen. Die Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und auf einer LB/Ampicillin-Platte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die anschließende Präparation der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung eines Plasmid-Kits der Firma Qiagen. Einzelne Bakterienkolonien wurden gepickt und in 5 ml LB-Medium, das mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war, über Nacht bei 37°C im Kulturröhrchen geschüttelt. Anschließend wurden 1,5 ml dieser Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 20 Sekunden in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 100 µl Qiagen P1 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Qiagen P2 Puffer (200 nM NaOH, 1% SDS) wurde invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Qiagen P3 Puffer (3 M KOAc, pH 5,5) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge (14000 rpm, 10 Minuten) wurde der Überstand auf eine mit 1 ml Qiagen QBT Puffer (750 nM NaCl, 50 nM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol) gewaschene Qiagen tip20-Säule verbracht. Nach viermaligem Waschen mit 1 ml Qiagen QC Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol) wurde die auf der Säule gebundene DNA mit 0,8 ml Qiagen QF Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15% Ethanol) eluiert. Die DNA wurde nach Zugabe von 560 µl Isopropanol (0,7 Volumen) durch 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm in der Eppendorfszentrifuge ausgefällt und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die nunmehr hochreine DNA wurde in 20 µl Wasser oder Tris-EDTA-Puffer gelöst und konnte nun in die Embryonen injiziert werden.

### 3.4.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Nikon Diaphot 200 als Mikroskop, Eppendorf TransferMan NK2 als Mikromanipulator) durchgeführt.

Die Plasmid-Injektion erfolgte im 4-Zellstadium in zwei der vier Blastomeren des Embryos. In die beiden anderen Blastomeren wurde Puffer (PBS) injiziert, sie dienten als Kontrolle. Der Embryo wurde mittels einer Haltepipette fixiert. Für die Plasmid-Injektion wurde aus einem kleinen Tröpfchen Plasmid-DNA unter Öl mit der Injektionspipette ca. 5  $\mu$ l Volumen aufgenommen. Die Pipette wurde in das Zytoplasma eingeführt. Anschließend wurde der Druck in der Pipette um so viel und so lange erhöht, bis im Phasenkontrast eine Einströmung sichtbar war. Die Injektion der beiden anderen Blastomeren mit PBS wurde analog durchgeführt. Im Anschluss an die Injektion erfolgte eine ca. eineinhalbtägige Kultur der Embryonen.

### 3.4.3 Konfokale Bildaufnahme und FRAP-Analysen

Nach der Kultur der Embryonen wurde zunächst mittels konfokaler Bildaufnahme erfasst, ob bzw. wie viele Blastomeren ein YFP-Signal aufwiesen und wie hoch die Fluoreszenzintensität war. Diese Analyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscankopfes (LSM 5 Pascal, Fa. Zeiss, Jena) am inversen Mikroskop (Axiovert 200M, Fa. Zeiss, Jena). Für die Anregung von YFP wurde ein Argon-Laser, der auf eine Wellenlänge von 514 nm und auf 10% seiner maximalen Leistung von 30 mW eingestellt war, verwendet. Der Detektionsbereich der Fluoreszenz von YFP betrug 530-580 nm.

Nach dieser ersten Bildaufnahme, also dem Erfassen der Ausgangssituation, erfolgte im Rahmen der FRAP-Analysen das Bleichen jeweils einer von zwei festgelegten ROIs (regions of interest) im Embryo: RIO 1 war auf einen rechteckigen Bereich über dem Zellkern beschränkt und diente der spezifischen Messung der auf Translokation beruhenden Fluoreszenzwiederherstellung (Recovery), ROI 2 erstreckte sich über das gesamte Gesichtsfeld bzw. über den gesamten Embryo und diente als Kontrolle der Recovery ohne Translokationsmöglichkeit. Das Bleichen der ROIs erfolgte unter Verwendung des oben beschriebenen Argon-Lasers über 3 Minuten (2 Zyklen pro Sekunde) bei 100% Laserleistung (30 mW). Unmittelbar im Anschluss an das Bleichen erfolgte eine erneute Bildaufnahme, gefolgt von Zeitreihenaufnahmen im Takt von einer (ROI 1) bzw. 30 (ROI 2) Minuten bis zur vollständigen Recovery. Hierbei wurden die Parameter wie für die Ausgangssituation (s.o.) gesetzt. In diesem Versuch wurde eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität auf 15% der Ausgangssituation als erfolgreiches Bleichen und das Erreichen von 85% des Ausgangswertes als erfolgreiche Recovery gewertet. Die Auswertung der Bildstapel erfolgte mit Image J 1.3 und

dem Plug-In Time Series Analyzer 2.0. Im Unterschied zu den unter Kapitel 3.3.4 durchgeführten LSM-Messungen wurden hier keine 3D-Stapel aufgenommen, die Schärfenebene wurde konstant belassen.

Während der relativ kurzen Zeit der Messungen befanden sich die Embryonen in einem auf dem Laserscanningmikroskop angebrachten Mikroskopinkubator XL3-LSM (Fa. Zeiss, Jena). Die Temperatur im Inkubator und in der Kammer auf dem Mikroskoptisch betrug 37°C. Der CO<sub>2</sub>-Gehalt war in der Kammer auf dem Mikroskoptisch auf 5% reduziert, die Luft wurde durch Befeuchtung des zugeführten Gasgemisches passiv befeuchtet.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen zur Erstellung von Diagrammen wurde in Excel durchgeführt. Alle weiteren statistischen Auswertungen erfolgten am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf mit Hilfe der Statistik-Software SAS (Version 9.2). Zum Vergleich der Fluoreszenzen in den einzelnen Zellkompartimenten wurde bei Vorliegen der entsprechenden Voraussetzungen (Varianzhomogenität und Normalverteilung) ein einseitiger t-Test, ansonsten der Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Der Einfluss von Inhibitorkonzentration und Entwicklungsstadium wurden mittels einseitiger Varianzanalysen (ANOVA) bzw. alternativ mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests überprüft. Bei Vorliegen von Signifikanzen wurde ein paarweiser Mehrfachvergleich mit Hilfe des Student Newman Keuls Tests bzw. des Dunn's Tests durchgeführt.

In dieser Studie wurden ermittelte Unterschiede zwischen Versuchsgruppen bei einem P-Wert < 0,05 als statistisch signifikant betrachtet und in den zugehörigen Diagrammen mittels verschiedener Buchstaben gekennzeichnet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 In-vitro-Produktion der Embryonen**

Zur Produktion der für die Versuche benötigten IVP-Embryonen wurden insgesamt 26318 Cumulus-Oozyten-Komplexe verwendet.

Um die Funktionalität unseres IVP-Systems zu überprüfen, wurde pro Versuchsansatz 44 Stunden nach der Befruchtung der Eizellen deren Teilungsrate ermittelt. Hierzu wurde die Anzahl aller Embryonen, die zu diesem Zeitpunkt mindestens zwei Blastomeren aufwiesen, ins Verhältnis zur Gesamtanzahl der eingesetzten Eizellen gesetzt. Die durchschnittliche Teilungsrate betrug 69,43 %.

Da aufgrund des Versuchsaufbaus der Großteil der Embryonen schon vor Erreichen des Blastozystenstadiums entnommen wurde, konnte keine aussagefähige Blastozystenrate ermittelt werden.

### **4.2 Entnahme der Embryonen und Einteilung der Entwicklungsstadien**

Bei der Entnahme der Embryonen aus dem Kulturmedium wurden nur die klassischen Entwicklungsstadien 4-Zeller, 8-Zeller und 16-Zeller berücksichtigt. Die Einteilung in die entsprechenden Entwicklungsgruppen erfolgte primär nach Kulturdauer und sekundär nach der erkennbaren Anzahl an Blastomeren. Die 8-Zeller wurden zusätzlich entsprechend ihrer Kulturdauer in frühe und späte 8-Zeller unterteilt, eine morphologische Unterscheidung dieser beiden Gruppen war unter dem Stereomikroskop nicht möglich. Für Versuchsabschnitt 1 bis 4 wurden insgesamt 816 4-Zeller, 1290 frühe 8-Zeller, 1391 späte 8-Zeller und 1004 16-Zeller entnommen.

Unter dem LSM kann mit Hilfe der Kernfärbung die genaue Anzahl der Blastomeren zuverlässiger bestimmt werden als unter dem Stereomikroskop. Zudem ist es möglich festzustellen, ob der Embryo bereits kompaktiert ist. Aus diesen Gründen wurden die für Versuchsabschnitt 2 und 4 entnommenen Embryonen nochmals unter dem LSM auf ihren Entwicklungsstand hin überprüft und gegebenenfalls neu eingeteilt. Hierbei wurden anhand der Blastomerenzahl neben den klassischen Entwicklungsstadien auch Zwischenstadien (6-, 10-, 12-, 14- und 18-Zellembryonen) berücksichtigt. Die Unterscheidung von frühen und späten 8-Zellern wurde anhand der Kompaktierung durchgeführt, wobei unkompaktierte Embryonen als frühe und kompaktierte Embryonen als späte 8-Zeller eingestuft wurden.

Als Basis für die weiteren Auswertungen wurde die unter dem LSM durchgeführte Zuordnung der Embryonen verwendet. Aufgrund geringer Embryonenzahlen wurden die als 10-, 12- und 14-Zeller identifizierten Embryonen einerseits sowie die 16- und 18-Zeller andererseits zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

Der Entwicklungsstand der für den Westernblot (Versuchsabschnitt 1 und 3) entnommenen Embryonen konnte aufgrund des Versuchsablaufs nicht zusätzlich unter dem LSM überprüft werden, so dass hier die unter dem Stereomikroskop durchgeführte Einteilung beibehalten wurde.

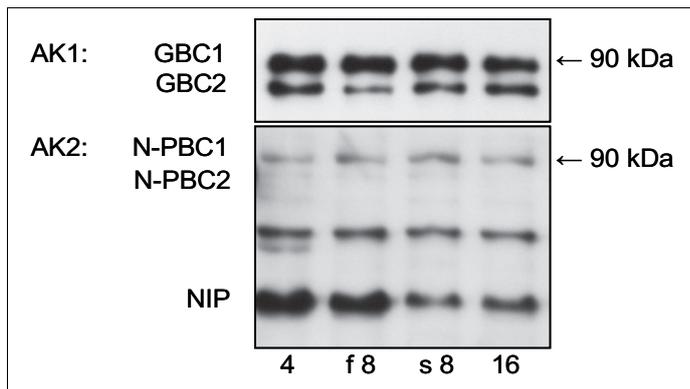
### **4.3 Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

#### **4.3.1 Proteinlevels im Westernblot**

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, ob und gegebenenfalls wann es im Verlauf der frühen präimplantatorischen Embryonalentwicklung zu Veränderungen im Proteinlevel von GBC und insbesondere von N-PBC kommt. Hierfür wurden in allen betrachteten Entwicklungsstadien mittels Westernblot die Levels von N-PBC und GBC untersucht. Zur Darstellung von GBC wurde AK1, zur Darstellung von N-PBC AK2 eingesetzt. Beide Antikörper binden innerhalb derselben Region am N-terminalen Ende von  $\beta$ -Catenin (siehe Kapitel 3.3.3).

AK1 lieferte im Molekularbereich von intaktem  $\beta$ -Catenin (Bereich um 90 kDa) zwei Banden unmittelbar übereinander, wobei die obere etwas stärker ausgeprägt war als die untere. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zwei Varianten von  $\beta$ -Catenin (GBC1 und GBC2). Eine genauere Abklärung erfolgte in Versuchsabschnitt 3 durch den Einsatz weiterer Antikörper (siehe Kapitel 4.6.1).

AK2 lieferte im entsprechenden Molekularbereich bei genauer Betrachtung ebenfalls zwei Banden, wobei die obere (N-PBC1) im Vergleich zu GBC1 nur schwach ausgeprägt und die untere (N-PBC2) nahezu nicht sichtbar bzw. messbar war und aus diesem Grund auch nicht weiter beachtet werden konnte. Darüber hinaus ließ sich noch eine zusätzliche, wesentlich deutlicher ausgeprägte Bande im niedrigeren Molekularbereich ausmachen, deren Herkunft unbekannt ist. Dieses noch nicht identifizierte Protein wird im Folgenden als NIP (nicht identifiziertes Protein) bezeichnet. In Abb. 8 sind die durch AK1 und AK2 angezeigten Proteinbanden dargestellt.

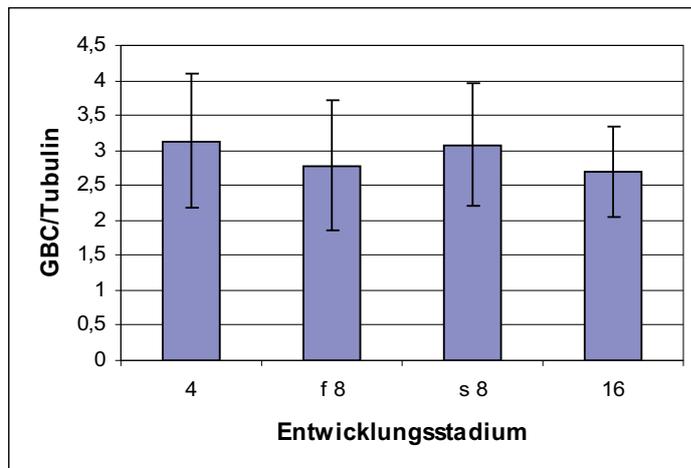


**Abb. 8: Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK2**

Die mittlere, unbeschriftete Bande bei AK2 trat nur sporadisch auf und wird im Weiteren nicht beachtet.

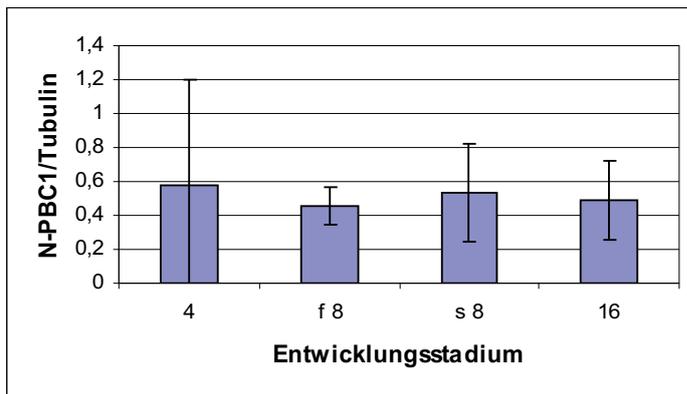
Die Abundanzen von GBC1, GBC2, deren Summe (GBC) sowie die Abundanz von N-PBC1 zeigten im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16-Zellstadium keine signifikante Unterschiede (Abb. 9 und 10). Die entsprechenden Proteinlevels wiesen demnach eine konstant bleibende Höhe auf.

Im Fall von NIP traten ebenfalls keine signifikante Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien auf. Allerdings ließ sich tendenziell eine Abnahme der Abundanz im Entwicklungsverlauf erkennen (Abb. 11).



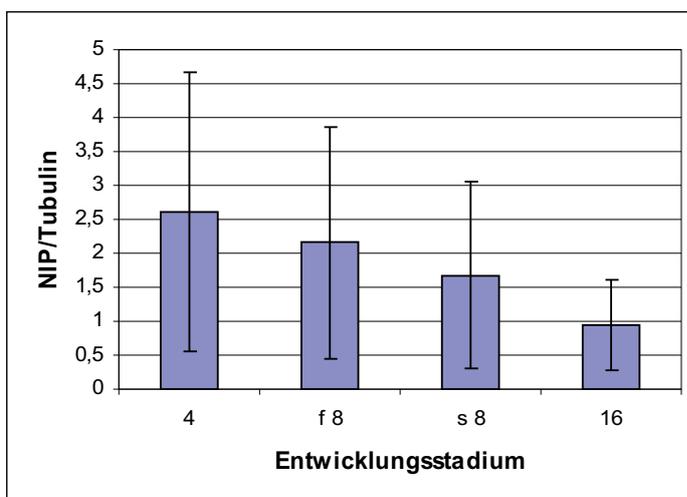
**Abb. 9: Westernblot: Abundanz von GBC in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

keine statistisch signifikanten Unterschiede



**Abb. 10: Westernblot: Abundanz von N-PBC1 in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

keine statistisch signifikanten Unterschiede



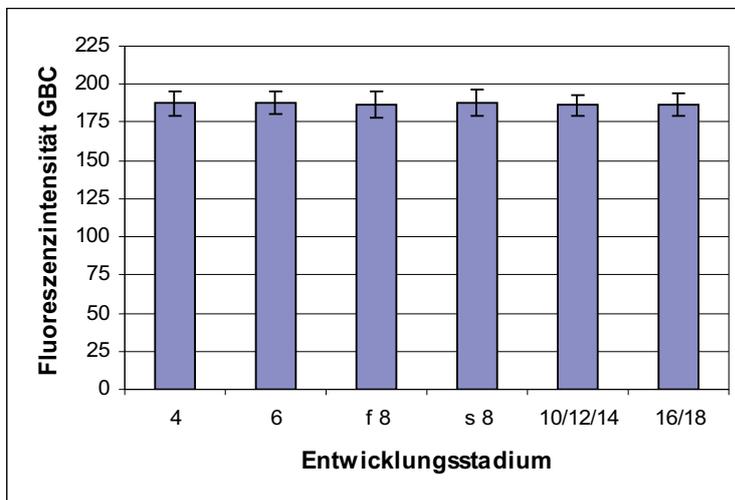
**Abb. 11: Westernblot: Abundanz von NIP in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

tendenzielle Abnahme im Entwicklungsverlauf, statistisch nicht signifikant

#### 4.3.2 Mittlere Fluoreszenzintensität im LSM

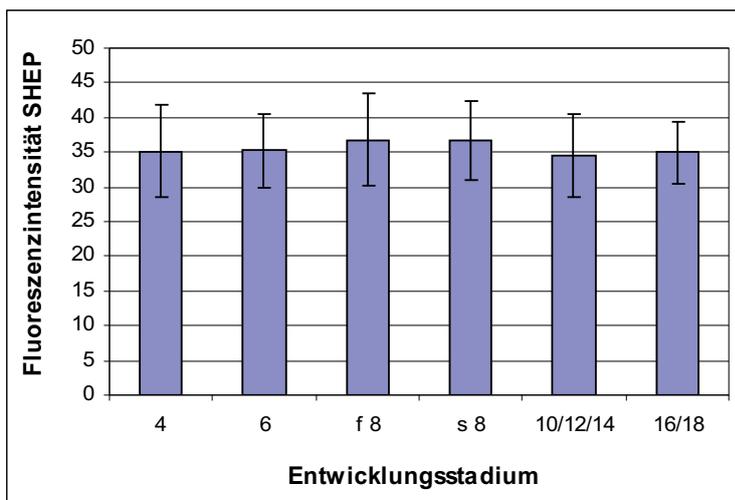
Als Vergleich zum Westernblot wurde im zweiten Versuchsabschnitt unter anderem die mittlere Fluoreszenzintensität der durch AK1 und AK2 angezeigten Proteine in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien bestimmt und deren Verlauf während der Entwicklung vom 4- zum 16/18-Zellstadium betrachtet. Dabei konnten allerdings im Gegensatz zum Westernblot die durch jeweils denselben AK angezeigten Proteine nicht getrennt dargestellt werden. Deshalb entsprechen die gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte im Fall von AK1 der Summe aus GBC1 und GBC2, die im Folgenden als GBC bezeichnet wird, und im Fall von AK2 der Summe aus N-PBC1, N-PBC2 und NIP, die im Folgenden als SHEP (Summe homologer Epitope aufweisender Phosphoproteine) bezeichnet wird.

Die in diesem Versuchsabschnitt erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen des Westernblots: Weder für GBC noch für SHEP ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den betrachteten Entwicklungsstadien, vielmehr hielten sich die mittleren Intensitätswerte im Verlauf der Entwicklung der Embryonen konstant (Abb. 12 und 13).



**Abb. 12: LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von GBC im Gesamtembryo in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

keine statistisch signifikanten Unterschiede



**Abb. 13: LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von SHEP im Gesamtembryo in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

keine statistisch signifikanten Unterschiede

#### 4.4 Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

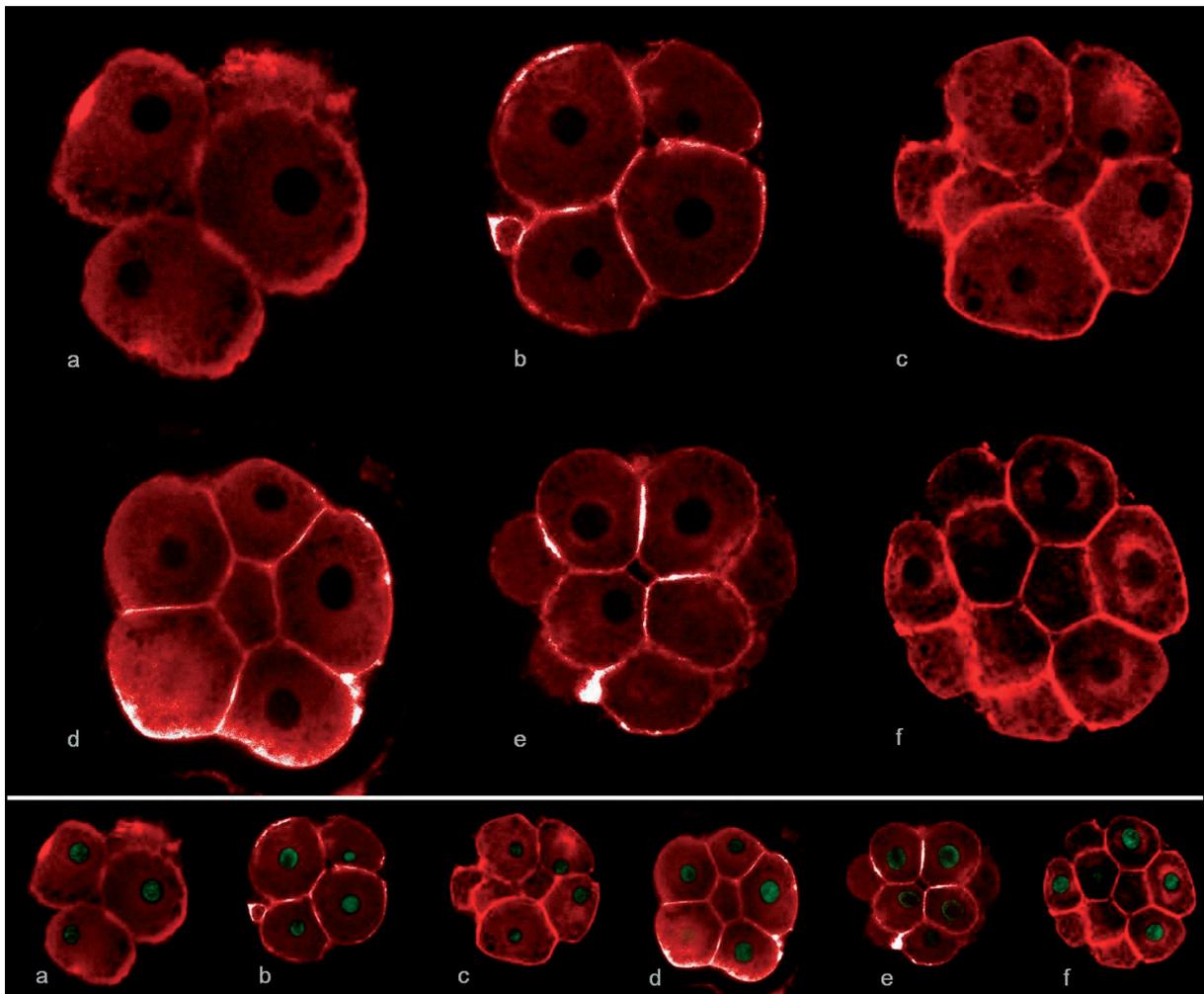
In der folgenden Auswertung sollte die Verteilung von GBC und SHEP auf die einzelnen Zellkompartimente Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern im Verlauf der Entwicklung vom 4- zum 16/18-Zeller dargestellt werden. Hierzu wurden zunächst die Fluoreszenzintensitätswerte für jedes Entwicklungsstadium und jedes Zellkompartiment separat bestimmt und anschließend miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte eine Betrachtung des Verteilungsmusters

## ERGEBNISSE

von GBC und SHEP innerhalb der einzelnen Zellkompartimente. Hierbei wurde zwischen einem zentralen, diffusen und zonalen Verteilungsmuster unterschieden. Darüber hinaus führende Verteilungsmuster wurden gesondert betrachtet.

### *GBC*

In der Laserscanningmikroskopie wies das durch AK1 detektierte GBC in allen untersuchten Entwicklungsstadien in der Zellmembran mit Abstand die höchste Fluoreszenzintensität auf. Im Zytoplasma zeigte sich ein wesentlich schwächeres Signal, im Zellkern war es optisch nahezu nicht zu erkennen (Abb. 14).

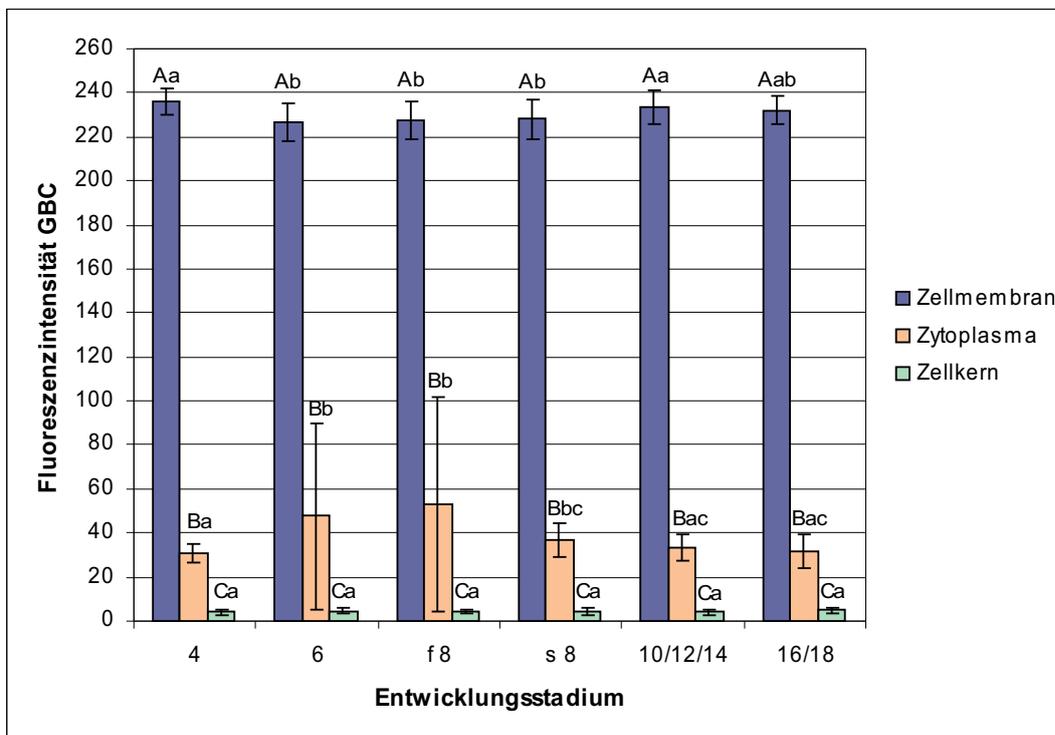


**Abb. 14: LSM: Fluoreszenzverteilung von GBC im Entwicklungsverlauf**

a: 4-Zeller   b: 6-Zeller   c: früher 8-Zeller   d: später 8-Zeller   e: 10-Zeller   f: 16-Zeller  
oben: Kernfärbung zur besseren Beurteilung des Zellkerns ausgeblendet  
unten: Kernfärbung (grün) zur besseren Orientierung eingeblendet

Diese Intensitätsunterschiede zwischen den drei Zellkompartimenten erwiesen sich in jedem Entwicklungsstadium als statistisch signifikant (Abb. 15, Großbuchstaben).

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzintensität von GBC im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium ließen sich in der Zellmembran im 6-, frühen 8- und späten 8-Zellstadium signifikant niedrigere Intensitätswerte als im 4- und 10/12/14-Zellstadium nachweisen. Demnach kam es hier zu einem Absinken und neuerlichen Anstieg des GBC-Gehalts. Umgekehrte Verhältnisse herrschten im Zytoplasma vor. Hier kam es im 6-Zellstadium zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität, der bis zum frühen 8-Zellstadium anhielt, bevor die Werte ab dem späten 8-Zellstadium wieder sanken. Allerdings konnten diese hier beobachteten Intensitätsschwankungen innerhalb eines Zellkompartiments durch die im Rahmen von Versuchsabschnitt 4 (siehe Kapitel 4.7) durchgeführten Messungen nicht bestätigt werden. Im Zellkern waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien zu erkennen (Abb. 15, Kleinbuchstaben).



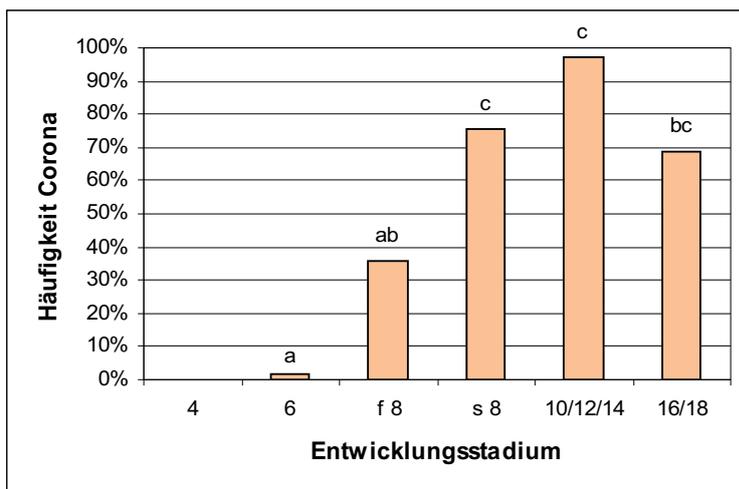
**Abb. 15: LSM: Fluoreszenzintensität von GBC in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B, A:C, B:C ( $p < 0,05$ )

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Zellkompartiments: a:b, a:c, b:c ( $p < 0,05$ )

## ERGEBNISSE

Was die Verteilung innerhalb der einzelnen Zellkompartimente betrifft, zeigte GBC prinzipiell in allen untersuchten Entwicklungsstadien in der Zellmembran stets ein zentrales, in Zytoplasma und Zellkern ein diffuses Verteilungsmuster. Allerdings trat im Zytoplasma abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium eine Besonderheit auf: Einige Embryonen wiesen eine ringförmige Verdichtung der Fluoreszenz um den Zellkern herum auf (Abb. 14). Diese Fluoreszenzverdichtung wird im Folgenden als Corona bezeichnet. Der Anteil von Embryonen mit Corona variierte je nach Entwicklungsstadium (Abb. 16). Während im 4-Zellstadium bei keinem der untersuchten Embryonen eine Corona zu finden war, wies ein kleiner Anteil der 6-Zeller (1,9%) diese bereits auf. Im frühen 8-Zellstadium stieg dieser Anteil auf 36,0% und im späten 8-Zellstadium auf 75,6% an. Der Höhepunkt lag mit 97,4% in der Gruppe der 10- bis 14-Zeller, bevor die Wahrscheinlichkeit einer Coronausbildung im 16/18-Zellstadium wieder auf 68,6% sank. Der Anstieg der Häufigkeit war zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium signifikant. Das Absinken im 16/18-Zellstadium war statistisch nicht signifikant und konnte auch durch die in Versuchsabschnitt 4 durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden (siehe Abb. 35).



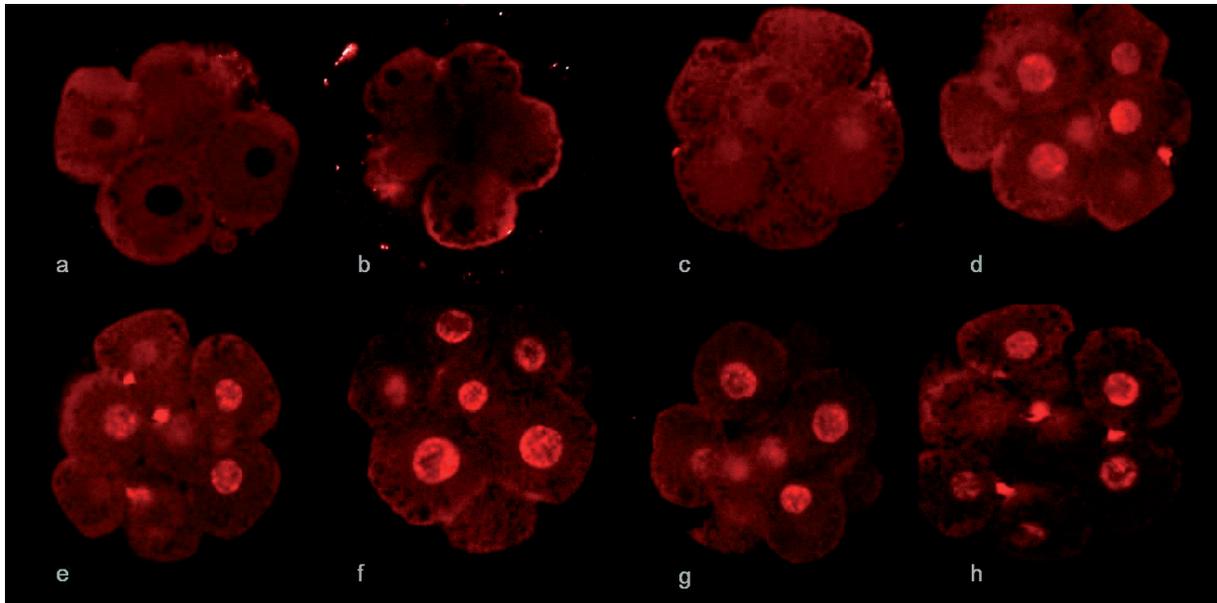
**Abb. 16: LSM: Häufigkeit des Auftretens einer Corona im perinukleären Bereich des Zytoplasmas bei GBC in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede: a:b, a:c, b:c ( $p < 0,05$ )

### ***SHEP***

Im Fall von SHEP konnte die für GBC typische Fluoreszenzanreicherung in der Zellmembran nicht festgestellt werden, Zellmembran und Zytoplasma waren nicht voneinander abgrenzbar. Durch die hier im Vergleich zu GBC gewählte höhere Verstärkung des Fluoreszenzsignals war

es möglich, SHEP auch im Zellkern einiger Embryonen deutlich sichtbar nachzuweisen. Der Anteil von Embryonen mit einem entsprechenden Signal im Zellkern sowie die Intensität dieses Signals stieg im Entwicklungsverlauf an (Abb. 17).

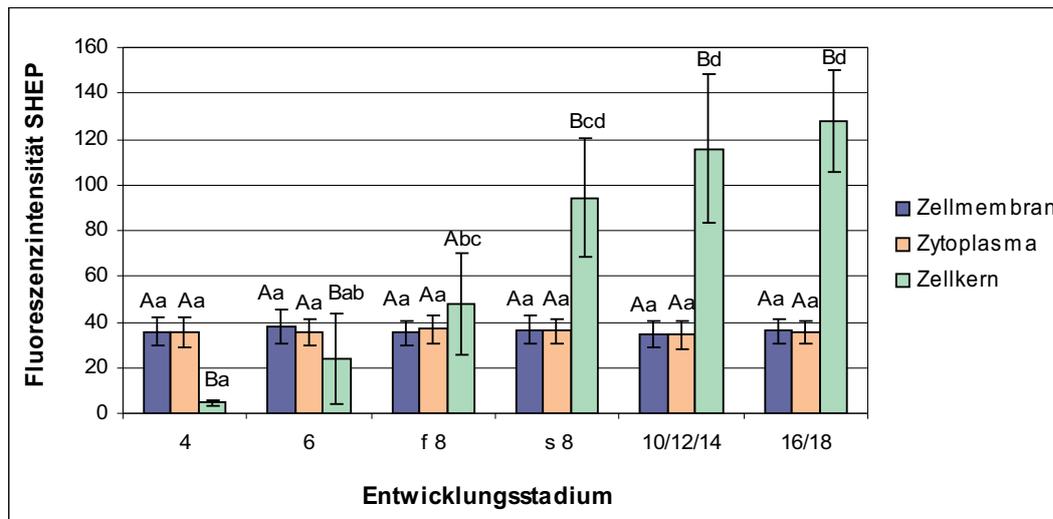


**Abb. 17: LSM: Fluoreszenzverteilung von SHEP im Entwicklungsverlauf**

a: 4-Zeller      b: 6-Zeller      c: früher 8-Zeller      d: später 8-Zeller  
 e: 10-Zeller      f: 12-Zeller      g: 14-Zeller      h: 16-Zeller

Die Intensitätsmessungen ergaben, dass in jedem der untersuchten Entwicklungsstadien die Fluoreszenzintensitätswerte von SHEP in Zellmembran und Zytoplasma annähernd gleich hoch waren. Unterschiede ergaben sich allerdings im Vergleich zum Zellkern. Hier war die Fluoreszenzintensität im 4- und 6-Zellstadium signifikant niedriger als in Zellmembran und Zytoplasma, während ab dem späten 8-Zellstadium signifikant höhere Werte nachweisbar waren. Im frühen 8-Zellstadium ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Zellkompartimenten erkennen (Abb.18, Großbuchstaben).

Im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium waren weder in der Zellmembran noch im Zytoplasma signifikante Unterschiede bzgl. der Fluoreszenzintensität von SHEP zu beobachten. Demgegenüber war im Zellkern, wie bereits angedeutet, ein stetiger Anstieg der Intensitätswerte zu verzeichnen. Dieser Anstieg war zwar zwischen zwei direkt aufeinander folgenden Entwicklungsstadien nicht signifikant, wohl aber zwischen dem 4- und frühen 8-, dem 6- und späten 8- sowie dem frühen 8- und 10/12/14-Zellstadium (Abb.18, Kleinbuchstaben).

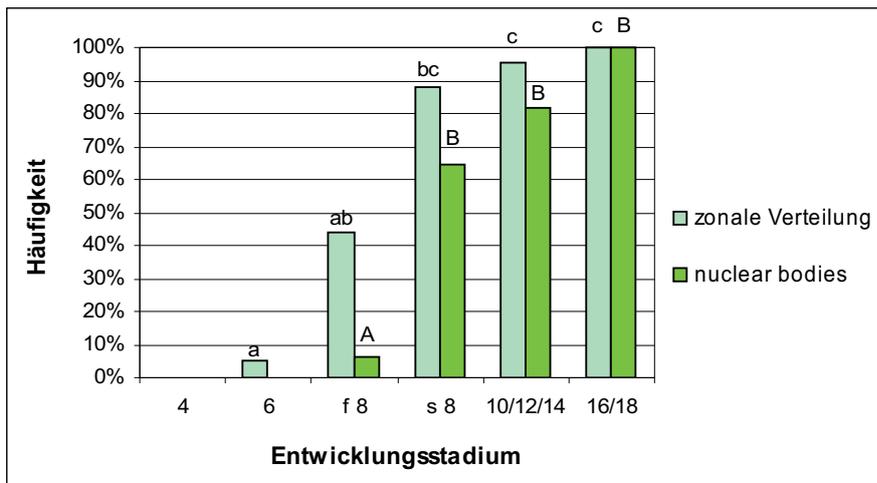


**Abb. 18: LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ )

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Zellkompartiments: a:b; a:c, a:d, b:c, b:d, c:d ( $p < 0,05$ )

Die Fluoreszenzverteilung von SHEP wies in Zellmembran und Zytoplasma in allen untersuchten Entwicklungsstadien ein diffuses Muster auf. Unterschiede ergaben sich für die Fluoreszenzverteilung im Zellkern. Hier konnte man ein diffuses oder zonales Verteilungsmuster finden, wobei die Häufigkeit von Letzterem mit zunehmendem Entwicklungsstadium anstieg. Zonale Verteilungsmuster traten erstmals im 6-Zellstadium mit einer Wahrscheinlichkeit von 5,4% auf. Diese Wahrscheinlichkeit stieg im frühen 8-Zellstadium auf 43,8% und im späten 8-Zellstadium auf 88,2% an. In der Gruppe der 10- bis 14-Zeller betrug sie 95,5%, im 16/18-Zellstadium wiesen schließlich 100% der untersuchten Embryonen ein zonales Verteilungsmuster im Zellkern auf. Der Anstieg der Wahrscheinlichkeit für ein zonales Verteilungsmuster war zwischen 6- und spätem 8- sowie zwischen frühem 8- und 10/12/14-Zellstadium signifikant (Abb. 19). Wurden im Rahmen der zonalen Verteilungsanalyse mehr als 5 und weniger als 25 zusammenhängende Pixel mit einer Intensität von mehr als dem fünffachen des Medians im Zellkern detektiert, wurden diese als nuclear bodies eingestuft. Analog zum zonalen Verteilungsmuster, jedoch im Vergleich zu diesem zeitlich etwas verzögert, stieg die Häufigkeit ihres Vorliegens mit zunehmendem Entwicklungsstadium an. Nuclear bodies waren erstmals im frühen 8-Zellstadium (6,3%) zu finden. Im späten 8-Zellstadium wiesen bereits 64,7%, im 10- bis 14-Zellstadium 81,8% und im 16-Zellstadium schließlich 100% aller untersuchten Embryonen nuclear bodies auf. Zwischen frühem und spätem 8-Zellstadium war der Anstieg signifikant (Abb. 19).



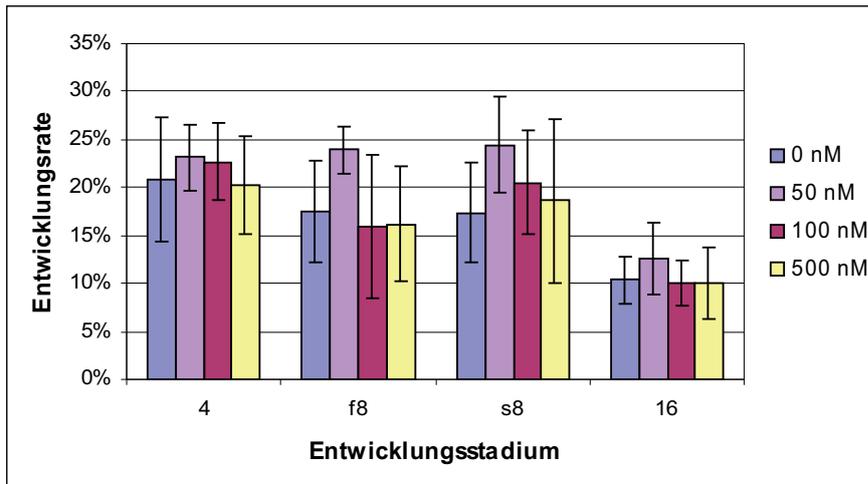
**Abb. 19: LSM: Häufigkeit des Auftretens von zonaler Verteilung im Zellkern und von nuclear bodies bei SHEP in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede bzgl. zonaler Verteilung: a:b, a:c, b:c ( $p < 0,05$ )

Statistisch signifikante Unterschiede bzgl. nuclear bodies: A:B ( $p < 0,05$ )

#### 4.5 Einfluss des GSK3-Inhibitors auf die Entwicklungskompetenz der Embryonen

Um zu überprüfen, ob der in Versuchsabschnitt 3 und 4 eingesetzte GSK3-Inhibitor BIO in den verwendeten Konzentrationen zytotoxische Wirkung hat, wurde innerhalb eines jeden Entwicklungsstadiums für jede Inhibitorkonzentrationsgruppe die sogenannte Entwicklungsrate bestimmt und vergleichend betrachtet. Hierzu wurde die Anzahl der Embryonen, die sich nach 25- (4-Zeller) bzw. 30-stündiger (restliche Entwicklungsstadien) Inhibitoreinwirkzeit zum gewünschten Stadium entwickelt hatten, ermittelt und in Bezug zur Gesamtanzahl der eingesetzten Eizellen gesetzt. Dabei ergaben sich in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Inhibitorkonzentrationsgruppen (Abb. 20).



**Abb. 20:**  
Entwicklungsrate in  
Abhängigkeit der  
InhibitorKonzentration

keine statistisch  
signifikanten Unterschiede  
innerhalb eines  
Entwicklungsstadiums

## 4.6 Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und InhibitorKonzentration

### 4.6.1 Proteinlevels im Westernblot

In Anlehnung an Versuchsabschnitt 1 (siehe Kapitel 4.3.1) wurde in dieser Auswertung untersucht, wie sich der Einsatz von BIO in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Proteinlevels von GBC, N-PBC und NIP im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16-Zellstadium auswirkt. Außerdem wurden zusätzlich zu Abschnitt 1 zwei weitere Antikörper eingesetzt: AK3 bindet im Bereich von Position 56 an  $\beta$ -Catenin, AK4 erkennt C-PBC (siehe Kapitel 3.3.3).

#### **GBC**

Analog zu Versuchsabschnitt 1 lieferte AK1 bei jeder InhibitorKonzentrationsgruppe im Molekularbereich von intaktem  $\beta$ -Catenin zwei eng beieinander liegende Banden (GBC1 und GBC2). Beim Einsatz von AK3, der ebenfalls gegen GBC gerichtet ist, trat nur noch die obere der beiden Banden (GBC1) deutlich zum Vorschein, wohingegen die untere Bande (GBC2) nahezu nicht mehr zu erkennen war. Somit wird GBC2 durch AK3 nicht bzw. kaum gebunden. In Abb. 21 sind die durch AK1 und AK3 angezeigten Bandenmuster dargestellt.

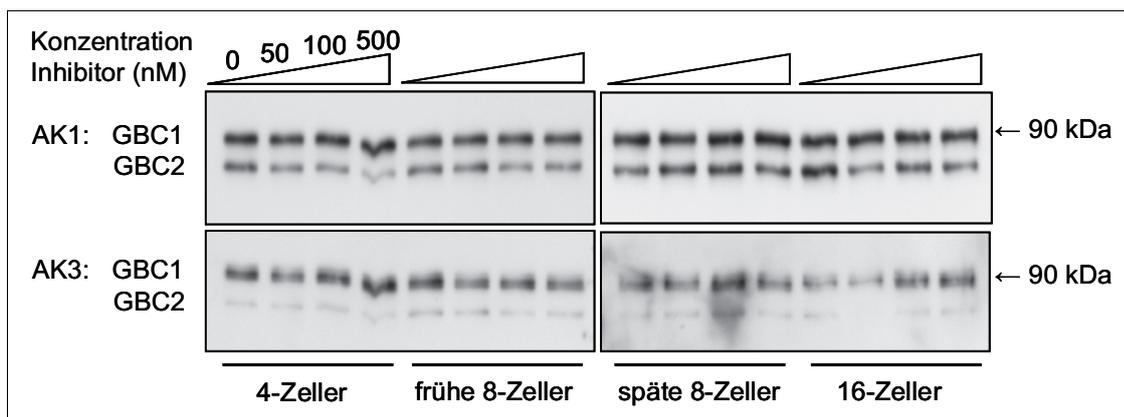


Abb. 21: Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK3 unter Inhibitoreinfluss

Eine Messung der Abundanzen erfolgte nur für die durch AK1 angezeigten Banden. Vergleichbar mit Versuchsabschnitt 1 zeigten GBC1, GBC2 sowie deren Summe GBC innerhalb aller Inhibitorkonzentrationsgruppen eine konstant bleibende Abundanz im Entwicklungsverlauf (Abb. 22). Beim Vergleich der verschiedenen Inhibitorkonzentrationsgruppen innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb.22).

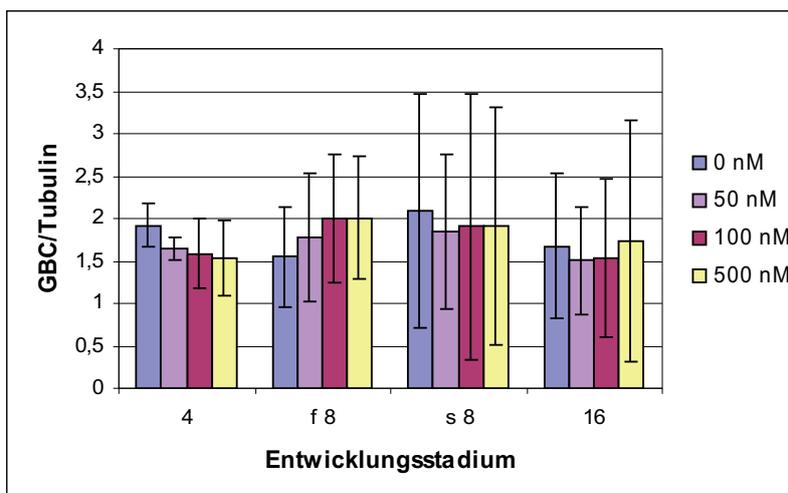


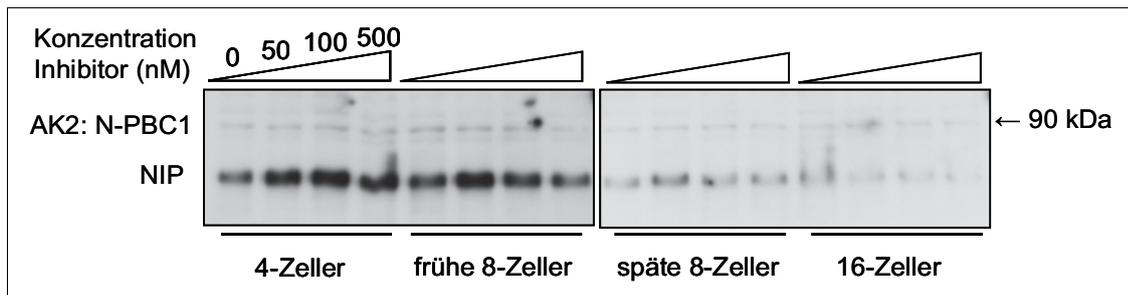
Abb. 22: Westernblot: Abundanz von GBC in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration

keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe sowie innerhalb eines Entwicklungsstadiums

### *N-PBC und NIP*

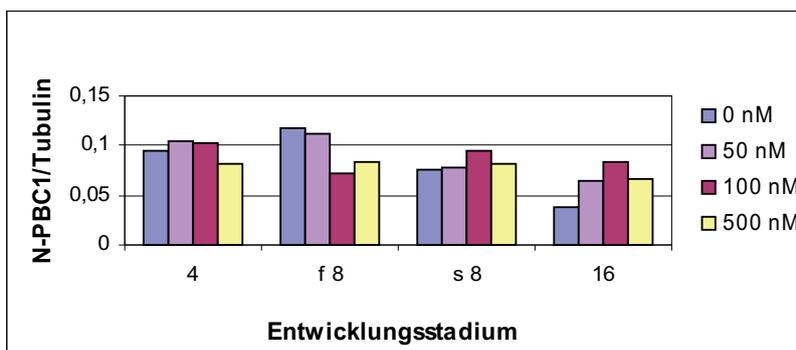
Auch AK2 lieferte in allen Inhibitorkonzentrationsgruppen ein mit Versuchsabschnitt 1 vergleichbares Bandenmuster: nur eine noch messbare, schwach ausgeprägte Bande im Molekularbereich von 90 kDa (N-PBC1) sowie eine um ein Vielfaches stärker ausgeprägte Bande unbekannter Herkunft im niedrigeren Molekularbereich (NIP) (Abb. 23).

## ERGEBNISSE



**Abb. 23: Westernblot: Bandenmuster von AK2 unter Inhibitoreinfluss**

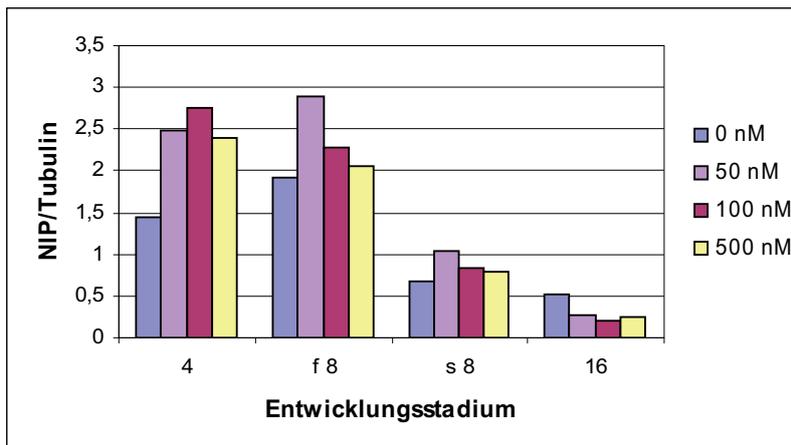
Hinsichtlich der Abundanzhöhe konnten im Fall von N-PBC1 und NIP aufgrund fehlender Wiederholungen keine statistisch gesicherten Aussagen getroffen werden. Bei Betrachtung von N-PBC1 ließen sich jedoch weder zwischen den untersuchten Entwicklungsstadien noch zwischen den verschiedenen Inhibitorkonzentrationsgruppen auffällige Unterschiede erkennen (Abb. 24).



**Abb. 24: Westernblot: Abundanz von N-PBC1 in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

keine auffälligen Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe sowie innerhalb eines Entwicklungsstadiums

Im Fall von NIP deutete sich bei einer getrennten Betrachtung der Inhibitorkonzentrationsgruppen vergleichbar mit Versuchsabschnitt 1 eine tendenzielle Abnahme der Abundanz im Entwicklungsverlauf an (Abb. 25). Innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien konnten keine auffälligen Unterschiede in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration festgestellt werden (Abb. 25).

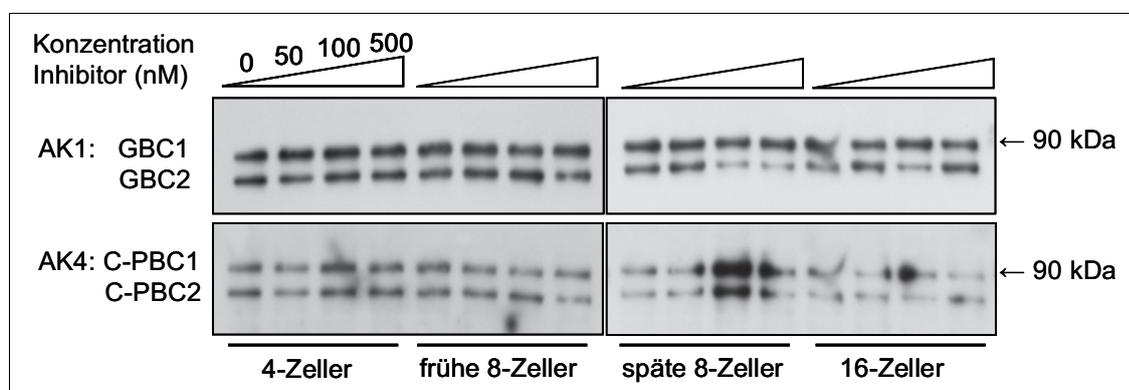


**Abb. 25: Westernblot: Abundanz von NIP in Bezug auf Tubulin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

tendenzielle Abnahme im Entwicklungsverlauf; keine auffälligen Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums

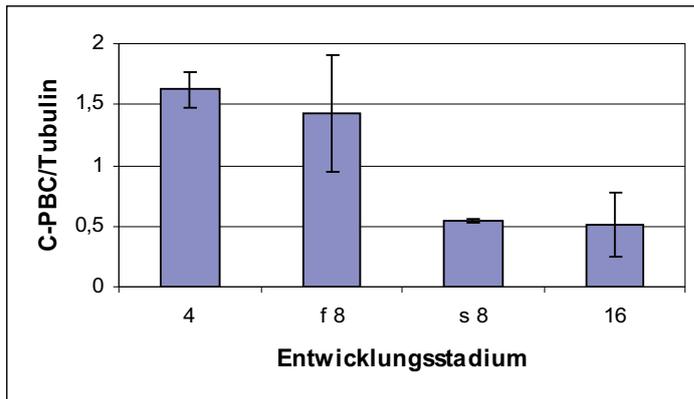
**C-PBC:**

Mit Hilfe des Einsatzes von AK4 wurde die Abundanz von C-PBC im Entwicklungsverlauf untersucht. Im Westernblot ergab sich ein mit AK1 vergleichbares Bild: Im Molekularbereich von 90 kDa ließen sich zwei nahe beieinander liegende Proteinbanden erkennen (C-PBC1 und C-PBC2), die den durch AK1 dargestellten Proteinbanden von GBC1 und GBC2 entsprechen und sich nahezu ebenso deutlich wie diese darstellten (Abb. 26). Die durch AK2 angezeigte Bande im niedrigeren Molekularbereich (NIP) wurde durch den hier verwendeten Antikörper nicht dargestellt.



**Abb. 26: Westernblot: Bandenmuster von AK1 und AK4 unter Inhibitoreinfluss**

Im Verlauf der Entwicklung vom 4- zum 16-Zellstadium ließ sich in der Kontrollgruppe (Gruppe 0) bei C-PBC1, C-PBC2 und somit auch bei deren Summe (C-PBC) eine tendenzielle Abnahme der Abundanz ab dem späten 8-Zellstadium erkennen, die statistisch allerdings nicht signifikant war (Abb. 27).



**Abb. 27: Westernblot: Abundanz von C-PBC in Bezug auf Tubulin in Gruppe 0 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

tendenzielle Abnahme im Entwicklungsverlauf, statistisch nicht signifikant

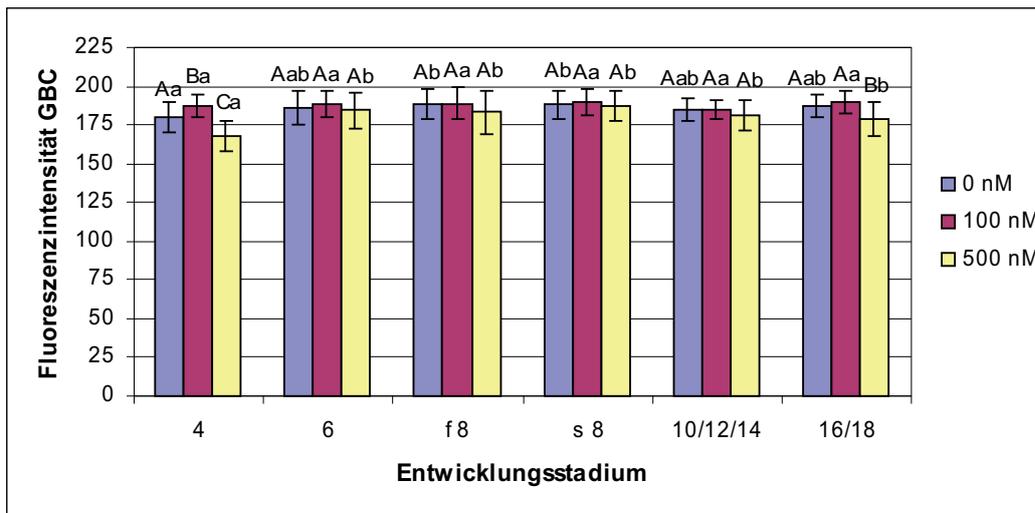
Die hier nicht dargestellten Inhibitorkonzentrationsgruppen zeigten diesbezüglich einen vergleichbaren Verlauf. Zwischen den einzelnen Inhibitorkonzentrationsgruppen waren keine Unterschiede zu erkennen.

#### 4.6.2 Mittlere Fluoreszenzintensität im LSM

##### *GBC*

Vergleichbar mit Versuchsabschnitt 2 (siehe Kapitel 4.3.2) traten innerhalb der Inhibitorkonzentrationsgruppen in Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität von GBC nahezu keine Veränderungen im Verlauf der Entwicklung vom 4- zum 16/18-Zellstadium auf. Lediglich im 4-Zellstadium wiesen die Embryonen in Gruppe 0 und 500 signifikant niedrigere Fluoreszenzwerte auf als im frühen und späten 8-Zellstadium (Gruppe 0) bzw. als in allen restlichen Entwicklungsstadien (Gruppe 500) (Abb. 28, Kleinbuchstaben).

Beim Vergleich der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationsgruppen innerhalb eines jeden Entwicklungsstadiums ließen sich nur bei den 4- und 16/18-Zellembryonen signifikante Unterschiede feststellen. Diese sind in Abb. 28 (Großbuchstaben) dargestellt.

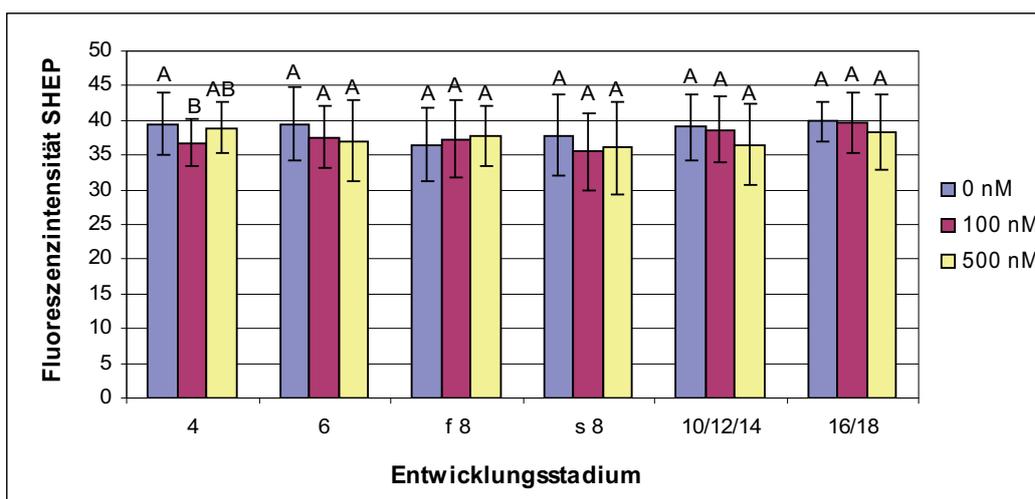


**Abb. 28: LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von GBC im Gesamtembryo in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe: a:b ( $p < 0,05$ )  
 Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B, A:C, B:C ( $p < 0,05$ )

### *SHEP*

Im Fall von SHEP traten in keiner der Inhibitorkonzentrationsgruppen signifikante Unterschiede im Entwicklungsverlauf auf (Abb. 29). Auch beim Vergleich der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationsgruppen innerhalb eines jeden Entwicklungsstadiums ließen sich mit Ausnahme der Gruppe der 4-Zellembryonen keinerlei signifikante Unterschiede erkennen (Abb. 29, Großbuchstaben).



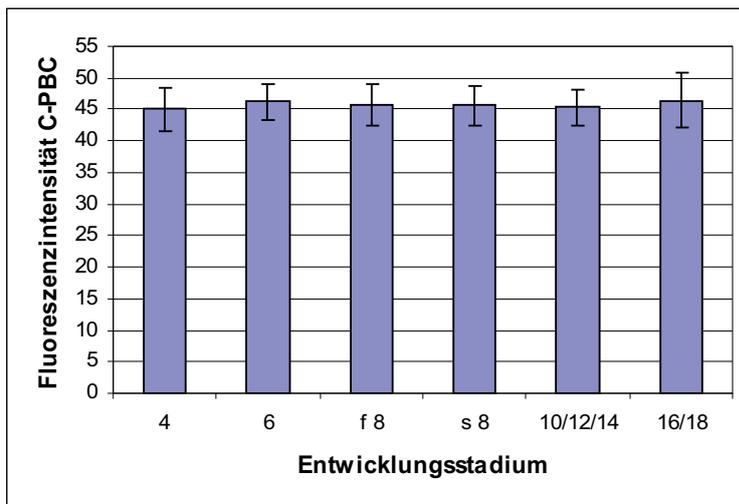
**Abb. 29: LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von SHEP im Gesamtembryo in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe  
 Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ )

**C-PBC:**

Für die Untersuchung der Fluoreszenzintensität von C-PBC wurden lediglich Kontrollembryonen verwendet.

Die Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität von C-PBC blieb im Entwicklungsverlauf konstant. Es waren keine statistisch signifikanten und im Gegensatz zum Abundanzverlauf im Westernblot auch keine tendenziellen Unterschiede zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien zu erkennen (Abb. 30).



**Abb. 30: LSM: mittlere Fluoreszenzintensität von C-PBC im Gesamtembryo in Gruppe 0 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

keine statistisch signifikanten Unterschiede

**4.7 Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

Im Vergleich zu Versuchsabschnitt 2 (siehe Kapitel 4.4) kam an dieser Stelle neben dem Zellkompartiment und dem Entwicklungsstadium die Inhibitorkonzentration noch als dritter Vergleichsbereich hinzu. Die Auswertungen hierzu erfolgten nach folgendem Schema:

1. Vergleich der einzelnen Zellkompartimente bzgl. der Fluoreszenzintensität (Frage: Wie ist  $\beta$ -Catenin auf die drei Kompartimente verteilt?)  
 → in jedem Entwicklungsstadium, in jeder Inhibitorkonzentrationsgruppe
2. Vergleich der einzelnen Entwicklungsstadien bzgl. der Fluoreszenzintensität (Frage: Wie verhält sich die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium?)  
 → in jeder Inhibitorkonzentrationsgruppe, in jedem Zellkompartiment

3. Vergleich der einzelnen Inhibitorkonzentrationsgruppen bzgl. der Fluoreszenzintensität

(Frage: Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen?)

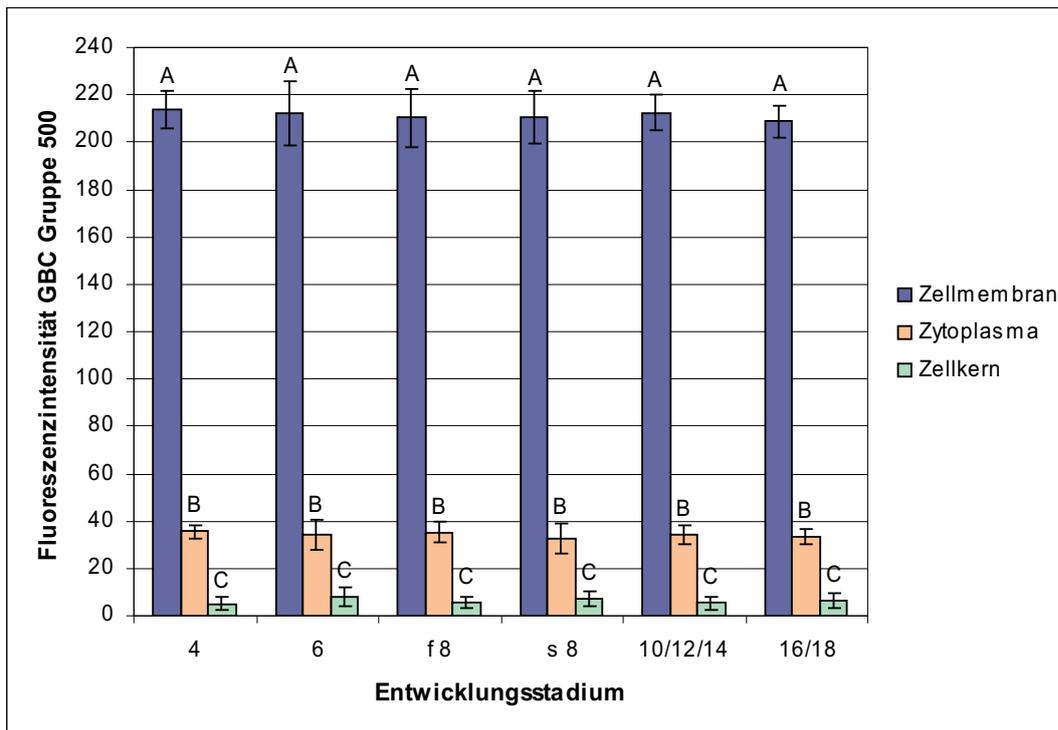
→ in jedem Entwicklungsstadium, in jedem Zellkompartiment

Darüber hinaus wurde analog zu Versuchsabschnitt 2 zusätzlich das Verteilungsmuster von GBC, SHEP und C-PBC innerhalb der drei Zellkompartimente betrachtet.

**GBC**

Bei einem für jede Inhibitorkonzentrationsgruppe getrennt durchgeführten Vergleich der Fluoreszenzintensitätswerte von GBC in Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern ergab sich ein mit Versuchsabschnitt 2 im Einklang stehendes Bild: Bei jeder Inhibitorkonzentrationsgruppe waren in jedem Entwicklungsstadium die Werte in der Zellmembran am höchsten, gefolgt von deutlich niedrigeren Werten im Zytoplasma und im Vergleich dazu verschwindend geringen Werten im Zellkern. Dabei waren die Unterschiede zwischen Zellmembran, Zytoplasma und Zellkern jeweils signifikant (Abb. 31, Großbuchstaben, Gruppe 500 repräsentativ für alle Inhibitorkonzentrationsgruppen).

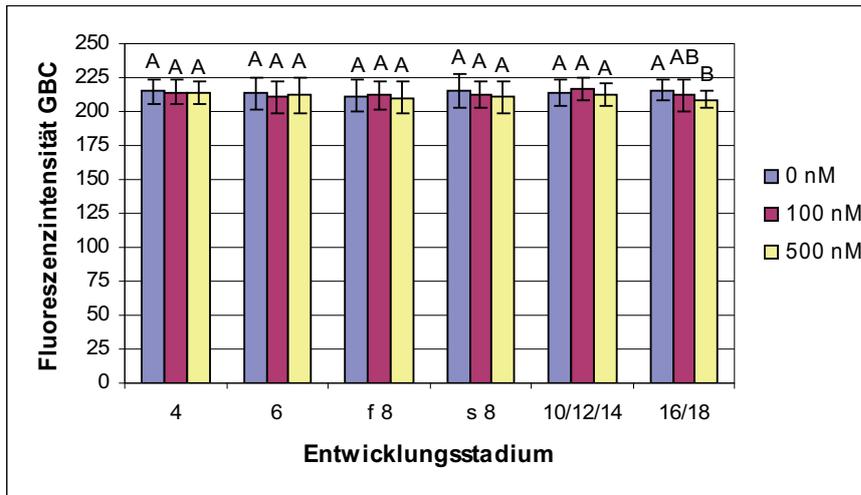
Innerhalb der einzelnen Zellkompartimente erwies sich die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium als überwiegend konstant. Sowohl in Gruppe 0 als auch in Gruppe 500 (Abbildung 31) waren in keinem der drei Zellkompartimente signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien festzustellen. Lediglich Gruppe 100 zeigte im Zytoplasma sowie im Zellkern gewisse Schwankungen (Zytoplasma: Fluoreszenzintensität im 4-Zellstadium signifikant höher als im späten 8-Zellstadium; Zellkern: signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität zwischen dem 4- und 6-Zellstadium, signifikanter Abfall zwischen dem späten 8- und 10/12/14-Zellstadium, restliche Entwicklungsstadien zeigten keine signifikanten Unterschiede). Eine Übereinstimmung mit dem in Versuchsabschnitt 2 (Abb. 15) beobachteten Verlauf der Fluoreszenzintensität in Zellmembran und Zytoplasma konnte in keiner der drei Inhibitorkonzentrationsgruppen festgestellt werden.



**Abb. 31: LSM: Fluoreszenzintensität von GBC in Gruppe 500 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium**

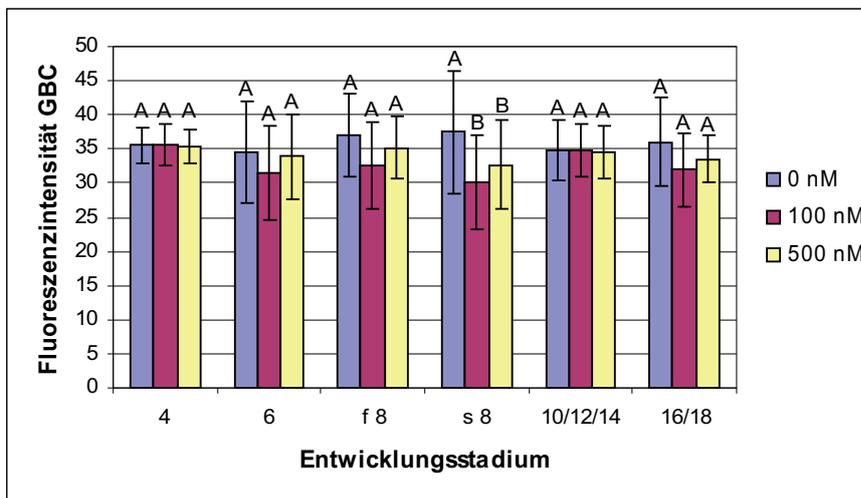
Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B, A:C, B:C ( $p < 0,05$ )  
 Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb eines Zellkompartiments

Bei einem innerhalb jedes Zellkompartiments für jedes Entwicklungsstadium durchgeführten Vergleich der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationsgruppen kam es ebenfalls nur vereinzelt zu signifikanten Unterschieden: In der Zellmembran wiesen im 16/18-Zellstadium Embryonen der Gruppe 500 signifikant niedrigere Intensitätswerte auf als Embryonen der Gruppe 0 (Abb. 32). Im Zytoplasma zeigten im späten 8-Zellstadium Gruppe 100 und 500 signifikant niedrigere Werte als Gruppe 0 (Abb. 33), während im Zellkern im späten 8-Zellstadium Gruppe 100, nicht jedoch Gruppe 500, signifikant höhere Werte als Gruppe 0 aufwies (Abb. 34). Signifikante Unterschiede waren somit jeweils auf ein Entwicklungsstadium beschränkt.



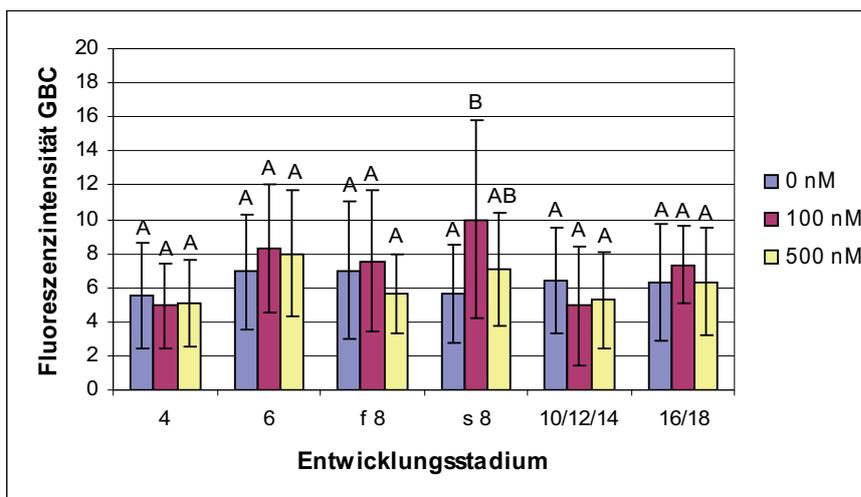
**Abb. 32: LSM:**  
**Fluoreszenzintensität von GBC in der Zellmembran in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ ); Unterschiede innerhalb einer InhibitorKonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt



**Abb. 33: LSM:**  
**Fluoreszenzintensität von GBC im Zytoplasma in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ ); Unterschiede innerhalb einer InhibitorKonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt



**Abb. 34: LSM:**  
**Fluoreszenzintensität von GBC im Zellkern in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration**

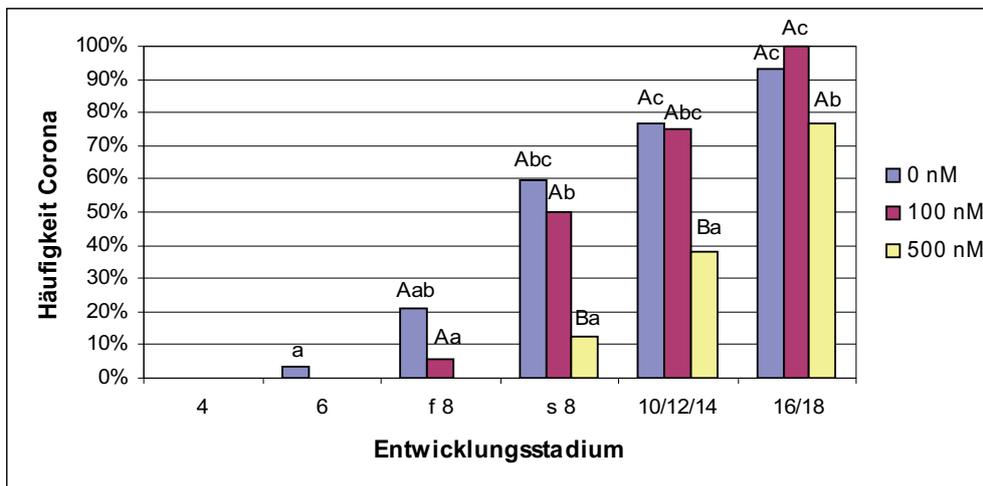
Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ ); Unterschiede innerhalb einer InhibitorKonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt

## ERGEBNISSE

Was das Verteilungsmuster von GBC innerhalb der einzelnen Zellkompartimente betrifft, so fand sich bei jeder der drei Inhibitorkonzentrationsgruppen, vergleichbar mit Versuchsabschnitt 2, in der Zellmembran ausnahmslos ein zentrales, in Zytoplasma und Zellkern ein diffuses Verteilungsmuster. Unterschiede traten allerdings bzgl. der Ausbildung der Corona im Zytoplasma auf:

In allen drei Inhibitorkonzentrationsgruppen stieg der Anteil der Embryonen mit Corona mit zunehmendem Entwicklungsstadium an, wobei jedoch bzgl. der Signifikanz Unterschiede zu erkennen waren (Abb. 35, Kleinbuchstaben). So war in Gruppe 100 der Anstieg vom frühen zum späten 8-Zellstadium, in Gruppe 500 der Anstieg vom 10/12/14 zum 16/18-Zellstadium signifikant. In Gruppe 0 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen direkt benachbarten Entwicklungsstadien, wohl aber zwischen dem 6- und späten 8- sowie zwischen dem frühen 8- und 10/12/14-Zellstadium. Ein weiterer Unterschied betrifft den Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Corona. Dieser verschob sich mit zunehmender Inhibitorkonzentration nach hinten. Während in Gruppe 0 bereits einige 6-Zellembryonen eine Corona aufwiesen, trat diese in Gruppe 100 erstmals im frühen 8- und bei Gruppe 500 sogar erst im späten 8-Zellstadium auf.

Beim Vergleich der drei Inhibitorkonzentrationsgruppen innerhalb eines jeden Entwicklungsstadiums wiesen in Gruppe 500 im späten 8- und 10/12/14-Zellstadium signifikant weniger Embryonen eine Corona auf als in Gruppe 0 oder 100. Im 16/18-Zellstadium war der Unterschied nicht mehr signifikant (Abbildung 35, Großbuchstaben).



**Abb. 35: LSM: Häufigkeit des Auftretens einer Corona im perinukleären Bereich des Zytoplasmas bei GBC in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

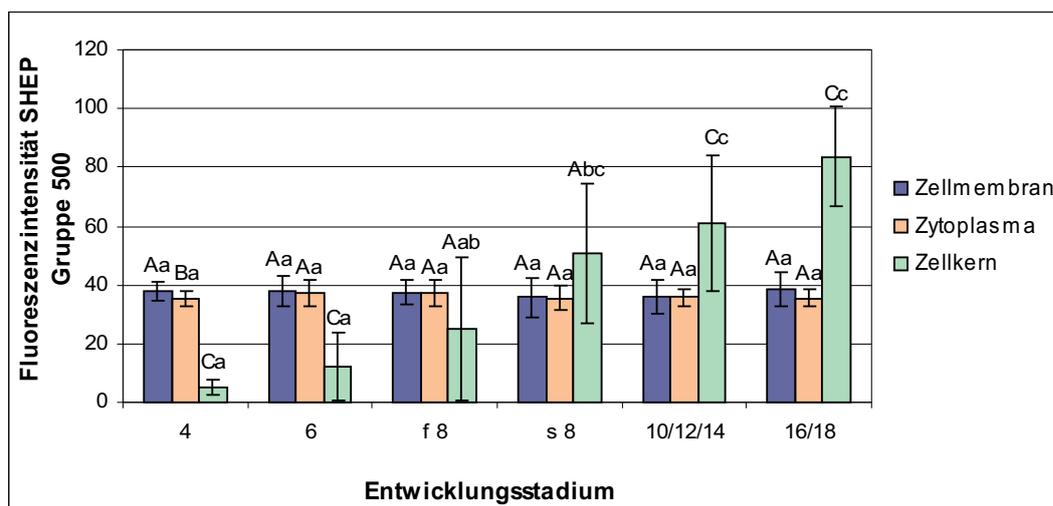
Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe:  
a:b, a:c, b:c ( $p < 0,05$ )

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ )

**SHEP:**

Bezüglich der Verteilung von SHEP auf die einzelnen Zellkompartimente zeigten alle Inhibitor-konzentrationsgruppen ein mit Versuchsabschnitt 2 vergleichbares Bild: Von wenigen Ausnahmen abgesehen waren in allen 3 Gruppen die Intensitätswerte von SHEP in Zellmembran und Zytoplasma jeweils annähernd gleich hoch. Lediglich im 4-Zell- (Gruppe 0, 100 und 500), 10/12/14-Zell- (Gruppe 0) und 16/18-Zellstadium (Gruppe 100) wies das Zytoplasma signifikant niedrigere Werte auf als die Zellmembran. Im Zellkern waren die Fluoreszenzwerte im 4- und 6-Zellstadium signifikant niedriger und ab dem späten 8-Zellstadium bzw. in Gruppe 500 erst ab dem 10/12/14-Zellstadium signifikant höher als in Zytoplasma und Zellmembran. Im Zellkern waren die Fluoreszenzwerte im 4- und 6-Zellstadium signifikant niedriger und ab dem späten 8-Zellstadium bzw. in Gruppe 500 erst ab dem 10/12/14-Zellstadium signifikant höher als in Zytoplasma und Zellmembran. Im frühen und in Gruppe 500 auch noch im späten 8-Zellstadium waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Hier bewegte sich die Höhe der Fluoreszenzintensität im Zellkern in etwa auf dem gleichen Level wie in Zytoplasma und Zellmembran. Abb. 36 (Großbuchstaben) zeigt die Fluoreszenzverteilung von SHEP am Beispiel von Gruppe 500.

Im Verlauf der Entwicklung vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium hielten sich die Intensitätswerte in Zellmembran und Zytoplasma in allen Inhibitor-konzentrationsgruppen nahezu konstant. Lediglich Gruppe 100 wies in der Zellmembran im 16/18-Zellstadium eine im Vergleich zum späten 8-Zellstadium signifikant höhere Fluoreszenz auf. Demgegenüber war im Zellkern vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium ein steter Anstieg zu verzeichnen. In Gruppe 100 war dieser Anstieg zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium signifikant, in Gruppe 0 und 500 (Abbildung 36, Kleinbuchstaben) waren die Werte erst über zwei Entwicklungsstadien hinweg betrachtet signifikant unterschiedlich.

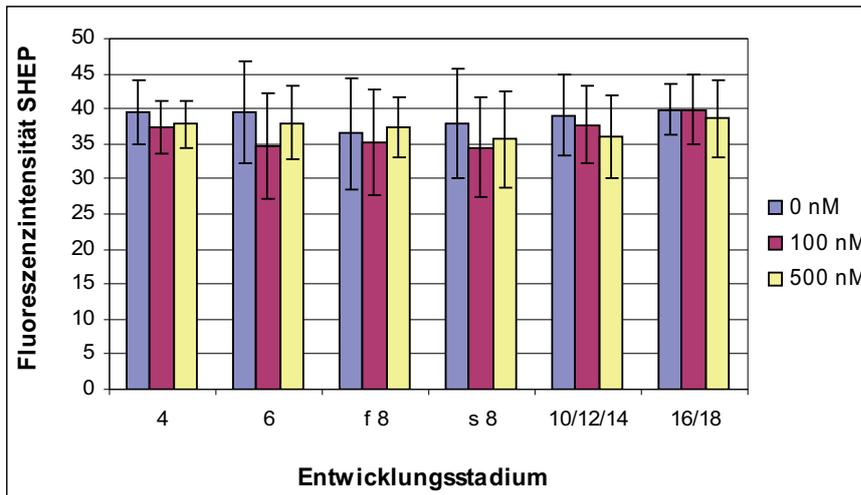


**Abb. 36: LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP in Gruppe 500 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B, A:C, B:C (p<0,05)  
 Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Zellkompartiments: a:b, a:c, b:c (p<0,05)

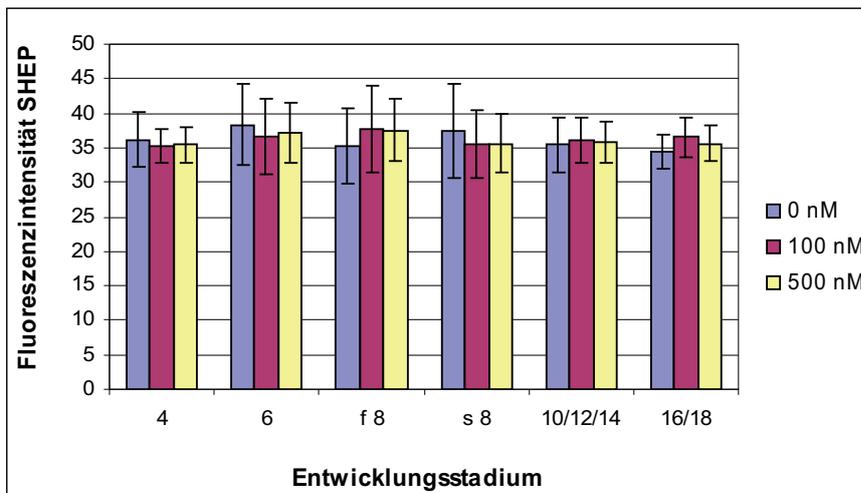
## ERGEBNISSE

Bei einem für jedes Entwicklungsstadium durchgeführten Vergleich der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationsgruppen zeigten sich weder in der Zellmembran (Abb. 37) noch im Zytoplasma (Abb. 38) signifikante Unterschiede. Im Zellkern wiesen die Embryonen aus Gruppe 500 ab dem 6-Zellstadium geringere Intensitätswerte auf, im späten 8- und 10/12/14-Zellstadium waren diese Unterschiede signifikant (Abb. 39).



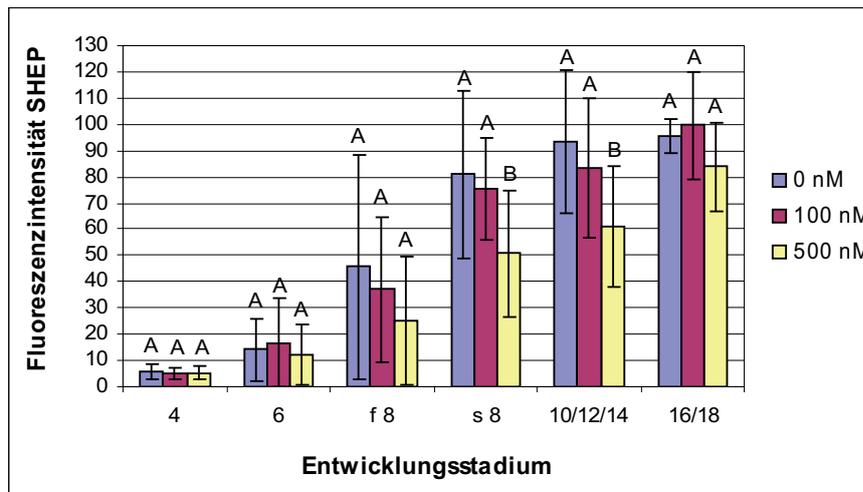
**Abb. 37: LSM:**  
Fluoreszenzintensität von SHEP in der Zellmembran in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration

Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums; Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt



**Abb. 38: LSM:**  
Fluoreszenzintensität von SHEP im Zytoplasma in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration

Keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums; Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt



**Abb. 39: LSM: Fluoreszenzintensität von SHEP im Zellkern in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration**

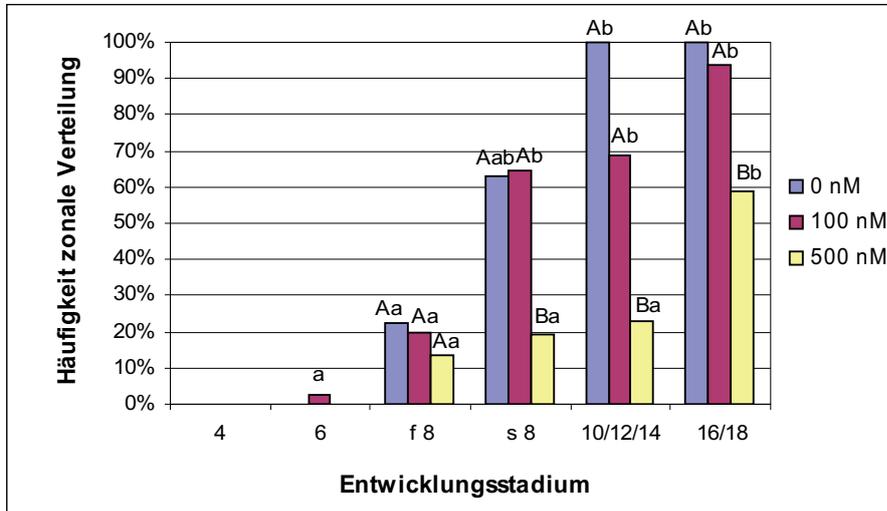
Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B ( $p < 0,05$ ); Unterschiede innerhalb einer InhibitorKonzentrationsgruppe hier nicht dargestellt

Hinsichtlich des Verteilungsmusters von SHEP innerhalb der einzelnen Zellkompartimente ergab sich folgendes Bild: Vergleichbar mit Versuchsabschnitt 2 lag in allen InhibitorKonzentrationsgruppen in Zellmembran und Zytoplasma ausschließlich ein diffuses, im Zellkern ein diffuses oder zonales Verteilungsmuster mit oder ohne Ausprägung von nuclear bodies vor. Ebenfalls vergleichbar mit Versuchsabschnitt 2 stieg die Häufigkeit, mit der zonale Verteilungsmuster oder nuclear bodies auftraten, mit zunehmendem Entwicklungsstadium an. Allerdings war dieser Anstieg je nach InhibitorKonzentrationsgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten signifikant (Abb. 40 und 41, Kleinbuchstaben): Gruppe 0 zeigte sowohl beim zonalen Verteilungsmuster als auch bei den nuclear bodies jeweils zwischen dem frühen 8- und dem 10/12/14-Zellstadium einen signifikanten Anstieg. In Gruppe 100 war der Anstieg zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium (zonales Verteilungsmuster) bzw. zwischen dem 6- und späten 8-Zellstadium (nuclear bodies) signifikant. Gruppe 500 wies nur beim zonalen Verteilungsmuster einen signifikanten Unterschied zwischen dem 10/12/14- und dem 16/18-Zellstadium auf.

Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen InhibitorKonzentrationsgruppen ergaben sich bezüglich der Höhe des Prozentsatzes von Embryonen mit zonalem Verteilungsmuster bzw. nuclear bodies in den einzelnen Entwicklungsstadien und bezüglich des Zeitpunkts ihres erstmaligen Auftretens: In Gruppe 500 war der Anteil an Embryonen mit zonalem Verteilungsmuster ab dem späten 8-Zellstadium stets signifikant geringer als in Gruppe 0 und Gruppe 100 (Abb. 40, Großbuchstaben). Nuclear bodies traten in Gruppe 500 erstmals im 10-bis 14-Zellstadium und somit wesentlich später als in den anderen Gruppen auf. Vergleichbar mit dem zonalen Verteilungsmuster wiesen in Gruppe 500 signifikant weniger Embryonen nuclear bodies auf als in Gruppe 0 und zum Teil auch als in Gruppe 100 (Abb. 41, Großbuchstaben). Zwischen Gruppe 0 und 100 fanden sich keine derart deutlichen Unterschiede. Zwar

## ERGEBNISSE

lag Gruppe 100, sowohl was die Häufigkeit eines zonalen Verteilungsmusters als auch das Auftreten von nuclear bodies betrifft, überwiegend hinter Gruppe 0 zurück, doch waren diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant.



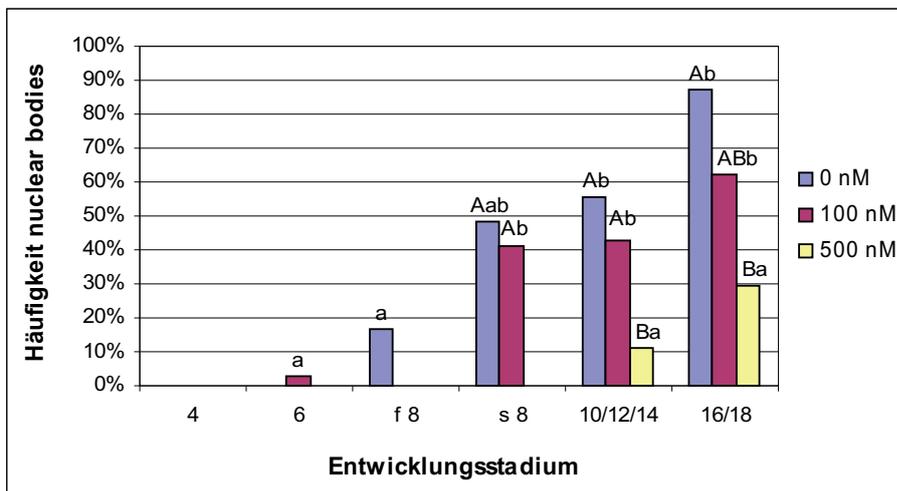
**Abb. 40: LSM: Häufigkeit des Auftretens einer zonalen Verteilung von SHEP im Zellkern in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe:

a:b ( $p < 0,05$ )

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums:

A:B ( $p < 0,05$ )



**Abb. 41: LSM: Häufigkeit des Auftretens von nuclear bodies bei SHEP in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Inhibitorkonzentration**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Inhibitorkonzentrationsgruppe:

a:b ( $p < 0,05$ )

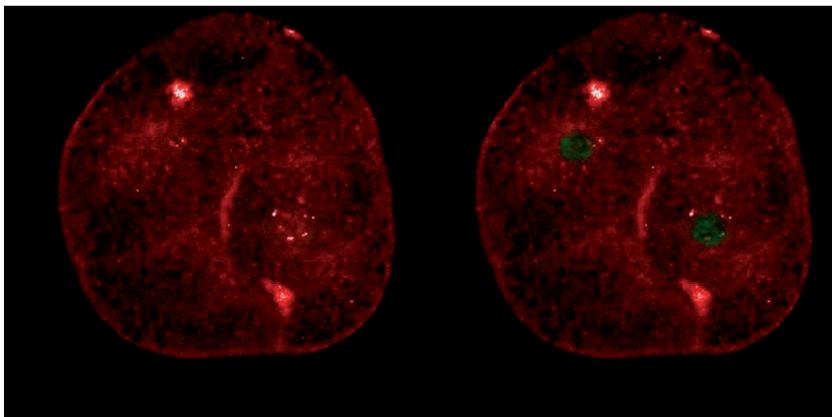
Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums:

A:B ( $p < 0,05$ )

***C-PBC***

Wie schon für die Untersuchung der mittleren Fluoreszenzintensität im Gesamtembryo wurden auch zur Analyse des Verteilungsmusters von C-PBC lediglich Kontrollembryonen verwendet.

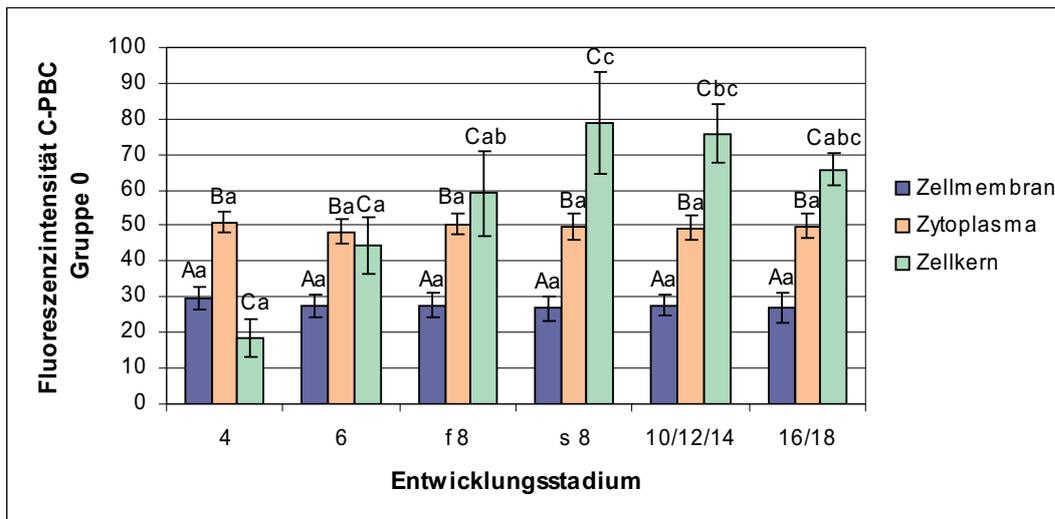
Die unter dem LSM erkennbare Verteilung von C-PBC entsprach in etwa der von SHEP, wies aber auch einige kleine Unterschiede auf (Abb. 42): So setzte sich bei einigen Embryonen die Zellmembran fluoreszenzbedingt deutlich vom Zytoplasma ab. Dabei war allerdings die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma nicht durchweg geringer als in der Zellmembran, wie das bei GBC der Fall war. Im Zytoplasma waren im Vergleich zu SHEP keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Der Zellkern wies ebenfalls ein Fluoreszenzsignal mit teils diffusem, teils zonalem Verteilungsmuster auf. Ebenso fanden sich bodies, allerdings deutlich heller und kompakter als bei SHEP und teilweise auch im kernnahen Zytoplasma gelegen.



**Abb. 42: LSM: Fluoreszenzverteilung von C-PBC (spätes 8-Zellstadium)**

links: Kernfärbung zur besseren Beurteilung des Zellkerns ausgeblendet  
rechts: Kernfärbung (grün) zur besseren Orientierung eingeblendet

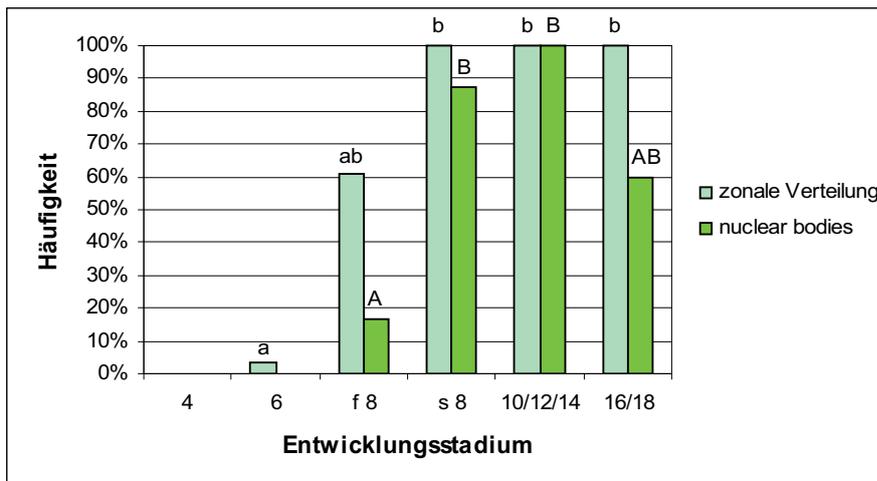
Die Messung der Fluoreszenzwerte und die entsprechende statistische Auswertung ergab folgendes Bild (Abb. 43): Obwohl unter dem LSM bei einigen Embryonen die Zellmembran deutlich abgrenzbar war, wies die Messung im Zytoplasma insgesamt stets signifikant höhere Fluoreszenzwerte nach als in der Zellmembran. In beiden Zellkompartimenten blieben die Fluoreszenzwerte im Verlauf der Entwicklung konstant. Im Zellkern konnte hingegen ein Anstieg der Fluoreszenz bis zum späten 8-Zellstadium festgestellt werden, wobei die Werte zunächst unter und anschließend über denen von Zytoplasma und Zellkern lagen. Dieser Anstieg war zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium signifikant. Ab dem 10/12/14-Zellstadium kam es tendenziell zu einem Rückgang der Fluoreszenzintensität im Zellkern, wobei jedoch die Werte von Zytoplasma und Zellmembran nicht mehr unterschritten wurden.



**Abb. 43: LSM: Fluoreszenzintensität von C-PBC in Gruppe 0 in Abhängigkeit von Zellkompartiment und Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Entwicklungsstadiums: A:B, A:C, B:C ( $p < 0,05$ )  
 Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Zellkompartiments: a:b, a:c, b:c ( $p < 0,05$ )

Im Vergleich zu SHEP (siehe Abb. 19) stieg der Anteil von Embryonen mit zonalem Verteilungsmuster wesentlich schneller an, so dass bereits im späten 8-Zellstadium 100% der Embryonen ein zonales Verteilungsmuster aufwiesen (Abb. 44). Hierbei war der Anstieg zwischen dem 6- und späten 8-Zellstadium signifikant. Auch bei den nuclear bodies war ein im Vergleich zu SHEP schnellerer Anstieg zu verzeichnen, bereits im 10/12/14-Zellstadium wurde ein Wert von 100% erreicht. Zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium war dieser Anstieg signifikant. Im Gegensatz zu SHEP kam es im 16/18-Zellstadium zu einem tendenziellen Rückgang von Embryonen mit nuclear bodies auf 60% (Abb. 44).



**Abb. 44: LSM: Häufigkeit des Auftretens von zonaler Verteilung im Zellkern und nuclear bodies bei C-PBC in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium**

Statistisch signifikante Unterschiede bzgl. zonaler Verteilung: a:b ( $p < 0,05$ )

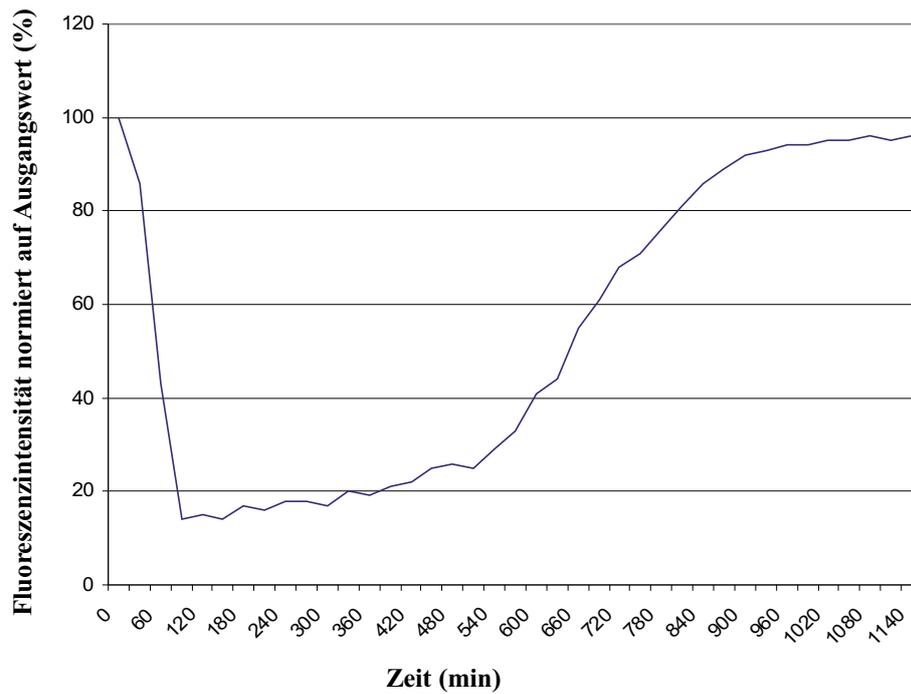
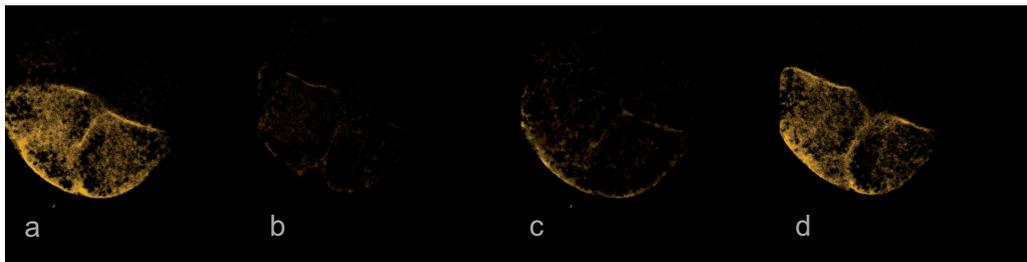
Statistisch signifikante Unterschiede bzgl. nuclear bodies: A:B ( $p < 0,05$ )

## 4.8 Translokationsprozesse von $\beta$ -Catenin

Um eine aktive Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern nachzuweisen, wurden FRAP-Analysen an YFP-Catenin exprimierenden Embryonen durchgeführt. Hierzu wurden im 4-Zellstadium in jeweils zwei Blastomeren YFP-Catenin-Plasmide injiziert, die daraufhin entstehende Fluoreszenzfärbung nach eineinhalb-tägiger Kultur gebleicht und die Zeitspanne bis zur vollständigen Recovery gemessen.

Insgesamt wurden 42 Embryonen injiziert, 31 waren auswertbar. Hiervon zeigten 11 Embryonen kein Fluoreszenzsignal und somit keine Überexpression von YFP-Catenin. 4 Embryonen wiesen nur eine fluoreszierende Blastomere auf, 10 Embryonen zeigten in jeweils 2 Blastomeren ein Signal, bei 5 Embryonen leuchteten 3 und bei einem Embryo 4 Blastomeren.

Nach dem Bleichen des gesamten Embryos dauerte es 16 Stunden, bis die Ausgangsfluoreszenzintensität wieder zu mindestens 85% hergestellt, also die entsprechende Menge an neuem YFP-Catenin synthetisiert war (Abb. 45). Wurde nur der Zellkern gebleicht, war die Färbung bereits nach 30 Minuten wiederhergestellt (Abb. 46). Dies lässt darauf schließen, dass die Recovery im Zellkern auf Translokation von YFP-Catenin aus dem Zytoplasma zurückzuführen ist.

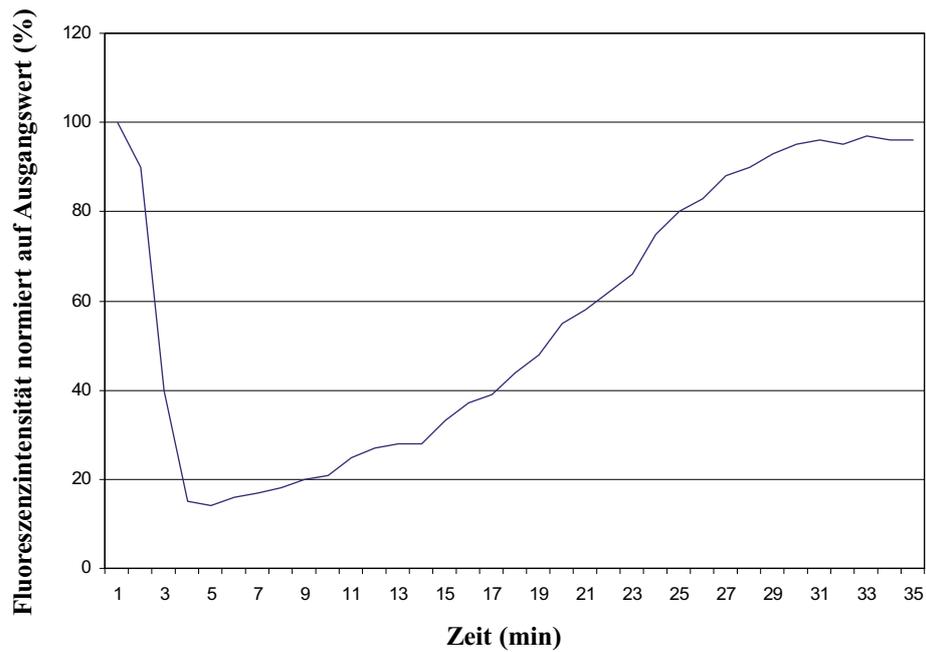
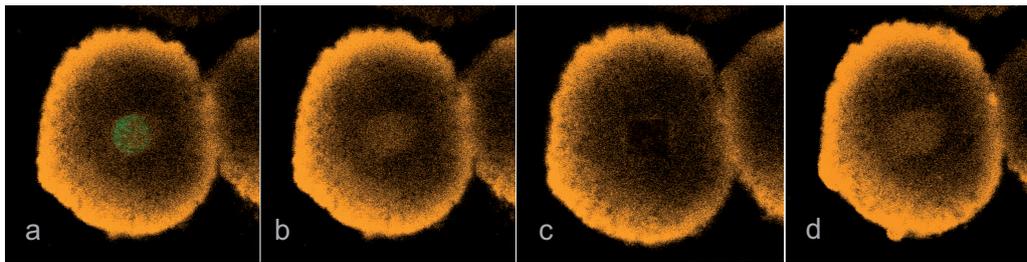


**Abb. 45: FRAP-Analyse gesamter Embryo**

oben: LSM-Aufnahmen: kompakter 8-Zellembryo, eine Ebene, 2 Blastomeren mit Fluoreszenzsignal:

a: vor dem Bleichen; b: nach dem Bleichen; c:nach 8 h Recovery; d:nach 16 h Recovery

unten: Messwerte: zeitlicher Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität von YFP-Catenin nach Bleichen des Gesamtembryos



**Abb. 46: FRAP-Analyse Zellkern**

oben: LSM-Aufnahmen: Ausschnitt aus kompaktem 8-Zellembryo, eine Ebene, zwei Blastomeren mit Fluoreszenzsignal (eine Blastomere dargestellt), viereckiger Bleachingbereich direkt über dem Zellkern:

a: vor dem Bleichen, mit Kernfärbung (grün); b: vor dem Bleichen, Kernfärbung ausgeblendet;  
 c: nach dem Bleichen, Kernfärbung ausgeblendet; d: nach 30 Minuten Recovery, Kernfärbung ausgeblendet

unten: Messwerte: zeitlicher Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität von YFP-Catenin nach Bleichen des Zellkerns

## **5 Diskussion**

### **5.1 Embryonenerzeugung**

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Eizellen aus Ovarien geschlachteter Rinder verwendet. Die Eizellgewinnung erfolgte mittels Punktion von Follikeln mit einem Durchmesser von 2 bis 10 mm. Gemäß einer Studie von PAVLOK et al. (1993) weisen Eizellen aus Follikeln dieser Größenordnung bessere Voraussetzungen für eine ungestörte nukleäre Differenzierung in den daraus entstehenden Embryonen auf als Eizellen, die aus kleineren Follikeln gewonnen werden. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang bovine in vitro produzierte 8-Zellembryonen. Stammten diese Embryonen aus Eizellen, die aus Follikeln mit einem Durchmesser über 2 mm gewonnen wurden, so war ihre transkriptionelle Aktivität deutlich höher und in vivo produzierten Embryonen ähnlicher. Dieses Erkenntnis ist für die vorliegende Studie insofern von besonderer Bedeutung, als hier ebenfalls Vorgänge im Zellkern, die temporal und eventuell auch kausal mit der MET in Zusammenhang stehen, betrachtet wurden.

In-vitro-Maturation, -Fertilisation und -Kultivierung erfolgten nach einem gängigen und in unserem Labor etablierten IVP-Protokoll. Die 44 hpi ermittelte Teilungsrate (69,43%) lag zwar unter dem in der Literatur häufig genannten Wert von 80% und mehr (LONERGAN 2003; WRENZYCKI 2007), bewegte sich aber innerhalb des für unser Labor üblichen Bereichs. Die für die Beurteilung des IVP-Erfolgs üblicherweise herangezogene Blastozystenrate konnte aufgrund des Versuchsaufbaus in der vorliegenden Studie nicht ermittelt werden.

Da bei den im Rahmen der FRAP-Analysen manipulierten Embryonen nach ca. eineinhalbtägiger Kultur teilweise mehr als die 2 injizierten Blastomeren leuchteten, ist davon auszugehen, dass hier eine Zellteilung stattgefunden hat. Dies lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Zellen vital waren und die für die Plasmidinjektion nötige Manipulation hier keine größeren nachteiligen Effekte hatte. Bei Embryonen mit nur 2 leuchtenden Blastomeren kann ebenfalls eine Zellteilung nicht ausgeschlossen werden, da vermutlich der Injektions- bzw. Translationserfolg des Plasmids nicht bei 100% lag und somit möglicherweise ursprünglich nur eine Blastomere leuchtete.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass das Ausgangsmaterial und die verwendeten Techniken der IVP und Mikromanipulation zur Erzeugung der Embryonen, die für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich Phosphorylierungsstatus, Verteilungsmuster und Translokationsverhalten von  $\beta$ -Catenin benötigt wurden, geeignet waren.

## 5.2 Proteinlevel und Phosphorylierungsstatus von $\beta$ -Catenin im bovinen Präimplantationsembryo

Da  $\beta$ -Catenin in zahlreiche biologische Prozesse, die während der Embryogenese ablaufen, involviert zu sein scheint (siehe Kapitel 2.3.4), wurde diesem Molekül und seiner Funktion gerade auch im Präimplantationsembryo zunehmend Beachtung geschenkt (GOVAL et al. 2000).

Studien an Mäuse- und Rinderembryonen ergaben, dass während der Präimplantationsentwicklung in allen Entwicklungsstadien, d.h. vor wie nach der MET, sowohl Transkripte von  $\beta$ -Catenin als auch die entsprechenden Proteine nachweisbar sind, was darauf schließen lässt, dass  $\beta$ -Catenin bei Präimplantationsembryonen sowohl aus maternaler als auch aus embryonaler Genexpression stammt (OHSUGI et al. 1996; BARCROFT et al. 1998). Dabei kommt es im Verlauf der präimplantatorischen Embryonalentwicklung höchstens zu geringen Schwankungen bzgl. des Proteinlevels (OHSUGI et al. 1996; GOVAL et al. 2000). Dass es zum Zeitpunkt der MET zu keinem Einbruch des Proteinlevels kommt, ist vermutlich damit zu begründen, dass maternales  $\beta$ -Catenin in diesem Zeitraum nicht massiv abgebaut wird. Vielmehr kann es noch bis zum Blastozystenstadium eine aktive Funktion bei der Zelladhäsion ausüben, wobei aber unter physiologischen Bedingungen bereits embryonales  $\beta$ -Catenin beteiligt ist (HAEGEL et al. 1995; OHSUGI et al. 1996). Somit handelt es sich bei der Umstellung vom maternalen auf embryonales  $\beta$ -Catenin um einen kontinuierlichen Prozess. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das Protein  $\beta$ -Catenin in allen untersuchten Entwicklungsstadien vom 4- bis hin zum 16-Zellstadium in nahezu konstanten Levels nachgewiesen werden. Dies könnte als Hinweis darauf betrachtet werden, dass es bereits im frühen bovinen Präimplantationsembryo eine Rolle spielt. Da der Funktionsstatus von  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung reguliert wird, scheint die Betrachtung des GBC-Levels allein allerdings nur wenig aussagekräftig zu sein. Vielmehr stellt die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin eine wesentliche Voraussetzung dar, um seine Funktion im Präimplantationsembryo genauer analysieren zu können. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit neben GBC auch phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin betrachtet.

$\beta$ -Catenin kann durch zahlreiche verschiedene Kinasen an unterschiedlichen Aminosäureresten phosphoryliert werden (DAUGHERTY und GOTTARDI 2007). Seine N-terminale Phosphorylierung durch GSK3 an Ser33/Ser37/Thr41 hat in somatischen Zellen seine Degradierung (ABERLE et al. 1997) und somit eine Hemmung seiner Funktion in Signalübertragung und Genexpression zur Folge. Da uns dieser Umstand gerade auch im Zusammenhang mit der MET im frühen Embryo interessant erschien, richtete sich in der vorliegenden Studie unser Hauptaugenmerk auf N-PBC. Einige vergleichende Experimente

wurden darüber hinaus auch mit C-PBC durchgeführt. Diese C-terminale Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Ser552 kann beispielsweise durch die Enzyme Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB bzw. AKT) und AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) erfolgen und bewirkt vermutlich eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von  $\beta$ -Catenin (TAURIN et al. 2006; FANG et al. 2007; ZHAO et al. 2010), was ebenfalls im Hinblick auf die MET von Interesse sein könnte.

Die Proteinlevels von GBC und N-PBC waren wegen des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der eingesetzten Antikörper hinsichtlich ihrer Höhe nicht direkt miteinander vergleichbar. Dennoch kann aufgrund des im Westernblot festgestellten extrem großen Abundanzunterschieds davon ausgegangen werden, dass in den untersuchten Embryonen wesentlich mehr GBC als N-PBC vorlag. Da sich die Proteinlevels von GBC und N-PBC im Entwicklungsverlauf weitestgehend konstant hielten, war folglich der Anteil von N-PBC an GBC in den untersuchten Entwicklungsstadien gleich bleibend sehr niedrig. Hier zeigt sich eine tendenzielle Übereinstimmung mit APARICIO et al. (2010): Sie konnten in ihrer Studie nachweisen, dass  $\beta$ -Catenin in bovinen Embryonen im Blastozystenstadium an Ser33, Ser37 und Thr41 nicht phosphoryliert ist. Zwei Erklärungen sind an dieser Stelle vorstellbar: Zum einen wäre es möglich, dass GSK3, ein für die Phosphorylierung an dieser Position verantwortliches Enzym (YOST et al. 1996; LIU et al. 2002), in diesen frühen Entwicklungsstadien noch nicht vorhanden bzw. aktiv ist. Dem widerspricht allerdings eine Studie von DE VRIES et al. (2004), in der Hinweise darauf gefunden wurden, dass im murinen Präimplantationsembryo nicht nur Transkripte von GSK3 $\beta$  präsent sind, sondern der  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex auch schon funktionsfähig ist. Somit bietet sich als Alternative die Möglichkeit an, dass  $\beta$ -Catenin zwar durch GSK3 phosphoryliert, anschließend aber sofort abgebaut bzw. gespalten wird, so dass intaktes N-PBC nur in äußerst geringen Mengen nachgewiesen werden kann. Dies steht auch im Einklang mit der Aussage von MAHER et al. (2010), dass an diesen Aminosäureresten phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin in der Zelle im Allgemeinen nur als transientscher Zwischenschritt vorliegt und rasch abgebaut wird.

Im Gegensatz zu N-PBC war im Falle von C-PBC im Westernblot ein deutliches Signal zu erkennen, was vermutlich darauf hindeutet, dass ein relativ großer Anteil von GBC an Ser552 phosphoryliert war. Dies stimmt wiederum mit den Erkenntnissen von APARICIO et al. (2010) überein. Was den Verlauf des Proteinlevels während der frühen Embryonalentwicklung betrifft, ließ sich zumindest im Westernblot zwischen dem frühen und späten 8-Zellstadium wiederholt eine tendenzielle Abnahme der Signalstärke erkennen. Diese war jedoch aufgrund der geringen Embryonenanzahl statistisch nicht signifikant und konnte auch in der Laserscanningmikroskopie im Hinblick auf die mittlere Fluoreszenzintensität im Gesamtembryo nicht bestätigt werden. Im Zellkern wiederum war unter dem LSM eine leichte tendenzielle

Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen, allerdings erst nach dem späten 8-Zellstadium. Da die beschriebenen tendenziellen Abnahmen in den zeitlichen Bereich der embryonalen Genomaktivierung fallen, wäre es möglich, dass hier auch ein kausaler Zusammenhang besteht. VIGNEAULT et al. (2009a) konnten zeigen, dass es kurz vor der Hauptaktivierung des embryonalen Genoms zur Expression einer Reihe von Genen kommt, die vermutlich eine bedeutende Rolle für das Initiieren der eigentlichen MET spielen. Somit wäre es denkbar, dass das in der vorliegenden Arbeit untersuchte C-PBC in seiner transkriptionischen Funktion die Synthese eben dieser Genprodukte fördert, die dann wiederum die Genomaktivierung einleiten. Ist das embryonale Genom dann aktiviert, wäre N-PBC nicht mehr in den entsprechenden Mengen nötig und könnte beispielsweise abgebaut werden. Um diesbezüglich jedoch genauere Aussagen machen zu können, müssten diese vorläufigen Ergebnisse im Rahmen weiterer Arbeiten noch statistisch abgesichert sowie weitere Versuche durchgeführt werden.

### **5.3 Bindungsepitope der eingesetzten Antikörper und Varianten von $\beta$ -Catenin**

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper brachten im Westernblot unterschiedliche Bandenmuster hervor. Ein Vergleich dieser Bandenmuster lässt vermuten, dass im Präimplantationsembryo verschiedene  $\beta$ -Catenin-Varianten bzw.  $\beta$ -Catenin ähnliche Proteine vorkommen, worauf an dieser Stelle näher eingegangen werden soll.

Insgesamt wurden vier Antikörper eingesetzt, die laut Herstellerangaben gegen GBC, N-PBC oder C-PBC gerichtet sind und in unterschiedlichen Regionen binden: AK1 ist gegen GBC gerichtet und bindet im Bereich von Ser37. AK2 ist gegen N-PBC gerichtet, er bindet etwa in derselben Region wie AK1. AK3 ist wiederum gegen GBC gerichtet und bindet in der Region um Asp56, AK4 erkennt C-PBC und bindet in der Region um Ser552.

Bei Verwendung von AK1, AK2 und AK4 waren im Westernblot im Molekularbereich um 90 kDa zwei nahe beieinander liegende Banden zu erkennen, wohingegen AK3 nur die obere der beiden Banden anzeigte. Somit wäre denkbar, dass die untere der beiden Banden eine Splicingvariante von  $\beta$ -Catenin darstellt, bei der Position 56 nicht mehr vorhanden bzw. derart modifiziert ist, dass AK3 hier nicht mehr binden kann. Da sich diese beiden  $\beta$ -Catenin-Varianten hinsichtlich der Höhe und des Verlaufs ihres Proteinlevels jeweils vergleichbar verhielten und sich die Modifikation nur auf eine umschriebene Region des Proteins zu begrenzen schien, wurden sie bei der Betrachtung von GBC, N-PBC und C-PBC zusammengefasst.

AK2 zeigte darüber hinaus eine zusätzliche, wesentlich stärker ausgeprägte Bande im niedrigeren Molekularbereich, die dem noch nicht näher identifizierten Protein NIP zugeordnet wurde. Da AK3 und AK4 diese Bande nicht anzeigten, könnte es sich um eine N-terminal verkürzte  $\beta$ -Catenin-Variante handeln, beispielsweise um ein Spalt- oder Splicingprodukt vor Position 56. Fraglich bleibt hierbei allerdings, warum AK1, der ja annähernd im selben Bereich bindet wie AK2, diese Bande nicht anzeigte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich um eine im entsprechenden Aminosäurebereich zu 100% phosphorylierte  $\beta$ -Catenin-Variante handelt, AK1 aber nur mit dem hier unphosphorylierten Epitop reagiert. Folglich würde AK1 nicht GBC, sondern nur dephosphoryliertes  $\beta$ -Catenin erkennen. Durch eine Überprüfung des Bindungsverhaltens von AK1 gegen ein zu 100% phosphoryliertes Kontrolllysate konnte diese Theorie allerdings widerlegt werden (hier nicht dargestellt; laut persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. W. Tomek, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf). Als weitere Möglichkeit könnte man in Betracht ziehen, dass sich die Spaltstelle direkt hinter dem Bindungsepitop von AK2, aber noch innerhalb des etwas größeren Bindungsepitops von AK1 befindet. Somit könnte zwar AK2, nicht aber AK1 an das Spaltstück binden und die entsprechende Bande anzeigen. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass ein auf diese Art entstandenes Spaltstück von  $\beta$ -Catenin ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufweisen würde als das hier vorgefundene Protein. Möglicherweise bindet das Spaltstück aber auch an ein zusätzliches Protein, so dass sich insgesamt ein höheres Molekulargewicht ergibt. Alternativ könnte die Spaltstelle aber auch weiter C-terminal liegen und die Bindestelle von AK1 durch die Assoziation mit dem zusätzlichen Protein lediglich maskiert sein. Unabhängig von der Position der Spaltstelle könnte eine derartige Komplexbildung mit einem anderen Protein außerdem als spezifischer Degradierungsschutz wirken. Normalerweise würde man erwarten, dass ein im Rahmen der  $\beta$ -Catenin-Degradierung entstandenes Spaltstück relativ rasch weiter abgebaut wird. Zwar kam es auch im Fall von NIP zu einer tendenziellen Abnahme des Proteinlevels im Entwicklungsverlauf, doch war das Protein dennoch insgesamt in relativ großer Menge im Embryo nachweisbar. Somit wäre denkbar, dass es durch eine Assoziation mit einem anderen Protein vor einer überstürzten weiteren Degradierung geschützt wird und dadurch im frühen Embryo eine physiologische Funktion übernehmen kann, bevor es anschließend endgültig abgebaut wird.

Möglicherweise handelt es sich bei NIP aber gar nicht um eine direkte Variante von  $\beta$ -Catenin, sondern um ein ganz anderes Protein, das nur im Bereich zwischen Aminosäure 33 und 41 ähnliche Phosphorylierungsstellen wie  $\beta$ -Catenin aufweist. Zwar sind entsprechende Kreuzreaktionen von AK2 bislang nicht beschrieben, doch wäre es durchaus denkbar, dass das hier vorgefundene Protein in entsprechenden Tests nur noch nicht nachgewiesen wurde, da es sich vermutlich um ein rein embryospezifisches Protein handelt. Zumindest konnte es

bei begleitend zu dieser Arbeit durchgeführten Versuchen weder in Fibroblasten oder Granulosazellen, noch in Kontrolllysaten nachgewiesen werden (hier nicht dargestellt; laut persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. R. Pöhlend, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf). Möglicherweise handelt es sich um ein Protein oozytären Ursprungs, das im frühen Embryo in relativ großer Menge vorhanden ist und dort eine uns noch unbekannt Funktion übernimmt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde begonnen, mittels einer In-silico-Datenbankanalyse nach Proteinen zu suchen, die eine hohe Homologie zu den ersten 50 Aminosäuren von  $\beta$ -Catenin aufweisen und deren Molekulargewicht in etwa dem des hier nachgewiesenen Proteins entspricht (ca. 400 bis 450 Aminosäuren). In einem weiteren Schritt müssten dann Antikörper gegen die aufgefundenen Proteine gesucht und das in dieser Arbeit nachgewiesene NIP mit diesen Antikörpern getestet werden. Die Analyse war allerdings bei Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Um definitive Aussagen zur Herkunft dieses Proteins machen zu können, sollte als nächster Schritt versucht werden, es zu isolieren und anschließend genauer zu charakterisieren.

## **5.4 Lokalisation und Funktionen von $\beta$ -Catenin im bovinen Präimplantationsembryo**

Da die Funktion von  $\beta$ -Catenin eng mit seiner intrazellulären Lokalisation verknüpft ist (ORSULIC et al. 1999), kommt der subzellulären Verteilung von  $\beta$ -Catenin besondere Bedeutung zu. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit unter dem LSM ermittelt, wobei wiederum GBC, N-PBC und C-PBC betrachtet werden sollten. Da bei den LSM-Versuchen im Gegensatz zum Westernblot allerdings nicht zwischen intaktem N-PBC und NIP unterschieden werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei den in diesem Zusammenhang erhaltenen Fluoreszenzsignalen um die Summe dieser beiden Proteine (SHEP) handelt.

### **5.4.1 $\beta$ -Catenin in Zellmembran und Zytoplasma**

Die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in frühen Furchungsstadien wird nach wie vor stark und teilweise kontrovers diskutiert (GOVAL et al. 2000). Einigkeit herrscht im Allgemeinen darüber, dass  $\beta$ -Catenin hauptsächlich im Bereich der Zellmembran konzentriert ist (BARCROFT et al. 1998; ROGERS und VERMUZA 2000), wie dies auch in der vorliegenden Studie bei GBC der Fall war. Im Zytoplasma zeigte sich demgegenüber eine wesentlich geringere Fluoreszenzintensität. Was die Verteilung von  $\beta$ -Catenin innerhalb der Zellmembran betrifft, gehen die Meinungen weiter auseinander. So berichten BARCROFT et al. (1998) von einer gleichmäßigen Verteilung des  $\beta$ -Catenin-Signals entlang der Zellgrenzen früher Furchungsstadien

boviner Embryonen. Erst ab dem Morulastadium konnte eine Konzentration des Signals auf den Bereich von Zellkontakten nachgewiesen werden. Dies ist insofern schlüssig, als es erst ab dem Zeitpunkt der Kompaktierung zur Aktivierung der E-Cadherin medierte Zelladhäsion kommt (FLEMING et al. 2001; WATSON und BARCROFT 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine durchweg gleichmäßige zentrale Verteilung von GBC vorgefunden. Demgegenüber konnten OHSUGI et al. (1996) bereits bei murinen 2-Zellembryonen, also weit vor der Kompaktierung, eine apolare Verteilung von  $\beta$ -Catenin in der Zellmembran nachweisen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen liefern OHSUGI et al. (1999). Ihrer Studie zufolge kommt es bei Verwendung von Antikörpern, die an das aminoterminele Ende von  $\beta$ -Catenin binden, zu einer gleichmäßigen Fluoreszenzverteilung entlang der Zellmembran, während Antikörper gegen das C-terminale Ende ein auf den Bereich von Zellkontakten beschränktes Fluoreszenzsignal hervorrufen. Zu erklären sei dieses Phänomen damit, dass im Bereich freier Zelloberflächen das carboxyterminale Ende von  $\beta$ -Catenin durch Tyrosinphosphorylierung blockiert sei und somit die entsprechenden Antikörper nicht binden könnten. Durch diese Tyrosinphosphorylierung würden vermutlich Cadherin-Catenin-Komplexe in Bereichen, in denen keine Zelladhäsion benötigt wird, inaktiv gehalten und erst bei Bedarf aktiviert und gegebenenfalls transloziert. Dass ein gewisser Anteil der Cadherin-Catenin-Komplexe schon vor der Kompaktierung aktiv zu sein scheint, lässt sich damit erklären, dass auch die Adhäsion der Blastomeren früherer Furchungsstadien E-Cadherin vermittelt sein könnte, selbst wenn hier noch keine vollständig aktiven Adhaerens junctions vorliegen (JOHNSON und MCCONNELL 2004). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Antikörper, die gegen das N-terminale Ende von GBC gerichtet sind, verwendet wurden, sind die erzielten Ergebnisse auch mit den letztgenannten Studien in Einklang zu bringen.

Im Gegensatz zu GBC konnte im Fall von SHEP keine Konzentration auf den Bereich der Zellmembran nachgewiesen werden. Vielmehr waren die Fluoreszenzintensitäten von SHEP in Zellmembran und Zytoplasma annähernd gleich hoch, lediglich in einzelnen Fällen war in der Zellmembran eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität zu erkennen. In beiden Zellkompartimenten zeigte sich ein diffuses Verteilungsmuster. SHEP schien somit gar nicht an der Zellmembran verankert zu sein, sondern mit dem zytoplasmatischen SHEP-Pool in ständigem Diffusionsgleichgewicht zu stehen. Geht man davon aus, dass SHEP sich aus verschiedenen N-PBC-Varianten zusammensetzt, entsprechen diese Ergebnisse einer an somatischen Zellen durchgeführten Studie von MAHER et al. (2010). Hier wurde gezeigt, dass an eben diesen Aminosäureresten phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin nicht mit E-Cadherin interagieren kann, was die Autoren damit begründen, dass es überwiegend mit Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes assoziiert ist. Unsere N-PBC-Varianten wären demnach gar nicht in Adhaerens junctions-Komplexe bzw. deren Vorläufer eingebunden und somit auch nicht an

der Zellmembran verankert. Folglich scheint N-PBC bei der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion keine Rolle zu spielen. Dasselbe gilt für den Fall, dass es sich bei SHEP überwiegend um ein von  $\beta$ -Catenin unabhängiges Proteine handelt. Auch dieses würde dann vermutlich keine bedeutende Funktion für die Zelladhäsion übernehmen.

Verglichen mit der Zellmembran war der Anteil von SHEP an GBC im Zytoplasma wesentlich höher. Falls es sich also bei SHEP um N-PBC-Varianten handelt, wäre im Zytoplasma somit ein wesentlich höherer Anteil des GBC an den entsprechenden Aminosäureresten phosphoryliert. Auch dies entspräche dem bestehenden Bild von  $\beta$ -Catenin. Denn solange es zu keiner Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, beispielsweise infolge eines Wnt-Signals, kommt, wird zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin kontinuierlich durch GSK3 phosphoryliert und infolgedessen proteasomal abgebaut (ABERLE et al. 1997).

Während sich die Fluoreszenzintensität von SHEP im Laufe der Entwicklung vom 4- zum 16/18-Zellstadium in Zellmembran und Zytoplasma konstant hielt, zeigten sich im Fall von GBC zumindest in Versuchsabschnitt 2 gewisse Schwankungen. In der Zellmembran war zwischen dem 4- und 6-Zellstadium ein signifikanter Abfall und zwischen dem späten 8- und 10/12/14-Zellstadium wiederum ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Zur gleichen Zeit kam es im Zytoplasma zunächst zu einem signifikanten Anstieg und anschließend wieder zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität von GBC. Diese Schwankungen könnten folgendermaßen erklärt werden: Bis zum 4-Zellstadium könnte noch oozytäres  $\beta$ -Catenin, das während der Oozytenreifung für die interzellulären Kontakte zwischen Eizelle und Cumuluszellen von Bedeutung war, an der Zellmembran des Embryos vorhanden sein. Da es im frühen Präimplantationsembryo für die Zelladhäsion nicht mehr in derart großen Mengen benötigt wird, kommt es nun zum Abbau des maternalen  $\beta$ -Catenins. Dieser findet im Zytoplasma statt, weshalb das GBC-Level dort kurzfristig ansteigt und gleichzeitig an der Zellmembran sinkt. Während der Degradierung des überschüssigen  $\beta$ -Catenins sinkt das GBC-Level im Zytoplasma allmählich wieder. Aufgrund der im Entwicklungsverlauf zunehmenden Zelladhäsion der Blastomeren wird schließlich neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin wieder an die Zellmembran transportiert, was den neuerlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität von GBC in der Zellmembran erklären würde.

Alternativ wäre auch denkbar, dass das sich im Zytoplasma anhäufende GBC nicht degradiert wird, sondern an der unter Kapitel 5.5 beschriebenen Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern beteiligt ist.

Im Fall von SHEP ist aufgrund der konstanten Proteinlevels davon auszugehen, dass sich de novo Phosphorylierung und Abbau im Gleichgewicht befinden. Alternativ wäre auch hier eine Translokation in den Zellkern vorstellbar, wobei sich in diesem Fall die Menge an de novo phosphoryliertem und translozierendem Protein entsprechen müssten.

Dass in Versuchsabschnitt 4 die eben beschriebenen Fluoreszenzintensitätsschwankungen von GBC nicht bestätigt werden konnten, lässt sich möglicherweise durch den in diesem Versuchsabschnitt kleineren Stichprobenumfang erklären. Es wäre allerdings auch denkbar, dass beispielsweise unterschiedliche Zellzyklusaktivitäten der Embryonen, schwankende Oozytenqualitäten oder Schwankungen im IVP-Regime die GBC-Konzentrationen zusätzlich beeinflussen, so dass der Einfluss des Entwicklungsstandes teilweise überdeckt wird.

Im Gegensatz zu SHEP ließ sich bei Betrachtung von C-PBC bei einigen der untersuchten Embryonen eine deutliche fluoreszenzbedingte Abgrenzbarkeit der Zellmembran beobachten. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des membrangebundenen  $\beta$ -Catenins an Position 552 phosphoryliert ist. Auch MAHER et al. (2010) konnten bereits nachweisen, dass C-PBC in somatischen Zellen im Bereich von Zellkontakten auftreten und mit E-Cadherin assoziieren kann. Welche Rolle es hierbei genau spielt, bleibt allerdings unbekannt.

### 5.4.2 $\beta$ -Catenin im Zellkern

Ob bzw. ab wann  $\beta$ -Catenin im Zellkern von Präimplantationsembryonen auftritt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Während GOVAL et al. (2000) sowie ROGERS und VERMUZA (2000) bei murinen Präimplantationsembryonen keine Hinweise auf ein Vorkommen von  $\beta$ -Catenin im Zellkern fanden, konnten BARCROFT et al. (1998) sowie PAUKEN und CAPCO (1999) bei bovinen bzw. murinen Präimplantationsembryonen dort durchaus ein  $\beta$ -Catenin-Signal nachweisen. Dieses war allerdings verglichen mit der Fluoreszenzintensität in der Zellmembran deutlich schwächer ausgeprägt und überschritt zu keinem Zeitpunkt die im umgebenden Zytoplasma nachgewiesene Intensität. Diese beiden letztgenannten Studien stehen auch im Einklang mit der vorliegenden Arbeit, in der vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium im Zellkern ein durchgehend konstantes, wenn auch im Vergleich zum Zytoplasma und vor allem zur Zellmembran wesentlich geringeres Fluoreszenzsignal von GBC nachgewiesen werden konnte. Das Vorkommen von  $\beta$ -Catenin im Zellkern wird meist mit einem aktiven kanonischen Wnt-Signalweg in Zusammenhang gebracht. In Anwesenheit eines Wnt-Signals kommt es zur Stabilisierung und folglich zur Akkumulation von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin. Anschließend transloziert es in den Zellkern, wo es als Transkriptionskoaktivator wirksam wird (WILLERT und NUSSE, 1998). Allerdings wird von zahlreichen Wissenschaftlern die Meinung vertreten, dass dieser Wnt-Signalweg während der frühen präimplantatorischen Embryonalentwicklung noch nicht bzw. nicht vollständig aktiv ist (KEMLER et al. 2004; DE VRIES et al. 2004; HARWOOD et al. 2008). Dass in der vorliegenden und den oben genannten Studien dennoch  $\beta$ -Catenin im Zellkern von Präimplantationsembryonen nachzuweisen war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass

bereits einige Teilbereiche des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs funktionsfähig sein könnten. Alternativ könnte das nukleäre  $\beta$ -Catenin im frühen Präimplantationsembryo auch eine vom Wnt-Weg völlig unabhängige Rolle spielen.

Während das GBC-Level im Zellkern im Laufe der präimplantatorischen Embryonalentwicklung keine Veränderungen zeigte, stieg das SHEP-Signal vom 4- bis zum 16/18-Zellstadium kontinuierlich von Werten weit unter denen von Zytoplasma und Zellmembran auf Werte weit darüber an. Um diesen Anstieg besser interpretieren zu können, wäre es interessant zu wissen, auf welchem Proteinanteil von SHEP er beruht. Da das GBC-Level konstant blieb, liegt die Annahme nahe, dass es sich nicht um einen Anstieg von N-PBC, sondern von NIP handelt, da NIP ja nur durch AK2 und nicht durch AK1 erkannt wird. Demnach würde also ein bisher noch nicht identifiziertes Protein im Lauf der Embryonalentwicklung im Zellkern akkumulieren. Da allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig unklar ist, um welches Protein es sich hierbei handeln könnte, können an dieser Stelle noch keinerlei Aussagen zu der Bedeutung seiner etwaigen Akkumulation im Zellkern gemacht werden. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Anstieg des SHEP-Signals im Zellkern vielleicht doch auf N-PBC zurückzuführen ist. Das zunächst paradox erscheinende Phänomen, nämlich der Anstieg von N-PBC bei fehlendem Anstieg von GBC, ließe sich dann beispielsweise damit erklären, dass sich verhältnismäßig viel mehr dephosphoryliertes als phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin im Zellkern befindet. Somit würde sich ein Anstieg von Letzterem bei Betrachtung des GBC-Levels kaum auswirken. Da das GBC-Level im Zellkern aber insgesamt extrem niedrig war, ist diese Theorie sehr unwahrscheinlich. Vermutlich ließe sich der Sachverhalt methodisch begründen: Da im Vergleich zu GBC nur wenig N-PBC im Gesamtembryo vorkam, wurde das N-PBC-Signal extrem verstärkt. Dadurch wurden bei N-PBC die Unterschiede im Zellkern deutlich, wohingegen sie bei der Betrachtung von GBC, das im Zellkern ja insgesamt nur in geringen Spuren aufzufinden war, gar nicht detektiert werden konnten.

Der Anstieg des SHEP-Signals im Zellkern kann entweder auf einer de-novo-Phosphorylierung ohne anschließende Degradierung oder Dephosphorylierung, auf einer Translokation von bereits phosphoryliertem Protein oder auf einer Kombination aus beiden Ereignissen beruhen. Da das Proteinlevel von N-PBC im Gesamtembryo allerdings nicht anstieg und im Fall von NIP sogar eine tendenzielle Abnahme im Entwicklungsverlauf zu verzeichnen war, ist eine reine Translokation am wahrscheinlichsten. Dafür sprechen zudem die Ergebnisse der FRAP-Analysen, die deutlich machen, dass es während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung zu aktiven Translokationsprozessen von  $\beta$ -Catenin kam. Allerdings ließ sich im Live Cell Imaging nicht zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin unterscheiden. Dennoch wäre es aufgrund der geschilderten Ergebnisse denkbar, dass phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin, sei es nun intaktes N-PBC oder eine N-PBC-Variante, in den

Zellkern transloziert. Doch auch eine de-novo-Phosphorylierung, gegebenenfalls verbunden mit einer vorhergehenden oder anschließenden Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, kann im vorliegenden Fall nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dass es trotzdem zu keinem Anstieg des SHEP-Levels im Gesamtembryo kam, könnte folgendermaßen erklärt werden: In der Zellmembran und vor allem im Zytoplasma als dem größten der drei Zellkompartimente könnte verhältnismäßig so viel mehr SHEP vorliegen als im relativ kleinen Zellkern, dass sich der dortige Anstieg auf das Gesamtproteinlevel nicht messbar auswirkt. Denkbar wäre prinzipiell auch, dass ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung herrscht, wobei die Dephosphorylierung dann aber nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma ablaufen müsste, wofür allerdings keine Hinweise gefunden wurden.

Da NIP bisher noch nicht identifiziert ist, wäre prinzipiell auch denkbar, dass es sich bei dem im Zellkern akkumulierenden Protein gar nicht um N-PBC oder eine N-PBC-Variante, sondern ein von  $\beta$ -Catenin völlig unabhängiges Protein handelt. Dagegen spricht allerdings, dass einerseits, wie eben ausgeführt, nachweislich eine Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern stattfand und andererseits auch eine Akkumulation von C-PBC im Zellkern festgestellt wurde, auf die im Lauf dieses Kapitels noch näher eingegangen wird. Das Auftreten von N-PBC im Zellkern wäre wiederum insofern überraschend, als bisher davon ausgegangen wurde, dass  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma phosphoryliert und infolgedessen auch dort rasch abgebaut wird. Im Zellkern wurde unseres Wissens bisher nur an den Aminosäureresten Ser33, Ser37 und Thr41 dephosphoryliertes  $\beta$ -Catenin nachgewiesen, das im Rahmen einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Zytoplasma akkumuliert und anschließend in den Zellkern transloziert war, wo es dann als aktive Form von  $\beta$ -Catenin an der Genexpression beteiligt ist (ABERLE et al. 1997; SALOMON et al. 1997). Auch laut MAHER et al. (2010) liegt N-PBC hauptsächlich im Zytoplasma und nicht im Zellkern vor, wobei allerdings unklar ist, ob dies auf eine Retention von derart phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma oder auf einen Export aus dem Zellkern zurückzuführen ist. Gemäß STAAL et al. (2002) sowie ARMSTRONG et al. (2007) kann  $\beta$ -Catenin die Transkription im Zellkern nur aktivieren, wenn es aktiv, also hypophosphoryliert, ist. Somit kann eine mögliche nukleäre Akkumulation von N-PBC nicht auf einen aktiven Wnt-Signalweg zurückzuführen sein. Welche Rolle es also im Zellkern spielen könnte, ist unklar.

Unabhängig davon, ob es sich bei dem akkumulierenden Protein nun um N-PBC oder etwas anderes handelt, zeigt die Tatsache, dass es offensichtlich akkumulierte und im Fall von N-PBC vermutlich sogar aktiv in den Kern translozierte, dass dieses Protein durchaus eine physiologische Funktion im Zellkern innehaben könnte. Einen weiteren Hinweis hierauf liefert die Beobachtung, dass es im Laufe der präimplantatorischen Embryonalentwicklung neben dem Anstieg auch zu einer zunehmenden Konzentration von SHEP auf bestimmte Kernbe-

reiche kam. Dies könnte auf eine im Zellkern stattfindende Interaktion mit anderen Proteinen zurückzuführen sein. Diese Proteinkomplexe könnten dann möglicherweise wiederum eine Funktion bei der Genexpression haben. Um hierzu jedoch konkrete Aussagen machen zu können, sind weitere Forschungsarbeiten nötig.

Auch bei der Untersuchung von C-PBC konnte, wie oben bereits angedeutet, eine Färbung im Kern nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu SHEP kam es hier allerdings im Lauf der Entwicklung nach einem Anstieg auch wieder zu einem tendenziellen Abfall der Fluoreszenzintensität. Dieser Rückgang der Phosphorylierung im Zellkern fällt ungefähr in den Zeitraum der embryonalen Genomaktivierung. Möglicherweise liefert er einen Hinweis darauf, dass C-PBC im Zellkern eine Funktion im Rahmen der Aktivierung des embryonalen Genoms spielen könnte.

Da SHEP und C-PBC im Zellkern ein vergleichbares Verteilungsmuster (teilweise zonale Verteilung mit Ausbildung von nuclear bodies) aufwiesen, ließe sich vermuten, dass dieselben  $\beta$ -Catenin-Moleküle an beiden Phosphorylierungsstellen gleichzeitig phosphoryliert sind. Dem widerspricht allerdings das im Westernblot ermittelte Bindungsverhalten der verschiedenen Phospho- $\beta$ -Catenin-Antikörper: Das durch AK4 angezeigte C-PBC wurde von AK2 nahezu nicht erkannt, wohingegen das mit AK2 reagierende NIP von AK4 nicht erkannt wurde. Möglicherweise erfolgen die unterschiedlichen Phosphorylierungsschritte im Rahmen von Spaltungs- und Abbauprozessen aber auch nacheinander, was wiederum eine Erklärung für das zeitlich etwas verzögerte Auftreten der nuclear bodies bei SHEP im Vergleich zu C-PBC darstellen würde. Inwiefern ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin am amino- und carboxyterminalen Ende besteht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, mittels Kolokationsanalysen zu testen, ob beide Proteinformen an identischen Stellen im Zellkern vorkommen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass  $\beta$ -Catenin im Zellkern boviner Präimplantationsembryonen vermutlich überwiegend an Ser33/Ser37/Thr41 und bzw. oder an Ser552 phosphoryliert ist. Beide Phosphorylierungsformen scheinen eine physiologische Funktion im Zellkern wahrzunehmen, die eventuell mit der embryonalen Genomaktivierung in Zusammenhang stehen könnte. Um diese Funktionen allerdings genauer analysieren zu können, sind noch weitere Forschungsarbeiten nötig.

## 5.5 Perinukleäre Verdichtung und Translokationsprozesse von $\beta$ -Catenin

Bei näherer Betrachtung des Verteilungsmusters von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma konnte in der vorliegenden Studie eine Besonderheit nachgewiesen werden: Bereits im 6-Zellstadium war bei einem geringen Anteil der Embryonen im Zytoplasma eine perinukleäre Fluoreszenzverdichtung (Corona) nachzuweisen. Der Anteil der betroffenen Embryonen stieg mit zunehmendem Entwicklungsstadium bis zur Gruppe der 10- bis 14-Zellembryonen an. Diese perinukleäre Akkumulation war allerdings nur bei Verwendung des Antikörpers gegen GBC nachweisbar, nicht bei dem gegen N-PBC gerichteten Antikörper. Demgegenüber waren bei dem gegen C-PBC gerichteten Antikörper bei einem Teil der untersuchten Embryonen bodies im kernnahen Zytoplasma zu erkennen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei dem perinukleär akkumulierten  $\beta$ -Catenin vermutlich überwiegend um die dephosphorylierte Form dieses Proteins handelt. Ein geringerer Anteil scheint C-terminal phosphoryliert zu sein, für eine N-terminale Phosphorylierung liegen keine Hinweise vor.

BARCROFT et al. (1998) konnten bei bovinen IVP-Embryonen ebenfalls eine perinukleäre Verteilung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma nachweisen, allerdings erst im Morulastadium (16- bis 32-Zell-Morula). Sie erklären dieses Phänomen mit einer möglichen Shuttle-Rolle von  $\beta$ -Catenin bei der Bildung von Tight junctions. Demnach würde  $\beta$ -Catenin mit zonula occludens-1 (ZO-1) im Bereich des perinukleären Zytoplasmas assoziieren, anschließend an die lateralen Membranen wandern und dadurch Komponenten von Tight junctions an ihren Zielort transportieren. ZO-1 konnte in ihrer Studie allerdings erst ab dem Morulastadium nachgewiesen werden, während die perinukleäre Verdichtung von  $\beta$ -Catenin in der vorliegenden Arbeit bereits wesentlich früher festzustellen war. Somit ist eine an ZO-1 gekoppelte Translokation von  $\beta$ -Catenin als Begründung für die hier beobachtete perinukleäre Akkumulation eher unwahrscheinlich.

Voraussetzung für die Entstehung von Tight junctions ist die vorhergehende Bildung von Adhaerens junctions (FLEMING et al. 2000). Zwar kommt es erst mit Beginn der Kompaktierung zur Aktivierung einer stabilen durch Adhaerens junctions medierte Zelladhäsion, jedoch werden die benötigten Bestandteile bereits in frühesten Embryonalstadien bereitgestellt und an die Zellmembran transportiert (FLEMING et al. 2001; WATSON und BARCROFT 2001). Gemäß einer Studie von CHEN et al. (1999) übernimmt  $\beta$ -Catenin auch hier die Rolle eines Transporteurs, indem es neu synthetisiertes E-Cadherin noch im ER bindet und von dort an die Zellmembran transportiert. Somit wäre auch denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete perinukleäre Verdichtung von  $\beta$ -Catenin in Zusammen-

hang mit der Bildung von Adhaerens junctions steht. Einen Hinweis darauf liefert auch die Beobachtung von BARCROFT et al. (1998), dass neben  $\beta$ -Catenin auch E-Cadherin in Bereichen um den Zellkern akkumuliert, und zwar bereits ab dem 4-Zellstadium.

Alternativ besteht aber auch die Möglichkeit, dass die perinukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin nicht die Vorstufe für dessen Transport an die Zellmembran, sondern in den Zellkern darstellt. Gemäß einer Studie von YAMOUCHI und KUROSAKA (2009b) ist in somatischen Zellen eine stimulierte Translokation von  $\beta$ -Catenin von der Zellmembran in den Zellkern ebenfalls mit einer perinukleären Verdichtung von  $\beta$ -Catenin assoziiert. Zudem belegen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FRAP-Analysen eindeutig, dass es während der präimplantatorischen Embryonalentwicklung zu einer Translokation von  $\beta$ -Catenin aus dem Zytoplasma in den Zellkern kommt. Da SHEP offensichtlich keine Corona ausbildet, handelt es sich hierbei vermutlich um eine Translokation von zumindest vorerst zum Großteil dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin, allerdings verbunden mit einem Anstieg beider Phospho- $\beta$ -Catenin-Levels im Zellkern bei konstant bleibendem GBC-Level. Folgende Erklärung wäre für dieses Phänomen denkbar: Dephosphoryliertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert in der perinukleären Region, wird dort bereits teilweise C-terminal phosphoryliert, anschließend in den Zellkern transportiert und formiert sich in bestimmten Kernregionen zu nuclear bodies. So kommt es im Zellkern zu der bereits in frühesten Entwicklungsstadien beobachteten Akkumulation von C-PBC, das dort dann seine physiologische Funktion beispielsweise im Vorlauf der embryonalen Genomaktivierung ausüben kann. Möglicherweise zeitlich etwas verzögert wird C-PBC dann auch N-terminal phosphoryliert, was den etwas später einsetzenden Anstieg von nuclear bodies im Fall von SHEP erklären könnte. GSK3 konnte in unterschiedlichen Zelllinien nicht nur im Zytoplasma, sondern teils in geringeren Mengen auch im Zellkern lokalisiert werden, wo es sogar verhältnismäßig aktiver ist (BIJUR und JOPE, 2003; MEIJER et al. 2004). Deshalb erscheint es durchaus möglich, dass es im Embryo zu einer N-terminalen Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern kommen könnte. Im Anschluss an diese zweite Phosphorylierung kommt es rasch zur Spaltung und zum teilweisen Abbau des nun nicht mehr benötigten C-PBC, so dass sein Anteil im Kern bereits wieder sinkt. Übrig bleibt ein die N-terminalen Phosphorylierungsstellen enthaltendes Spaltstück von  $\beta$ -Catenin, das seine Lokalisation im Kern beibehält und weiterhin akkumuliert. Da dieses Spaltstück offensichtlich von dem gegen GBC gerichteten Antikörper nicht erkannt wird, wäre es vorstellbar, dass es mit anderen Proteinen assoziiert ist. Möglicherweise erfüllt es selbst noch eine physiologische Funktion im Zellkern, da es offensichtlich nicht sofort abgebaut wird.

Zu diesem Modell gibt es sicherlich noch zahlreiche Alternativen. Denkbar wäre beispielsweise auch, dass beide Phospho- $\beta$ -Catenin-Varianten voneinander völlig unabhängig im Zellkern vorkommen. Im Falle von NIP könnte es sich ferner um eine Splicing-Variante

anstelle eines Spaltprodukts von  $\beta$ -Catenin handeln, die möglicherweise zudem eine völlig andere Funktion übernimmt. Oder aber es liegt hier gar nicht  $\beta$ -Catenin, sondern ein ganz anderes Protein mit ähnlichen Phosphorylierungsstellen vor, was eine weitere Erklärung für die fehlende Reaktion mit dem gegen GBC gerichteten Antikörper liefern würde. Des Weiteren ist das hier beschriebene Verhalten von C-PBC aufgrund zu geringer Embryonenzahlen statistisch noch nicht ausreichend abgesichert. Weiterhin ist noch nicht geklärt, an welchen genauen Orten in der Zelle es zu den unterschiedlichen Phosphorylierungsschritten kommt. Somit bleiben zahlreiche interessante Fragen offen, die in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden sollen.

Zusammenfassend lassen sich bisher folgende Aussagen treffen: Im Laufe der frühen präimplantatorischen Embryonalentwicklung kommt es zu einer perinukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin, die zeitlich und räumlich mit Ereignissen im Zellkern in Beziehung zu stehen scheint. Dabei ist jedoch noch unklar, ob es sich hierbei um die Quelle oder das Auffangbecken des nukleären  $\beta$ -Catenins handelt. Weiterhin bleibt ungeklärt, wie genau diese perinukleäre Akkumulation mit unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern von  $\beta$ -Catenin in Zusammenhang steht. Zur genaueren Abklärung der Funktion dieser perinukleären Verdichtung müssten im Rahmen zukünftiger Arbeiten die genauen Orte der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bestimmt und mit der Corona koloziert werden.

### **5.6 Effekte eines GSK3-Inhibitors**

Die eben beschriebene Akkumulation von phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin im Zellkern präimplantatorischer Embryonen deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bereits in diesen frühesten Entwicklungsstadien eine bedeutende Rolle spielt. Um die diesbezüglichen Zusammenhänge noch genauer analysieren zu können, wurden die Auswirkungen einer Hemmung der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Ser33/Ser37/Thr41 auf die Weiterentwicklung der Embryonen sowie auf das Proteinlevel und Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin untersucht.

Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an den N-terminalen Aminosäureresten Ser33, Ser37 und Thr41 erfolgt durch GSK3 (YOST et al. 1996; LIU et al. 2002). Diese Phosphorylierung bewirkt, dass zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin ubiquitiniert und anschließend dem proteasomalen Abbau zugeführt wird, wohingegen infolge einer Hemmung von GSK3 hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin stabilisiert wird und in den Zellkern transloziert (ABERLE et al. 1997, SALOMON et al. 1997). Ob in frühen Embryonalstadien bereits ähnliche Verhältnisse vorherrschen, sollte durch den Einsatz eines GSK3-Inhibitors getestet werden.

Der hierbei verwendete GSK3-Inhibitor IX (Fa. Merck, Darmstadt), auch bezeichnet als BIO ((2'Z, 3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime; C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), ist laut Herstellerangaben ein hochpotenter, selektiver und reversibler Inhibitor von GSK3 $\alpha/\beta$ . Seine mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) beträgt 5 nM (POLYCHRONOPOULOS et al. 2004). Er wurde in der vorliegenden Studie in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM sowie 500 nM eingesetzt.

### 5.6.1 Zytotoxizität des GSK3-Inhibitors

Mehreren Studien zufolge zeigt BIO konzentrationsabhängig zytotoxische Effekte in Zellkulturen. So trat gemäß einer Studie von LLUIS et al. (2008) in embryonalen Stammzellen bei Konzentrationen über 1  $\mu$ M eine leicht toxische Wirkung auf. ATILLA-GOKCUMEN et al. (2006) wiesen in HeLa Zellen bei einer Inhibitorkonzentration von 3  $\mu$ M erste Anzeichen einer Zytotoxizität nach, ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M war die zytotoxische Wirkung deutlich zu erkennen. Auch TSENG et al. (2006) konnten in neonatalen Cardiomyozyten ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M deutliche zytotoxische Effekte beobachten.

Inwiefern ein Einsatz von BIO die Weiterentwicklungsfähigkeit von Präimplantationsembryonen beeinflusst, ist unseres Wissens noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien konzentrationsabhängige Unterschiede bzgl. der Entwicklungsraten der Embryonen nachgewiesen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten eher niedrigen Inhibitorkonzentrationen zwischen 50 nM und 500 nM keinerlei zytotoxische Wirkung auf präimplantatorische Embryonen haben.

### 5.6.2 Einfluss des GSK3-Inhibitors auf Proteinlevel und Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin

Es gibt eine Reihe von Studien, die die Wirkung von BIO auf unterschiedliche Zelllinien beschreiben. Eine Zusammenfassung der einzelnen Erkenntnisse ergibt im Wesentlichen folgendes Bild: BIO reduziert die durch GSK3 mediierte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin (MEIJER et al. 2003), was zur Folge hat, dass einerseits das Level an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin sinkt (LLUIS et al. 2008) und andererseits das Level an dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin ansteigt (MEIJER et al. 2003). Da die Halbwertszeit von dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin höher ist als die von phosphoryliertem, ist außerdem ein moderater Anstieg des GBC-Levels zu beobachten (MEIJER et al. 2003).

Darüber hinaus konnte häufig eine nukleäre Translokation und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in mit BIO behandelten Zellen beobachtet werden, gepaart mit einer Erhöhung der funktionalen Aktivität von  $\beta$ -Catenin, was einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs entspricht (SATO et al. 2004; TSENG et al. 2006; LLUIS et al. 2008; YAMOUCI und KUROSAKA 2009a,b).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich im Vergleich hierzu allerdings teilweise ein etwas anderes Bild:

Der eingesetzte GSK3-Inhibitor zeigte die Höhe des Proteinlevels von GBC betreffend im Westernblot keinerlei Auswirkungen. Ebenso wenig deutete sich eine Beeinflussung der Proteinlevels von N-PBC und NIP an. Im Fall von C-PBC war ebenfalls keine Wirkung des Inhibitors zu verzeichnen, was allerdings den Erwartungen entsprach, da die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an Ser552 nicht durch GSK3 mediiert ist.

Die LSM-Versuche ließen bezüglich der mittleren Fluoreszenzintensität im Gesamtembryo lediglich im 4-Zellstadium bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM die erwarteten Effekte erkennen: einen Abfall von SHEP sowie einen Anstieg von GBC. Demgegenüber kam es beim Einsatz der höheren Inhibitorkonzentration (500 nM) zu einem Abfall von GBC im 4- und 16/18-Zellstadium, was den erwarteten Effekten widerspricht. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch um Artefakte. Es wäre durchaus vorstellbar, dass neben der Inhibitorkonzentration auch andere Faktoren, beispielsweise unterschiedliche Zellzyklusaktivitäten der Embryonen oder schwankende Oozytenqualitäten, die Proteinlevels von  $\beta$ -Catenin beeinflussen. Auf die Höhe der Fluoreszenzintensität von SHEP ließen sich keine Auswirkungen erkennen. Ebenso wenig traten in den restlichen Entwicklungsstadien inhibitorabhängige Unterschiede auf.

Eine mögliche Erklärung für den überwiegend fehlenden Effekt von BIO auf die Höhe der Gesamtproteinlevels von GBC, N-PBC und NIP wäre, dass GSK3 in bovinen Präimplantationsembryonen noch nicht vorhanden ist und somit gar nicht gehemmt werden kann. In diesem Fall müsste man davon ausgehen, dass es sich bei den wenigen dennoch beobachteten scheinbaren Auswirkungen von BIO in Wahrheit um Artefakte handelt. Dem widerspricht allerdings die bereits oben erwähnte Studie von DE VRIES et al. (2004), in der in murinen Präimplantationsembryonen ein bereits funktionsfähiger  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex nachgewiesen wurde. Zudem konnten APARICIO et al. (2010) zeigen, dass GSK3 auch in bovinen Embryonen vom 2-Zell- bis zum Blastozystenstadium in seinen beiden Isoformen GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  präsent ist. Dabei scheint allerdings eine zunehmende Inaktivierung von GSK3 durch Serinphosphorylierung Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklung zum Blastozystenstadium zu sein. Für eine Inaktivierung von GSK3 sind unter anderem AKT und PKA zuständig (HINO et al. 2005; FANG et al. 2007), eben jene Kinasen, die  $\beta$ -Catenin auch an Ser552

phosphorylieren können (TAURIN et al. 2006; FANG et al. 2007). Da in der vorliegenden Studie C-PBC nachgewiesen wurde, ist es naheliegend, dass zumindest eine der genannten Kinasen im frühen bovinen Präimplantationsembryo aktiv ist. Somit wäre auch denkbar, dass eventuell mit Ausnahme des 4-Zellstadiums, in dem zumindest teilweise Effekte des GSK3-Inhibitors zu erkennen waren, GSK3 in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsstadien nicht ausreichend aktiv war, um durch eine zusätzliche Hemmung durch BIO einen sichtbaren Effekt bzgl. der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin erzielen zu können. Dafür spricht auch das in dieser Studie nachgewiesene extrem niedrige Level an intaktem N-PBC. Möglicherweise wird  $\beta$ -Catenin in bovinen Präimplantationsembryonen noch gar nicht bzw. kaum durch GSK3 phosphoryliert. Dies steht wiederum in Einklang mit APARICIO et al. (2010), die in bovinen Blastozysten keine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an den Aminosäureresten Ser33, Ser37 und Thr41 nachweisen konnten. Das im Westernblot detektierte NIP, das ja eine wesentlich deutlichere Phosphorylierung aufwies als intaktes N-PBC, könnte unter diesen Voraussetzungen dann allerdings während der hier untersuchten Phase der Embryonalentwicklung ebenfalls nicht durch GSK3 phosphoryliert werden. Denkbar wäre, dass dieses Protein entweder durch ein anderes Enzym an den entsprechenden Aminosäureresten phosphoryliert wird oder aber oozytären Ursprungs ist und im Entwicklungsverlauf keine weitere Veränderung seines Phosphorylierungsstatus durchläuft.

Geht man davon aus, dass NIP möglicherweise gar nicht durch GSK3 phosphoryliert wird und BIO somit auch keinen Einfluss auf sein Proteinlevel nehmen kann, eröffnet sich eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den mangelnden Effekt von BIO insbesondere auf SHEP: SHEP setzt sich vermutlich zum überwiegenden Teil aus NIP und nur zu einem geringen Anteil aus N-PBC zusammen. Selbst falls BIO also das Proteinlevel von N-PBC beeinflussen sollte, würde dies bei Betrachtung von SHEP aufgrund der sich nicht ändernden und wesentlich größeren Menge von NIP gar nicht ersichtlich. Dass im Westernblot auch im Fall von N-PBC keine inhibitorabhängigen Veränderungen gesichert werden konnten, kann durch fehlende Wiederholungen begründet werden. Alternativ wäre vorstellbar, dass die entsprechenden Effekte bei Betrachtung des N-PBC-Levels im Gesamtembryo nicht sichtbar werden, weil insgesamt nur ein extrem kleiner Teil des  $\beta$ -Catenins phosphoryliert ist, so dass eine weitere Abnahme nahezu nicht zu erkennen ist.

Alternativ wäre denkbar, dass BIO in der eingesetzten Konzentration bei bovinen Embryonen keine zuverlässige Wirkung zeigt. Im Vergleich zu Studien an verschiedenen Zellkulturen waren die in dieser Studie verwendeten Inhibitorkonzentrationen (nanomolarer Bereich) eher niedrig. Gemäß einer Studie von ATILA-GOCKUMEN et al. (2006) benötigt man in Zellkulturen für einen sichtbaren Effekt mikromolekulare Konzentrationen von BIO. Die am häufigsten erfolgreich eingesetzten Konzentrationen dieses GSK3-Inhibitors liegen zwischen

1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  (ATILA-GOKCUMEN et al. 2006; TSENG et al. 2006; LLUIS et al. 2008; ULLMANN et al. 2008). Allerdings liegt laut Herstellerangaben die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von BIO bei 5 nM, weshalb bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von bis zu 500 nM ein sichtbarer Effekt erwartet wurde.

In gewissem Widerspruch zu all diesen Theorien steht die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Studie inhibitorabhängig eine Abnahme der Intensität von SHEP im Zellkern sowie ein Rückgang des Anteils von Embryonen mit zonalem Verteilungsmuster und nuclear bodies zeigten. Darüber hinaus schien auch der Anteil von Embryonen mit perinukleärer Verdichtung von GBC zu sinken. Dies deutet darauf hin, dass BIO doch eine Auswirkung auf GBC und N-PBC bzw. NIP hat, zwar nicht unbedingt auf die Höhe ihrer Proteinlevels, wohl aber auf ihr Verteilungsmuster. Hier könnte man vermuten, dass durch die Blockade des GSK3-Pathways ein anderer Phosphorylierungspathway verstärkt aktiviert wird. Dieser übernimmt dann anstelle von GSK3 die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bzw. NIP an den entsprechenden Aminosäureresten, so dass das Gesamtproteinlevel relativ konstant bleibt. Die Integration von  $\beta$ -Catenin bzw. NIP in den anderen Pathway hat dann allerdings eine andere Verteilung dieser Proteine zur Folge. Dies würde insbesondere auch erklären, warum BIO einen Einfluss auf die perinukleäre Verdichtung von  $\beta$ -Catenin zeigt, obwohl diese vermutlich im Wesentlichen aus dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin besteht.

Alles in allem scheint bei bovinen Präimplantationsembryonen also beim Einsatz von BIO in den genannten Konzentrationen die aus somatischen Zellen bekannte Akkumulation von aktivem  $\beta$ -Catenin und nachfolgende Stimulation des Wnt-Signalwegs zu unterbleiben. Dennoch werden gewisse Effekte sichtbar, insbesondere, was das Verteilungsmuster von  $\beta$ -Catenin betrifft. Dies lässt darauf schließen, dass GSK3 auch bei diesen frühen Entwicklungsstadien schon eine, eventuell vom Wnt-Weg unabhängige, funktionelle Rolle spielt.

## **6 Zusammenfassung**

### **Phosphorylierungsstatus und Verteilungsmuster von $\beta$ -Catenin in bovinen Embryonen um den Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms**

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Verhalten von  $\beta$ -Catenin während der frühen präimplantatorischen Embryonalentwicklung, insbesondere während des kritischen 8-Zellstadiums, näher zu analysieren, um Hinweise auf eine mögliche Funktion von  $\beta$ -Catenin während dieser Entwicklungsphase zu erhalten. Hierzu wurden neben der Höhe des Gesamtproteinlevels von  $\beta$ -Catenin auch dessen Phosphorylierungsstatus sowie das Verteilungsmuster von Gesamt- $\beta$ -Catenin (GBC) und phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin betrachtet. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf N-PBC (an Ser33/Ser37/Thr41 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin), dessen Funktion durch den Einsatz eines GSK3-Inhibitors noch genauer untersucht werden sollte. Darüber hinaus wurden zusätzlich das Proteinlevel und die Lokalisation von C-PBC (an Ser552 phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin) betrachtet. FRAP-Analysen von YFP-markiertem  $\beta$ -Catenin dienten der Analyse von Translokationsprozessen innerhalb des Embryos. Auf diese Weise sollte das Wissen bezüglich der grundlegenden Mechanismen, die während der in diesem Zeitraum stattfindenden embryonalen Genomaktivierung und der folgenden ersten Differenzierungsprozesse eine Rolle spielen, verbessert werden. Durch eine Erweiterung des Wissens auf diesem Gebiet könnte ein Beitrag geleistet werden, langfristig die Technik der In-vitro-Produktion boviner Embryonen zu verbessern.

$\beta$ -Catenin war vom 4- bis zum 16-Zellstadium in konstant hohen Proteinlevels nachweisbar und stammt somit aus maternaler und embryonaler Genaktivität. In den untersuchten Entwicklungsstadien war es nur in geringem Maß an Ser33/Ser37/Thr41 phosphoryliert. Allerdings zeigte der gegen N-PBC gerichtete Antikörper im Westernblot zusätzlich ein deutliches Signal mit NIP, einem noch nicht näher identifizierten Protein von geringerem Molekulargewicht. Hierbei könnte es sich um ein phosphoryliertes Splicing- oder Spaltprodukt oder um ein von  $\beta$ -Catenin völlig unabhängiges Protein handeln. Da bei der Analyse des Verteilungsmusters nicht zwischen NIP und N-PBC unterschieden werden konnte, beziehen sich die diesbezüglichen Angaben auf beide Proteine, die hierfür unter der Bezeichnung SHEP (Summe homologer Epitope aufweisender Phosphoproteine) zusammengefasst wurden. C-PBC schien in größeren Mengen vorhanden zu sein als N-PBC.

In den untersuchten bovinen Präimplantationsembryonen lag GBC überwiegend membranständig vor. Ein geringerer Anteil befand sich im Zytoplasma, wobei hier eine im Entwicklungsverlauf zunehmende perinukleäre Verdichtung (Corona) auszumachen war. In sehr kleinen Mengen war  $\beta$ -Catenin auch im Zellkern zu finden. Die durchgeführten FRAP-

Analysen zeigten, dass es im Lauf der präimplantatorischen Embryonalentwicklung zu einer Translokation von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin in den Zellkern kam, was auch in Zusammenhang mit der perinukleären Verdichtung stehen könnte. Überraschenderweise schienen sich überwiegend die phosphorylierten Varianten von  $\beta$ -Catenin, SHEP und C-PBC, im Zellkern anzureichern. Dies widerspricht der am nächsten liegende Vermutung, dass  $\beta$ -Catenin unter dem Einfluss von Wnt-Signalen in den Zellkern transloziert, da in diesem Fall an den Aminosäureresten Ser33, Ser37 und Thr41 hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin zu erwarten wäre. Dennoch spricht die Tatsache, dass die Phosphoproteine offensichtlich im Zellkern akkumulierten und sich bezüglich ihrer Lokalisation dabei zunehmend auf bestimmte Kernbereiche konzentrierten (Bildung von nuclear bodies), dafür, dass sowohl SHEP als auch C-PBC eine physiologische Funktion während der frühesten Embryonalentwicklung innehaben könnten.

Der Einsatz des GSK3-Inhibitors führte nicht zu dem erwarteten Rückgang des N-PBC-Levels und der damit in Zusammenhang stehenden Akkumulation von dephosphoryliertem  $\beta$ -Catenin. Eine derartige Stimulierung des Wnt-Signalwegs ist aus ähnlichen Versuchen an somatischen Zellen bekannt. Nichts desto trotz waren unter Inhibitoreinfluss gewisse Effekte sichtbar, insbesondere, was das Verteilungsmuster von GBC und SHEP betrifft. So kam es zu einer Verringerung des nukleären SHEP-Levels verbunden mit einem Rückgang des Anteils von Embryonen mit nuclear bodies und Corona. Dies deutet darauf hin, dass GSK3 auch bei frühesten Entwicklungsstadien bereits eine funktionelle, allerdings vom Wnt-Signalweg vermutlich unabhängige Rolle spielt.

Insgesamt deutete sich an, dass es um den Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung herum in bovinen Embryonen zu interessanten, jedoch teils unerwarteten und noch nicht abschließend erklärbaren Phänomenen das Verhalten von  $\beta$ -Catenin betreffend kommt. Gleichwohl scheint dieses Protein durchaus eine Rolle in dieser frühen Entwicklungsphase zu spielen. Um diesbezüglich genauere Interpretationen zu ermöglichen, sind im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten detailliertere Untersuchungen, insbesondere unter Einbeziehung weiterer Signalkaskaden, nötig.

## **7 Summary**

### **Phosphorylation status and distribution pattern of $\beta$ -catenin in bovine embryos around the time of embryonic genome activation**

The purpose of this research project was to investigate the characteristics of  $\beta$ -catenin during early preimplantation development, especially during the critical 8-cell stage, in order to get information about a possible function of  $\beta$ -catenin during this phase of development. For this, we considered the protein level of  $\beta$ -catenin as well as its phosphorylation status and the distribution pattern of total  $\beta$ -catenin and phosphorylated  $\beta$ -catenin. In this process, the main focus of attention was on N-PBC ( $\beta$ -catenin phosphorylated at Ser33/Ser37/Thr41), whose function should be analysed more deeply by using a GSK3-inhibitor. In addition, the protein level and localization of C-PBC ( $\beta$ -catenin phosphorylated at Ser552) was considered. To investigate processes of translocation of  $\beta$ -catenin within the embryo, FRAP-analyses of YFP-tagged  $\beta$ -catenin were performed. Thereby, the knowledge about basic mechanisms that are important during embryonic genome activation and the following first processes of differentiation should be improved. By augmenting the knowledge within this sector, it could be possible to make a contribution to an improvement of in-vitro-production of bovine embryos in the long run.

Non-varying protein levels of  $\beta$ -catenin were detectable from the 4- to the 16-cell stage. Thus  $\beta$ -catenin was both of maternal and embryonic origin. In embryos of the investigated developmental stages, it was phosphorylated at Ser33/Ser37/Thr41 only to a minor degree. However, in the Western blot, the anti-N-PBC antibody additionally showed a clear reaction with NIP, a still unidentified protein of lower molecular weight. This protein might be a phosphorylated cleavage- or splicing-product or another protein that is completely independent of  $\beta$ -catenin. Concerning the analysis of the distribution pattern, it was not possible to distinguish between NIP and N-PBC. Thus, the statements made in this regard refer to both proteins. Therefore, we introduced the term SHEP that includes both NIP and N-PBC. C-PBC seemed to be detectable in higher quantities than N-PBC.

Within the investigated preimplantation embryos,  $\beta$ -catenin was localized mainly at the cell membrane. A lesser fraction was found in the cytoplasm, where an increasing perinuclear aggregation (corona) could be observed in the course of development. Diminutive amounts of  $\beta$ -catenin could also be detected in the nucleus. The FRAP-analyses showed a translocation of  $\beta$ -catenin from the cytoplasm to the nucleus in the course of preimplantation development, which could be associated with its perinuclear aggregation. Surprisingly, mainly the phosphorylated forms of  $\beta$ -catenin, SHEP and C-PBC, seemed to accumulate in the nucleus. This is

## SUMMARY

---

contrary to the most obvious assumption that  $\beta$ -catenin is translocated into the nucleus in the context of wnt-signaling, as in this case,  $\beta$ -catenin that is hypophosphorylated at Ser33, Ser37 and Thr 41 would be expected. Nevertheless, the fact that the phosphoproteins apparently accumulate in the nucleus and thereby concentrate their localization on specific nuclear regions (formation of nuclear bodies) indicates that both SHEP and C-PBC could play a physiological role in the nucleus during earliest embryonic development.

The application of the GSK3-inhibitor has not led to the expected decline of the protein level of N-PBC and to the associated accumulation of dephosphorylated  $\beta$ -catenin. Such a stimulation of the wnt-signaling pathway is known from comparable experiments with somatic cells. Nevertheless, under the influence of the inhibitor, certain effects could be seen, especially concerning the distribution pattern of total  $\beta$ -catenin and SHEP. This implies a diminished level of nuclear SHEP as well as a reduced proportion of embryos with nuclear bodies or a corona. This suggests that, also in embryos of early developmental stages, GSK3 already plays a functional part, that, however, probably is independent of the wnt-signaling pathway.

All in all, it seems that around the time of embryonic genome activation, interesting, but partly unexpected and not completely explainable phenomena concerning the properties of  $\beta$ -catenin are taking place in bovine embryos. Nevertheless, this protein seems to have a function in this early phase of development. To enable more precise interpretations in this regard, more detailed investigations, especially the consideration of further signaling cascades, would be necessary.

## **8 Anhang**

### **8.1 Medien für die In-vitro-Produktion**

#### **Lösung zur COK-Gewinnung (mD-PBS)**

500 ml	Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (D-PBS) (Fa. Biochrom, Berlin)
500 mg	Glucose (Fa. Sigma, Steinheim)
18 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)
10 mg	Penicillin (Fa. Sigma, Steinheim)
20 mg	Streptomycin (Fa. Sigma, Steinheim)
5,6 mg	Heparin (Fa. Sigma, Steinheim)
150 mg	Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Sigma, Steinheim)

Die Lösung wurde am Morgen vor der Verwendung vorbereitet, im Kühlschrank gelagert und vor der Benutzung im Wasserbad auf 35°C erwärmt.

#### **Maturationsmedium (TCM 199)**

100 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa <sup>®</sup> ) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
220 mg	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
5 mg	Gentamicin-Sulfat (Fa. Sigma, Steinheim)
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)
1510 mg	Medium 199 Hepes Modification (Fa. Sigma, Steinheim)

Das Maturationsmedium wurde spätestens alle 4 Wochen frisch hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

Der für den jeweiligen Ansatz benötigten Menge an TCM 199 wurde vor der Verwendung 10% ECS zugesetzt (siehe Medienzusätze).

**Kapazitationsmedium*****Stammlösung***

125 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
725 mg	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
28,75 mg	KCl (Fa. Sigma, Steinheim)
261,25 mg	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
4,5 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
297,5 mg	Medium 199 HEPES Modification (Fa. Sigma, Steinheim)
460 µl	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)
38,75 mg	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)
1,25 mg	Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe)
36 mg	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)

Diese Stammlösung wurde spätestens alle 4 Wochen frisch hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

***Arbeitslösung***

10 ml	Stammlösung
60 mg	BSA (Fa. Sigma, Steinheim)
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)

Die Arbeitslösung wurde am Abend vor der Verwendung vorbereitet und im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert.

## Befruchtungsmedium

### Stammlösung

100 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
666 mg	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
23,5 mg	KCl (Fa. Sigma, Steinheim)
210 mg	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
4 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
186 µl	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)
10 mg	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)
1 mg	Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe)
30 mg	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)

Diese Stammlösung wurde spätestens alle 4 Wochen frisch hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt, sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

### Arbeitslösung

10 ml	TL-Stock	Dieser erste Teil der Arbeitslösung wurde am Abend vor der Verwendung hergestellt Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei 39°C, 5% CO <sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit.
60 mg	BSA (Fa. Sigma, Steinheim)	
2,2 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)	
100 µl	Heparin-Lösung	Der Zusatz der restlichen Zutaten (Herstellung siehe Medienzusätze) erfolgte mindestens 3 Stunden vor Gebrauch der Arbeitslösung. Das nun fertige Befruchtungsmedium wurde sterilfiltriert und im Brutschrank wie oben beschrieben gelagert.
100 µl	Gentamicin-Lösung	
360 µl	Hypotaurin-Epinephrin-Lösung	

**Kultivierungsmedium SOF*****Stammlösung***

100 ml	H <sub>2</sub> O (0,1 µm gefiltert, Fa. Sigma, Steinheim)
629,2 mg	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
53,4 mg	KCl (Fa. Sigma, Steinheim)
16,2 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
24,8 mg	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)
9,6 mg	MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma, Steinheim)
210,6 mg	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Sigma, Steinheim)
0,14 mg	Phenolrot (Fa. Roth, Karlsruhe)
5 mg	Gentamicin
47,06 µl	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)

Diese Stammlösung wurde spätestens alle 4 Wochen frisch hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,3 sowie auf eine Osmolarität von 270 bis 280 mOsm eingestellt, sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

***Arbeitslösung***

9 ml	Stammlösung
3,3 mg	Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg)
200 µl	BME (Fa. Sigma, Steinheim)
100 µl	MEM (Fa. Sigma, Steinheim)
1 ml	ECS
20 mg	BSA (Fa. Sigma, Steinheim)

Das Kultivierungsmedium wurde am Abend vor der Verwendung vorbereitet und im Brutschrank in Stickstoffatmosphäre bei 39,0°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Am Morgen vor der Verwendung wurde es sterilfiltriert, in die Kultivierungsschalen gefüllt und bis zum endgültigen Gebrauch wiederum im Brutschrank gelagert.

## Medienzusätze

### *ECS (estrus cow serum) als Zusatz zum Maturationsmedium*

Die Herstellung von östrischem Kuhserum erfolgte nach folgendem Schema:

- Blutentnahme bei 4-10 brünstigen Kühen oder Färsen
- Stehenlassen des Blutes zur Gerinnung (mind. 1 Stunde bei Raumtemperatur)
- Zentrifugation des Blutes bei 500 x g für 20 Minuten
- Abgießen und Poolen des Serumüberstandes
- erneute Zentrifugation bei 500 x g für 20 Minuten
- Abgießen des Überstandes in ein Becherglas
- Erhitzen des Serums im Wasserbad bei 56°C für eine Stunde zur Inaktivierung des Komplementsystems
- Abkühlen des Serums bei Raumtemperatur
- Abfüllen des Serums in Vacutainer und Tiefgefrieren bei -20°C

Je nach Gebrauch wurde ein Teil der Vacutainer aufgetaut und das ECS in Portionen von 500 bzw. 1000 µl in 1,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und erneut eingefroren.

### *FSH-Lösung als Zusatz zum Maturationsmedium*

Die FSH-Lösung (Ovagen<sup>®</sup>, Fa. Bondico, Alkmaar, Holland) wurde entsprechend der Herstellerangaben hergestellt, in Volumina von 120 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und anschließend eingefroren.

### *Heparin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium*

5 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa <sup>®</sup> ) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
5 mg	Heparin (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert, in Volumina von 100 µl in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und anschließend eingefroren.

### *Gentamicin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium*

2,5 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa <sup>®</sup> ) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
12,5 mg	Gentamicin-Sulfat (Fa. Sigma, Steinheim)

## ANHANG

---

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert, in Volumina von 100  $\mu$ l in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und anschließend eingefroren.

### *Hypotaurin-Epinephrin-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium*

#### Lösung 1

20 ml	NaCl 0,9% (Fa. Braun, Tuttlingen)
2,19 mg	Hypotaurin (Fa. Sigma, Steinheim)

#### Lösung 2

50 ml	Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)
50 mg	Na-Meta-bi-sulfit (Fa. Sigma, Steinheim)
113 $\mu$ l	Na-Laktat-Sirup 60% (Fa. Sigma, Steinheim)
30 $\mu$ l	Konz. HCl (Fa. Roth, Karlsruhe)

#### Lösung 3

40 ml	Lösung 2
1,83 mg	Epinephrin (Fa. Sigma, Steinheim)

#### Lösung 4 (Gebrauchslösung)

10 ml	Lösung 1
4 ml	Lösung 3
16 ml	NaCl 0,9% (Fa. Braun, Tuttlingen)

Die Herstellung dieser Lösung erfolgte unter Lichtschutz. Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert, in Volumina von 360  $\mu$ l in 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und anschließend eingefroren.

## 8.2 Medien zum Waschen entnommener Embryonen

### Proteinfreie PBS

Zur Herstellung der gebrauchsfähigen Lösung wurde gemäß der Herstelleranweisung eine Tablette PBS (Fa. Sigma, Steinheim) in 200 ml destilliertem Wasser (Ampuwa® Fa. Fresenius, Bad Homburg) bei Raumtemperatur gelöst. Die fertige Lösung wurde im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt.

## Polyvinylalkohol

Zur Herstellung der gebrauchsfähigen Lösung wurden 50 mg Polyvinylalkohol (Fa. Sigma, Steinheim) in 60 ml proteinfreier PBS gelöst und im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt.

## 8.3 Medien für Gelelektrophorese und Westernblot

### Trenngel 10%

10 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Fa. Roth, Karlsruhe)
7,5 ml	Tris 1,5 mol/l; pH 8,8 (Fa. Roth, Karlsruhe)
12 ml	Bidestilliertes Wasser
0,3 ml	SDS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe)
0,3 ml	APS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe)
20 µl	TMED (Fa. GE Healthcare)

Nach Mischen dieser Komponenten wurde das Trenngel in die Gelschablone gegossen und mit gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach einer Polymerisationsdauer von mindestens 2 Stunden wurde die Isobutanol schicht entfernt, ein Taschenformer in die Schablone eingelegt und das frisch zubereitete Sammelgel eingegossen.

### Sammelgel 5%

1,25 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Fa. Roth, Karlsruhe)
1,9 ml	Tris 0,5 mol/l; pH 6,8 (Fa. Roth, Karlsruhe)
4,25 ml	Bidestilliertes Wasser
75 µl	SDS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe)
150 µl	APS 10% (Fa. Roth, Karlsruhe)
10 µl	TMED

Die Polymerisationsdauer für das gegossene Sammelgel betrug ca. 45 Minuten.

## Elektrophoreselaufpuffer nach Laemmli

### *Stammlösung, zehnfach konzentriert*

100 g	Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe)
-------	------------------------------

## ANHANG

60,5 g	Tris (Fa. Roth, Karlsruhe)
10 g	SDS (Fa. Roth, Karlsruhe)
1 l	Bidestilliertes Wasser

### *Arbeitslösung, einfach konzentriert*

100 ml	Stammlösung
900 ml	Destilliertes Wasser

## Transferpuffer nach Towbin

### *Stammlösung, zehnfach konzentriert*

144 g	Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe)
30 g	Tris (Fa. Roth, Karlsruhe)
7,5 g	SDS (Fa. Roth, Karlsruhe)
1 l	Destilliertes Wasser

### *Arbeitslösung, einfach konzentriert, 20% Methanol*

100 ml	Stammlösung
700 ml	Destilliertes Wasser
200 ml	Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)

## Waschpuffer für Westernblots

### *Stammlösung TBS (Tris Buffered Saline), zehnfach konzentriert*

24,2 g	Tris (Fa. Roth, Karlsruhe)
80 g	NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
	HCl, 25%ig, zum Einstellen des pH-Wertes (Fa. Roth, Karlsruhe)
	Destilliertes Wasser, in 2 Schritten auf insgesamt 1 Liter auffüllen

Tris und NaCl wurden zunächst mit destilliertem Wasser auf 900 ml aufgefüllt, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die Lösung anschließend nochmals mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

**Arbeitslösung TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween), einfach konzentriert, 0,1% Tween**

100 ml	Stammlösung TBS
900 ml	Destilliertes Wasser
1 ml	Tween (Fa. Serva, Heidelberg)

**Blocken der PVDF-Membran und Inkubation mit Antikörpern mit Hilfe des SNAP i.d.-Systems (Fa. Milipore, USA) - Übersicht**

- Befeuchten der Innenseite der Blot-Halterung mit destilliertem Wasser und Einlegen der mit TBS-T gewaschenen Blot-Membran
- Blocken mit 30 ml 0,5% fettfreier Trockenmilch in TBS-T
- Inkubation mit 4 ml der 1. Antikörperlösung (AK verdünnt in TBS-T; AK1 und AK3 je 1:1000, AK2 und AK4 je 1:400) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit je 30 ml TBS-T
- Inkubation mit 4 ml der 2. Antikörperlösung (AK verdünnt in Blockinglösung, 1:2000) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit je 30 ml TBS-T

**ECL-Detektionsreagenz**

## Solution A

200 ml	TRIS-HCL (0,1M, pH 8,6)
50 mg	Luminol (Fa. AppliChem, Darmstadt)

Solution A wurde im Kühlschrank gelagert.

## Solution B

11 mg	Para-Hydroxycoumarinsäure (Fa. Sigma, Steinheim)
10 ml	DMSO (Fa. Roth, Karlsruhe)

Solution B wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

## fertige ECL-Detektionsreagenz

4 ml	Solution A
1,2 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (Fa. Roth, Karlsruhe)
400 µl	Solution B

Die Blot-Membran wurde für 2 Minuten in 4 ml der fertigen ECL-Lösung inkubiert, anschließend erfolgte die Filmexposition.

## **8.4 Medien für die Immunhistochemie**

### **3%iges Paraformaldehyd + 2% Saccharose**

Zur Herstellung einer 3%igen Paraformaldehyd-Lösung wurden 3 g Paraformaldehyd (Fa. Roth, Karlsruhe) zu 100 ml proteinfreier PBS gegeben und für eine Stunde auf 60°C erwärmt. Anschließend wurde, falls nötig, tropfenweise 1 N Natronlauge (Fa. Roth, Karlsruhe) zugegeben, bis die Lösung klar war und der pH-Wert gegebenenfalls mit 1 N Salzsäure (Fa. Roth, Karlsruhe) wieder auf 7,4 eingestellt. Nach Einstellen des pH-Wertes wurden 2 g Saccharose zugegeben. Die fertige Lösung wurde bei 7°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2%iges Paraformaldehyd**

Zur Herstellung einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung wurden 2 g Paraformaldehyd (Fa. Sigma, Steinheim) zu 100 ml proteinfreier PBS gegeben und für eine Stunde auf 60°C erwärmt. Anschließend wurde, falls nötig, tropfenweise 1 N Natronlauge (Fa. Roth, Karlsruhe) zugegeben, bis die Lösung klar war und der pH-Wert gegebenenfalls mit 1 N Salzsäure (Fa. Roth, Karlsruhe) wieder auf 7,4 eingestellt. Die fertige Lösung wurde bei 7°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Waschpuffer mPBS für die Immunhistochemie**

100 ml	Proteinfreie PBS (Fa. Sigma, Steinheim)
500 mg	BSA (Fa. Sigma, Steinheim)
50 µl	Triton x 100 (Fa. Serva, Heidelberg)

Der Waschpuffer mPBS wurde direkt vor Gebrauch frisch hergestellt und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

**Permeabilisierungspuffer**

476 mg	Hepes (Fa. Serva, Heidelberg)
10270 mg	Saccharose (Fa. Roth, Karlsruhe)
292,2 mg	NaCl (Fa. Merck)
60,9 mg	MgCl <sub>2</sub> (Fa. Roth, Karlsruhe)
0,5 ml	Triton x 100 (Serva, Heidelberg)
auf 100 ml auffüllen	Aqua ad injectabilia (Ampuwa®) (Fa. Fresenius, Bad Homburg)

Der Permeabilisierungspuffer wurde im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

**Roti®-ImmunoBlock Arbeitslösungen**

Zum Blocken (1:50)	Zum Verdünnen der Antikörper- und Kernfarbstofflösung (1:100)	
10 µl	100 µl	Roti®-ImmunoBlock (Fa. Roth, Karlsruhe)
490 µl	9,9 ml	Aqua dest. (Fa. Sigma, Steinheim)

Die Arbeitslösung zum Blocken („Roti 1:50“) wurde direkt vor Gebrauch im Well der verwendeten 4-Wellenschale hergestellt.

Die Arbeitslösung zur Verdünnung der Antikörper- und Kernfarbstofflösung („Roti 1:100“) wurde direkt vor dem ersten Gebrauch hergestellt und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

## **9 Literaturverzeichnis**

- ABERLE, H., BAUER, A., STAPPERT, J., KISPERT, A., KEMLER, R. (1997)  
β-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.  
*EMBO J.* *16*, 3797-3804.
- ABERLE, H., BUTZ, S., STAPPERT, J., WEISSIG, H., KEMLER, R., HOSCHUETZKY, H. (1994)  
Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins.  
*J. Cell Sci.* *107 (Pt 12)*, 3655-3663.
- ABERLE, H., SCHWARTZ, H., KEMLER, R. (1996)  
Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.  
*J. Cell. Biochem.* *61*, 514-523.
- AGOSTONI, E. (1993)  
Preimplantation development of the mammalian embryo.  
*Ann. Ist. Super. Sanita* *29*, 15-25.
- ALM, H., TORNER, H., TIEMANN, U., KANITZ, W. (1998)  
Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro.  
*Reprod. Toxicol.* *12*, 559-563.
- AMIT, S., HATZUBAI, A., BIRMAN, Y., ANDERSEN, J., BEN-SHUSHAN, E., MANN, M., BEN-NERIAH, Y., ALKALAY, I. (2002)  
Axin-mediated CKI phosphorylation of β-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway.  
*Genes Dev.* *16*, 1066-1076.
- ANASTASIADIS, P., REYNOLDS, A. (2000)  
The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer.  
*J. Cell Sci.* *113*, 1319-1334.
- APARICIO, I. M., GARCIA-HERREROS, M., FAIR, T., LONERGAN, P. (2010)  
Identification and regulation of glycogen synthase kinase-3 during bovine embryo development.  
*Reproduction* *140*, 83-92.
- ARMSTRONG, V. J., MUZYLA, M., SUNTERS, A., ZAMAN, G., SAXON, L. K., PRICE, J. S., LANYON, L. E. (2007)  
Wnt/β-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor α.  
*J. Biol. Chem.* *282*, 20715 -20727.

- ATILLA-GOKCUMEN, G. E., WILLIAMS, D. S., BREGMAN, H., PAGANO, N., MEGGERS, E. (2006)  
Organometallic compounds with biological activity: a very selective and highly potent cellular inhibitor for glycogen synthase kinase 3.  
*ChemBioChem* 7, 1443-1450.
- BACHVAROVA, R. (1985)  
Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals.  
*Dev. Biol.* 1, 453-524.
- BACHVAROVA, R. (1992)  
A maternal tail of poly(A): the long and the short of it.  
*Cell* 69, 895-897.
- BALSAMO, J., ARREGUI, C., LEUNG, T., LILIEN, J. (1998)  
The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage.  
*J. Cell Biol.* 143, 523-532.
- BARCROFT, L., HAY-SCHMIDT, A., CAVENEY, A., GILFOYLE, E., OVERSTROM, E., HYTTEL, P., WATSON, A. (1998)  
Trophectoderm differentiation in the bovine embryo: characterization of a polarized epithelium.  
*J. Reprod. Fertil.* 114, 327-339.
- BARKER, N., MORIN, P., CLEVERS, H. (2000)  
The Yin-Yang of TCF/ $\beta$ -catenin signaling.  
*Adv. Cancer Res.* 77, 1-24.
- BARKER, N., HURLSTONE, A., MUSISI, H., MILES, A., BIENZ, M., CLEVERS, H. (2001)  
The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with  $\beta$ -catenin to promote target gene activation.  
*EMBO J* 20, 4935-4943.
- BARNES, F. L., EYESTONE, W. H. (1990)  
Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos.  
*Theriogenology* 33, 141-152.
- BARNES, F. L., FIRST, N. L. (1991)  
Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos.  
*Mol. Reprod. Dev.* 29, 117-123.
- BARTH, A., NATHKE, I., NELSON, W. (1997a)  
Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 683-690.

- BARTH, A., POLLACK, A., ALTSCHULER, Y., MOSTOV, K., NELSON, W. (1997b)  
 NH2-terminal deletion of  $\beta$ -catenin results in stable colocalization of mutant  $\beta$ -catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion.  
*J. Cell Biol.* *136*, 693-706.
- BEHRENS, J., VON KRIES, J., KUHL, M., BRUHN, L., WEDLICH, D., GROSSCHEDL, R., BIRCHMEIER, W. (1996).  
 Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1.  
*Nature* *382*, 638-642.
- BEK, S., KEMLER, R. (2002)  
 Protein kinase CKII regulates the interaction of  $\beta$ -catenin with alpha-catenin and its protein stability.  
*J. Cell Sci.* *115*, 4743-4753.
- BELL, C., CALDER, M., WATSON, A. (2008)  
 Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development.  
*Mol. Hum. Reprod.* *14*, 691-701.
- BETTEGOWDA, A., LEE, K., SMITH, G. W. (2008)  
 Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition.  
*Reprod. Fertil. Dev.* *20*, 45-53.
- BHANOT, P., BRINK, M., SAMOS, C., HSIEH, J., WANG, Y., MACKE, J., ANDREW, D., NATHANS, J., NUSSE, R. (1996)  
 A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor.  
*Nature* *382*, 225-230.
- BHOJWANI, S., VAJTA, G., CALLESEN, H., ROSCHLAU, K., KUWER, A., BECKER, F., ALM, H., TORNER, H., KANITZ, W., POEHLAND, R. (2005).  
 Developmental competence of HMC TM derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulosa cells.  
*J. Reprod. Dev.* *51*, 465-475.
- BHOJWANI, S., TOMEK, W., JONAS, L., BECKER, F., ALM, H., TORNER, H., KANITZ, W., POEHLAND, R. (2007)  
 Ultrastructural analysis reveals striking differences of intercellular contact lengths in bovine embryos produced in vivo, in vitro and by somatic cell nuclear transfer.  
*Mol. Reprod. Dev.* *74*, 775-784.
- BIJUR, G. N., JOPE, R. S. (2003)  
 Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is highly activated in nuclei and mitochondria.  
*Neuroreport* *14*, 2415.

- BILLIN, A. N., THIRLWELL, H., AYER, D. E. (2000)  
β-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator.  
*Mol. Cell. Biol.* 20, 6882-6890.
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- BOLTON, V., OADES, P., JOHNSON, M. (1984)  
The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.* 79, 139-163.
- BONI, R., TOSTI, E., ROVIELLO, S., DALE, B. (1999)  
Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos.  
*Biol. Reprod.* 61, 1050-1055.
- BRACKETT, B., BOUSQUET, D., BOICE, M., DONAWICK, W., EVANS, J., DRESSEL, M. (1982)  
Normal development following in vitro fertilization in the cow.  
*Biol. Reprod.* 27, 147-158.
- BRANNON, M., BROWN, J. D., BATES, R., KIMELMAN, D., MOON, R. T. (1999)  
XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development.  
*Development* 126, 3159-3170.
- BRANNON, M., GOMPERTS, M., SUMOY, L., MOON, R., KIMELMAN, D. (1997)  
A β-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*.  
*Genes Dev.* 11, 2359-2370.
- BRAUDE, P., BOLTON, V., MOORE, S. (1988)  
Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development.  
*Nature* 332, 459-461.
- BUTZ, S., KEMLER, R. (1994)  
Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion.  
*FEBS Lett* 355, 195-200.
- BUTZ, S., STAPPERT, J., WEISSIG, H., KEMLER, R. (1992)  
Plakoglobin and β-catenin: distinct but closely related.  
*Science* 257, 1142-1144.

- CAMOUS, S., HEYMAN, Y., MEZIOU, W., MENEZO, Y. (1984)  
Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles.  
*J. Reprod. Fertil.* 72, 479-485.
- CAMOUS, S., KOPECNY, V., FLECHON, J. (1986)  
Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo.  
*Biol. Cell* 58, 195-200.
- CAVALLO, R., COX, R., MOLINE, M., ROOSE, J., POLEVOY, G., CLEVERS, H., PEIFER, M., BEJSOVEC, A. (1998).  
*Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingleless signalling activity.  
*Nature* 395, 604-608.
- CAVENEY, S. (1985)  
The role of gap junctions in development.  
*Annu. Rev. Physiol.* 47, 319-335.
- CHEN, Y., STEWART, D. B., NELSON, W. J. (1999)  
Coupling assembly of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells.  
*J. Cell Biol.* 144, 687-699.
- CHISHOLM, J. C., JOHNSON, M. H., WARREN, P. D., FLEMING, T. P., PICKERING, S. J. (1985)  
Developmental variability within and between mouse expanding blastocysts and their ICMs.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.* 86, 311-336.
- CIRUNA, B., ROSSANT, J. (2001)  
FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak.  
*Dev. Cell* 1, 37-49.
- CROSBY, I., GANDOLFI, F., MOOR, R. (1988)  
Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos.  
*J. Reprod. Fertil.* 82, 769-775.
- DALE, T. (1998)  
Signal transduction by the Wnt family of ligands.  
*Biochem. J.* 329 (Pt 2), 209-223.

- DANIEL, J., REYNOLDS, A. (1995)  
The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin.  
*Mol. Cell. Biol.* 15, 4819-4824.
- DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A., MIAGKOV, A., SKEEL, A., NAKAIGAWA, N., ZBAR, B., LEONARD, E. J. (2001)  
Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the  $\beta$ -Catenin pathway.  
*Mol. Cell. Biol.* 21, 5857-5868.
- DAUGHERTY, R. L., GOTTARDI, C. J. (2007)  
Phospho-regulation of  $\beta$ -catenin adhesion and signaling functions.  
*Physiology* 22, 303 -309.
- DE SOUSA, P. A., CAVENEY, A., WESTHUSIN, M. E., WATSON, A. J. (1998a)  
Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors.  
*Theriogenology* 49, 115–128.
- DE SOUSA, P., WATSON, A., SCHULTZ, R. (1998b)  
Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos.  
*Biol. Reprod.* 59, 969-977.
- DE VRIES, W., EVSIKOV, A., HAAC, B., FANCHER, K., HOLBROOK, A., KEMLER, R., SOLTER, D., KNOWLES, B. (2004)  
Maternal  $\beta$ -catenin and E-cadherin in mouse development.  
*Development* 131, 4435-4445.
- DREES, F., POKUTTA, S., YAMADA, S., NELSON, W. J., WEIS, W. I. (2005)  
 $\alpha$ -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly.  
*Cell* 123, 903-915.
- EVSIKOV, A., DE VRIES, W., PEASTON, A., RADFORD, E., FANCHER, K., CHEN, F., BLAKE, J., BULT, C., LATHAM, K., SOLTER, D., U. A. (2004)  
Systems biology of the 2-cell mouse embryo.  
*Cytogenet. Genome Res.* 105, 240-250.
- EYESTONE, W. H., FIRST, N. L. (1986)  
A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro.  
*Theriogenology* 25, 152.
- EYESTONE, W. H., FIRST, N. L. (1991)  
Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured in vitro.  
*Theriogenology* 35, 613-624.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- FAGOTTO, F., FUNAYAMA, N., GLUCK, U., GUMBINER, B. (1996)  
Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of  $\beta$ -catenin during axis formation in *Xenopus*.  
*J. Cell Biol.* 132, 1105-1114.
- FAGOTTO, F., GLÜCK, U., GUMBINER, B. M. (1998)  
Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of  $\beta$ -catenin.  
*Curr. Biol.* 8, 181-190.
- FANG, D., HAWKE, D., ZHENG, Y., XIA, Y., MEISENHELDER, J., NIKA, H., MILLS, G. B., KOBAYASHI, R., HUNTER, T., LU, Z. (2007)  
Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by AKT promotes  $\beta$ -catenin transcriptional activity.  
*J. Biol. Chem.* 282, 11221 -11229.
- FIRST, N. L., BARNES, F. L. (1989)  
Development of preimplantation mammalian embryos.  
*Prog. Clin. Biol. Res.* 294, 151-170.
- FLACH, G., JOHNSON, M., BRAUDE, P., TAYLOR, R., BOLTON, V. (1982)  
The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo.  
*EMBO J.* 1, 681-686.
- FLEMING, T. P., SHETH, B., FESENKO, I. (2001)  
Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis.  
*Front. Biosci* 6, D1000–D1007.
- FLEMING, T., GHASSEMIFAR, M., SHETH, B. (2000)  
Junctional complexes in the early mammalian embryo.  
*Semin. Reprod. Med.* 18, 185-193.
- FREI, R., SCHULTZ, G., CHURCH, R. (1989)  
Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow.  
*J. Reprod. Fertil.* 86, 637-641.
- FUJIMORI, T., KUROTAKI, Y., MIYAZAKI, J., NABESHIMA, Y. (2003)  
Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos.  
*Development* 130, 5113-5122.
- GALBIATI, F., VOLONTE', D., BROWN, A. M. C., WEINSTEIN, D. E., BEN-ZE'EV, A., PESTELL, R. G., LISANTI, M. P. (2000)  
Caveolin-1 expression inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin/Lef-1 signaling by recruiting  $\beta$ -catenin to caveolae membrane domains.  
*J. Biol. Chem.* 275, 23368 -23377.

- GATES, J., PEIFER, M. (2005)  
Can 1000 reviews be wrong? Actin,  $\alpha$ -Catenin, and adherens junctions.  
*Cell* 123, 769-772.
- GIANNINI, A. L., VIVANCO, M. D. M., KYPTA, R. M. (2000)  
 $\alpha$ -catenin inhibits  $\beta$ -catenin signaling by preventing formation of a  $\beta$ -catenin·T-cell factor·DNA complex.  
*J. Biol. Chem.* 275, 21883 -21888.
- GOTTARDI, C. J., GUMBINER, B. M. (2001)  
Adhesion signaling: how  $\beta$ -catenin interacts with its partners.  
*Curr. Biol.* 11, R792-R794.
- GOVAL, J. J., VAN CAUWENBERGE, A., ALEXANDRE, H. (2000)  
Respective roles of protein tyrosine kinases and protein kinases C in the upregulation of  $\beta$ -catenin distribution, and compaction in mouse preimplantation embryos: a pharmacological approach.  
*Biol. Cell* 92, 513-526.
- GRAHAM, C. F., DEUSSEN, Z. A. (1978)  
Features of cell lineage in preimplantation mouse development.  
*Development* 48, 53.
- GRIGORYAN, T., WEND, P., KLAUS, A., BIRCHMEIER, W. (2008)  
Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of  $\beta$ -catenin in mice.  
*Genes Dev.* 22, 2308 -2341.
- GRISART, B., MASSIP, A., DESSY, F. (1994)  
Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium.  
*J. Reprod. Fertil.* 101, 257-264.
- GUETH-HALLONET, C., MARO, B. (1992)  
Cell polarity and cell diversification during early mouse embryogenesis.  
*Trends in Genetics* 8, 274-279.
- GUMBINER, B., MCCREA, P. (1993)  
Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins.  
*J. Cell Sci. Suppl* 17, 155-158.
- HAEGEL, H., LARUE, L., OHSUGI, M., FEDOROV, L., HERRENKNECHT, K., KEMLER, R. (1995)  
Lack of  $\beta$ -catenin affects mouse development at gastrulation.  
*Development* 121, 3529-3537.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- HAMATANI, T., CARTER, M. G., SHAROV, A. A., KO, M. S. (2004)  
Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development.  
*Dev. Cell* 6, 117-131.
- HANDYSIDE, A. H. (1978)  
Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos.  
*J. Embryol. ex. Morph.* 45, 37 -53.
- HART, M., CONCORDET, J., LASSOT, I., ALBERT, I., DEL LOS, S. R., DURAND, H., PERRET, C., RUBINFELD, B., MARGOTTIN, F., BENAROUS, R., U. A. (1999)  
The F-box protein  $\beta$ -TrCP associates with phosphorylated  $\beta$ -catenin and regulates its activity in the cell.  
*Curr. Biol.* 9, 207-210.
- HART, M., DE LOS, S. R., ALBERT, I., RUBINFELD, B., POLAKIS, P. (1998)  
Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$ .  
*Curr. Biol.* 8, 573-581.
- HARWOOD, B. N., CROSS, S. K., RADFORD, E. E., HAAC, B. E., DE VRIES, W. N. (2008)  
Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos.  
*Dev. Dyn.* 237, 1099-1111.
- HAY, E., LAPLANTINE, E., GEOFFROY, V., FRAIN, M., KOHLER, T., MULLER, R., MARIE, P. J. (2009)  
N-Cadherin interacts with Axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, osteoblast function, and bone formation.  
*Mol. Cell. Biol.* 29, 953-964.
- HAY-SCHMIDT, A., VIUFF, D., GREVE, T., HYTTEL, P. (2001)  
Transcriptional activity in in vivo developed early cleavage stage bovine embryos.  
*Theriogenology* 56, 167-176.
- HECHT, A., LITTERST, C., HUBER, O., KEMLER, R. (1999)  
Functional characterization of multiple transactivating elements in  $\beta$ -catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro.  
*J. Biol. Chem.* 274, 18017-18025.
- HECHT, A., VLEMINCKX, K., STEMMLER, M., VAN, R. F., KEMLER, R. (2000)  
The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of  $\beta$ -catenin in vertebrates.  
*EMBO J.* 19, 1839-1850.

- HENDERSON, B. R., FAGOTTO, F. (2002)  
The ins and outs of APC and  $\beta$ -catenin nuclear transport.  
*EMBO Reports* 3, 834-839.
- HENDERSON, B. R. (2000)  
Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates  $\beta$ -catenin subcellular localization and turnover.  
*Nat. Cell. Biol* 2, 653-660.
- HINCK, L., NATHKE, I., PAPKOFF, J., NELSON, W. (1994a)  
Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly.  
*J. Cell Biol.* 125, 1327-1340.
- HINCK, L., NELSON, W., PAPKOFF, J. (1994b)  
Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing  $\beta$ -catenin binding to the cell adhesion protein cadherin.  
*J. Cell Biol.* 124, 729-741.
- HINO, S., TANJI, C., NAKAYAMA, K. I., KIKUCHI, A. (2005)  
Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes  $\beta$ -catenin through inhibition of its ubiquitination.  
*Mol. Cell. Biol.* 25, 9063-9072.
- HOLM, P., BOOTH, P., CALLESEN, H. (2002)  
Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media.  
*Reproduction* 123, 553-565.
- HOLM, P., BOOTH, P., SCHMIDT, M., GREVE, T., CALLESEN, H. (1999)  
High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.  
*Theriogenology* 52, 683-700.
- HSU, S., GALCERAN, J., GROSSCHEDL, R. (1998)  
Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with  $\beta$ -catenin.  
*Mol. Cell. Biol.* 18, 4807-4818.
- HUBER, O., KORN, R., MCLAUGHLIN, J., OHSUGI, M., HERRMANN, B., KEMLER, R. (1996)  
Nuclear localization of  $\beta$ -catenin by interaction with transcription factor LEF-1.  
*Mech. Dev.* 59, 3-10.

- HUELSKEN, J., BIRCHMEIER, W., BEHRENS, J. (1994)  
 E-cadherin and APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenin and the cytoskeleton.  
*J. Cell Biol.* *127*, 2061-2069.
- HUELSKEN, J., VOGEL, R., BRINKMANN, V., ERDMANN, B., BIRCHMEIER, C.,  
 BIRCHMEIER, W. (2000)  
 Requirement for  $\beta$ -catenin in anterior-posterior axis formation in mice.  
*J. Cell Biol.* *148*, 567-578.
- HYTTEL, P., LAURINCIK, J., VIUFF, D., FAIR, T., ZAKHARTCHENKO, V.,  
 ROSENKRANZ, C., AVERY, B., RATH, D., NIEMANN, H., THOMSEN, P., U. A.  
 (2000)  
 Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos.  
*Anim. Reprod. Sci.* *60-61*, 49-60.
- HYTTEL, P., VIUFF, D., AVERY, B., LAURINCIK, J., GREVE, T. (1996)  
 Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and  
 granules in two-cell bovine embryos.  
*J. Reprod. Fertil.* *108*, 263-270.
- IKEDA, S., KISHIDA, S., YAMAMOTO, H., MURAI, H., KOYAMA, S., KIKUCHI, A.  
 (1998)  
 Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-  
 3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin.  
*EMBO J.* *17*, 1371-1384.
- ITOH, K., KRUPNIK, V. E., SOKOL, S. Y. (1998)  
 Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen  
 synthase kinase 3 and  $\beta$ -catenin.  
*Curr. Biol.* *8*, 591-594.
- IWASAKI, S., WILMUT, I., CAMPBELL, K. H. (1997).  
 Time-dependent RNA synthesis in early bovine embryos derived from, in-vitro  
 fertilization.  
*J. Reprod. Dev.* *43*, 271-277.
- JAKOBSEN, A., AVERY, B., DIELEMAN, S., KNIJN, H., VOS, P., THOMSEN, P. (2006)  
 Transcription of ribosomal RNA genes is initiated in the third cell cycle of bovine  
 embryos.  
*Mol. Reprod. Dev.* *73*, 196-205.
- JAMORA, C., FUCHS, E. (2002)  
 Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton.  
*Nat. Cell Biol.* *4*, E101-E108.

- JI, J., LIU, R., TONG, T., SONG, Y., JIN, S., WU, M., ZHAN, Q. (2007)  
Gadd45a regulates  $\beta$ -catenin distribution and maintains cell-cell adhesion//contact.  
*Oncogene* 26, 6396-6405.
- JIANG, W. (1996)  
E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis.  
*Br. J. Surg.* 83, 437-446.
- JOHNSON, M. H., PICKERING, S. J., DHIMAN, A., RADCLIFFE, G. S., MARO, B. (1988)  
Cytocortical organization during natural and prolonged mitosis of mouse 8-cell blastomeres.  
*Development* 102, 143-158.
- JOHNSON, M.H., ZIOMEK, C.A. (1981)  
Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry and stability.  
*J. Cell Biol.* 91, 303-308.
- JOHNSON, M. H., MCCONNELL, J. M. L. (2004)  
Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis.  
*Seminars in Cell & Developmental Biology* 15, 583-597.
- KEMLER, R., HIERHOLZER, A., KANZLER, B., KUPPIG, S., HANSEN, K., TAKETO, M. M., DE VRIES, W. N., KNOWLES, B. B., SOLTER, D. (2004)  
Stabilization of  $\beta$ -catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast.  
*Development* 131, 5817.
- KIDDER, G. M., WINTERHAGER, E. (2001)  
Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions.  
*Front. Biosci.* 6, D731-6.
- KIDDER, G. (1992)  
The genetic program for preimplantation development.  
*Dev. Genet.* 13, 319-325.
- KIDDER, G., MCLACHLIN, J. (1985)  
Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos.  
*Dev. Biol.* 112, 265-275.
- KING, W., NIAR, A., CHARTRAIN, I., BETTERIDGE, K., GUAY, P. (1988)  
Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos.  
*J. Reprod. Fertil.* 82, 87-95.

- KISHIDA, S., YAMAMOTO, H., IKEDA, S., KISHIDA, M., SAKAMOTO, I., KOYAMA, S., KIKUCHI, A. (1998)  
Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of  $\beta$ -catenin.  
*J. Biol. Chem.* 273, 10823 -10826.
- KITAGAWA, M., HATAKEYAMA, S., SHIRANE, M., MATSUMOTO, M., ISHIDA, N., HATTORI, K., NAKAMICHI, I., KIKUCHI, A., NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K. (1999)  
An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of  $\beta$ -catenin.  
*EMBO J.* 18, 2401-2410.
- KLAUS, A., BIRCHMEIER, W. (2008)  
Wnt signalling and its impact on development and cancer.  
*Nat Rev. Cancer* 8, 387-398.
- KNUDSEN, K., SOLER, A., JOHNSON, K., WHEELOCK, M. (1995)  
Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin.  
*J. Cell Biol.* 130, 67-77.
- KOPECNY, V., FLECHON, J., CAMOUS, S., FULKA, J. (1989)  
Nucleogenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study.  
*Mol. Reprod. Dev.* 1, 79-90.
- KRAMPS, T., PETER, O., BRUNNER, E., NELLEN, D., FROESCH, B., CHATTERJEE, S., MURONE, M., ZÜLLIG, S., BASLER, K. (2002)  
Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear  $\beta$ -catenin-TCF complex.  
*Cell* 109, 47-60.
- KRASNOW, R., WONG, L., ADLER, P. (1995)  
Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in *Drosophila*.  
*Development* 121, 4095-4102.
- KRIEGHOFF, E., BEHRENS, J., MAYR, B. (2006)  
Nucleo-cytoplasmic distribution of  $\beta$ -catenin is regulated by retention.  
*J. Cell. Sci* 119, 1453-1463.
- LAEMMLI, U. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227, 680-685.
- LATHAM, K., SCHULTZ, R. (2001)  
Embryonic genome activation.  
*Front. Biosci.* 6, D748-D759.

- LATHAM, K., SOLTER, D., SCHULTZ, R. (1992)  
Acquisition of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis.  
*Dev. Biol.* 149, 457-462.
- LAURINCIK, J., SCHMOLL, F., MAHABIR, E., SCHNEIDER, H., STOJKOVIC, M., ZAKHARTCHENKO, V., PRELLE, K., HENDRIXEN, P., VOSS, P., MOESZLACHER, G., U. A. (2003)  
Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos.  
*Mol. Reprod. Dev.* 65, 73-85.
- LEHTONEN, E. (1980)  
Changes in cell dimensions and intercellular contacts during cleavage-stage cycles in mouse embryonic cells.  
*Development* 58, 231.
- LEIBFRIED, L., FIRST, N. L. (1979)  
Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.  
*J. Anim. Sci.* 48, 76-86.
- LEQUARRE, A., MARCHANDISE, J., MOREAU, B., MASSIP, A., DONNAY, I. (2003)  
Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition.  
*Biol. Reprod.* 69, 1707-1713.
- LI, J., ZHANG, J. V., CAO, Y., ZHOU, J., LIU, W., FAN, X., DUAN, E. (2005)  
Inhibition of the  $\beta$ -catenin signaling pathway in blastocyst and uterus during the window of implantation in mice.  
*Biol. Reprod.* 72, 700 -706.
- LI, L., YUAN, H., WEAVER, C. D., MAO, J., FARR, G. H., SUSSMAN, D. J., JONKERS, J., KIMELMAN, D., WU, D. (1999)  
Axin and Frat1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1.  
*EMBO J.* 18, 4233-4240.
- LICKERT, H., BAUER, A., KEMLER, R., STAPPERT, J. (2000)  
Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/ $\beta$ -catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion.  
*J. Biol. Chem.* 275, 5090-5095.
- LILIEN, J., BALSAMO, J., ARREGUI, C., XU, G. (2002)  
Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins.  
*Dev. Dyn.* 224, 18-29.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- LIU, C., LI, Y., SEMENOV, M., HAN, C., BAEG, G., TAN, Y., ZHANG, Z., LIN, X., HE, X. (2002)  
Control of  $\beta$ -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.  
*Cell* 108, 837-847.
- LIU, C., KATO, Y., ZHANG, Z., DO, V. M., YANKNER, B. A., HE, X. (1999)  
 $\beta$ -Trcp couples  $\beta$ -catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6273-6278.
- LIU, X., RUBIN, J. S., KIMMEL, A. R. (2005)  
Rapid, Wnt-induced changes in GSK3 $\beta$  associations that regulate  $\beta$ -catenin stabilization are mediated by G $\alpha$  proteins.  
*Curr. Biol.* 15, 1989-1997.
- LLOYD, S., FLEMING, T. P., COLLINS, J. E. (2003)  
Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development.  
*Gene Expr. Patterns* 3, 309-312.
- LLUIS, F., PEDONE, E., PEPE, S., COSMA, M. (2008)  
Periodic activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion.  
*Cell Stem Cell* 3, 493-507.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., UND BOLAND, M. (2003)  
Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies.  
*Reprod. Biomed. Online* 7, 657-663.
- MACDONALD, B. T., TAMAI, K., HE, X. (2009)  
Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.  
*Dev. Cell* 17, 9-26.
- MAHER, M. T., MO, R., FLOZAK, A. S., PELED, O. N., GOTTARDI, C. J. (2010)  
 $\beta$ -catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from  $\beta$ -catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling.  
*PLoS ONE* 5, e10184.
- MAO, J., WANG, J., LIU, B., PAN, W., FARR, G., FLYNN, C., YUAN, H., TAKADA, S., KIMELMAN, D., LI, L., U. A. (2001)  
Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway.  
*Mol. Cell* 7, 801-809.
- MARRS, J., NELSON, W. (1996)  
Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis.  
*Int. Rev. Cytol.* 165, 159-205.

- MCGRAW, S., VIGNEAULT, C., SIRARD, M. (2007)  
Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development.  
*Reproduction* 133, 597-608.
- MEIJER, L., FLAJOLET, M., GREENGARD, P. (2004)  
Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3.  
*Trends Pharmacol. Sci.* 25, 471-480.
- MEIJER, L., SKALTSOUNIS, A., MAGIATIS, P., POLYCHRONOPOULOS, P., KNOCKAERT, M., LEOST, M., RYAN, X. P., VONICA, C. A., BRIVANLOU, A., DAJANI, R. (2003)  
GSK-3-selective inhibitors derived from tyrian purple indirubins.  
*Chem. Biol.* 10, 1255-1266.
- MEMILI, E., DOMINKO, T., FIRST, N. L. (1998)  
Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos.  
*Mol. Reprod. Dev.* 51, 36-41.
- MEMILI, E., FIRST, N. L. (1999)  
Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development.  
*Biol. Reprod.* 61, 1198-1207.
- MEMILI, E., FIRST, N. L. (2000)  
Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species.  
*Zygote*. 8, 87-96.
- MICHEL, G. (1995)  
Vergleichende Embryologie der Haustiere.  
Jena: Gustav Fischer Verlag.
- MILLER, J., MOON, R. (1997)  
Analysis of the signaling activities of localization mutants of  $\beta$ -catenin during axis specification in *Xenopus*.  
*J. Cell Biol.* 139, 229-243.
- MILLER, J., MOON, R. (1996)  
Signal transduction through  $\beta$ -catenin and specification of cell fate during embryogenesis.  
*Genes Dev.* 10, 2527-2539.
- MOLENAAR, M., VAN DE, W. M., OOSTERWEGEL, M., PETERSON-MADURO, J., GODSAVE, S., KORINEK, V., ROOSE, J., DESTREE, O., CLEVERS, H. (1996)  
XTcf-3 transcription factor mediates  $\beta$ -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos.  
*Cell* 86, 391-399.

- MORGAN, H., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W., REIK, W. (2005)  
Epigenetic reprogramming in mammals.  
*Hum. Mol. Genet. 14 Spec No 1*, R47-R58.
- MOSIMANN, C., HAUSMANN, G., BASLER, K. (2009)  
 $\beta$ -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10*, 276-286.
- MUELLER, T., CHOIDAS, A., REICHMANN, E., ULLRICH, A. (1999)  
Phosphorylation and free pool of  $\beta$ -catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration.  
*J. Biol. Chem. 274*, 10173-10183.
- NATALE, D., KIDDER, G., WESTHUSIN, M., WATSON, A. (2000)  
Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development.  
*Mol. Reprod. Dev. 55*, 152-163.
- NELSON, W., NUSSE, R. (2004)  
Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways.  
*Science 303*, 1483-1487.
- NOTHIAS, J., MAJUMDER, S., KANEKO, K., DEPAMPHILIS, M. (1995)  
Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development.  
*J. Biol. Chem. 270*, 22077-22080.
- OHSUGI, M., BUTZ, S., KEMLER, R. (1999)  
 $\beta$ -catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development.  
*Dev. Dyn. 216*, 168-176.
- OHSUGI, M., HWANG, S., BUTZ, S., KNOWLES, B., SOLTER, D., KEMLER, R. (1996)  
Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development.  
*Dev. Dyn. 206*, 391-402.
- ORFORD, K., CROCKETT, C., JENSEN, J., WEISSMAN, A., BYERS, S. (1997)  
Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of  $\beta$ -catenin.  
*J. Biol. Chem. 272*, 24735-24738.
- ORSULIC, S., HUBER, O., ABERLE, H., ARNOLD, S., KEMLER, R. (1999)  
E-cadherin binding prevents  $\beta$ -catenin nuclear localization and  $\beta$ -catenin/LEF-1-mediated transactivation.  
*J. Cell. Sci 112 (Pt 8)*, 1237-1245.

- ORSULIC, S., PEIFER, M. (1996)  
An in vivo structure-function study of armadillo, the  $\beta$ -catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling.  
*J. Cell Biol.* 134, 1283-1300.
- OZAWA, M., BARIBAULT, H., KEMLER, R. (1989)  
The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.  
*EMBO J.* 8, 1711-1717.
- PARKER, D. S., JEMISON, J., CADIGAN, K. M. (2002)  
Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*.  
*Development* 129, 2565-2576.
- PARRISH, J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M., CRITSER, E., EYESTONE, W., FIRST, N. (1986)  
Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.  
*Theriogenology* 25, 591-600.
- PAUKEN, C. M., CAPCO, D. G. (1999)  
Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and  $\beta$ -catenin.  
*Mol. Reprod. Dev.* 54, 135-144.
- PAVLOK, A., KOPECNY, V., LUCAS-HAHN, A., UND NIEMANN, H. (1993).  
Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles.  
*Mol. Reprod. Dev.* 35, 233-243.
- PEIFER, M. (1993)  
The product of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is part of a multi-protein complex resembling the vertebrate adherens junction.  
*J. Cell. Sci* 105 (Pt 4), 993-1000.
- PEIFER, M., MCCREA, P., GREEN, K., WIESCHAUS, E., GUMBINER, B. (1992)  
The vertebrate adhesive junction proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties.  
*J. Cell Biol.* 118, 681-691.
- PIAO, S., LEE, S., KIM, H., YUM, S., STAMOS, J. L., XU, Y., LEE, S., LEE, J., OH, S., HAN, J., U. A. (2008)  
Direct inhibition of GSK3 $\beta$  by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.  
*PLoS ONE* 3.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- PIEDRA, J., MIRAVET, S., CASTANO, J., PALMER, H., HEISTERKAMP, N., GARCIA DE, H. A., DUNACH, M. (2003)  
p120 catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate  $\beta$ -catenin Tyr-142 phosphorylation and  $\beta$ -catenin- $\alpha$ -catenin interaction.  
*Mol. Cell. Biol.* 23, 2287-2297.
- PLANTE, L., PLANTE, C., SHEPHERD, D., KING, W. (1994)  
Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential.  
*Mol. Reprod. Dev.* 39, 375-383.
- POEHLAND, R., TOMEK, W., BECKER, F., KURTH, J., KANITZ, W., BHOJWANI, S. (2008)  
Qualitative and quantitative differences of cytoskeleton proteins in embryos produced in vitro, in vivo, and by somatic nuclear transfer.  
*Mol. Reprod. Dev.* 75, 1109-1119.
- POLYCHRONOPOULOS, P., MAGIATIS, P., SKALTSOUNIS, A., MYRIANTHOPOULOS, V., MIKROS, E., TARRICONE, A., MUSACCHIO, A., ROE, S. M., PEARL, L., LEOST, M., U. A. (2004)  
Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases.  
*J. Med. Chem.* 47, 935-946.
- PRATHER, R. S., FIRST, N. L. (1988)  
A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species.  
*J. Anim. Sci.* 66, 2626-2635.
- PRIEVE, M. G., WATERMAN, M. L. (1999)  
Nuclear localization and formation of  $\beta$ -catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression.  
*Mol. Cell. Biol.* 19, 4503-4515.
- RESTUCCI, B., MARTANO, M., DE VICO, G., LO MUZIO, L., MAIOLINO, P. (2009)  
Expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and APC protein in canine colorectal tumours.  
*Anticancer Res.* 29, 2919 -2925.
- REYNOLDS, A., DANIEL, J., MCCREA, P., WHEELLOCK, M., WU, J., ZHANG, Z. (1994)  
Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes.  
*Mol. Cell. Biol.* 14, 8333-8342.
- RIESE, J., YU, X., MUNNERLYN, A., ERESH, S., HSU, S., GROSSCHEDL, R., BIENZ, M. (1997)  
LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wntless and decapentaplegic.  
*Cell* 88, 777-787.

- RIMM, D. L., KOSLOV, E. R., KEBRIAIEI, P., CIANCI, C. D., MORROW, J. S. (1995)  
Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8813-8817.
- RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M., LONERGAN, P. (2002)  
Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.  
*Mol. Reprod. Dev.* 61, 234-248.
- ROGERS, I., VARMUZA, S. (2000)  
LiCl disrupts axial development in mouse but does not act through the  $\beta$ -catenin/Lef-1 pathway.  
*Mol. Reprod. Dev.* 55, 387-392.
- ROOSE, J., CLEVERS, H. (1999)  
TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis.  
*Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Cancer* 1424, M23-M37.
- ROOSE, J., MOLENAAR, M., PETERSON, J., HURENKAMP, J., BRANTJES, H., MOERER, P., VAN DE WETERING, M., DESTREE, O., CLEVERS, H. (1998)  
The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors.  
*Nature* 395, 608-612.
- ROTHBÄCHER, U., LAURENT, M. N., DEARDORFF, M. A., KLEIN, P. S., CHO, K. W., FRASER, S. E. (2000)  
Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis.  
*EMBO J.* 19, 1010-1022.
- ROURA, S., MIRAVET, S., PIEDRA, J., GARCIA DE, H. A., DUNACH, M. (1999)  
Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation.  
*J. Biol. Chem.* 274, 36734-36740.
- RUBINFELD, B., ALBERT, I., PORFIRI, E., FIOL, C., MUNEMITSU, S., POLAKIS, P. (1996)  
Binding of GSK3 $\beta$  to the APC- $\beta$ -catenin complex and regulation of complex assembly.  
*Science* 272, 1023-1026.
- RUBINFELD, B., TICE, D. A., POLAKIS, P. (2001)  
Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1 $\epsilon$ .  
*J. Biol. Chem.* 276, 39037-39045.

- RÜSSE, I., SINOWATZ, F. (1998)  
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere 2. Aufl.  
Berlin: Parey Buchverlag.
- SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N. L., PARRISH, J. J., MEMILI, E. (2006)  
Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos.  
*Reproduction* 131, 895-904.
- SALIC, A., LEE, E., MAYER, L., KIRSCHNER, M. (2000)  
Control of  $\beta$ -catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts.  
*Mol. Cell* 5, 523-532.
- SALOMON, D., SACCO, P., ROY, S., SIMCHA, I., JOHNSON, K., WHEELLOCK, M., BEN-ZE'EV, A. (1997)  
Regulation of  $\beta$ -catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system.  
*J. Cell Biol.* 139, 1325-1335.
- SANSON, B., WHITE, P., VINCENT, J. (1996)  
Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*.  
*Nature* 383, 627-630.
- SATO, N., MEIJER, L., SKALTSOUNIS, L., GREENGARD, P., BRIVANLOU, A. H. (2004)  
Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor.  
*Nat. Med.* 10, 55-63.
- SCHULTZ, R. (1993)  
Regulation of zygotic gene activation in the mouse.  
*Bioessays* 15, 531-538.
- SCHULTZ, R. (2002)  
The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo.  
*Hum. Reprod. Update* 8, 323-331.
- SCHULTZ, R., DAVIS, W., STEIN, P., SVOBODA, P. (1999)  
Reprogramming of gene expression during preimplantation development.  
*J. Exp. Zool.* 285, 276-282.
- SCHWARZ-ROMOND, T., METCALFE, C., BIENZ, M. (2007)  
Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies.  
*J. Cell. Sci* 120, 2402-2412.

- STAAL, F. J., VAN NOORT, M., STROUS, G. J., CLEVERS, H. C. (2002)  
Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated  $\beta$ -catenin.  
*EMBO Reports* 3, 63–68.
- SURANI, M. A., BARTON, S. C. (1984)  
Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae.  
*Dev. Biol.* 102, 335–343.
- TAKEMARU, K., MOON, R. (2000)  
The transcriptional coactivator CBP interacts with  $\beta$ -catenin to activate gene expression.  
*J. Cell Biol.* 149, 249-254.
- TAMAI, K., SEMENOV, M., KATO, Y., SPOKONY, R., LIU, C., KATSUYAMA, Y., HESS, F., SAINT-JEANNET, J., HE, X. (2000)  
LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction.  
*Nature* 407, 530-535.
- TAMAI, K., ZENG, X., LIU, C., ZHANG, X., HARADA, Y., CHANG, Z., HE, X. (2004)  
A mechanism for Wnt coreceptor activation.  
*Mol. Cell* 13, 149-156.
- TANG, F., KANEDA, M., O'CARROLL, D., HAJKOVA, P., BARTON, S., SUN, Y., LEE, C., TARAKHOVSKY, A., LAO, K., SURANI, M. (2007)  
Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development.  
*Genes Dev.* 21, 644-648.
- TAURIN, S., SANDBO, N., QIN, Y., BROWNING, D., DULIN, N. O. (2006)  
Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase.  
*J. Biol. Chem.* 281, 9971 -9976.
- TELFORD, N., WATSON, A., SCHULTZ, G. (1990)  
Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species.  
*Mol. Reprod. Dev.* 26, 90-100.
- TESARIK, J. (1989)  
Involvement of oocyte-coded message in cell differentiation control of early human embryos.  
*Development* 105, 317–322.
- THIBAUT, C., MELIÈRES, A., ESCAFFRE, A. (1966)  
La culture in vitro de l'oeuf de vache.  
*Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 6, 159-164.

- TOMÁNEK, M., KOPEČNÝ, V., KAŇKA, J. (1989)  
Genome reactivation in developing early pig embryos: an ultrastructural and autoradiographic analysis.  
*Anat. Embryol.* 180, 309-316.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- TSENG, A., ENGEL, F. B., KEATING, M. (2006)  
The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes.  
*Chem. Biol.* 13, 957-963.
- ULLMANN, U., GILLES, C., DE RYCKE, M., VAN DE VELDE, H., SERMON, K., LIEBAERS, I. (2008)  
GSK-3-specific inhibitor-supplemented hESC medium prevents the epithelial–mesenchymal transition process and the up-regulation of matrix metalloproteinases in hESCs cultured in feeder-free conditions.  
*Mol. Hum. Reprod.* 14, 169 -179.
- VAN DE WETERING, M., CAVALLO, R., DOOIJES, D., VAN, B. M., VAN, E. J., LOUREIRO, J., YPMA, A., HURSH, D., JONES, T., BEJSOVEC, A., U. A. (1997)  
Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF.  
*Cell* 88, 789-799.
- VAN LEEUWEN, F., SAMOS, C., NUSSE, R. (1994)  
Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal disc cells.  
*Nature* 368, 342-344.
- VERHEYEN, E., GOTTARDI, C. (2010)  
Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by protein kinases.  
*Dev. Dyn.* 239, 34-44.
- VIGNEAULT, C., GRAVEL, C., VALLEE, M., MCGRAW, S., SIRARD, M. (2009a)  
Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition.  
*Reproduction* 137, 245-257.
- VIGNEAULT, C., MCGRAW, S., MASSICOTTE, L., SIRARD, M. (2004)  
Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition.  
*Biol. Reprod.* 70, 1701-1709.

- VIGNEAULT, C., MCGRAW, S., SIRARD, M. (2009b)  
Spatiotemporal expression of transcriptional regulators in concert with the maternal-to-embryonic transition during bovine in vitro embryogenesis.  
*Reproduction* 137, 13-21.
- VIUFF, D., HYTTEL, P., AVERY, B., VAJTA, G., GREVE, T., CALLESEN, H., THOMSEN, P. (1998)  
Ribosomal ribonucleic acid is transcribed at the 4-cell stage in in vitro-produced bovine embryos.  
*Biol. Reprod.* 59, 626-631.
- WANG, Q., PIOTROWSKA, K., CIEMERYCH, M. A., MILENKOVIC, L., SCOTT, M. P., DAVIS, R. W., ZERNICKA-GOETZ, M. (2004)  
A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo.  
*Dev. Cell* 6, 133-144.
- WATSON, A. J., BARCROFT, L. C. (2001)  
Regulation of blastocyst formation.  
*Front. Biosci.* 6, D708–D730.
- WATSON, A. J. (1992)  
The cell biology of blastocyst development.  
*Mol. Reprod. Dev.* 33, 492-504.
- WEISS, E., KROEMKER, M., RUDIGER, A., JOCKUSCH, B., RUDIGER, M. (1998)  
Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin.  
*J. Cell Biol.* 141, 755-764.
- WILLERT, K., NUSSE, R. (1998)  
 $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling.  
*Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95-102.
- WODARZ, A., NUSSE, R. (1998)  
Mechanisms of wnt signaling in development.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88.
- WONG, H., BOURDELAS, A., KRAUSS, A., LEE, H., SHAO, Y., WU, D., MLODZIK, M., SHI, D., ZHENG, J. (2003)  
Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled.  
*Mol. Cell* 12, 1251-1260.
- WRENZYCKI, C. (2007)  
Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität.  
*J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* 4, 234-239.

- WU, G., HUANG, H., ABREU, J. G., HE, X. (2009)  
 Inhibition of GSK3 phosphorylation of  $\beta$ -catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6.  
*PLoS ONE* 4, e4926.
- WU, X., TU, X., JOENG, K. S., HILTON, M. J., WILLIAMS, D. A., LONG, F. (2008)  
 Rac1 activation controls nuclear localization of  $\beta$ -catenin during canonical Wnt signaling.  
*Cell* 133, 340-353.
- XING, Y., CLEMENTS, W. K., KIMELMAN, D., XU, W. (2003)  
 Crystal structure of a  $\beta$ -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the  $\beta$ -catenin destruction complex.  
*Genes Dev.* 17, 2753-2764.
- YAMADA, S., POKUTTA, S., DREES, F., WEIS, W. I., NELSON, W. J. (2005)  
 Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex.  
*Cell* 123, 889-901.
- YAMANAKA, Y., RALSTON, A., STEPHENSON, R. O., ROSSANT, J. (2006)  
 Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst.  
*Dev. Dyn.* 235, 2301–2314.
- YAMAUCHI, K., KUROSAKA, A. (2009a)  
 Expression and function of glycogen synthase kinase-3 in human hair follicles.  
*Arch. Dermatol. Res* 302, 263-270.
- YAMAUCHI, K., KUROSAKA, A. (2009b)  
 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture.  
*Arch. Dermatol. Res* 301, 357-365.
- YANAGAWA, S., VAN LEEUWEN, F., WODARZ, A., KLINGENSMITH, J., NUSSE, R. (1995)  
 The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*.  
*Genes Dev.* 9, 1087 -1097.
- YANAGAWA, S., LEE, J., HARUNA, T., ODA, H., UEMURA, T., TAKEICHI, M., ISHIMOTO, A. (1997)  
 Accumulation of armadillo induced by wingless, dishevelled, and dominant-negative zeste-white 3 leads to elevated DE-cadherin in *Drosophila* clone 8 wing disc cells.  
*J. Biol. Chem.* 272, 25243-25251.
- YANG-SNYDER, J., MILLER, J. R., BROWN, J. D., LAI, C., R, MOON, A. T. (1996)  
 A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway.  
*Curr. Biol.* 6, 1302-1306.

- YOKOYA, F., IMAMOTO, N., TACHIBANA, T., YONEDA, Y. (1999)  
β-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner.  
*Mol. Biol. Cell* 10, 1119-1131.
- YOST, C., TORRES, M., MILLER, J., HUANG, E., KIMELMAN, D., MOON, R. (1996)  
The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of β-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3.  
*Genes Dev.* 10, 1443-1454.
- ZENG, F., BALDWIN, D. A., SCHULTZ, R. M. (2004)  
Transcript profiling during preimplantation mouse development.  
*Dev. Biol.* 272, 483-496.
- ZENG, L., FAGOTTO, F., ZHANG, T., HSU, W., VASICEK, T., PERRY, W., LEE, J., TILGHMAN, S., GUMBINER, B., COSTANTINI, F. (1997)  
The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation.  
*Cell* 90, 181-192.
- ZENG, X., HUANG, H., TAMAI, K., ZHANG, X., HARADA, Y., YOKOTA, C., ALMEIDA, K., WANG, J., DOBLE, B., WOODGETT, J., U. A. (2008)  
Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions.  
*Development* 135, 367-375.
- ZENG, X., TAMAI, K., DOBLE, B., LI, S., HUANG, H., HABAS, R., OKAMURA, H., WOODGETT, J., HE, X. (2005)  
A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation.  
*Nature* 438, 873-877.
- ZHAO, J., YUE, W., ZHU, M. J., SREEJAYAN, N., DU, M. (2010)  
AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of β-catenin at Ser 552.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 146-151.

## **10 Danksagung**

Für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen sowie die freundliche Aufnahme in den Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie Dummerstorf bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Kanitz.

Herrn Prof. Dr. Dr. R. Einspanier danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Freien Universität Berlin einreichen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. R. Pöhland. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine zahlreichen Fragen und stand mir sowohl bei der Durchführung meiner Versuche als auch beim Abfassen der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite.

Bei Herrn Dr. W. Tomek möchte ich mich recht herzlich für die Betreuung des biochemischen Abschnittes dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank auch für die stets schnelle und umfassende Beantwortung meiner Fragen.

Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Angestellten des Forschungsbereiches Fortpflanzungsbiologie, allen voran Frau P. Reckling und Frau G. Krüger, für die Einarbeitung, die zahlreichen Tipps und ihre Hilfe bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen danke ich den Statistikern des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie Dummerstorf.

Bei der Geschäftsführung des Besamungsvereins Neustadt/Aisch e.V. (BVN), Herrn Dr. C. Leiding und Herrn Dr. J. Aumann, bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, meine Versuche in den stationeigenen Einrichtungen durchführen und darüber hinaus Einblicke in die verschiedenen Arbeitsbereiche des BVN gewinnen zu dürfen. Des Weiteren bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch die Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Woehl-Wenigerkind, meiner Kollegin und primären Ansprechpartnerin beim BVN, die mich nicht nur unermüdlich und professionell in die Laborpraxis der In-vitro-Produktion eingeführt, sondern mich darüber hinaus bei der Durchführung meiner Versuche tatkräftig unterstützt hat und mir bei all meinen Problemen stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme im IVP-Labor, die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen lehrreichen Gespräche und Diskussionen, die Antworten auf meine unzähligen Fragen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Für die Einblicke in die Praxis des Embryotransfers sowie die fachlichen Ratschläge möchte ich mich bei Herrn Dr. H.-P. Nohner und dem gesamten ET-Team des BVN bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des BVN in Stall, Labor und Büro, die durch ihre Hilfsbereitschaft meine Arbeit unterstützt haben.

Bei den Mitarbeitern des Schlachthofs Erlangen bedanke ich mich für die Überlassung der für meine Versuche benötigten Ovarien sowie für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Meinen Vorgängern im IVP-Labor des BVN, Corinna Siemer und Ursel Fucker, sowie Dana Janowski vom Leibniz-Institut Dummerstorf möchte ich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Ratschläge rund um das Thema Promotion danken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Mitbewohnern und -doktoranden in Neustadt a. d. Aisch, Barbara Auinger und Vendula Bernet. Vielen Dank für die vielen Gespräche, Anregungen und Ratschläge und vor allem für die gemeinsame WG-Zeit.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich bei meinen langjährigen Freunden Anna Lena Weber, Julia Hammer und Carolin Speier; Ron Hammer danke ich recht herzlich für seine Hilfe beim Formatieren meiner Arbeit sowie beim Lösen zahlreichen Computerprobleme.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatten und mir während der letzten Jahre stets unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

## **11 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Arberg, den 21.09.2011

Heidi Leitner