

Zirkulierende Nukleinsäuren als molekulare Marker zur
Trächtigkeitsbestimmung beim Rind

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

an der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Jennifer Mayer

aus **Cottbus**

Göttingen **2012**

Mitglieder des Betreuungsausschusses: Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig,
Prof. Dr. Rainer Willmann
Referent: Prof. Dr. Rainer Willmann
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig
Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Der ovarielle Zyklus des Rindes	6
1.2	Frühe embryonale Entwicklung und Implantation	8
1.3	Trächtigkeitsbestimmung beim Rind	11
1.4	Zirkulierende Nukleinsäuren (CNAs)	12
1.5	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Gewinnung und Aufbereitung von Serumproben	15
2.2	Versuchstiere	15
2.3	DNA Extraktion und Whole Genome Amplification	17
2.4	454-Sequenzierung	18
2.4.1	DNA-Aufbereitung für 454-Sequenzierung	18
2.4.2	<i>In silico</i> -Analyse der 454-Sequenzierungsdaten	19
2.4.3	Statistische Auswertung	21
2.5	Validierung	22
2.5.1	CNA-Aufbereitung für PCR-Reaktionen	22
2.5.2	Primerkonstruktion	22
2.5.3	Quantitative Real-Time PCR	23
2.5.4	Präparation der Standardkurven zur Bestimmung der Kopienzahl	24
2.5.5	Statistische Auswertung	24
2.6	SOLiD TM -Sequenzierung methylierter und unmethylierter CNAs	25
2.6.1	CNA-Aufbereitung für die SOLiD TM -Sequenzierung	25
2.6.2	<i>In silico</i> -Analyse der SOLiD TM -Sequenzierungsdaten	28
2.6.3	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	454-Sequenzierungsergebnisse	30
3.1.1	Erhaltene Sequenz-Anzahlen	30
3.1.2	Verteilung funktioneller genomischer Bereiche	30
3.1.3	Verteilung von <i>Tag</i> -Treffern auf Chromosomen	31
3.1.4	Verteilung von <i>Tags</i> auf einzelnen Genen	35
3.1.5	Repräsentation von repetitiven Elementen	36
3.1.6	Exklusive <i>Tag</i> -Sequenzen trächtiger Kühe	37

Inhaltsverzeichnis

3.2	Validierungsergebnisse	40
3.2.1	QPCR-Experiment 1.....	40
3.2.2	QPCR-Experiment 2.....	41
3.2.2.1	<i>Vergleich der Kopienzahlen zwischen trächtigen Kühen</i>	<i>41</i>
3.2.2.2	<i>Vergleich von Kopienzahlen trächtiger Kühe mit der gesamten Kontrollgruppe</i>	<i>42</i>
3.2.2.3	<i>Vergleich der Kopienzahlen jedes Entnahmetages aus Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe.....</i>	<i>43</i>
3.2.3	ROC-Statistik	44
3.3	Ergebnisse aus der SOLiD™-Sequenzierung	45
3.3.1	Erhaltene Sequenz-Anzahlen.....	45
3.3.2	Verteilung der Methylierung über Chromosomen.....	46
3.3.3	Verteilung der Methylierung innerhalb von Genen.....	48
4	Diskussion	50
4.1	454-Sequenzierung.....	51
4.2	Validierung.....	58
4.3	SOLiD™-Sequenzierung methylierter und unmethylierter CNAs	61
4.4	Fazit und Ausblick.....	64
5	Zusammenfassung.....	66
6	Summary.....	67
7	Anhang: Zusätzliche Tabellen und Abbildungen	68
8	Literaturverzeichnis.....	73
9	Abkürzungsverzeichnis.....	83
10	Abbildungsverzeichnis.....	87
11	Tabellenverzeichnis.....	91
12	Lebenslauf.....	93
13	Danksagung	94

Für meine Familie

1 Einleitung

Bei CNAs handelt es sich sowohl um DNA, als auch um RNA, welche im Serum oder Plasma als freie und/oder in Mikrovesikeln (Exosomen) verpackte Nukleinsäuren zirkulieren (Swarup & Rajeswari 2007; Fleischhacker & Schmidt 2007). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bisher zirkulierende Nukleinsäuren sowohl in gesunden als auch erkrankten Individuen (Tan *et al.* 1966; Fleischhacker & Schmidt 2007; Swarup & Rajeswari 2007; Beck *et al.* 2009), sowie zirkulierende fetale Nukleinsäuren im maternalen Serum nachweisen (Swaminathan & Butt 2006; Honda *et al.* 2002; Liu *et al.* 2007). Außerdem konnten in Rindern BSE-induzierte CNAs (Brenig *et al.* 2002; Schütz *et al.* 2005; Gordon *et al.* 2009), sowie fetale Y-spezifische DNA im Blutkreislauf identifiziert werden (Wang *et al.* 2010; Lemos *et al.* 2011).

Des Weiteren wurden durch vergleichende Transkriptom-Analysen am 16. und 18. Tag *post inseminationem* (*p.i.*) spezifische Genexpressionsmuster und Signalwege im Endometrium trächtiger und nicht-trächtiger Kühe beschrieben (Bauersachs *et al.* 2006; Forde *et al.* 2011). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch Änderungen im Endometrium spezifische CNAs als molekulare Marker für eine Bestimmung des Trächtigkeitsstatus beim Rind nachweisbar sein könnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zirkulierende DNA im Serum von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen zu identifizieren. Diese zirkulierenden Nukleinsäuren sollten auf ihre Trächtigkeits-Spezifität untersucht werden. Zusätzlich sollte die Untersuchung der CNAs durch einen epigenetischen Ansatz zur Identifizierung von Methylierungsmustern innerhalb der CpG-Abschnitte der CNA Profile erweitert werden.

1.1 Der ovarielle Zyklus des Rindes

Bei Rindern verläuft der Sexualzyklus in einem Zeitraum von 21 Tagen, wobei die Brunst 24 h andauert (Schnorr & Kressin 2006). Dabei werden durch die Ausschüttung verschiedener Hormone die Voraussetzungen für die Befruchtung, die Nidation der befruchteten Eizelle, sowie der anschließenden Trächtigkeit geschaffen.

Der ovarielle Zyklus wird in die Follikelreifungsphase (d 19-21 des alten bzw. d 1 des neuen Zyklus), Ovulationsphase (d 1-2) und Gelbkörperphase (d 2-19) eingeteilt. Während der Follikelreifungsphase produzieren die dominanten Follikel LH-Rezeptoren, den Insulin-like growth factor (IGF-I) sowie Progesteron und Estradiol

(E₂). Unter erhöhtem Einfluss des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) entwickelt sich der dominante Follikel, der nach dem 18. Zyklustag am weitesten gereift ist, zum Tertiärfollikel. In allen Zyklusphasen ist ein Follikelwachstum vorhanden, sodass im Verlauf des gesamten Zyklus Tertiärfollikel in 2-3 Entwicklungswellen heranwachsen (Abbildung 1). Pro Welle wird ein Follikel dominant, der unter Einfluss von LH zum Wachstum angeregt wird (Grunert & Berchthold 1999). Der Tertiärfollikel produziert vermehrt E₂, was zu einer erhöhten Sekretion des ovariellen Proteins Inhibin und zu einem Absinken der FSH-Konzentration führt, womit die Entwicklung von rückständigen Follikeln unterdrückt wird. Dabei verlieren die dominanten Follikel der vorherigen Wellen ihre LH-Rezeptoren und weisen hohe Konzentrationen des IGF-I-binding Proteins (IGFBP 4 & 5) auf, welches zu einem Absinken der E₂-Konzentration sowie zu einer vermehrten Apoptose der Follikelzellen führt (Moore & Thatcher 2006; von Engelhardt & Breves 2010). Die erhöhte E₂-Konzentration in der späten Follikelreifungsphase bewirkt einen Anstieg der LH-Konzentration, wodurch die Ovulation ausgelöst wird. Aus der zurückbleibenden Follikelhöhle entsteht der Gelbkörper (*Corpus luteum*, Cl), der von diesem Zeitpunkt an mit der Progesteron-Bildung beginnt.

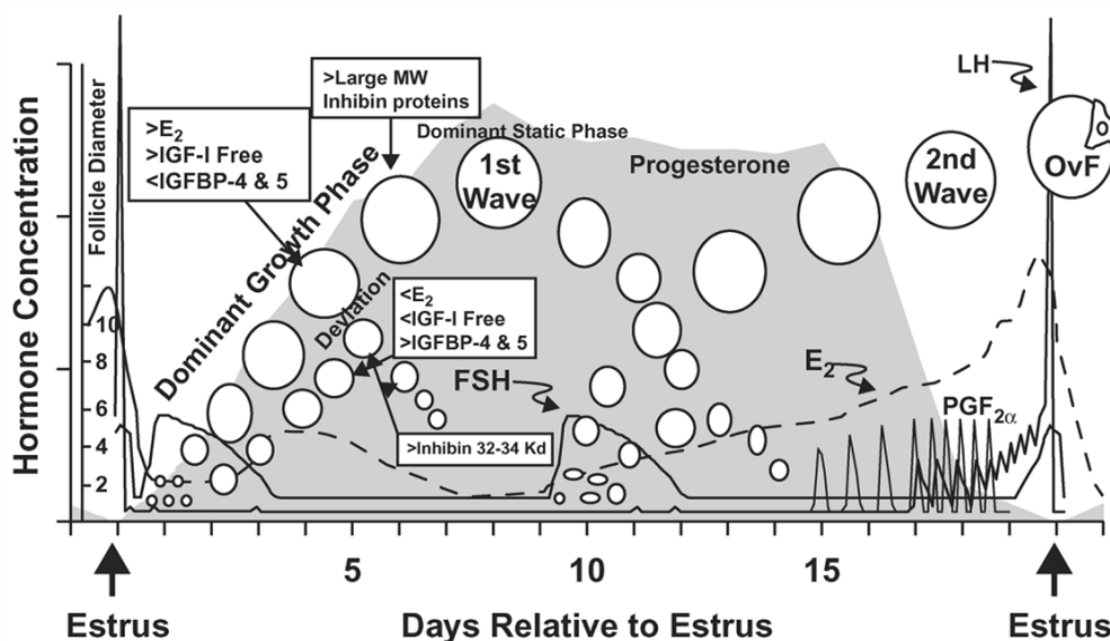


Abbildung 1: Darstellung der Follikel-Entwicklung im Zusammenhang mit endokrinen Veränderungen im Verlauf eines ovariellen Zyklus nach Moore & Thatcher (2006). Kd = Kilodalton; MW = Molekulargewicht; IGF-1 = insulin-like growth factor; IGFBP-4 & -5 = insulin-like growth factor binding Proteins 4 & 5; E₂ = Estradiol; FSH = Follikel-stimulierendes Hormon; LH = luteinisierendes Hormon; PGF_{2α} = Prostaglandin; OvF = ovulierender Follikel.

8 | Einleitung

Bei einem Ausbleiben der Gravidität wird vom Endometrium Prostaglandin ($\text{PGF}_{2\alpha}$) gebildet. $\text{PGF}_{2\alpha}$ bewirkt die Rückbildung des Cl (Luteolyse) und den Abfall der Progesteronkonzentration. Dadurch wird im Hypothalamus vermehrt das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) freigesetzt, dass eine vermehrte Ausschüttung von FSH und die Entwicklung eines neuen dominanten Follikels stimuliert und somit ein neuer ovarieller Zyklus eingeleitet wird. Nach einer Befruchtung wird vom Cl weiter Progesteron gebildet, um damit die Implantation vorzubereiten und den Embryo während der Trächtigkeit zu schützen (Niswender *et al.* 2000; von Engelhardt & Breves 2010). In Abbildung 1 ist der Verlauf der Follikel-Entwicklung während des ovariellen Zyklus im Zusammenhang mit den endokrinen Veränderungen schematisch dargestellt.

1.2 Frühe embryonale Entwicklung und Implantation

Nach der Befruchtung der ovulierten Zelle in der Eileiterampulle (*Ampulla tubae*) durch ein Spermium durchläuft die Zygote mehrere mitotische Teilungen (Furchung) zur Blastozyste (Keimblase). Diese besteht aus dem Trophoblast (einzellige äußere Zellschicht) und dem Embryoblast (innerer Zellknoten). Während dieser Zellteilungen wandert die Zygote von dem Ort der Befruchtung bis zu dem Uterus, an dem die Implantation stattfindet (Schnorr & Kressin 2006). Der schematische Verlauf von der Follikelreifung bis zum Blastozysten-Stadium ist in Abbildung 2 dargestellt.

In den ersten fünf Tagen nach der Ovulation stellt der Eileiter das optimale Milieu für die Entwicklung der Zygote zu der Morula (16-Zellstadium) her. Der sich entwickelnde Keim wird vom Eileiter unter E_2 -Einfluss mit Nährstoffen (z.B. Aminosäuren, Glukose) und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und -2 versorgt. Zusätzlich wird der Transport des Keims zum Uterus durch koordinierte Zilien- und Muskelbewegungen gesteuert (Robinson *et al.* 2008). Des Weiteren wird vom Cl in hoher Konzentration Progesteron kontinuierlich gebildet, wodurch die Sekretion von LH, GnRH und FSH herab reguliert wird (Niswender *et al.* 2000).

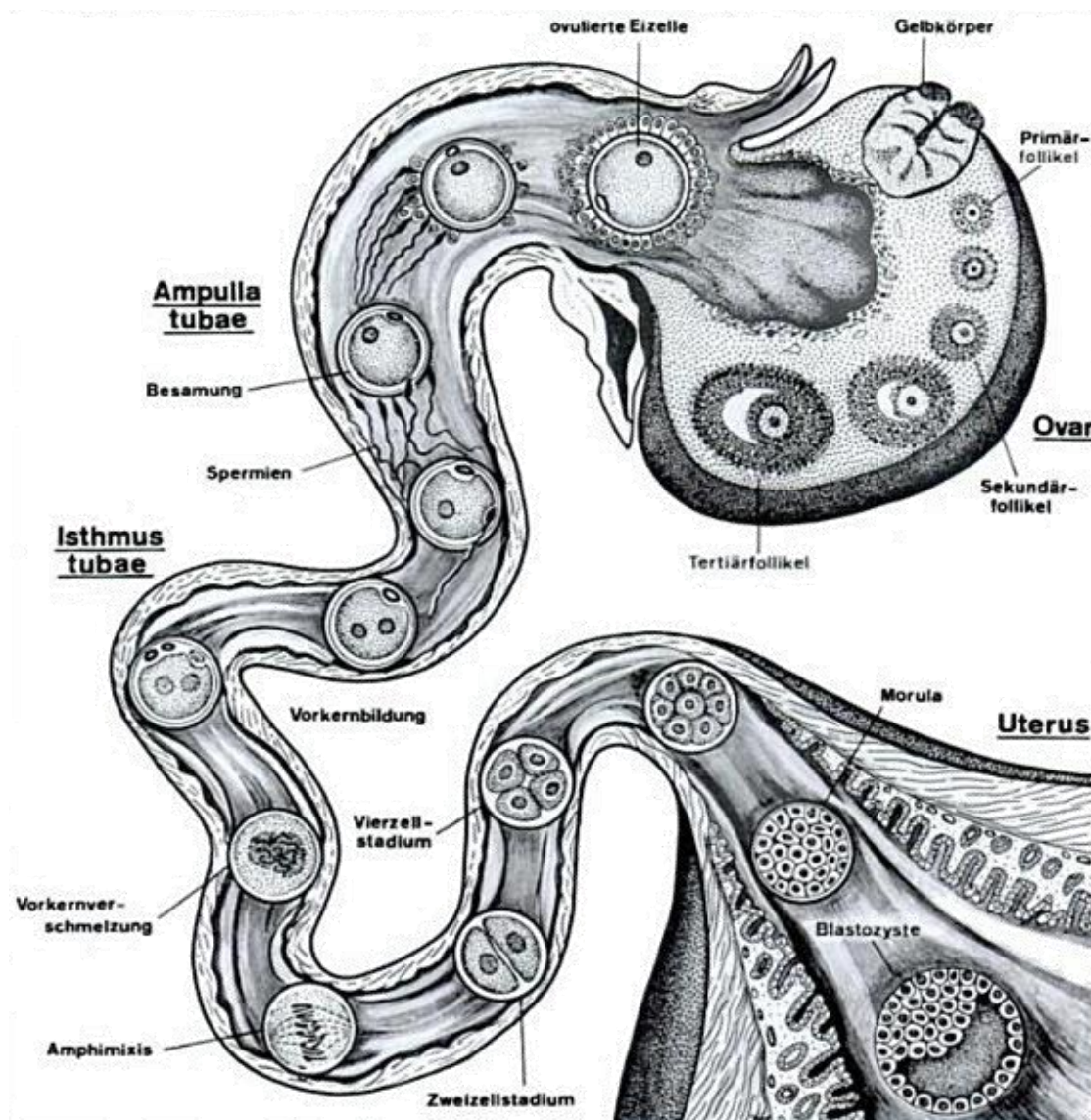


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verlaufs der Follikelreifung, Befruchtung und Furchung bis zum Blastozysten-Stadium nach Schnorr & Kressin (2006).

Nach dem Eintritt in den Uterus entwickelt sich 5 – 12 Tage nach der Befruchtung die Blastozyste. Unter dem Einfluss von Progesteron wird von den endometrialen Drüsen das Histotrophe gebildet. Diese Nährflüssigkeit enthält unter anderem Aminosäuren, Glukose sowie Wachstumsfaktoren, die für die Entwicklung der Blastozyste essentiell sind. Zusätzlich wird durch Progesteron die endometriale Fläche verringert und die Dichte der endometrialen Drüsengänge erhöht (Robinson *et al.* 2008). Die assoziierten Gene, die diese endometrialen Funktionen steuern, wurden von Bauersachs *et al.* (2005) beschrieben.

Um eine Trächtigkeit zu gewährleisten wird zwischen dem 12. und 20. Tag nach der Befruchtung die Luteolyse des Cl vom heranwachsenden Embryo inhibiert. Die Trophoblast-Zellen der Blastozyste sezernieren das bovine Interferon tau ($\text{IFN}\tau$). Unter dem Einfluss von $\text{IFN}\tau$ wird im Endometrium die luteolytische Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$

10 | Einleitung

durch eine verringerte Bildung von Oxytocin- (OXTR) und Östrogenrezeptoren (ER α) verhindert (Robinson *et al.* 2008). Zusätzlich induziert IFN τ die Expression von einer Reihe von Genen im Endometrium. Diese Prozesse sind essentiell für die Entwicklung und Implantation des Konzeptus und wurden durch vergleichende Transkriptom-Analysen am Tag 18 der Trächtigkeit detektiert. Die molekularen Abläufe zur Implantation des Konzeptus sind in Abbildung 3 zusammengefasst dargestellt (Bauersachs *et al.* 2006).

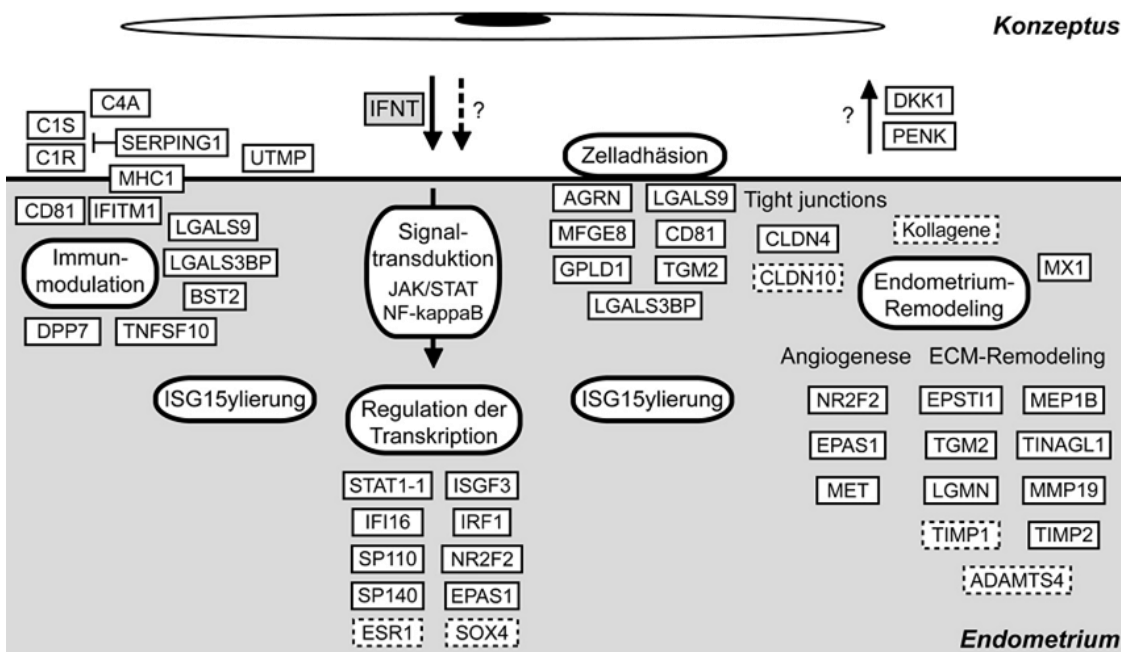


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozesse und korrespondierender Gene, die wahrscheinlich in die Vorbereitung des Endometriums zur Implantation des Konzeptus involviert sind. Boxen mit Umrandungen enthalten Namen von Genen, die im Endometrium von trächtigen Tieren hochreguliert sind. Boxen mit unterbrochenen Umrandungen beinhalten Namen von Genen die herab reguliert werden (Wolf *et al.* 2006; Bauersachs *et al.* 2006).

IFN τ bindet dabei an den endometrialen IFN-Rezeptoren und aktiviert somit den JAK-STAT Signalweg. In diesem Zusammenhang wurden im Endometrium mRNAs von hoch regulierten Genen detektiert, die für Transkriptionsfaktoren kodieren (z.B. *ISGF3*, *IFI16*, *EPAS1* & *NR2F2*). Diese Transkriptionsfaktoren sind unter anderem assoziiert mit der Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese), sowie der Regulation des Zellzyklus und des Hormonhaushaltes. Zusätzlich wurden Gen-Transkripte entdeckt, die an der Regulierung des maternalen Immunsystems beteiligt sind und die Abstoßung des Konzeptus verhindern (z.B. *C1S*, *C1R*, *SERPINI1* & *UTMP*). Einige Gene, die an dem Prozess der Zelladhäsion (z.B. *AGRN*, *CD81*, *LGALS3BP* & *TGM2*) beteiligt sind, wurden unter anderem auch mit der Verknüpfung von Zellen durch

Membranproteine (Tight junctions) während des Umbaus des Endometriums assoziiert. Des Weiteren wurden zusätzliche Gen-Transkripte identifiziert (z.B. *TGM2*, *LGMN*, *MX1* & *EPAS1*), die maßgeblich den Umbauprozess des Uterus zur Vorbereitung der Implantation einleiten und gleichzeitig bei der Wundheilung und Angiogenese beteiligt sind (Bauersachs *et al.* 2006; Wolf & Bauersachs 2010).

Bei beginnender Implantation verschmelzen die doppelkernigen („binukleären“) Trophoblast-Zellen des Konzeptus mit den endometrialen Epithelzellen zu einem Zellsynzytium. Aus diesem Zellverband entwickelt sich die synepitheliochoriale Plazenta der Wiederkäuer. Die bovine Plazenta besitzt eine Interhämalschranke, die aus insgesamt sechs separaten Schichten, den maternalen (Endometrium) und den fetalen (Fruchthüllen) Anteilen, zusammengesetzt ist. Im Gegensatz dazu stehen die Trophoblastzellen bei Primaten in direktem Kontakt zu dem maternalen Blutkreislauf (hämochoriale Plazenta), so dass ein maternal-fetaler Stofftransport ermöglicht wird (King *et al.* 1980; Enders & Carter 2004).

Während des Trächtigtkeitsverlaufs bei Wiederkäuern werden von den Trophoblastzellen der Plazenta verschiedene Gewebs-spezifische Proteine exprimiert, wie z.B. Progesteron, Laktogen und pregnancy associated glycoproteins (PAGs). Diese spielen ebenfalls eine wichtige Rolle während der Initiierung der Implantation, wie z.B. bei der Verschmelzung der fetomaternalen Zelloberflächen (Hashizume 2007; Kumar *et al.* 2007) und sind im maternalen Blut messbar (Patel *et al.* 2004).

1.3 Trächtigtkeitsbestimmung beim Rind

Zur Bestimmung einer bestehenden Trächtigtkeit sind die manuelle rektale Palpation und Ultrasonographie, sowie die Bestimmung der Konzentrationen von Progesteron und PAG bereits etablierte Verfahren (Abbitt *et al.* 1978; Sasser *et al.* 1986; Szenci *et al.* 1998; Rioux & Rajotte 2004).

Durch die Anwendung der manuellen rektalen Palpation oder der Ultrasonographie ist es möglich innerhalb von 28 bis 35 Tagen nach der Besamung eindeutige Aussagen über den Trächtigtkeitsstatus zu treffen (Szenci *et al.* 1998; Fricke 2002). Jedoch wurde im Zusammenhang mit der rektalen Palpation von Fehldiagnosen durch aberrante Uterusvergrößerungen oder vom frühen Abort durch Schädigung der Fruchthüllen berichtet (Ball & Carroll 1963; Abbitt *et al.* 1978; Thurmond & Picanso 1993).

In biochemischen Verfahren werden zur Bestimmung einer Trächtigtkeit die Konzentrationen von Steroidhormonen in Blut oder Milch-Proben quantifiziert.

Zum Beispiel wird nach einer Befruchtung durch das Fehlen der luteolytischen Impulse von $\text{PGF}_{2\alpha}$ vom Cl weiter Progesteron gebildet. Im Gegensatz dazu wird bei einem Ausbleiben der Gravidität vom Endometrium $\text{PGF}_{2\alpha}$ gebildet, das Cl bildet sich zurück und die Progesteronkonzentration sinkt (Niswender *et al.* 2000). Eine Bestimmung der Progesteronkonzentration im Falle einer Luteolyse des Cl ermöglicht die Diagnose „nicht-trächtig“ mit einer Sicherheit von bis zu 100 % am Tag 21 nach der Besamung (Rioux & Rajotte 2004). Im Gegensatz dazu ist zu diesem Zeitpunkt die Bestimmung einer Trächtigkeit nur mit einer Sicherheit von 59 % bis 78 % möglich (Pieterse *et al.* 1990). Als mögliche Ursachen für die verringerte Sicherheit einer richtig-positiven Diagnose wurde unter anderem der embryonaler FrühTod, eine gestörte oder verzögerte Rückbildung des Cl sowie ein verkürzter Brunstzyklus diskutiert (Ball & Carroll 1963; Abbitt *et al.* 1978; Thurmond & Picanso 1993).

Die Analyse verschiedener PAGs in bovinen Blutproben für eine Trächtigkeitsbestimmung stellt eine weitere biochemische Methode dar (Sasser *et al.* 1986). Erhöhte PAG-Konzentrationen im maternalen Blut sind ab dem 24. Tag nach der Besamung messbar. Jedoch ist eine verlässliche Trächtigkeitsbestimmung erst ab dem Tag 28-30 nach der Besamung möglich (Szenci *et al.* 1998; Pare *et al.* 2008). In einzelnen Tieren konnte ein Anstieg der PAG-Konzentration nicht vor Tag 36 nachgewiesen werden. Insgesamt liegt bei einer PAG-Analyse die Aussagesicherheit bei 90 % am Tag 30 und nahezu 100 % am Tag 40 (Szenci *et al.* 1998; Friedrich 2006; Friedrich & Holtz 2010). Daneben ist die im Blutkreislauf messbare PAG-Konzentration auch abhängig von der Anzahl, dem Geschlecht sowie einem eventuellen FrühTod der Feten.

Diese hier vorgestellten Methoden zur Trächtigkeitsbestimmung beim Rind erlauben eine sichere Diagnose nicht vor dem Tag 28 nach der Besamung. Zudem sind diese Methoden kosten- und zeitintensiv. Jedoch wäre eine zuverlässige Trächtigkeitsdiagnose vor dem Tag 21 nötig, um im Falle einer Nicht-Trächtigkeit innerhalb des Brunstzyklus erneut besamen zu können.

1.4 Zirkulierende Nukleinsäuren (CNAs)

Der Nachweis von CNAs in Blut von gesunden und kranken Individuen wurde erstmals von Mandel & Métails (1948) beschrieben (zitiert nach Mandel *et al.* 1950; Swarup & Rajeswari 2007).

Bei CNAs handelt es sich sowohl um DNA- als auch um RNA-Moleküle die im Blutkreislauf zirkulieren (Abbildung 4) und z.B. durch Nekrose oder durch Apoptose in

den Blutkreislauf gelangen (Gahan & Stroun 2010). CNAs sind dabei definiert als freie, an Histon-Protein gebundene (Holdenrieder *et al.* 2008) oder in Lipoprotein-Komplexen verpackte Nukleinsäuren (Gahan & Stroun 2010). Es wird postuliert, dass zirkulierende Nukleosomen apoptotischen Ursprungs möglicherweise vor einer Nuklease-Restriktion geschützt sind (Holdenrieder *et al.* 2008), wodurch die durchschnittliche Fragmentlänge von ungefähr 180 bp in gesunden Individuen herrührt (Suzuki *et al.* 2008).

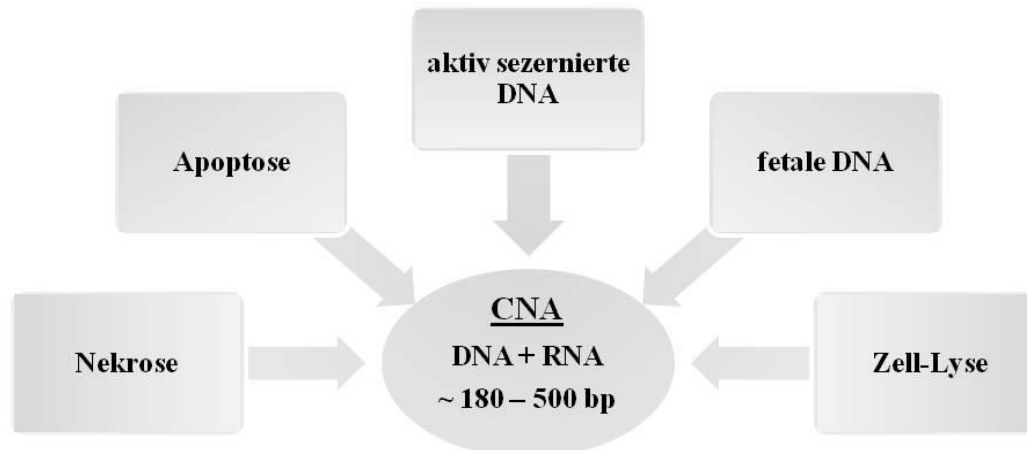


Abbildung 4: Darstellung des möglichen Ursprungs zirkulierender Nukleinsäuren (CNAs). Bp = Basenpaar.

Im Zusammenhang mit der Existenz von CNAs im Blutkreislauf wurde Zell-freie fetale CNA im maternalen Plasma oder Serum ab der siebten Woche der Schwangerschaft detektiert (Lo *et al.* 1997; Lo *et al.* 1998).

Einige Wissenschaftler vergleichen sogar den Prozess der Implantation sowie die Proliferation des endometrialen und embryonalen Gewebes mit gutartigen Tumorwachstum (Müller *et al.* 2004; Swarup & Rajeswari 2007). Dabei wurden auch epigenetische Veränderungen, wie die gehäufte Demethylierung während der Zellteilung des Keims und die das Genom umfassende Methylierung nach der Implantation beschrieben (Müller *et al.* 2004).

Generell erfolgt eine DNA-Methylierung an der 5-C-Position des Cytosins innerhalb von CpG-Dinukleotiden, wobei 70 % aller CpGs des Genoms methyliert vorliegen (Robertson & Wolffe 2000). CpG-Dinukleotide liegen häufig innerhalb von Promotor-Regionen von Genen und in Clustern vor, den sogenannten CpG-Islands (Laird 2003). Diese DNA-Modifikation ist als Schutzmechanismus oder auch zur Regulation von Genen geeignet. So können z.B. Gene und Retrotransposons für einen bestimmten Zeitraum aktiviert bzw. inaktiviert werden (Robertson & Wolffe 2000). Chim *et al.* (2005) detektierten einen universellen epigenetischen Marker für fetale

DNA im maternalen Serum. Dieser Biomarker entstammte von der humanen *Maspin* (*SERPIN5*) Promotor-Sequenz und liegt schwach methyliert in maternalem Plasma, sowie stark methyliert in plazentalem Gewebe vor.

Modifizierte (methylierte/unmethylierte) und native Trächtigkeits-assoziierte CNAs können aus maternalem Serum isoliert und mit Hilfe von hochsensitiven Techniken wie Next-Generation-Sequencing und quantitativer Real-Time PCR in frühen Stadien der Trächtigkeit identifiziert werden (Lo & Chiu 2009).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zirkulierende Trächtigkeits-spezifische Nukleinsäuren aus Sera von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen isoliert und identifiziert werden. Dazu sollten isolierte CNAs aus korrespondierenden Proben trächtiger Kühe zu den Zeitpunkten d 0, d 20 und d 40 nach der Besamung sowie nicht-trächtiger Kühe mit Hilfe eines modifizierten SuperSAGE-Verfahrens bearbeitet und anschließend im Roche/454 GS-FLX Titanium sequenziert werden. Die generierten CNAs sollten anschließend auf Unterschiede in ihrer Verteilung zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe untersucht werden.

In einer anschließenden Validierung sollten ausgewählte CNA-Sequenzen auf ihre Trächtigkeits-Spezifität überprüft werden. Dazu sollten mit neuen korrespondierenden Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe qPCR-Reaktionen etabliert werden. Die CNAs, die dieser Überprüfung stand halten, sollten für eine mögliche frühzeitige molekularbiologische Trächtigkeitsbestimmung herangezogen werden.

Zusätzlich sollten durch einen epigenetischen Ansatz Trächtigkeits-spezifische Methylierungsmuster von CNAs identifiziert werden. Dazu sollten methylierte und unmethylierte CNAs aus korrespondierenden Proben trächtiger und nicht-trächtiger Tiere ab dem Zeitpunkt d 0 und d 40 nach der Besamung mit Hilfe der SOLiDTM-Sequenzierung analysiert werden. Veränderungen der Methylierungsmuster sollten für den frühen Trächtigkeitsverlauf aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung und Aufbereitung von Serumproben

Blutproben wurden auf dem milcherzeugenden Betrieb Gut Agrar Natura GmbH in Steinheuterode von brunstsynchronisierten Kühen der Rasse Holstein-Friesian gesammelt. Die Sammlung der Blutproben erfolgte vom 24.05.2007 bis zum 04.07.2007, 19.11.2007 bis 06.02.2008 und 19.03.2009 bis zum 28.04.2009. Der Trächtigkeitsstatus wurde im Rahmen der Nachbeobachtung durch das Abkalbedatum nach einer Tragezeit von 280-285 Tagen und gegebenenfalls mit Hilfe eines PAG-Tests verifiziert. Aus der Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) wurden 3-10 ml Blut entnommen. Nach der Gerinnung wurde das Blutserum durch ungebremste Zentrifugation bei 3000 rpm für 20 min gewonnen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

2.2 Versuchstiere

Insgesamt wurden für die 454-Sequenzierung Serumproben von acht trächtigen (T) und neun nicht-trächtigen (NT) Kühen aufbereitet. Die insgesamt 40 Serumproben umfassen die Zeitpunkte (d = Tag) d 0, d 20 und d 40 *post inseminationem* (*p.i.*).

Für die anschließende Validierung der 454-Sequenzierung wurden zusätzliche Sera von 12 trächtigen und 16 nicht-trächtigen Kühen mit Hilfe von qPCR-Experimenten untersucht. Insgesamt 74 Proben wurden zu den Zeitpunkten d 0-3, d 20-23 und d 40-43 *p.i.* aufbereitet.

Für die SOLiDTM-Sequenzierung zur Analyse von methylierten und unmethylierten CNAs wurden Sera von 10 trächtigen Kühen, 2 trächtigen Färsen, 12 nicht-trächtigen Kühen und einer nicht-trächtigen Färse analysiert. Die insgesamt 50 Serumproben umfassen die Zeitpunkte d 0-3 und d 36-41 *p.i.*.

Alle untersuchten Proben sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Analytierte Proben bei der 454-Sequenzierung, Validierung und SOLiD™-Sequenzierung.

454-Sequenzierung (N = 40)						
Tier	Besamung	Abkalbung	Status T/NT	Zeitpunkt (d) p.i.		
34	23.05.2007	24.02.2008	T	0	20	40
222	23.05.2007	25.02.2008	T	0	20	40
286	23.05.2007	-	NT	-	20	-
325	23.05.2007	-	NT	0	20	40
402	23.05.2007	-	NT	-	20	-
544	23.05.2007	01.03.2008	T	0	20	40
601	23.05.2007	-	NT	-	20	-
703	23.05.2007	-	NT	0	20	-
707	23.05.2007	-	T	0	20	40
852	23.05.2007	10.02.2008	T	0	20	40
944	23.05.2007	01.03.2008	T	0	20	40
1018	23.05.2007	-	NT	0	20	40
1128	23.05.2007	-	NT	0	20	-
1166	23.05.2007	-	NT	-	20	-
1189	23.05.2007	28.02.2008	T	0	20	40
1283	23.05.2007	-	NT	0	20	-
1299	23.05.2007	-	T	0	20	40
Validierung (N = 74)						
Tier	Besamung	Abkalbung	Status T/NT	Zeitpunkt (d) p.i.		
171	23.05.2007	-	NT	0	20	40
910	23.05.2007	-	NT	0	20	-
954	23.05.2007	-	NT	0	20	40
003	19.03.2009	23.12.2009	T	0	20	40
083	18.04.2009	-	NT	1	21	-
278	19.03.2009	-	NT	0	20	40
340	18.03.2009	-	NT	1	21	-
411	15.03.2009	-	NT	2	22	-
440	18.03.2009	-	NT	1	21	-
480	18.03.2009	-	NT	1	21	-
533	16.03.2009	21.12.2009	T	3	23	43
536	18.03.2009	29.12.2009	T	1	21	41
559	16.03.2009	26.12.2009	T	3	23	43
609	18.03.2009	-	NT	1	21	41
643	17.03.2009	26.12.2009	T	2	22	42
740	17.03.2009	23.12.2009	T	2	22	42
742	18.03.2009	-	NT	1	21	-
794	16.03.2009	27.12.2009	T	3	23	43
947	19.03.2009	-	NT	0	20	40
987	18.03.2009	-	NT	1	21	-
1140	16.03.2009	16.12.2009	T	3	23	43
1164	18.03.2009	-	NT	1	21	41
1218	19.03.2009	21.12.2009	T	0	20	40
1314	18.03.2009	24.12.2009	T	1	21	41
1336	18.03.2009	29.12.2009	T	1	21	41
1408	19.03.2009	-	NT	0	20	-
1422	19.03.2009	-	NT	0	20	-
1514	18.03.2009	22.12.2009	T	1	21	41

Tabelle 1-Fortsetzung: Analyisierte Proben bei der 454-Sequenzierung, Validierung und SOLiD™-Sequenzierung.

SOLiD™-Sequenzierung methylierter und unmethylierter CNAs (N = 50)						
Tier	Besamung	Abkalbung	Status T/NT	Zeitpunkt (d) p.i.		
003	19.03.2009	23.12.2009	T	0	-	40
034	23.05.2007	24.02.2008	T	0	-	40
039	18.03.2009	28.12.2009	T	1	-	41
171	23.05.2007	-	NT	0	-	40
278	19.03.2009	-	NT	0	-	40
325	23.05.2007	-	NT	0	-	40
402	23.05.2007	-	NT	0	-	40
434	18.03.2009	24.12.2009	T	1	-	41
536	18.03.2009	29.12.2009	T	1	-	41
609	18.03.2009	-	NT	1	-	41
703	23.05.2007	-	NT	0	-	40
947	19.03.2009	-	NT	0	-	40
954	23.05.2007	-	NT	0	-	40
987	18.03.2009	-	NT	1	-	41
1164	18.03.2009	-	NT	1	-	41
1166	23.05.2007	-	NT	0	-	40
1189	23.05.2007	28.02.2008	T	0	-	40
1218	19.03.2009	21.12.2009	T	0	-	40
1314	18.03.2009	24.12.2009	T	1	-	41
1336	18.03.2009	29.12.2009	T	1	-	41
1408	19.03.2009	-	NT	0	-	40
1514	18.03.2009	22.12.2009	T	1	-	41
35904	28.04.2007	27.08.2008	T	0	-	36
35909	25.11.2007	-	NT	3	-	39
64246	28.11.2007	02.09.2008	T	0	-	36

2.3 DNA Extraktion und Whole Genome Amplification

Tiefgefrorene Sera wurden bei 4 °C aufgetaut. Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 4000 x g für 20 min bei 4 °C entfernt.

Für die 454- und SOLiD™-Sequenzierung wurden 200 µl bzw. 1 ml Serum mit dem High Pure Nucleic Acids Extraction Kit (Roche) ohne die Carrier-RNA nach den Herstellerangaben aufbereitet. Die Extraktion der CNA erfolgte gegebenenfalls durch mehrfache Beladung der Säulen.

Mit Hilfe des GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit (WGA4, Sigma-Aldrich) wurden DNA-Bibliotheken aus je 1 µl Extrakt für die 454-Sequenzierung und Validierung nach den Herstellerangaben erzeugt. Diese Reaktionen erfolgten im Doppelansatz und wurden nach der Amplifikation gepoolt, um mögliche Amplifikationsfehler zu vermeiden.

2.4 454-Sequenzierung

2.4.1 DNA-Aufbereitung für 454-Sequenzierung

Die CNA-Amplifikate (siehe Abschnitt 2.3, S. 17) wurden mit einem modifizierten SuperSAGE-Verfahren (Serial Analysis of Gene Expression) aufbereitet (Matsumura *et al.* 2003). Eine Inkubation mit Restriktionsendonukleasen fragmentierte jedes CNA-Amplifikat in kurze Sequenzabschnitte, den sogenannten *Tags*.

Zur Vorbereitung der einzelnen SAGE-*Tags* erfolgte eine Restriktion (1 h bei 37 °C) mit dem Enzym *NlaIII* (NEB) der Biotin-markierten CNA-Amplifikate. Anschließend wurden an jeweils 200 ng Restriktionsprodukt Adapter-A und Adapter-B (Saha *et al.* 2002) ligiert. Die Ligation dieser Adapter erfolgte mit dem Enzym T4 DNA Ligase (2 U, NEB) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Ligation wurde mit Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen) nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

Zur Erzeugung einzelner Adapter-*Tag*-Fragmente wurden 250 ng des Ligationsproduktes mit dem Enzym *EcoP15I* (5 U, NEB) für 1 h bei 37 °C inkubiert, welches 25-27 bp entfernt von seiner Erkennungssequenz schneidet.

Anschließend wurden SAGE-*DiTags* durch Ligation der Adapter-*Tag*-Fragmente erzeugt. Die Ligationsprodukte wurden mit Biotin-markierten Adapter-PrimerA und -PrimerB in einer PCR-Reaktion amplifiziert.

Die Adaptersequenzen der PCR-Produkte wurden durch das Restriktionsenzym *NlaIII* (20 U, NEB), sowie einer kombinierten Aufreinigung mit Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen) und QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), entfernt. Die erhaltenen SAGE-*DiTags* (15 pmol) wurden durch Ligation zu Konkatemeren verknüpft, wobei die Länge der resultierenden Konkatemere über die eingesetzte Menge von Adapter-C (1,5 pmol) reguliert wurde. In Abbildung 5 ist der Ablauf des SAGE-Protokolls grafisch dargestellt.

Konkatemerfragmente zwischen 400 bp und 500 bp wurden mit Roche/454-Sequenzierungs-Adaptoren reamplifiziert. Diese Adapter enthielten probenspezifische MID-Sequenzen (molecular identification tag). Dadurch wurde das Sequenzieren der gesamten bovinen CNAs im selben Sequenzierlauf mit dem Roche/454 GS-FLX Titanium ermöglicht und jede Sequenz konnte der entsprechenden Probe zugeordnet werden. Die 454-Sequenzierung und die anschließende *in silico* Analyse wurden in Kooperation mit Chronix Biomedical GmbH und der Abteilung Virologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

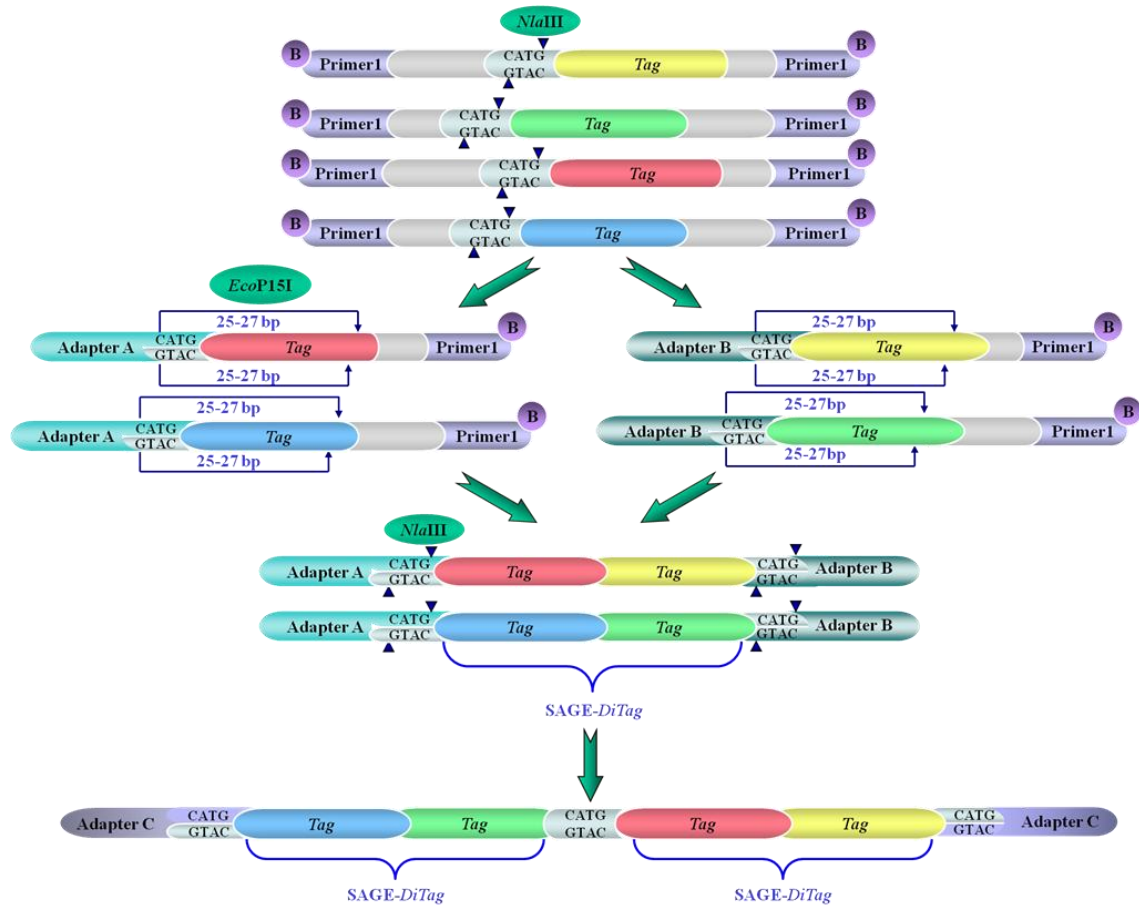


Abbildung 5: Grafische Darstellung des SAGE-Verfahrens. Mit den Restriktionsenzymen *NlaIII* und *EcoP15I* (NEB) wurde aus jedem Biotin-markierten CNA-Fragment ein kurzer ca. 25 bp langer Sequenzabschnitt (*Tag*) herausgeschnitten. Durch Ligation wurden *DiTags* zu ungefähr 400 bp langen Konkatemeren verknüpft. B = Biotin-Markierung; „CATG“ = Erkennungssequenz von *NlaIII*; bp = Basenpaar.

2.4.2 *In silico*-Analyse der 454-Sequenzierungsdaten

Nach der Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Proben wurden die Adapter- und MID-Sequenzen entfernt. *DiTag*-Sequenzen wurden an jedem „CATG“ Motiv (*NlaIII* Erkennungssequenz) zu *Tag*-Sequenzen aufgeteilt.

Die generierten *Tag*-Sequenzen wurden *in silico* mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) mit dem bovinen Genom (NCBI Btau_4.0) und der Datenbank für repetitive Elemente (Repbase ver.12.09) verglichen. Dabei wurden hoch stringente Parameter (> 96 % Sequenzidentität) verwendet. Im Detail wurde der Ablauf der *in silico* Sequenzanalyse von Beck *et al.* (2009) beschrieben.

Alle Sequenzen wurden nach ihrer Position auf den Referenzsequenzen geordnet und die Treffer gezählt, die in der BLAST Analyse signifikante Treffer erzeugten. Die erhaltenen Sequenzzahlen wurden über die Gesamtanzahl der Sequenz-Treffer normalisiert.

Die *Tag*-Sequenzen wurden mit NCBI annotierten funktionellen Regionen des bovinen Genoms (Tabelle 2) und deren Verteilung aufgezeichnet. Die *Tag*-Treffer wurden analysiert und jedem einzelnen Chromosom zugeordnet. Des Weiteren wurden die Chromosomen in 500.000 bp Fenster aufgeteilt und die Anzahlen der *Tag*-Treffer zu den Trächtigkeitstagen untersucht.

Tabelle 2: Beschreibung der analysierten genomischen Regionen (modifiziert nach Beck *et al.* 2009). RNA = Ribonukleinsäure, CDS = proteinkodierende Sequenz, UTR = nicht-translatierte Region, mRNA = messenger RNA.

Funktionelle genomische Region	Beschreibung
Gen	Sequenz wurde bei NCBI als Gen annotiert
Pseudogen	Sequenz wurde bei NCBI als Pseudogen annotiert
RNA	Genregion, die in RNA transkribiert werden
CDS	Gen- und RNA-Regionen, die in Proteine translatiert werden
UTR	Genregionen, die transkribiert werden; keine Translation von mRNA in Protein
Intergenische Sequenz	Sequenz wurde bei NCBI nicht als Gen oder Pseudogen annotiert

Zusätzlich wurden die Verteilungen der *Tag*-Sequenzen auf allen repetitiven Elementen bestimmt. Für das bovine Genom wurden dazu alle *Nla*III-Schnittstellen („CATG“) gezählt ($1,25 \times 10^7$ im gesamten Genom, davon $6,99 \times 10^6$ in repetitiven Regionen), wobei die Anzahlen der *Nla*III-Schnittstellen in den repetitiven Elementen als Erwartungswerte verwendet wurden. Damit wurde das Verhältnis zwischen beobachteten und erwarteten Anzahlen der *Tag*-Treffer (B/E-Verhältnis) für die Repeat-Klassen gebildet.

Im weiteren Verlauf wurden alle erhaltenen *Tag*-Sequenzen in eine Datenbank für „trächtige“ und „nicht-trächtige“ Tiere sortiert. Die generierten *Tag*-Sequenzen aus beiden Datenbanken wurden gegenseitig im BLAST mit geringer Stringenz (> 90 % Sequenzidentität) verglichen. Alle Sequenzen aus der Datenbank „trächtig“, die mit den Sequenzen aus der Datenbank „nicht-trächtig“ > 90 % Sequenzidentität aufwiesen, wurden herausgefiltert und entfernt. Alle übriggebliebenen *Tag*-Sequenzen wurden in einer zweiten BLAST Analyse mit hoher Stringenz (100 % Sequenzidentität) gegen die Datenbank „trächtig“ verglichen. Es wurden alle *Tags* und ihre Häufigkeit ausgegeben, die „trächtige“ Tiere gemeinsam haben und die in „nicht-trächtigen“ nicht vorkommen. Es wurden die Sequenzen ausgewählt, die ein erhöhtes Vorkommen in trächtigen Tieren am Tag 20 gegenüber Tag 0 und 40, sowie eine hohe Trefferzahl pro

Tier aufwiesen. Der Ablauf dieser Datenanalyse wird in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

Ausgewählte CNA-*Tags* wurden mit dem bovinen Genom und der Datenbank für repetitive Elemente verglichen. Die repetitiven und Einzelkopie-CNAs, die im BLAST signifikante Treffer (> 95 % Sequenzidentität) aufwiesen, wurden zur Validierung mit Hilfe von quantitativen Real-Time PCR Reaktionen (qPCR) überprüft.

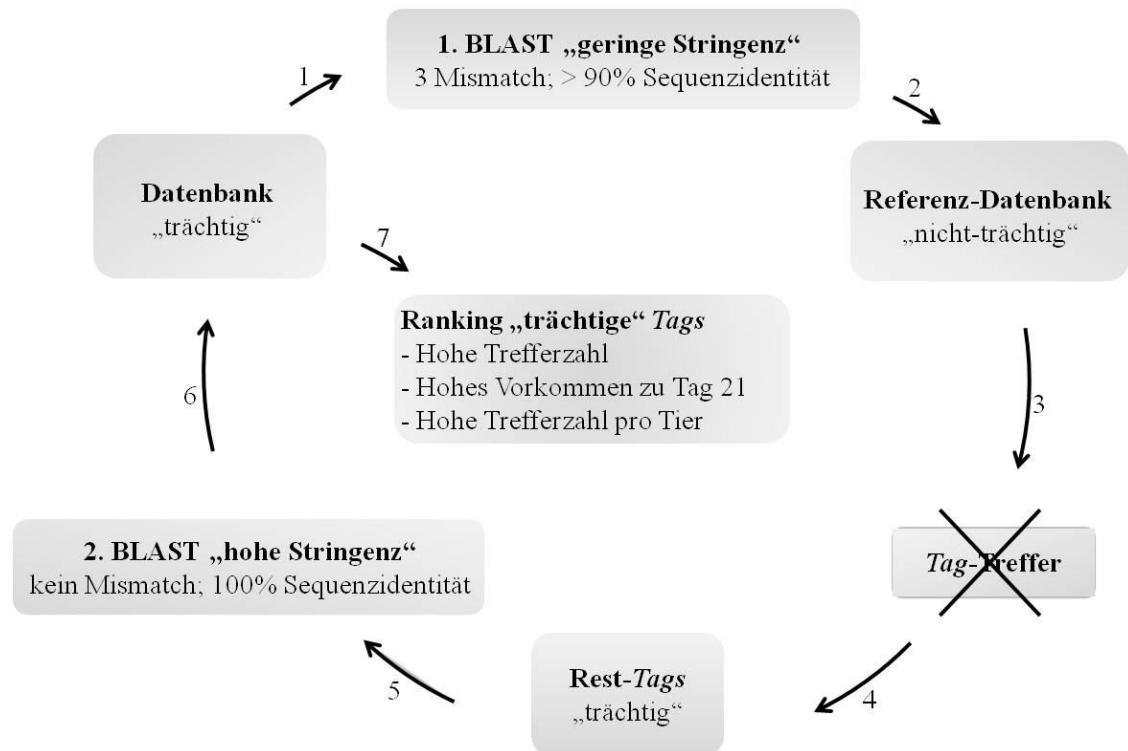


Abbildung 6: Grafische Darstellung der *in silico* Auswertung. Die generierten *Tag*-Sequenzen der trächtigen Tiere wurden mit den Sequenzen der nicht-trächtigen Tiere mittels BLAST verglichen (1, 2). Es wurden die Sequenzen herausgefiltert, die ausschließlich in trächtigen Tieren detektiert wurden (3, 4). Ein zweiter BLAST gegen die Datenbank „trächtig“ generierte alle *Tags* und ihre Häufigkeit des Vorkommens (5, 6). *Tag*-Sequenzen wurden nach einem Ranking ausgewählt (7).

2.4.3 Statistische Auswertung

Normalisierte *Tag*-Treffer-Anzahlen wurden gruppiert (T am d 0, d 20, d 40 und NT) und auf Abweichungen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe untersucht. Gruppenunterschiede wurden mit einem Student's t-Test (zweiseitig, gepaart bzw. ungepaart mit ungleichen Varianzen) bestimmt. Die ermittelten p-Werte wurden für multiples Testen nach Bonferroni korrigiert. Zur Ermittlung von Gruppenunterschieden in der Verteilung von *Tags* innerhalb einzelner Gene wurde ein Median-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

2.5 Validierung

2.5.1 CNA-Aufbereitung für PCR-Reaktionen

Für die Analyse mit Hilfe von qPCR-Reaktionen wurden Sera von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen untersucht, die zuvor nicht sequenziert wurden.

Die qPCR-Reaktionen wurden sowohl mit nativen CNAs (1 pg/μl), als auch mit WGA-Amplifikaten (1 ng/μl) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3, S. 17).

Die CNA-Konzentrationen wurden durch anschließende Messung im Mikroplattenleser GENios Pro (Tecan) mit Hilfe des Kits Quant-iT™ dsDNA assay (Invitrogen) nach der Verdünnung verifiziert.

2.5.2 Primerkonstruktion

Für die repetitiven und Einzelkopie-CNAs, die bei der Auswertung der 454-Sequenzierung die besten Ergebnisse aufwiesen, wurden Primer für die qPCR-Experimente konstruiert. Primer wurden mit Hilfe von Lasergene 7 Software (DNASar) und NCBI Primer-BLAST so konstruiert, dass möglichst viele *Tags* in einem PCR-Produkt amplifiziert werden konnten (Tabelle 3). Dazu wurden Sequenz-Alignments der CNA-*Tags* der repetitiven Elemente und ihren entsprechenden Referenzsequenzen (Repbase ver.12.09) erstellt, um mögliche *Tag*-Cluster zu identifizieren (Abbildung 7). Bei diesen Clustern handelte es sich um Bereiche des BovB, das zur Familie der LINE (long interspersed nuclear elements), sowie um die Bereiche Art2A und BovA2, die der SINE-Familie (short interspersed nuclear elements) zu zuordnen sind.

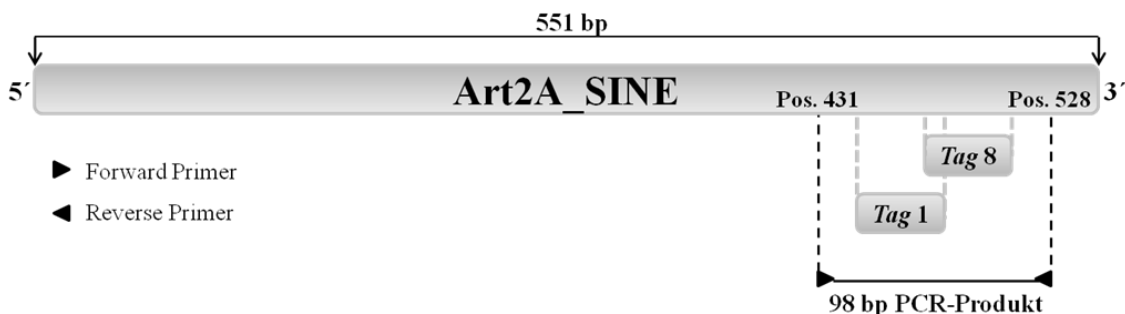


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Alignments der erhaltenen repetitiven *Tag*-Sequenzen und den konstruierten Primern am Beispiel des repetitiven Elements Art2A. Die Sequenzen der *Tags* 1 und 8 werden in einer qPCR-Reaktion amplifiziert. Pos. = Position, bp = Basenpaar, SINE = short interspersed nuclear element.

Tabelle 3: Konstruierte Primer zur Amplifikation von repetitiven und Einzelkopie-Sequenzen in qPCR-Experimenten. F = Forward-Primer, R = Reverse-Primer.

repetitive Elemente	F/R	Primer 5' → 3'
Tag 1_8_Art2A	F	GGGTAAACTCTGGGAGTCGGTGATG
	R	AGTCAGTTCAGTCGCTCAGTCGTG
Tag 6_10_11_BovA	F	AAATCCCATGGACGGAGGAGCCTGGTAG
	R	GAACACTGGAGTGGGTTGCCATTTCCCTT
Tag 2_3_BovB	F	TAGAGGAAAACAACAGAATGGGAAAGAC
	R	CTTCTGCTTCTGTTAGGTCCATACCATT
Tag 5_BovB	F	TGGCCTTGGGAATACGGAATGAAGCA
	R	AGGGTGTGTTGCTATGACCAGTGCA
Tag 9_FordPrefect	F	TGGGTAAATGGGGGCTGTTGCC
	R	GCCCCTGCCAGATCCGTCT
Einzelkopie-Sequenzen	F/R	Primer 5' → 3'
Tag 18	F	AAACCATCAGTTATAGAGC
	R	TATGATATGCACAAGTTCC
Tag 28	F	TGGAAGCCTCCATGGCTTGTGAC
	R	GCTCAGACAAGGCTGCAGTTGGG
Tag 41-2	F	GGACGAGCACCTTTTAACATCTACA
	R	AGGTGTGGAGTTAGCAAAGTCAATG
Tag 41-3	F	GCCTATGGAAGCCCTGATGGAT
	R	AATGCCCGGACAGGTGTGAAAC
Tag 62	F	GACGAGCATGTTAGGGCTTAGGA
	R	AATCCCCTGGCAATTGCTTGGTAAT
Tag 65	F	AGAGTCCTGGTAATTCTGG
	R	GTTTCATAGGGCGTGTATC

2.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Die qPCR-Amplifikationen und Analysen wurden im LightCycler® 480 II (Roche) durchgeführt. Der „Cycle of threshold“ (C_T) wurde mit der „Second Derivate Maximum Methode“ bestimmt.

Folgende Konditionen wurden für jede Amplifikation verwendet (20 µl Reaktionsvolumen): 1x FastStart Reaction Buffer ohne MgCl₂, 3,5 mM MgCl₂, 250 µM je dNTP, 1,2 U FastStart Taq Polymerase (Roche) und 0.5x EvaGreen® Fluorescent DNA Stain (Jena Bioscience). Das Standard-PCR-Protokoll erfolgte mit der initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 35-40 Zyklen bei 95 °C für 30 sek, spezifische Annealingtemperatur (T_{ANN}) für 30 sek und 72 °C für 30 sek. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Ende eines jeden Zyklus. Spezifische PCR-Parameter für jede Amplifikation sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Es wurden drei biologische CNA-Replikate in qPCR-Doppelansätzen analysiert. Die Spezifität der Reaktion wurde durch die Ermittlung der Schmelztemperatur (T_{MC}) der

Amplikons überprüft. Diese wurde mit einer Schmelzkurve von 61 °C bis 95 °C in 0,1 °C/sek-Schritten ermittelt. Die Validierung der Amplikons erfolgte anschließend durch eine Sanger-Sequenzierung.

Tabelle 4: Darstellung der individuellen PCR-Parameter der durchgeführten Amplifikationen. Bp = Basenpaar, sek = Sekunden, °C = Grad Celsius, pmol = Pikomol, T_{ANN} = Annealingtemperatur, T_{MC} = Schmelztemperatur.

Name	Produkt (bp)	T _{ANN} (°C)	T _{MC} (°C)	Einsatz je Primer (pmol)	Probe	Einsatz DNA
Tag 1_8_Art2A	98	61 (15sek)	~82	0,125	Extrakt	5 pg
Tag 6_10_11_BovA	134	63	~82	0,25	Extrakt	5 pg
Tag 2_3_BovB	130	61	~77	0,25	Extrakt	5 pg
Tag 5_BovB	81	61	~79	0,25	Extrakt	5 pg
Tag 9_FordPrefect	89	63	~86	0,25	WGA	5 ng
Tag 18	104	61	~76	0,25	WGA	5 ng
Tag 28	122	61	~82	0,25	WGA	5 ng
Tag 41-2	123	61	~83	0,25	WGA	5 ng
Tag 41-3	57	65	~79	0,25	WGA	5 ng
Tag 62	104	65	~78/82	0,125	Extrakt	5 pg
Tag 65	165	61	~86	0,25	WGA	5 ng

2.5.4 Präparation der Standardkurven zur Bestimmung der Kopienzahl

Es wurden sequenzspezifische Amplikon-Standards für die Verwendung in qPCR-Experimenten hergestellt. Die Amplifikation der Standards (10¹ bis 10⁷ Kopien in 5 µl) erfolgte mit jeder PCR-Reaktion im Doppelansatz. Standardkurven wurden durch log/lineare Regression der Kopienzahl und des C_T-Wertes generiert.

2.5.5 Statistische Auswertung

Die Konzentrationsunterschiede der CNA-Tags wurden nach den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Besamung gruppiert und ausgewertet.

Gruppen-Mittelwerte der Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe wurden untereinander durch Anwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und des Tukey-Kramer Multiple Comparison Tests mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) miteinander verglichen. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig, gepaart bzw. ungepaart mit ungleichen Varianzen) bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf p < 0,05 festgelegt.

Die ermittelten Kopienzahlen wurden zur grafischen Darstellung mit Hilfe der z-Transformation auf eine einheitliche Skala standardisiert. Die Standardisierung der Kopienzahlen erfolgte nach folgender Formel:

$$z_T = \frac{x_T - \bar{x}_{NT}}{s_{NT}}$$

Die Gruppe NT wurde als Kontrollgruppe gewählt. Dazu wurden die Mittelwerte (\bar{x}) und die Standardabweichungen (s) der Kontrollgruppe zur Berechnung der z-Werte der trächtigen Gruppen herangezogen. Dabei wird der Unterschied zwischen den Kopienzahlen einer trächtigen Gruppe zu der Kontrollgruppe durch den z-Wert in Standardabweichungen ausgedrückt.

Zusätzlich wurde die ROC-Statistik (Reciever Operating Characteristic) zur Bewertung von Gruppenunterschieden angewandt. Die ROC-Statistik beschreibt die Richtig-Positiv-Rate (= Sensitivität) und die Falsch-Positiv-Rate (= 1 – Spezifität) im Zusammenhang mit einem steigenden Cut-off-Wert (= Schwellenwert). Die Genauigkeit der Gruppenunterschiede wird durch die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC = Area under the ROC-curve) dargestellt. Eine Fläche von 1,0 bedeutet die höchste Genauigkeit des Tests. Im Gegensatz dazu beschreibt eine Fläche von 0,5 ein zufälliges Ereignis (Bewick *et al.* 2004). Die ROC-Statistik wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) berechnet.

Der Youden-Index (J) wurde zur Auswahl eines geeigneten Cut-off-Wertes herangezogen und nach folgender Formel berechnet:

$$J = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$$

Der höchste Index-Wert wurde für den entsprechenden Cut-off-Wert ausgewählt. Dabei beschreibt ein $J = 1,0$ den perfekten Cut-off-Wert, wo hingegen ein $J = 0$ für einen ungeeigneten Test steht (Bewick *et al.* 2004).

2.6 SOLiDTM-Sequenzierung methylierter und unmethylierter CNAs

2.6.1 CNA-Aufbereitung für die SOLiDTM-Sequenzierung

Für die SOLiDTM-Sequenzierung wurde ein Protokoll entwickelt, um methylierte und unmethylierte CNAs einer Probe gemeinsam in einem Sequenzierungslauf untersuchen zu können. Diese Methode macht sich zunutze, dass die Restriktionsendonukleasen *SmaI* und *XmaI* als Isoschizomere die gleiche Erkennungssequenz „CCCGGG“ spalten. Dabei werden von *SmaI* methylierte Erkennungssequenzen nicht hydrolisiert und glatte Enden (blunt ends) zwischen dem C und G bei unmethylierten Erkennungssequenzen erzeugt. Im Gegensatz dazu werden methylierte Erkennungssequenzen von *XmaI* zu klebrigen Enden (sticky ends) mit einem 5'-Überhang von vier Basen hydrolisiert (Roberts *et al.* 2010). Somit erlauben diese unterschiedlichen enzymatischen

Restriktionen einer gemeinsamen Erkennungssequenz eine konsekutive Restriktion. Zusätzlich wurden für diese Restriktionen individuelle Adapter verwendet, die den jeweiligen Enzymcode integriert hatten. In Abbildung 8 ist der Ablauf des Protokolls schematisch dargestellt.

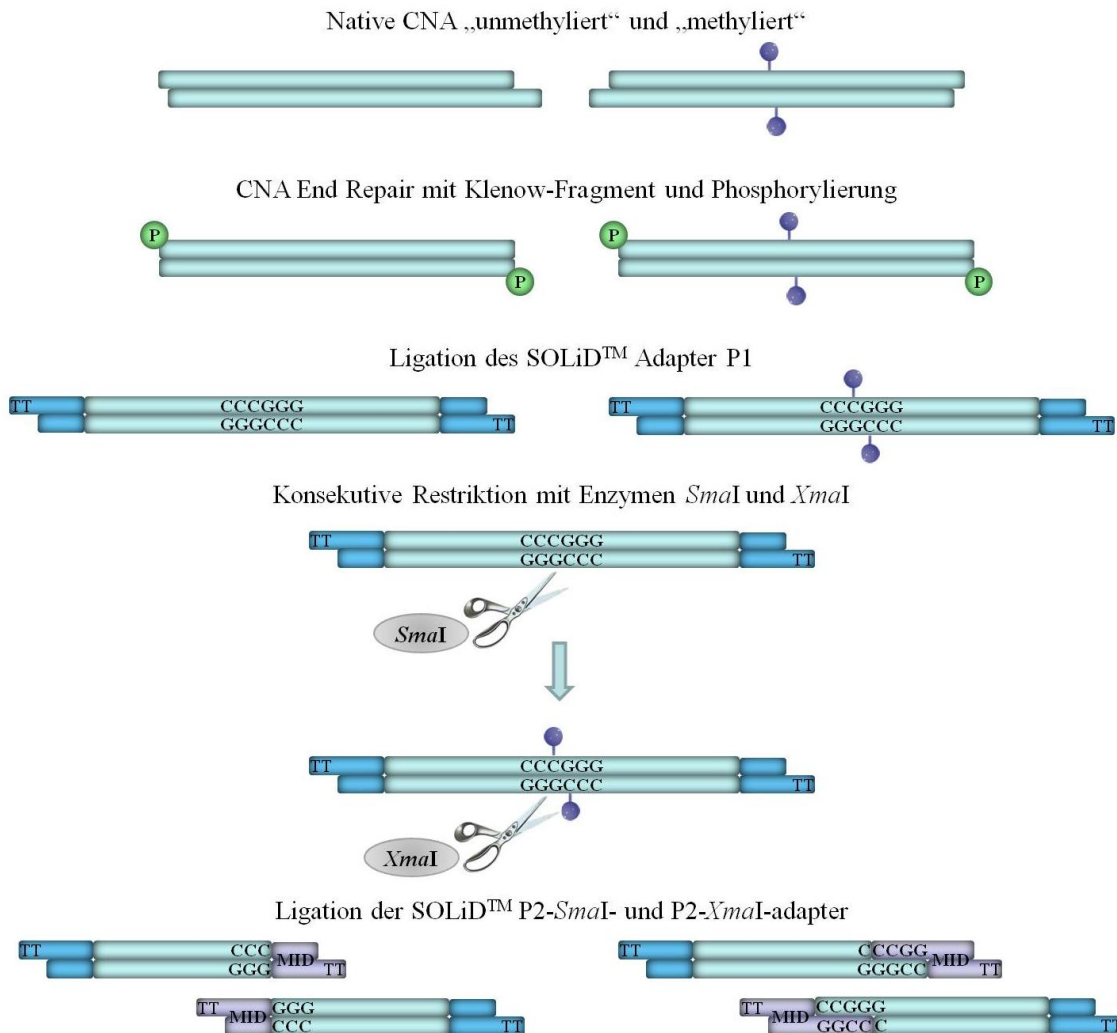


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung zur Untersuchung von methylierten und unmethylierten CNA-Sequenzen mit Hilfe der SOLiD™-Sequenzierung. Nach der CNA End Repair mit Phosphorylierung (grüner Kreis mit „P“) wurde der SOLiD™ P1-Adapter endständig ligiert. Mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Xma*I (NEB) wurde jedes CNA-Fragment mit einer Erkennungssequenz geschnitten. Durch Ligation der jeweiligen SOLiD™ P2-Adapter wurden die Proben mit einer individuellen MID-Sequenz versehen. P = Phosphorylierung; „CCCGGG“ = Erkennungssequenz von *Sma*I und *Xma*I; MID = MID-Sequenz/molecular identifier.

Unter den folgenden Konditionen wurden an nativen CNAs Blunt Ends mit Hilfe einer 3'-End Repair Reaktion generiert und diese am 5'-Ende phosphoryliert (100 µl Reaktionsvolumen): 1x Klenow Reaction Buffer, 20 U Klenow DNA Polymerase (USB, Affymetrix), 10 U T4 Polynukleotid Kinase (USB, Affymetrix), 400 µM je dNTP (Roche) und 50 ng DNA. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei

Raumtemperatur (RT) und eine anschließende Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75 °C. Die Aufreinigung der CNA-Proben erfolgte immer mit Hilfe von Agencourt® AMPure® XP Beads (Beckman Coulter) nach den Herstellerangaben.

Die anschließende Ligation des SOLiD™ Adapters-P1 erfolgte unter den folgenden Konditionen (50 µl Reaktionsvolumen): 1x T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 12,5 U T4 DNA Ligase (USB, Affymetrix), 2,5 pmol Adapter-P1 und 18 µl CNA-Eluat. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

Die konsekutive Restriktion der aufgereinigten CNAs erfolgte unter den folgenden Bedingungen (25 µl Reaktionsvolumen): 1x NEBuffer 4, 1x BSA, 5 U *SmaI* (NEB) und 20 µl CNA-Eluat. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 25 °C. Anschließend wurde zu jeder Probe 5 U *XmaI* (NEB) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C.

An jede CNA wurden die SOLiD™ Adapter-P2 ligiert, welche spezifisch an den *SmaI*- und *XmaI*-Schnittstellen binden. Zudem beinhaltete jeder Adapter-P2 eine für jede Probe spezifische MID-Sequenz. Die Ligation erfolgte unter den folgenden Konditionen (50 µl Reaktionsvolumen): 1x T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 12,5 U T4 DNA Ligase (USB, Affymetrix), 0,025 pmol P2-*SmaI*-Adapter, 0,025 pmol P2-*XmaI*-Adapter und 25 µl CNA-Lösung. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

Anschließend wurde mit den aufgereinigten CNAs im Doppelansatz eine Nick Translation durchgeführt. Folgendes Amplifikationsschema wurde verwendet (25 µl Reaktionsvolumen): 1x FastStart High Fidelity Reaction Buffer mit MgCl₂, 200 µM je dNTP, 1,25 U FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche), 0,5x EvaGreen® Fluorescent DNA Stain (Jena Bioscience), 1 pmol SOLiD™ Library PCR Primer 1 und 1 pmol SOLiD™ Library PCR Primer 2. Das PCR-Protokoll war: initiale 72 °C für 20 min, initiale 95 °C für 5 min, gefolgt von 25-30 Zyklen bei 95 °C für 15 sek, 62 °C für 15 sek, 70 °C für 1 min, sowie abschließender Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 5 min. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Ende eines jeden Zyklus. Die Amplifikation wurde beim Erreichen des Plateaus beendet. Die PCR-Produkte einer Probe (2x 25 µl) wurden mit Hilfe des innuPREP PCRpure Kits (Jena Analytik) nach den Herstellerangaben über eine Säule aufgereinigt und anschließend mit einem NanoDrop® Spektrophometer (ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH) quantifiziert. Von jeder Probe wurden 100 ng in einem Proben-Pool zugefügt. Dieser Pool wurde anschließend mit Hilfe eines E-Gel® SizeSelect™ Gels (Invitrogen) und dem E-Gel® iBase™ system inklusive des E-Gel® Safe Imager™ Real-time Transilluminators (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden CNA-Fragmente zwischen

200 und 300 bp separiert und anschließend mit dem SOLiD™ 4 System (Applied Biosystems) nach den Herstellerangaben durch die Firma Chronix Biomedical GmbH sequenziert und anschließend *in silico* analysiert.

2.6.2 *In silico*-Analyse der SOLiD™-Sequenzierungsdaten

Die SOLiD™ 4 (Applied Biosystems) CNA-Sequenzierung generierte Sequenzen in der Länge von 50 bp in 3'-Orientierung (F3-Sequenzen) und von 35 bp in 5'-Orientierung (F5-Sequenzen; Abbildung 9). Die F5-Sequenzen hatten für jede Probe eine individuelle Adapter-P2-MID-Sequenz. Zusätzlich war der jeweilige Enzymkode „GGG“ für die Restriktion mit *SmaI* (unmethyliert) oder „CCGGG“ für die Restriktion mit *XmaI* (methyliert) integriert. Nach der Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Proben wurden die Adapter- und MID-Sequenzen entfernt. Der Enzymkode wurde ausgelesen und die Sequenzen wurden in die entsprechenden Datenbanken „methyliert“ und „unmethyliert“ sortiert. Anschließend wurde mit den erhaltenen Sequenzen ein Mapping und Pairing mit Hilfe der BioScope™ Software (Applied Biosystems) auf dem bovinen Referenzgenom (NCBI Btau_4.0) durchgeführt. Dabei wurden nur F3-F5-Sequenzpaare herausgefiltert, die eine Gesamtlänge von maximal 500 bp nicht überschritten.

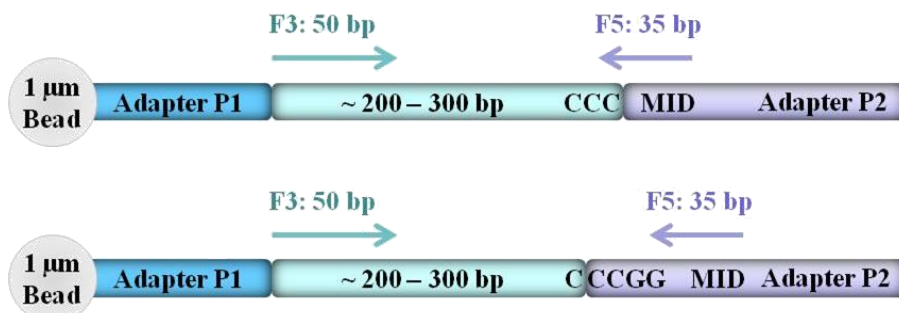


Abbildung 9: Schematische Darstellung der erhaltenen Sequenzen aus der SOLiD™-Sequenzierung. Von dem Adapter P1 aus wurden 50 bp lange F3-Sequenzen generiert. Von dem Adapter P2 aus wurden 35 bp lange F5-Sequenzen erhalten, die die 10 bp MID-Sequenz und den jeweiligen Enzymkode integriert hatten. µm = Mikrometer, bp = Basenpaar, F3 = 3'-Leserichtung, F5 = 5'-Leserichtung, MID = MID-Sequenz/molecular identifier.

Alle somit erhaltenen Sequenzen wurden nach ihrer Position auf den Referenzsequenzen geordnet und die Anzahl der Treffer gezählt. Es wurden sowohl Chromosomen-Treffer in 100.000 bp-Fenstern als auch Gen-Treffer ausgegeben. Die erhaltenen Sequenzzahlen wurden über die Gesamtanzahl der Sequenz-Treffer normalisiert.

2.6.3 Statistische Auswertung

Normalisierte Sequenz-Treffer wurden gruppiert (T am d 0-3, d 36-41; NT). Anschließend wurde zur Bestimmung des Methylierungsgrades zwischen den generierten methylierten und unmethylierten Sequenzen folgendes Verhältnis gebildet:

$$\text{Verhältnis} = \frac{\text{methyliert}}{(\text{methyliert} + \text{unmethyliert})}$$

Dabei ergaben ausschließlich methylierte Sequenz-Treffer ein Verhältnis von 1. Ein Verhältnis von 0 besagt, dass ausschließlich unmethylierte Sequenz-Treffer detektiert wurden.

Gruppenunterschiede wurden mit einem Student's t-Test (zweiseitig, gepaart bzw. ungepaart mit ungleichen Varianzen) bestimmt. Die ermittelten p-Werte wurden für multiples Testen nach Bonferroni korrigiert. Die Nullhypothese wurde bei $p < 0,05$ abgelehnt. Wurden nach der Bonferroni-Korrektur die Alternativhypothesen verworfen, dann wurden in dieser Analyse die Ergebnisse zugunsten des Fehlers zweiter Art (falsch negativ) explorativ beschrieben ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$, nach t-Test; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$, nach Bonferroni-Korrektur).

Bei der Auswertung wurden folgende drei Kriterien berücksichtigt:

1. Alle Proben getesteter trächtiger Tiere müssen Sequenz-Treffer aufweisen.
2. Zwischen Sequenz-Treffern von Proben der trächtigen Tiere zu d 0-3 und d 36-41 muss ein Unterschied vorliegen.
3. Sequenz-Treffer aus Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 und nicht-trächtiger Tiere (mind. 90 %) müssen unterschiedlich sein.

3 Ergebnisse

3.1 454-Sequenzierungsergebnisse

Zur Identifizierung von Unterschieden in der Verteilung der *Tag*-Sequenzen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe wurde eine SAGE-Bibliothek im Roche/454 GS-FLX Titanium sequenziert. Dazu wurden Serumproben von acht trächtigen und neun nicht-trächtigen Kühen herangezogen. Die insgesamt 40 Serumproben umfassen die Zeitpunkte d 0, d 20 und d 40 *p.i.*.

3.1.1 Erhaltene Sequenz-Anzahlen

Die absoluten Sequenzanzahlen für insgesamt 40 bovine Serumproben sind in Tabelle 5 dargestellt.

Aus dem gesamten Sequenz-Pool erzeugten $4,0 \times 10^6$ *Tag*-Sequenzen signifikante Treffer auf dem bovinen Genom (NCBI Btau_4.0) und der Datenbank für repetitive Elemente (Rebase ver.12.09). Von diesen Sequenzen waren 63 % ($2,5 \times 10^6$ *Tags*) nicht-repetitiven und 37 % ($1,5 \times 10^6$ *Tags*) repetitiven Ursprungs. Eine mittlere Anzahl von 62.298 ± 9085 CNA-*Tags* in Sera von trächtigen und 64.796 ± 10.454 *Tags* von nicht-trächtigen Kühen war nicht-repetitiven Regionen zu zuordnen. Ein Mittel von 36.936 ± 4464 *Tags* in Proben trächtiger und 38.344 ± 5666 nicht-trächtiger Kühe war repetitiven Ursprungs.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Sequenz-Treffer. T = trächtig, NT = nicht-trächtig.

Anzahl Sequenzen	nicht-repetitiv	repetitiv	Gesamt auf bovinen Genom	Gesamt
T	$1,5 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
NT	$1,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
Gesamt	$2,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$

3.1.2 Verteilung funktioneller genomischer Bereiche

Um Gruppenunterschiede in der Verteilung von *Tags* in funktionellen genomischen Bereichen zu identifizieren, wurden die generierten *Tag*-Sequenzen Genen, transkribierten Sequenzen [RNAs und nicht-translatierte Regionen (UTR)], proteinkodierenden Sequenzen (CDS) und Pseudogenen zugeordnet. Dazu wurden nur *Tags* mit einer Sequenzidentität von > 96 % als Treffer gewertet.

Im Vergleich zu der nicht-trächtigen Kontrollgruppe war die Anzahl der *Tag*-Treffer auf CDS in Proben trächtiger Kühe am d 40 unterrepräsentiert ($p = 0,038$). Die Menge an

Tag-Treffern auf funktionellen genomischen Regionen von Proben trächtiger Kühe zu den Tagen d 0 und d 20 wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf.

3.1.3 Verteilung von *Tag*-Treffern auf Chromosomen

Zur Bestimmung von Gruppenunterschieden in der Verteilung von *Tag*-Sequenzen auf bovinen Chromosomen wurden die *Tag*-Treffer über den gesamten Chromosomen sowie über chromosomale 500.000 bp Sequenz-Abschnitte analysiert.

Für die Verteilung der *Tag*-Treffer über die gesamten bovinen Chromosomen und der mtDNA wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede detektiert (Anhang-Abb. 1, S. 71). Zur detaillierten Erfassung von Unterschieden in der Sequenz-Verteilung wurden im weiteren Verlauf der Analyse die Chromosomen in 500.000 bp Sequenz-Abschnitte aufgeteilt. Dazu wurden die normalisierten *Tag*-Treffer zu den Trächtigkeitstagen auf Gruppenunterschiede überprüft.

Signifikante Unterschiede zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen wurden für 14 chromosomale Regionen detektiert und in Abbildung 10 grafisch dargestellt (Anhang-Tab. 1, S. 68). Dabei wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe in Proben trächtiger Kühe am d 0 für zwei Regionen eine erhöhte Anzahl der *Tag*-Treffer und für zwei Regionen eine verringerte Anzahl der *Tag*-Treffer beobachtet ($p < 0,05$). Verglichen mit der Kontrollgruppe wurden die häufigsten Unterschiede in Proben trächtiger Kühe am d 20 erhalten. Dabei wurden für insgesamt vier chromosomale Regionen eine Erhöhung und für fünf chromosomale Regionen wurde eine Verringerung der *Tag*-Treffer detektiert ($p < 0,05$). Für eine chromosomale Region wurde in Proben trächtiger Kühe am d 40 verglichen mit der Kontrollgruppe eine Verringerung der *Tag*-Treffer beobachtet ($p < 0,05$).

Für die chromosomale Region des BTA 1 von 117,0 Mbp bis 117,5 Mbp wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe zu d 0 ($0,58 \pm 0,25$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,28 \pm 0,43$) ermittelt ($p = 0,021$). Es wurden keine Unterschiede in der Verteilung der *Tag*-Treffer in Proben trächtiger Kühe zu d 20 ($0,92 \pm 0,31$) und d 40 ($1,04 \pm 0,37$) im Vergleich zu d 0 und der Kontrollgruppe beobachtet.

Zwischen Proben trächtiger Kühe zu d 20 ($2,81 \pm 0,42$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,85 \pm 0,45$) wurde für die chromosomale Region des BTA 4 von 4,5 Mbp bis 5,0 Mbp ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* ermittelt ($p = 0,028$). Im Vergleich zu d 20 und

der Kontrollgruppe wurden in Proben trächtiger Kühe zu d 0 ($2,44 \pm 0,60$) und d 40 ($1,96 \pm 0,61$) keine Unterschiede in der Verteilung der *Tag*-Treffer beobachtet.

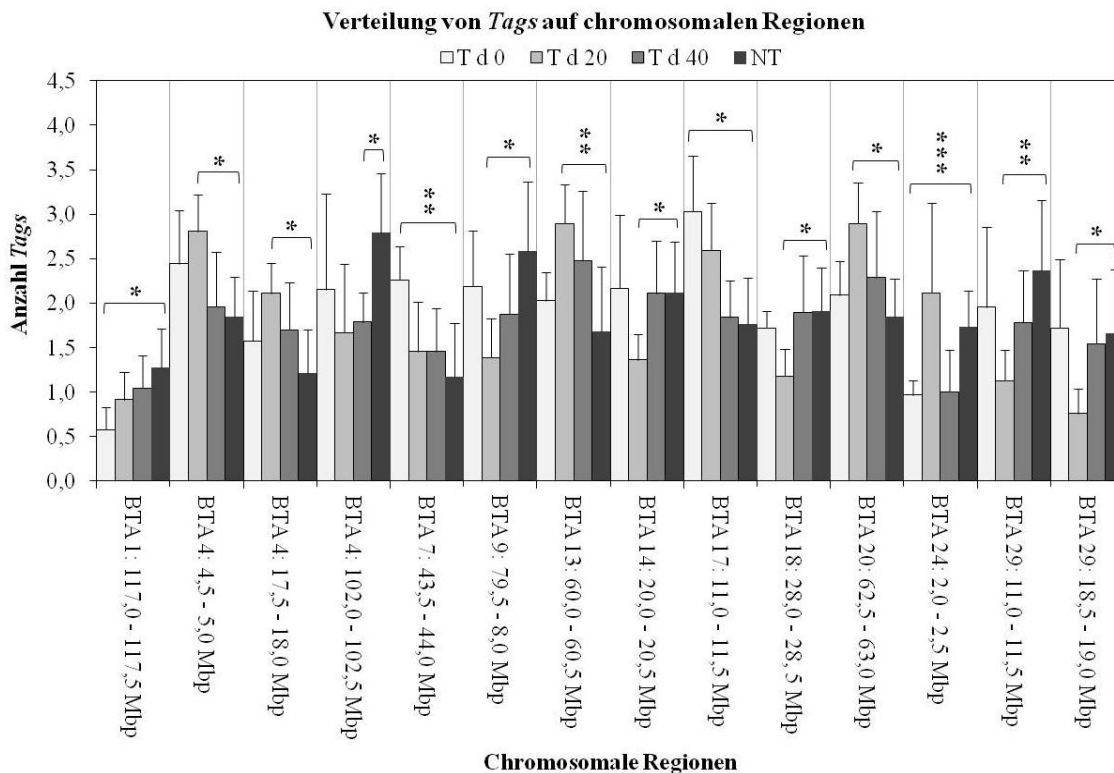


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Verteilung der normalisierten *Tag*-Treffer-Anzahlen auf chromosomalen Regionen von Proben trächtiger Kühe im Vergleich zur NT Kontrollgruppe (Säulen). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. BTA = bovines Chromosom; Mbp = Megabasenpaar; T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; *, $p < 0,05$; **, $p = 0,01$; ***, $p = 0,001$.

Ein Unterschied zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($2,11 \pm 0,35$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,21 \pm 0,49$) in der Anzahl der *Tags* wurde für die chromosomale Region des BTA 4 von 17,5 Mbp bis 18,0 Mbp ermittelt ($p = 0,013$). Verglichen mit d 20 und der Kontrollgruppe wurden keine weiteren Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer zu den Proben trächtiger Kühe am d 0 ($1,58 \pm 0,57$) und d 40 ($1,70 \pm 0,53$) beobachtet.

Für die Region des BTA 4 von 102,0 Mbp bis 102,5 Mbp wiesen die Proben trächtiger Kühe am d 40 ($1,79 \pm 0,33$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($2,80 \pm 0,66$) einen Unterschied in der Anzahl der *Tag*-Treffer auf ($p = 0,014$). Die *Tag*-Anzahlen aus Proben trächtiger Kühe zu d 20 ($1,67 \pm 0,77$) waren leicht verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe am d 0 ($2,15 \pm 1,08$) und der Kontrollgruppe ermittelt.

Es wurden keine Unterschiede in der Verteilung der *Tag*-Treffer innerhalb von Proben trächtiger Kühe während des Trächtigkeitsverlaufs beobachtet.

Ein großer Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger ($2,26 \pm 0,37$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,18 \pm 0,60$) wurde für die chromosomale Region des BTA 7 von 43,5 Mbp bis 44,0 Mbp ermittelt ($p = 0,005$). Die Proben aus den Trächtigkeitstagen d 20 ($1,46 \pm 0,56$) und d 40 ($1,45 \pm 0,48$) wiesen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Während des Verlaufs der Trächtigkeit wurde eine tendenzielle Verringerung in der *Tag*-Anzahl von d 0 zu d 20 und zu d 40 beobachtet.

Für die chromosomale Region des BTA 9 von 79,5 Mbp bis 80,0 Mbp wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($1,39 \pm 0,44$) und nicht-trächtiger Kühe ($2,58 \pm 0,78$) ermittelt ($p = 0,019$). Die Proben aus den Trächtigkeitstagen d 0 ($2,19 \pm 0,63$) und d 40 ($1,88 \pm 0,67$) wiesen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Innerhalb der Proben trächtiger Kühe wurde eine tendenzielle Verringerung der *Tag*-Anzahl von d 0 zu d 20 beobachtet.

Ein großer Unterschied in der *Tag*-Anzahl zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($2,90 \pm 0,44$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,69 \pm 0,73$) wurde für die Region des BTA 13 von 60,0 Mbp bis 60,5 Mbp beobachtet ($p = 0,009$). Die Proben aus den Trächtigkeitstagen d 0 ($2,03 \pm 0,32$) und d 40 ($2,48 \pm 0,79$) wiesen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Während des Verlaufs der Trächtigkeit wurde eine tendenzielle Erhöhung in der *Tag*-Anzahl ausschließlich von d 0 zu d 20 beobachtet.

Zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($1,36 \pm 0,29$) und nicht-trächtiger Kühe ($2,12 \pm 0,56$) wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* für die chromosomale Region des BTA 14 von 20,0 Mbp bis 20,5 Mbp ermittelt ($p = 0,042$). Verglichen mit d 20 und der Kontrollgruppe wurden keine weiteren Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer zu den Proben trächtiger Kühe am d 0 ($2,17 \pm 0,83$) und d 40 ($2,11 \pm 0,59$) beobachtet.

Für die chromosomale Region des BTA 17 von 11,0 Mbp bis 11,5 Mbp wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe zu d 0 ($3,03 \pm 0,62$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,76 \pm 0,53$) ermittelt ($p = 0,050$). Die *Tag*-Anzahlen aus Proben trächtiger Kühe zu d 20 ($2,59 \pm 0,54$) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe am d 40 ($1,84 \pm 0,41$) und der Kontrollgruppe ermittelt. Innerhalb der Proben trächtiger Kühe wurde eine tendenzielle Verringerung der *Tag*-Anzahl von d 0 zu d 40 beobachtet.

Für die chromosomale Region des BTA 18 von 28,0 Mbp bis 28,5 Mbp wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($1,18 \pm 0,31$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,92 \pm 0,48$) ermittelt ($p = 0,025$). Die Proben aus den Trächtigkeitstagen d 0 ($1,72 \pm 0,19$) und d 40 ($1,90 \pm 0,64$) wiesen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Während des Verlaufs der Trächtigkeit wurde eine tendenzielle Erhöhung in der *Tag*-Anzahl ausschließlich von d 0 zu d 20 beobachtet.

Zwischen Proben trächtiger Kühe zu d 20 ($2,90 \pm 0,46$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,85 \pm 0,43$) wurde für die chromosomale Region des BTA 20 von 62,5 Mbp bis 63,0 Mbp ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* ermittelt ($p = 0,016$). Es wurde kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Proben aus den Trächtigkeitstagen d 0 ($2,09 \pm 0,38$) und d 40 ($2,29 \pm 0,75$) ermittelt. Während des Verlaufs der Trächtigkeit wurde eine tendenzielle Erhöhung in der *Tag*-Anzahl ausschließlich von d 0 zu d 20 beobachtet.

Der größte Unterschied in der Anzahl der *Tags* wurde zwischen Proben trächtiger Kühe am d 0 ($0,97 \pm 0,16$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,73 \pm 0,41$) in der Region des BTA 24 von 2,0 Mbp bis 2,5 Mbp ermittelt ($p = 0,0002$). Die *Tag*-Anzahlen aus Proben trächtiger Kühe zu d 40 ($1,01 \pm 0,47$) waren leicht verringert im Vergleich zu den nicht-trächtigen Kühen. Zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($2,12 \pm 1,01$) und der Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer beobachtet. Während des Trächtigkeitsverlaufs wurde eine tendenzielle Erhöhung in der *Tag*-Anzahl von d 0 zu d 20 sowie eine Verringerung von d 20 zu d 40 beobachtet.

Ein großer Unterschied zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($1,13 \pm 0,35$) und nicht-trächtiger Kühe ($2,37 \pm 0,79$) wurde für die Region des BTA 29 von 11,0 Mbp bis 11,5 Mbp ermittelt ($p = 0,002$). Es wurden keine Unterschiede in den *Tag*-Anzahlen zwischen der Kontrollgruppe und den Proben trächtiger Kühe am d 0 ($1,96 \pm 0,90$) und d 40 ($1,79 \pm 0,59$) beobachtet. Während des Verlaufs der Trächtigkeit wurde eine tendenzielle Erhöhung in der *Tag*-Anzahl ausschließlich von d 20 zu d 40 beobachtet.

Zwischen Proben trächtiger Kühe am d 20 ($0,76 \pm 0,28$) und nicht-trächtiger Kühe ($1,66 \pm 0,72$) wurde ein Unterschied in der Anzahl der *Tags* für die chromosomale Region des BTA 29 von 18,5 Mbp bis 19,0 Mbp ermittelt ($p = 0,027$). Verglichen mit d 20 und der Kontrollgruppe wurden keine weiteren Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer zu den Proben trächtiger Kühe am d 0 ($1,72 \pm 0,77$) und d 40 ($1,54 \pm 0,73$) beobachtet.

3.1.4 Verteilung von *Tags* auf einzelnen Genen

Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe in der *Tag*-Verteilung innerhalb von einzelnen Genen wurde ein Median-Test berechnet. Insgesamt wurden acht trächtige Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen d 0, d 20 und d 40 mit der Kontrollgruppe (N = 16) verglichen. Für fünf Gene wurden *Tag*-Treffer ausschließlich in Proben trächtiger Kühe detektiert ($p < 0,01$). Die mittlere Anzahl der beobachteten *Tag*-Treffer in diesen Genen wurde in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

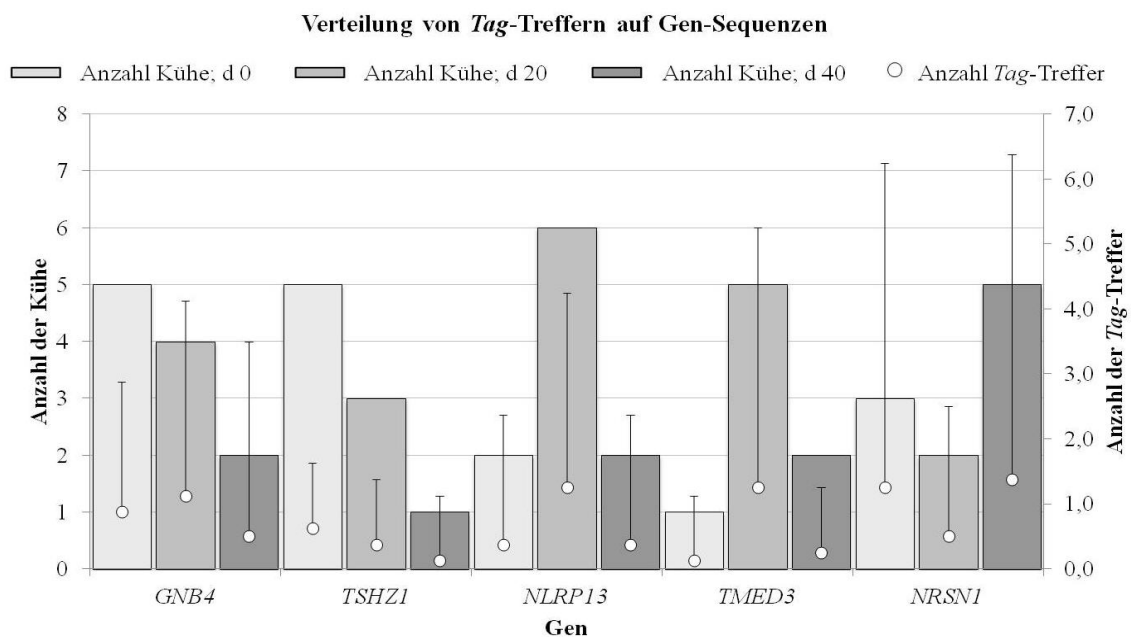


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Verteilung von *Tag*-Sequenzen in Genen in Proben trächtiger Kühe. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar (N = 8), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag.

Ein erhöhtes Vorkommen von *Tag*-Sequenzen auf den Genen *GNB4* [guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4; BTA 1] und *TSHZ1* (teashirt zinc finger homeobox 1; BTA 24) wurde in fünf Proben zu d 0 ermittelt. Im Verlauf der Trächtigkeit nahm die Anzahl der Proben, in denen diese Gene detektiert wurden ab. Die höchste *Tag*-Treffer-Anzahl für den Trächtigkeitstag d 20 wurde in sechs Proben für das Gen *NLRP13* (NLR family, pyrin domain containing 13; BTA 18), sowie in fünf Proben für das Gen *TMED3* (transmembrane emp24 protein transport domain containing 3; BTA 21) detektiert. Für beide Gene wurde eine Verringerung in der Anzahl der *Tags* in Proben zu d 0 und d 40 ermittelt. Fünf Proben zu d 40 zeigten die höchste *Tag*-Treffer-Anzahl für das Gen *NRSN1* (neurensin 1; BTA 23). Die Sequenzen von diesem Gen wurden ebenfalls in drei Proben am d 0 und in zwei Proben am d 20 beobachtet.

3.1.5 Repräsentation von repetitiven Elementen

In dieser Auswertung wurden die *Tag*-Treffer auf Unterschiede in ihrer Verteilung auf repetitiven Elementen geprüft. Dabei wurden von den erhaltenen *Tag*-Sequenzen 37,1 % repetitiven Elementen des bovinen Genoms zugeordnet. Der Anteil der repetitiven Elemente des bovinen Genoms beträgt 46,5 % (Elsik *et al.* 2009; Adelson *et al.* 2009). Somit war der Anteil der erhaltenen repetitiven interspersed CNA-*Tags* im Vergleich zum repetitiven Anteil des bovinen Genoms unterrepräsentiert.

Durch das SAGE-Verfahren wurden nur die Sequenzen generiert, die in ihrer Gesamtlänge eine *Nla*III-Schnittstelle aufwiesen. Insgesamt wurden $6,99 \times 10^6$ *Nla*III-Schnittstellen im bovinen repetitiven Genom gezählt. Aus diesem Grund wurden aus den beobachteten und erwarteten (Anteil *Nla*III-Schnittstellen) Verteilungen der *Tags* B/E-Verhältnisse und z-Werte für die Repeat-Klassen gebildet. Durch den z-Wert wird der Unterschied zwischen den B/E-Verhältnissen und dem Erwartungswert in Standardabweichungen ausgedrückt. Für die ermittelten Häufigkeiten wurde die entsprechende Fläche unter der Standardnormalverteilung errechnet und der p-Wert nach Bonferroni korrigiert. In Tabelle 6 sind die B/E-Verhältnisse der interspersed Repeat-Klassen [long interspersed nuclear elements (LINEs), short interspersed nuclear elements (SINEs), long terminal repeats (LTRs) und DNA-Transposons] innerhalb der untersuchten Gruppen dargestellt.

Zwischen Proben von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen wurden keine Unterschiede in der Verteilung der repetitiven Elemente aufgezeigt. Jedoch waren nach den B/E-Verhältnissen die *Tag*-Treffer in allen untersuchten Gruppen innerhalb der Repeat-Klasse SINE unterrepräsentiert ($p < 0,05$). Die *Tag*-Treffer innerhalb der Repeat-Klassen LINE und DNA-Transposon waren in allen Gruppen im Vergleich zum Erwartungswert leicht unterrepräsentiert. Die *Tags* aus den Proben trächtiger Kühe zu d 40 und nicht-trächtiger Kühe waren innerhalb der Repeat-Klasse LTR überrepräsentiert ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wurde aufgrund der hohen Standardabweichung für die *Tag*-Anzahlen aus Proben trächtiger Kühe zu d 0 und d 20 kein signifikanter Unterschied zu dem Erwartungswert erhalten.

Tabelle 6: Darstellung der beobachteten und erwarteten Häufigkeit (%) von Repeat-Klassen in Proben trächtiger (T) und nicht-trächtiger (NT) Kühe. Aus den ermittelten Häufigkeiten wurden die B/E-Verhältnisse und z-Werte berechnet. Für die ermittelten Häufigkeiten wurde die jeweilige Fläche unter der Standardnormalverteilung errechnet und der p-Wert nach Bonferroni korrigiert. D = Tag; LINE = long interspersed nuclear element; SINE = short interspersed nuclear element; LTR = long terminal repeat; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Mittelwert ± Standardabweichung beobachteter Tags (%)				
Untersuchte Gruppen	LINE	SINE	Transposon	LTR
T d 0	37,4 ± 1,1	42,8 ± 2,8	3,0 ± 0,3	8,1 ± 1,2
T d 20	38,1 ± 1,2	42,5 ± 2,3	3,1 ± 0,4	8,3 ± 1,4
T d 40	37,7 ± 0,9	43,0 ± 0,8	3,2 ± 0,2	8,1 ± 0,4
NT	38,4 ± 1,6	42,0 ± 2,0	3,2 ± 0,3	8,0 ± 0,9
Mögliche Tags	39,1	50,2	3,6	5,8
B/E-Verhältnis				
Untersuchte Gruppen	LINE	SINE	Transposon	LTR
T d 0	0,96	0,85 *	0,83	1,40
T d 20	0,97	0,85 **	0,86	1,43
T d 40	0,96	0,86 ***	0,89	1,40 ***
NT	0,98	0,84 ***	0,90	1,38 *
z-Werte				
Untersuchte Gruppen	LINE	SINE	Transposon	LTR
T d 0	1,55	2,64	2,00	-1,92
T d 20	0,83	3,35	1,25	-1,79
T d 40	1,56	9,00	2,00	-5,75
NT	0,44	4,10	1,33	-2,44

3.1.6 Exklusive Tag-Sequenzen trächtiger Kühe

Um die *Tag*-Sequenzen zu erhalten, die exklusiv aus Proben trächtiger Kühe generiert wurden, wurden alle erhaltenen *Tag*-Sequenzen in Datenbanken für „trächtig“ und „nicht-trächtig“ sortiert und miteinander verglichen. Die *Tag*-Sequenzen, die ausschließlich in Proben trächtiger Kühe vorkamen, wurden mit dem bovinen Genom und allen bekannten repetitiven Elementen verglichen. Die Anzahl der CNA-*Tag*-Treffer wurden für jede Probe gezählt. Es wurden die Sequenzen ausgewählt, die ein erhöhtes Vorkommen in trächtigen Tieren am Tag 20 gegenüber Tag 0 und 40, sowie eine hohe Trefferzahl pro Tier aufwiesen.

Aus den insgesamt 6.1×10^6 *Tag*-Sequenzen wurden ~23 % (1.4×10^6 *Tags*) ausschließlich in Proben trächtiger Kühe gefunden. Davon wurde eine mittlere Anzahl von 59.593 ± 7003 CNA-*Tags* den Proben trächtiger Kühe dem d 0, 58.993 ± 7687 *Tags* dem d 20 und 59.813 ± 8331 *Tags* dem d 40 zugeordnet.

Sieben Einzelkopie-CNA-*Tags* zeigten ein hohes Vorkommen in Proben zu d 20 und wurden mit Hilfe der BLAST-Analyse intergenischen Regionen zugeordnet. In Abbildung 12 ist die Verteilung der *Tag*-Treffer und deren mittlere Anzahl in Proben trächtiger Kühe grafisch dargestellt. Der CNA-*Tag* 18 wurde ausschließlich in vier Proben zu d 20 (N = 8) detektiert und wies die höchste Gesamtanzahl an *Tag*- Treffern

von 532 auf. Die CNA-*Tags* 14, 24, 28 und 65 wurden ausschließlich in Proben von vier bzw. fünf Kühen zu d 20 beobachtet. Die höchste Verteilung mit *Tags* in sechs von acht Proben sowie einer gesamten Treffer-Anzahl von 154 wurde für den CNA-*Tag* 41 beobachtet. Dieser CNA-*Tag* konnte neben den Proben vom d 20 ebenfalls drei Proben am d 40 zugeordnet werden. Der *Tag* 47 wurde in einer Probe zu d 0 und vier Proben zu d 20 ermittelt.

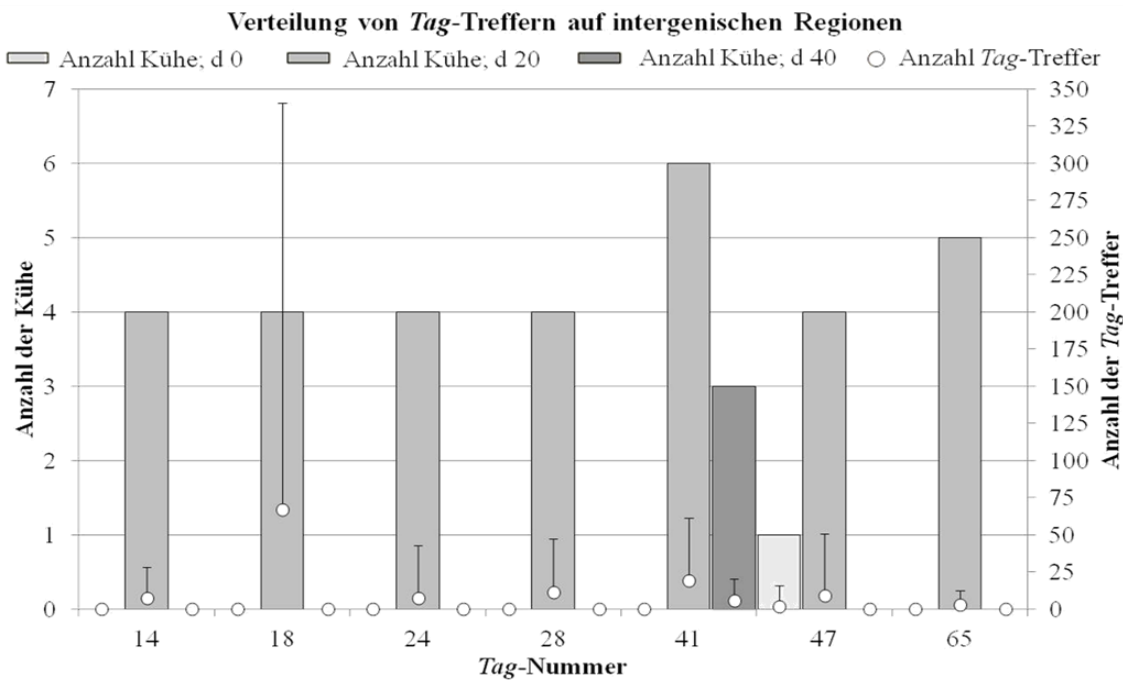


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Verteilung von *Tag*-Treffern auf intergenischen Regionen in Proben trächtiger Kühe. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar (N = 8), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag.

Die intergenischen *Tag*-Sequenzen, sowie deren chromosomalen und genomischen Lokalisationen sind tabellarisch im Anhang-Tab. 2 (S. 69) aufgeführt.

13 *Tag*-Sequenzen waren repetitiven Elementen zuzuordnen und wiesen ein hohes Vorkommen in Proben trächtiger Kühe auf (Anhang-Tab. 3, S. 69). Eine vergleichende BLAST-Analyse dieser CNA-*Tags* gegen das unmaskierte bovine Genom identifizierte ein hohes Vorkommen von LINEs (long interspersed nuclear elements) und SINEs (short interspersed nuclear elements). Bei diesen repetitiven Elementen handelte es sich um Elemente des BovB, das zur Familie der LINEs, sowie um Art2A und BovA2, die der SINE-Familie zu zuordnen sind.

Mit den erhaltenen CNA-*Tags* wurden zusammen mit ihren entsprechenden Referenzsequenzen (Repbse ver.12.09) Alignments erstellt, um definierte *Tag*-Kombinationen in einem begrenzten amplifizierbaren Sequenzbereich zu

identifizieren (siehe Abschnitt 2.5.2, S. 22). Für die erhaltenen *Tag*-Kombinationen wurden die Sequenzverteilungen für die einzelnen Trächtigkeitstage der Kühe bestimmt. In Abbildung 13 sind die mittleren Treffer-Anzahlen der repetitiven CNA-*Tag*-Kombinationen grafisch dargestellt. Für die Kombination der CNA-*Tags* 1 und 8 auf dem Element Art2A (SINE) wurde die höchste Gesamtanzahl an *Tag*- Treffern mit 46 in Proben von sechs Kühen zu d 20 (N = 8) beobachtet. *Tags* aus dieser Kombination waren neben den Proben aus d 20 ebenfalls fünf Proben aus d 40 zu zuordnen. In Proben von sechs Kühen am d 20 wurde mindestens einer der *Tags* 2 und 3 bzw. *Tag* 5 dem repetitiven Element BovB (LINE) beobachtet. Mindestens einer der *Tags* aus dieser Kombination konnte einer Probe zu d 0 sowie in maximal drei Proben zu d 40 beobachtet werden. Die Proben aller acht Kühe zu d 20 wiesen mindestens einen der *Tags* 6, 10 und 11 auf dem repetitiven Element BovA2 (SINE) mit einer gesamten Treffer-Anzahl von 24 auf. Mindestens einer der *Tags* aus dieser Kombination konnte in zwei Proben zu d 0 sowie in fünf Proben zu d 40 beobachtet werden.

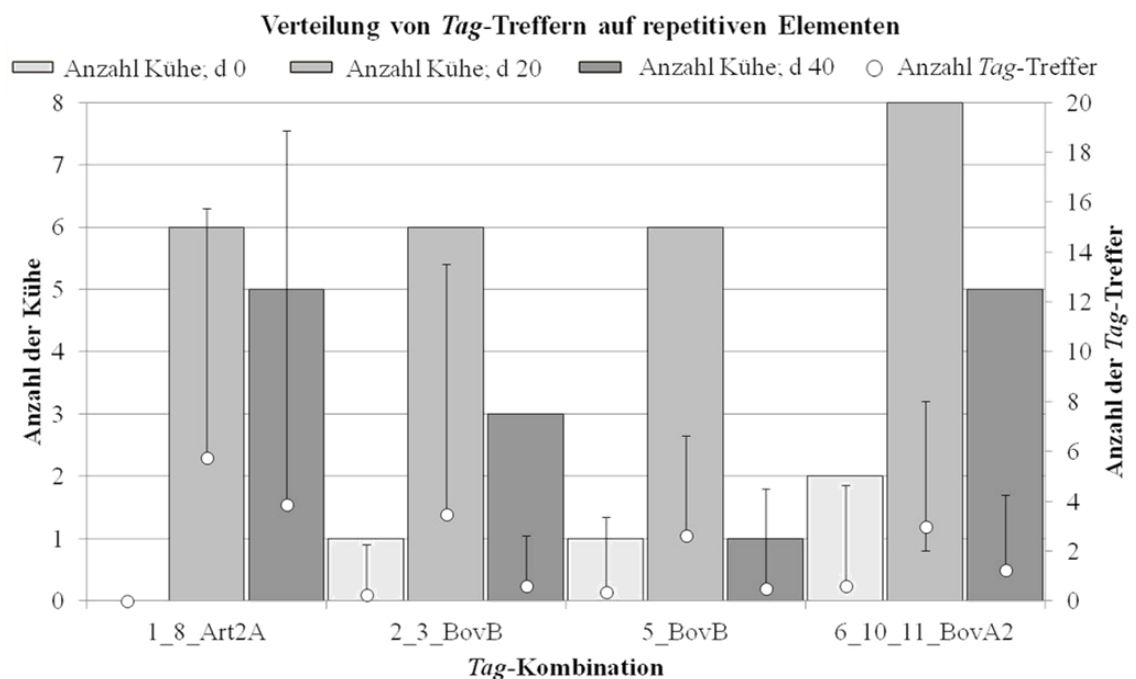


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Treffer-Verteilung innerhalb der *Tag*-Kombinationen. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar (N = 8), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag.

3.2 Validierungsergebnisse

Die repetitiven und Einzelkopie-CNAs, die in der Sequenzierungsauswertung die besten Ergebnisse aufwiesen, wurden in qPCR-Experimenten auf ihre Trächtigkeitsspezifität untersucht. Für die qPCR-Experimente wurden korrespondierende Proben von 12 trächtigen und 16 nicht-trächtigen Kühen herangezogen.

3.2.1 QPCR-Experiment 1

Mit dem ersten qPCR-Experiment wurden ausschließlich Proben trächtiger ($n = 12$) und nicht-trächtiger Kühe ($n = 16$) zu dem Probenentnahmetag d 20-23 auf Unterschiede in der Verteilung der Kopienzahlen untersucht. Dazu wurden für die Analysen mit den repetitiven *Tag*-Kombinationen die nativen CNAs auf $1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ und für die intergenischen *Tags* die WGA-Amplifikate auf $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und gepoolt. Die Daten wurden mit Hilfe eines Sequenz-Standards zur Bestimmung der Kopienzahlen ausgewertet. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden durch die z-Transformation standardisiert und in Abbildung 14 dargestellt.

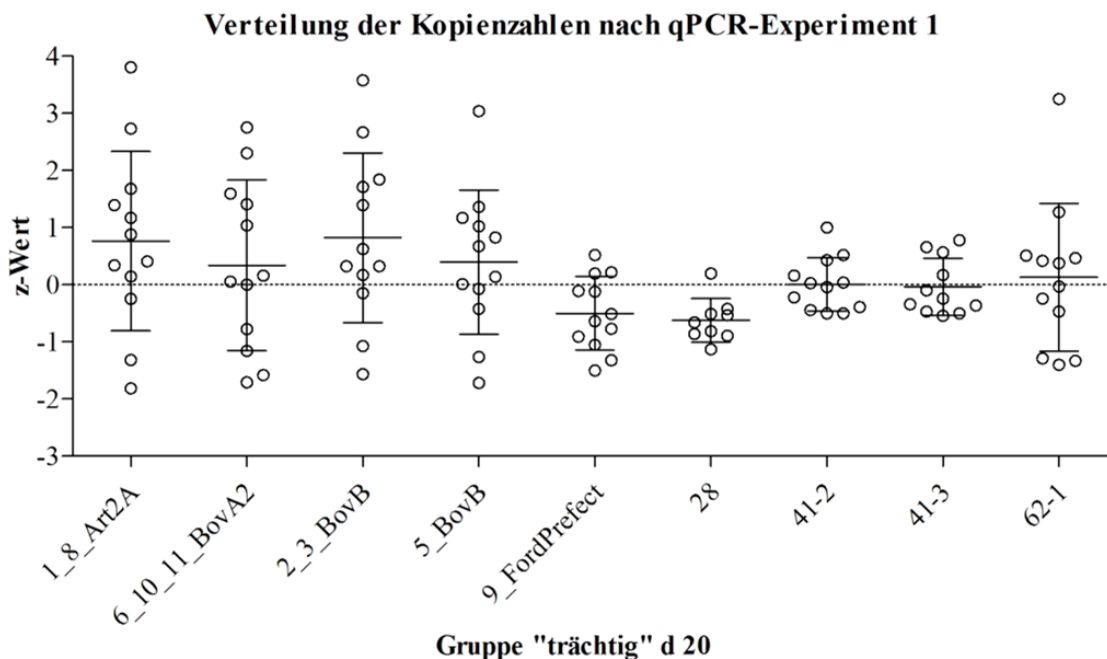


Abbildung 14: Verteilung der Kopienzahlen aus dem qPCR-Experiment 1 in Proben trächtiger Kühe zu d 20, dargestellt als z-Werte. Die repetitiven Elemente Art2A, BovA2 und BovB wiesen tendenzielle Unterschiede zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen auf. Die gepunktete Nulllinie stellt die NT Kontrollgruppe dar. Die Standardabweichung wird durch die Whisker dargestellt. D = Tag.

Die qPCR-Experimente zu *Tag*-18 und *Tag*-65 ergaben keine auswertbaren Ergebnisse. Es wurden keine signifikanten Unterschiede für die Verteilung der Kopienzahlen in den Proben von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen ermittelt. Bei der Auswertung der

z-Werte wiesen jedoch die repetitiven Elemente Art2A, BovA2 und BovB, zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen, tendenzielle Unterschiede in der Verteilung der Kopienzahlen auf. Daher wurden diese repetitiven Elemente in einem zweiten qPCR-Experiment wiederholt untersucht.

3.2.2 QPCR-Experiment 2

In dem zweiten qPCR-Experiment wurden insgesamt 74 native CNA-Proben (1 pg/ μ l) korrespondierender Kühe zu den Zeitpunkten d 0-3, d 20-23 und d 40-43 mit jeweils drei biologischen Replikaten auf Gruppenunterschiede geprüft. Die Kopienzahlen wurden mit Hilfe eines Sequenz-Standards bestimmt. Von den erhaltenen Kopienzahlen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die Gruppen „trächtig“ und „nicht-trächtig“ zu den jeweiligen Entnahmetagen berechnet und in Anhang-Abb. 2 (S. 71) grafisch dargestellt.

3.2.2.1 Vergleich der Kopienzahlen zwischen trächtigen Kühen

Während des Trächtigkeitsverlaufs stieg die mittlere Kopienzahl der 1_8_Art2A-Amplifikate des Trächtigkeitstages d 20-23 (8067 ± 4388 Kopien) um das 2,6-fache an ($p < 0,01$), verglichen mit d 0-3 (3149 ± 1635 Kopien). Von Trächtigkeitstag d 0-3 im Vergleich zu d 40-43 (7391 ± 3599 Kopien) wurde eine Erhöhung der Kopienzahl um das 2-fache beobachtet ($p < 0,05$). Die mittlere Kopienzahl der 2_3_BovB-Amplifikate von d 20-23 (93.900 ± 49.528 Kopien) und d 40-43 (94.143 ± 45.231 Kopien) wiesen gegenüber d 0-3 (35.338 ± 19.309 Kopien) eine 2,7-fache Erhöhung auf ($p < 0,01$). Bei den 5_BovB-Amplifikaten stiegen die Kopienzahlen von d 0-3 (34.976 ± 18.525 Kopien) zu d 20-23 (93.258 ± 48.701 Kopien) um das 2,7-fache ($p < 0,01$). Die Kopienzahlen von d 40-43 (92.192 ± 43.091 Kopien) stiegen im Vergleich zu d 0-3 um das 2,6-fache ($p < 0,01$). Die mittleren Kopienzahlen der 6_10_11_BovA2-Amplifikate von d 0-3 (243.394 ± 139.228 Kopien) wiesen eine 2,9-fache Erhöhung zu d 20-23 (699.343 ± 402.494 Kopien) auf ($p < 0,01$). Die Kopienzahlen von d 40-43 (677.852 ± 314.854 Kopien) stiegen gegenüber d 0-3 um das 2,8-fache ($p < 0,01$). Die ermittelten Kopienzahlen aus den Amplifikationen aller vier Tag-Kombination wiesen zwischen den Trächtigkeitstagen d 20-23 und d 40-43 keine Unterschiede auf. Zwischen den einzelnen Tagen der nicht-trächtigen Kontrollgruppe wurden in allen Amplifikationen keine Unterschiede beobachtet.

3.2.2.2 Vergleich von Kopienzahlen trächtiger Kühe mit der gesamten Kontrollgruppe

In einer weiteren Analyse wurden die ermittelten Kopienzahlen aus Proben trächtiger Kühe zu den einzelnen Trächtigkeitstagen mit den Kopienzahlen der gesamten nicht-trächtigen Kontrollgruppe verglichen. Abbildung 15 zeigt die standardisierten Kopienzahlen nach der z-Transformation, wobei alle Proben nicht-tragender Kühe als Kontrollgruppe in die Berechnung eingingen.

Signifikante Unterschiede wurden zwischen der Kontrollgruppe und den Trächtigkeitstagen d 0-3 und d 40-43 beobachtet. Dabei zeigten die Amplifikate von 1_8_Art2A, 2_3_BovB und 5_BovB zu d 0-3 verringerte ($p < 0,05$) und von 6_10_11_BovA2 stark verringerte Kopienzahlen ($p < 0,01$), verglichen mit den gesamten Proben aller nicht-trächtigen Kühe. Für alle vier *Tag*-Kombination wurden keine Unterschiede in der Kopienzahl zwischen Proben von d 20-23 und der Kontrollgruppe beobachtet. Die Kopienzahlen der Amplifikate von 2_3_BovB, 5_BovB und 6_10_11_BovA2 wiesen zu d 40-43 eine Erhöhung der Kopienzahlen gegenüber den Proben aller nicht-trächtigen Kühe auf ($p < 0,05$). Für die Kopienzahlen aus den 1_8_Art2A-Amplifikationen wurden keine Unterschiede zwischen d 40-43 und der Kontrollgruppe ermittelt.

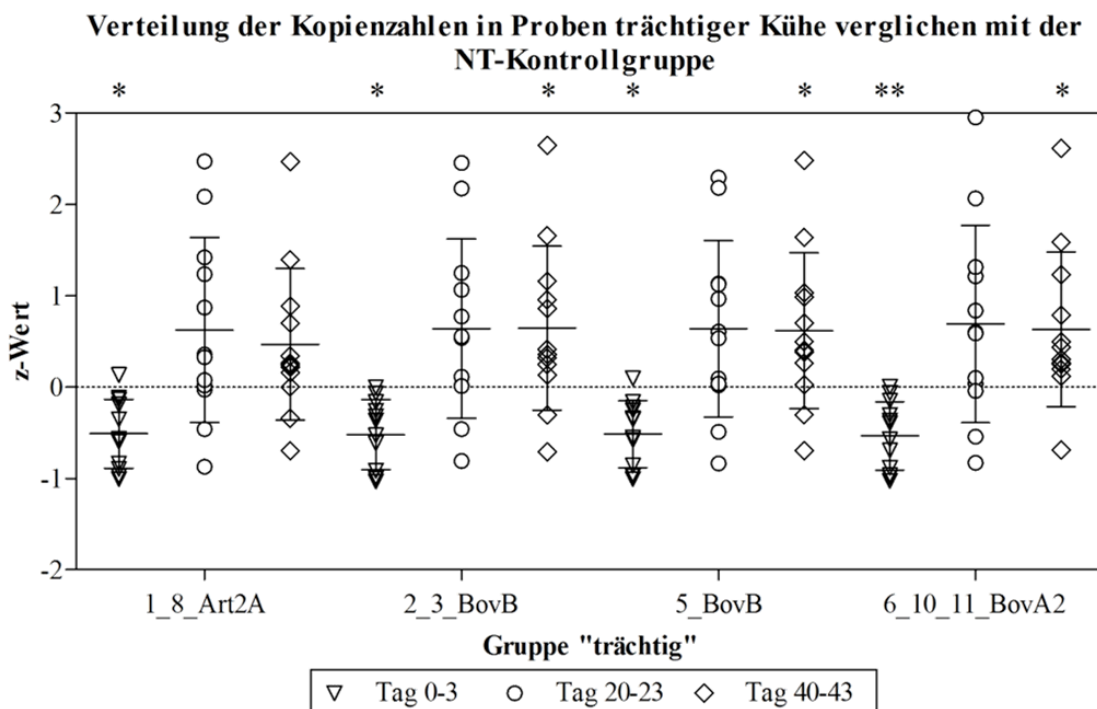


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Verteilung von Kopienzahlen zu den Trächtigkeitstagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43 im Vergleich zur gesamten Kontrollgruppe (Nulllinie). Signifikante Unterschiede wurden zwischen der Kontrollgruppe und den Trächtigkeitstagen d 0-3 und d 40-43 erhalten. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

3.2.2.3 Vergleich der Kopienzahlen jedes Entnahmetages aus Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe

Zusätzlich wurden die Kopienzahlen eines jeden Entnahmetages miteinander verglichen, die aus den Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe gewonnen wurden. In Abbildung 16 sind die standardisierten Kopienzahlen nach der z-Transformation grafisch aufgetragen, wobei die Mittelwerte und Standardabweichungen nicht-tragender Kühe aus den jeweiligen Entnahmetagen für die Berechnung verwendet wurden.

Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Kopienzahlen aus Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23 für alle vier repetitiven *Tag*-Kombinationen ermittelt. Dabei wiesen die Proben trächtiger Kühe zu d 20-23 eine Erhöhung der Kopienzahlen gegenüber denen nicht-trächtiger Kühe zu d 20-23 auf ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wurden zwischen den Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 0-3 sowie am d 40-43 keine Unterschiede in den Kopienzahlen beobachtet.

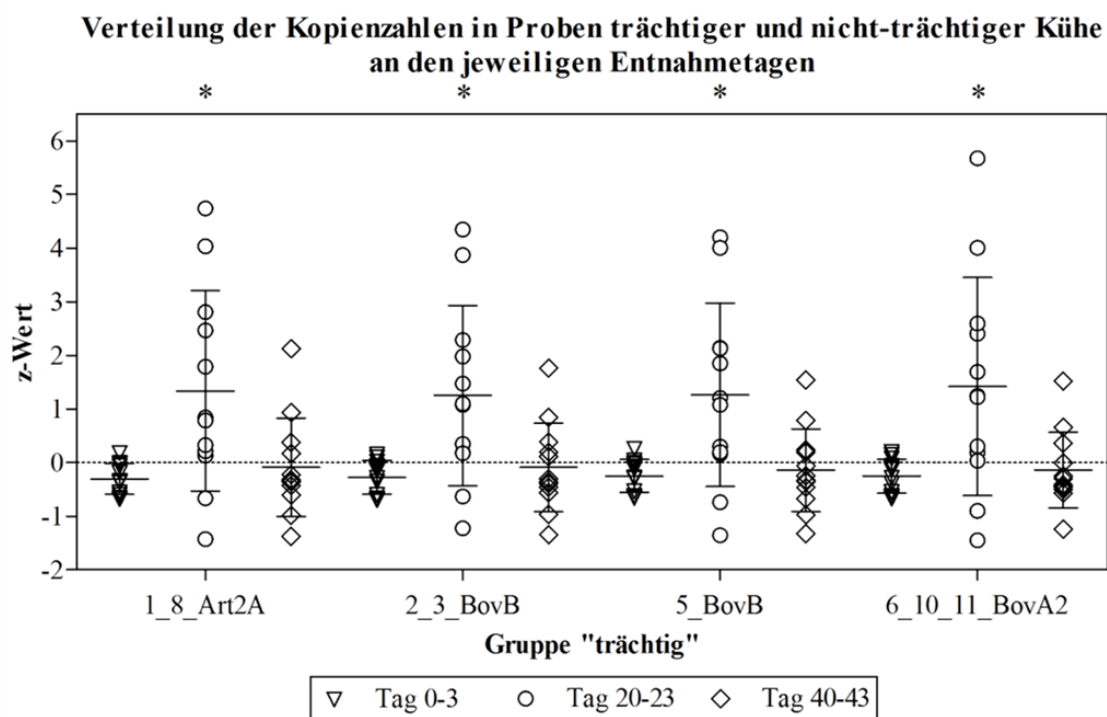


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Verteilung der Kopienzahlen zu den unterschiedlichen Entnahmetagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43. Die Kopienzahlen jedes Entnahmetages wurden zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen (Nulllinie) verglichen. Proben trächtiger Kühe zu d 20-23 wiesen erhöhte Kopienzahlen gegenüber nicht-trächtiger Kühe zu d 20-23 auf ($p < 0,05$). *, $p < 0,05$.

Somit können die Beobachtungen aus der 454-Sequenzierung, in der häufig Proben trächtiger Kühe zu d 20 erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe vorkamen, durch die q-PCR-Analysen bestätigt werden.

3.2.3 ROC-Statistik

Zur Bewertung und Beschreibung dieser Gruppenunterschiede wurde die ROC-Statistik (Receiver Operating Characteristic) angewendet. Mit Hilfe dieser statistischen Analyse kann ein möglicher Schwellenwert (Cut-off-Wert) und die Genauigkeit der Gruppenunterschiede ($AUC = \text{Area under the ROC-curve}$) ermittelt werden.

Dieses Verfahren ermöglicht daher eine Aussage zu treffen, welche *Tag*-Kombination sich eignen könnte, um zwischen trächtiger und nicht-trächtiger Kühe unterscheiden zu können.

Folgende ROC-Analysen wurden berechnet:

- Es wurde für jede *Tag*-Kombination die Entwicklung der Kopienzahlen von d 0-3 zu d 20-23 in Proben trächtiger Kühe bewertet.
- Es wurde für jede *Tag*-Kombination der Unterschied zwischen den Kopienzahlen am d 20-23 von Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe berechnet.

In Tabelle 7 sind alle berechneten Parameter zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Bewertung von Unterschieden in der Verteilung der Kopienzahlen in Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe für jede *Tag*-Kombination. D = *Tag*, Cut-off = Schwellenwert, J = Youden Index, AUC = Area under the ROC-curve.

Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen in Proben trächtiger Kühe von d 0-3 zu d 20-23.						
<i>Tag</i> -Kombination	Cut-off	J	AUC	p-Wert	Sensitivität	Spezifität
1_8_Art2A	> 5044	0,75	0,88	0,002	0,83	0,92
2_3_BovB	> 61.856	0,83	0,90	0,0008	0,83	1,00
5_BovB	> 57.307	0,75	0,88	0,002	0,83	0,92
6_10_11_BovA2	> 422.464	0,75	0,90	0,001	0,83	0,92
Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23.						
<i>Tag</i> -Kombination	Cut-off	J	AUC	p-Wert	Sensitivität	Spezifität
1_8_Art2A	> 5064	0,46	0,73	0,04	0,83	0,63
2_3_BovB	> 62.122	0,58	0,76	0,02	0,83	0,75
5_BovB	> 61.434	0,52	0,75	0,03	0,83	0,69
6_10_11_BovA2	> 749.777	0,42	0,71	0,06	0,42	1,00

Alle *Tag*-Kombinationen und deren Kopienzahlen aus den qPCR-Experimenten wiesen im Verlauf der Trächtigkeit von d 0-3 zu d 20-23 eine hohe Sensitivität (= 0,83) und eine hohe Spezifität ($\geq 0,92$) auf. Zudem beschreiben die AUC-Werte ($\geq 0,88$) eine hohe Verlässlichkeit des Testverfahrens. Somit sind alle *Tag*-Kombinationen geeignet, um zwischen Proben trächtiger Kühe von d 0-3 zu d 20-23 zu unterscheiden. Dabei wies die *Tag*-Kombination 2_3_BovB mit 83 % richtig-positiv bestimmten und 100 % richtig-negativ bestimmten Proben ($p = 0,0008$) die beste Bewertung auf.

Für die Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23 war eine Bewertung für die *Tag*-Kombinationen 1_8_Art2A, 2_3_BovB und 5_BovB möglich ($p < 0,05$). Für die Kopienzahlen dieser *Tag*-Kombinationen wurde eine hohe Sensitivität (= 0,83) bei einer niedrigen Spezifität ($\geq 0,63$) bei einer AUC von 0,73-0,76 berechnet. Die *Tag*-Kombination 6_10_11_BovA2 wies zwar die höchste Spezifität (= 1,00) auf, jedoch wurden nur 42 % der untersuchten Tiere als „richtig-trächtig“ bestimmt. Nach der ROC-Statistik ist mit dieser *Tag*-Kombination keine deutliche Bestimmung von Proben trächtiger Tiere am d 20-23 möglich ($p = 0,06$). Die beste Bewertung in dieser Analyse wies die *Tag*-Kombination 2_3_BovB auf. Mit dieser *Tag*-Kombination war es für die untersuchten Tiere am d 20-23 möglich 83 % der trächtigen Kühe als „richtig-trächtig“ und 75 % der nicht-trächtigen Kühe als „richtig-nicht-trächtig“ zu bestimmen ($p = 0,02$).

Die ermittelten ROC-Kurven für beide Bewertungen sind in Anhang-Abb. 3 (S. 72) dargestellt.

3.3 Ergebnisse aus der SOLiD™-Sequenzierung

Die SOLiD™-Sequenzierung diente der Analyse von methylierten und unmethylierten CNAs in Serumproben von 12 trächtigen und 13 nicht-trächtigen Tiere. Die insgesamt 50 Serumproben umfassen die Zeitpunkte d 0-3 und d 36-41 *p.i.*. Der Methylierungsgrad der Sequenzen aus diesen Proben sollte bestimmt und auf Unterschiede im Verlauf einer Trächtigkeit überprüft werden.

3.3.1 Erhaltene Sequenz-Anzahlen

Die absoluten Sequenzanzahlen für insgesamt 50 bovine Serumproben sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Sequenz-Treffer nach dem Mapping und Pairing. T = trächtig, NT = nicht-trächtig.

Anzahl Sequenzen	T	NT	Gesamt nach Pairing	Gesamt nach Mapping
methyliert	$5,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
unmethyliert	$1,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$
Gesamt	$6,6 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$

Aus dem gesamten Sequenz-Pool erzeugten $1,5 \times 10^8$ Sequenzen beim Mapping signifikante Treffer auf dem bovinen Genom (NCBI Btau_4.0). Von diesen Sequenzen wurden im Pairing 77 % ($1,0 \times 10^8$) methylierte und 23 % ($3,0 \times 10^7$) unmethylierte

Sequenzen erhalten. Der Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide des Säugetiergenoms beträgt über 70 % (Laird 2003). Insgesamt wurden $5,3 \times 10^7$ methylierte CNAs in Sera von trächtigen und $5,0 \times 10^7$ methylierte CNAs von nicht-trächtigen Kühen detektiert. Von den unmethylierten CNAs wurden $1,3 \times 10^7$ Sequenzen in Proben trächtiger und $1,7 \times 10^7$ nicht-trächtiger Kühe beobachtet.

3.3.2 Verteilung der Methylierung über Chromosomen

Der Grad der Methylierung von Sequenz-Treffern auf bovinen Chromosomen nach dem Pairing und Mapping ist in Abbildung 17 dargestellt. Der Methylierungsgrad wurde mit Hilfe eines Verhältnisses zwischen den generierten methylierten und unmethylierten Sequenzen bestimmt. Ein Verhältnis von 1 zeigte ausschließlich methylierte Sequenz-Treffer auf. Unmethylierte Sequenz-Treffer wurden durch ein Verhältnis von 0 beschrieben. Die Verhältnisse wurden auf Gruppenunterschiede überprüft.

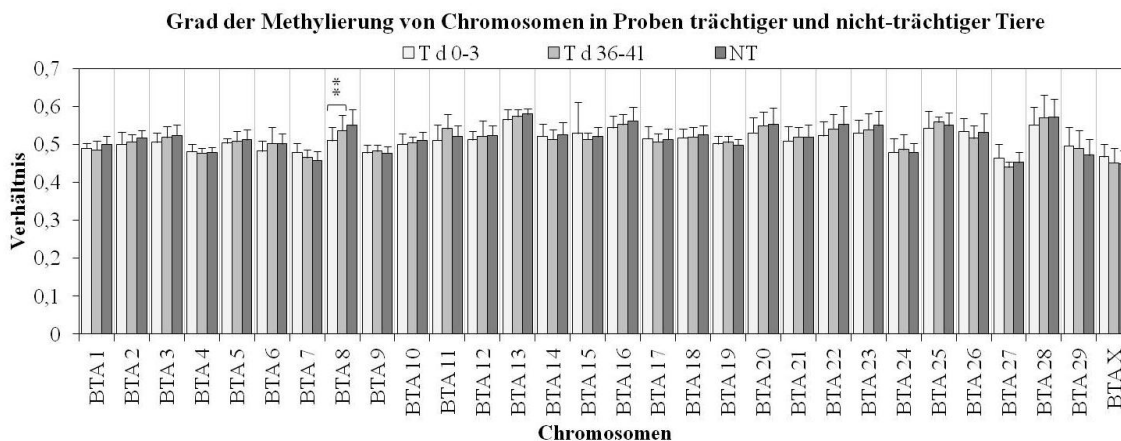


Abbildung 17: Grafische Darstellung des Methylierungsgrades (Verhältnis) der bovinen Chromosomen von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; BTA = bovinen Chromosom; **, $p_{\text{korr}} < 0,01$.

Für die Chromosomen BTA 7 und BTA 8 wurden Unterschiede im Methylierungsgrad der Sequenzen beobachtet. Dabei wurde ein höheres Verhältnis an methylierten Sequenzen des BTA 7 aus Proben trächtiger Tiere zu d 0-3 ($0,48 \pm 0,02$) im Vergleich zu d 36-41 ($0,46 \pm 0,02$) beobachtet ($p_{\text{unkorr}} < 0,05$; $p_{\text{korr}} > 0,05$). Es wurde jedoch kein Unterschied im Methylierungsgrad zwischen trächtigen Tieren am d 36-41 und nicht-trächtigen Tieren ($0,46 \pm 0,02$) ermittelt.

Für das BTA 8 wurde im Verlauf der Trächtigkeit eine Erhöhung des Methylierungsgrades von d 0-3 ($0,51 \pm 0,04$) zu d 36-41 ($0,54 \pm 0,04$) beobachtet ($p_{\text{unkorr}} < 0,001$; $p_{\text{korr}} < 0,01$). Zwischen Proben trächtiger Tiere am d 36-41 und

nicht-trächtiger Tiere ($0,55 \pm 0,04$) wurde kein Unterschied im Methylierungsgrad detektiert.

Für alle anderen bovinen Chromosomen konnten keine Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Tieren aufgezeigt werden. Nur für einzelne Proben wurden Sequenzen mitochondrialen Ursprungs generiert, sodass für die mtDNA eine Auswertung nicht möglich war.

Im weiteren Verlauf der Auswertung wurden alle Chromosomen in 100.000 bp Sequenz-Abschnitte (Fenster) aufgeteilt und der Grad der Methylierung auf Gruppenunterschiede überprüft. Für insgesamt fünf chromosomale Regionen wurden Unterschiede im Methylierungsgrad der Sequenzen beobachtet (Abbildung 18). Für die Sequenzen aus fünf chromosomalen Regionen wurden zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Tiere Unterschiede im Methylierungsgrad ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der ermittelten Verhältnisse der chromosomalen Regionen sind in Anhang-Tab. 4 (S. 70) aufgelistet.

Während des Trächtigkeitsverlaufs wurden für die Sequenzen des BTA 5 von 79,0 Mbp bis 79,1 Mbp eine Verringerung des Methylierungsgrades von d 0-3 ($0,71 \pm 0,25$) zu d 36-41 ($0,32 \pm 0,18$) beobachtet ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,01$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Zwischen den Proben trächtiger Tiere am d 36-41 und den nicht-trächtigen Tieren ($0,74 \pm 0,25$) wurden die größten Unterschiede im Methylierungsgrad ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,001$; $p_{\text{korrigiert}} < 0,01$).

Für die Region von 63,0 Mbp bis 63,1 Mbp des BTA 18 wurden für die Proben trächtiger Tiere am d 36-41 ($0,46 \pm 0,26$) ein geringerer Methylierungsgrad im Vergleich zu d 0-3 ($0,75 \pm 0,27$) und den nicht-trächtigen Tieren ($0,73 \pm 0,27$) ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,01$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$).

Im Gegensatz dazu wurde ein höherer Methylierungsgrad von Sequenzen aus Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 ($0,92 \pm 0,13$) verglichen mit d 0-3 ($0,54 \pm 0,34$) und nicht-trächtiger Tiere ($0,71 \pm 0,31$) für die chromosomale Region des BTA 19 von 17,4 Mbp bis 17,5 Mbp detektiert ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,01$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$).

Eine Verringerung des Methylierungsgrades von d 0-3 ($0,77 \pm 0,22$) zu d 36-41 ($0,48 \pm 0,14$) wurde für die Sequenzen des BTA X von 48,3 Mbp bis 48,4 Mbp beobachtet ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,01$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Zusätzlich wurden zwischen den Proben trächtiger Tiere am d 36-41 und den nicht-trächtigen Tieren ($0,64 \pm 0,21$) Unterschiede im Methylierungsgrad ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$).

Für die Region von 84,4 Mbp bis 84,5 Mbp des BTA X wurden für die Proben trächtiger Tiere am d 36-41 ($0,60 \pm 0,35$) ein geringerer Methylierungsgrad im Vergleich zu d 0-3 ($0,94 \pm 0,09$) und den nicht-trächtigen Tieren ($0,84 \pm 0,18$) ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$).

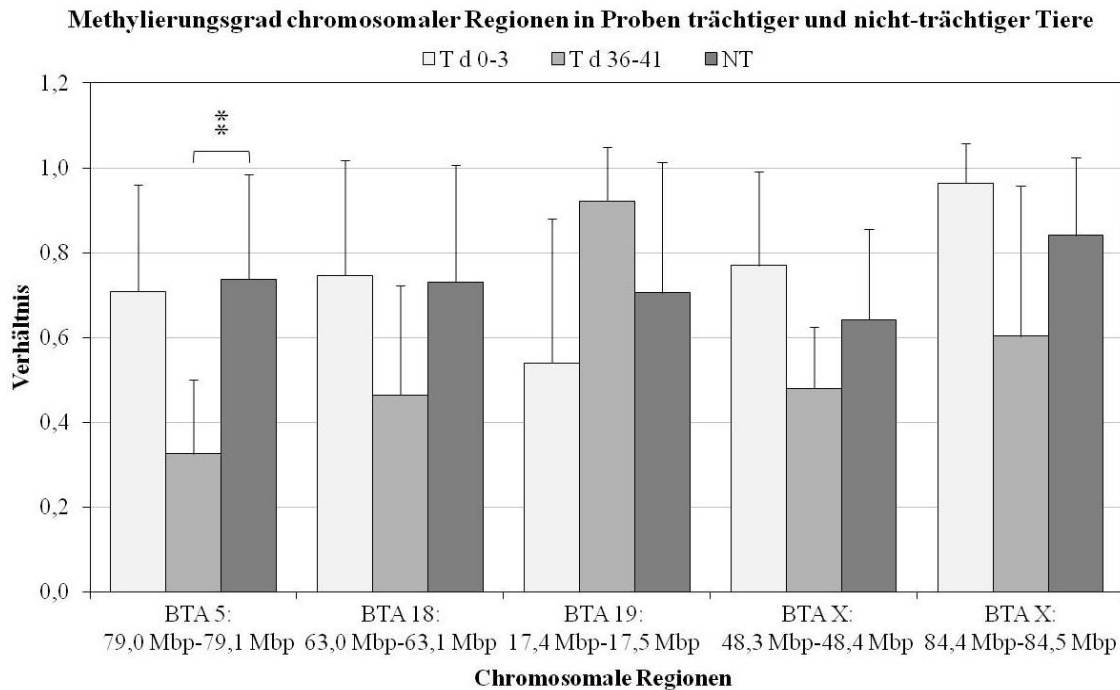


Abbildung 18: Grafische Darstellung des Grades der Methylierung (Verhältnis) von chromosomalen Regionen an den Tagen d 0-3, d 36-41 trächtiger und nicht-trächtiger Tiere. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; BTA = bovines Chromosom; Mbp = Megabasenpaar; **, $p_{\text{korrigiert}} < 0,01$.

3.3.3 Verteilung der Methylierung innerhalb von Genen

Die Verhältnisse für die Sequenz-Treffer auf Genen wurden auf Gruppenunterschiede überprüft und in Abbildung 19 dargestellt.

Für insgesamt drei Gene konnten Gruppenunterschiede im Methylierungsgrad beobachtet werden ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Die Sequenz-Treffer auf dem Gen *ERC1* (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1; BTA 5) generierten in Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 ($0,75 \pm 0,15$) ein geringeres Verhältnis im Vergleich zu d 0-3 ($0,97 \pm 0,04$) und nicht-trächtiger Tiere ($0,87 \pm 0,14$).

Für das Gen *PDXK* [pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase; BTA 1] wurde für die Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 ($1,00 \pm 0,00$) ein höherer Methylierungsgrad beobachtet, verglichen mit d 0-3 ($0,71 \pm 0,31$) und nicht-trächtiger Tiere ($0,89 \pm 0,18$).

Die Sequenz-Anzahlen auf dem Gen *MATK* (megakaryocyte-associated tyrosine kinase; BTA 7) generierten in Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 ($0,96 \pm 0,09$) einen höheren Methylierungsgrad im Vergleich zu d 0-3 ($0,73 \pm 0,28$) und nicht-trächtiger Tiere ($0,85 \pm 0,21$).

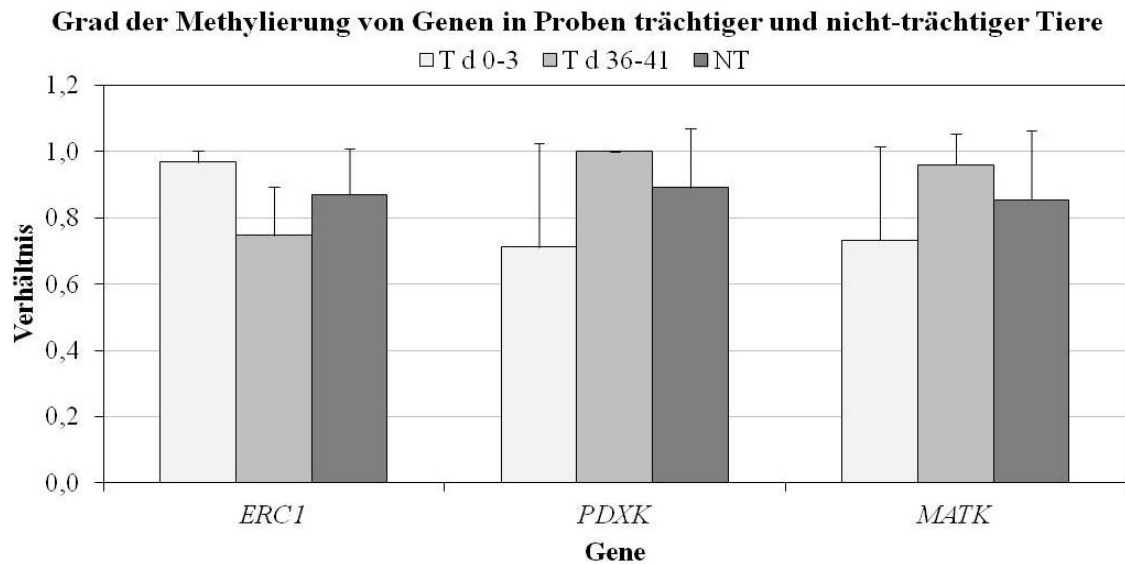


Abbildung 19: Grafische Darstellung des Methylierungsgrades (Verhältnis) der Gene von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag.

4 Diskussion

Die Verkürzung der Zwischenkalbezeit stellt im Herdenmanagement von Milchvieh-Betrieben ein wichtiges ökonomisches Ziel dar. Dieses kann nur durch eine intensive Brunstbeobachtung und eine frühzeitige und zuverlässige Trächtigkeitsdiagnostik erreicht werden. Daher ist ein zuverlässiges Verfahren zur frühzeitigen Bestimmung des Trächtigkeitsstatus bei Hausrindern vor Ablauf des Brunstzyklus (21 Tage) von agrarwissenschaftlichem Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im maternalen Blut von Kühen zirkulierende Nukleinsäuren (CNAs) identifiziert und auf ihre Trächtigkeits-Spezifität untersucht sowie Eignung als Biomarker zur Bestimmung einer Trächtigkeit überprüft werden.

Bei endogenen zirkulierenden Nukleinsäuren (CNAs) des Blutkreislaufs handelt es sich sowohl um DNA- als auch um RNA-Moleküle. Dabei sind CNAs definiert als freie, an Histon-Proteinen gebundene (Holdenrieder *et al.* 2008) oder in Lipoprotein-Komplexen (Gahan & Stroun 2010) verpackte Nukleinsäuren. Gahan & Stroun (2010) beschrieben, dass CNAs z.B. durch Hämolyse, Bakterien und Viren, Leukozyten, Nukleosomen, nekrotischen Zellen oder durch Apoptose freigesetzte Exosomen in den Blutkreislauf gelangen.

Im Blut gesunder Individuen weisen frei zirkulierende DNA-Moleküle eine Konzentration von circa 10-50 ng/ml und RNA-Moleküle bis zu 3 ng/ml auf (Swarup & Rajeswari 2007; Holford *et al.* 2008). Höhere CNA-Konzentrationen wurden im Vergleich zu gesunden Menschen bei Patienten mit Tumorerkrankungen gefunden. Dabei wurden CNAs als geeignete Biomarker für verschiedene Tumorerkrankungen, wie z.B. der Mamma, Lunge und Prostata beschrieben (Stroun *et al.* 1987; Fleischhacker & Schmidt 2007; Beck *et al.* 2010). In dem Zusammenhang mit CNAs als Marker zur Trächtigkeitsfeststellung beschrieben Swarup & Rajeswari (2007), dass ein heranwachsender Fetus oder eine wachsende Plazenta ein gutartiges Tumorstadium simulieren. Dem entsprechend sollte Trächtigkeits-assoziierte zirkulierende DNA maternalen Ursprungs in den frühen Phasen einer Trächtigkeit detektierbar sein.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob verschiedene molekulare Muster in der Verteilung von zirkulierenden Nukleinsäuren (CNAs) in trächtigen und nicht-trächtigen Kühen beobachtet werden können. Dabei sollte erforscht werden, wie maternale, sowie

eventuell im Serum vorhandene zirkulierende fetale DNA, die molekulargenetischen zellulären Differenzierungsprozesse während des frühen Trächtigkeitsverlaufs widerspiegeln. Zusätzlich sollte diese Analyse durch einen epigenetischen Ansatz, d.h. die Identifizierung von CpG-Methylierungsmustern der CNA-Profile, erweitert werden.

4.1 454-Sequenzierung

Die Analyse der Verteilung der *Tags* auf NCBI annotierten funktionellen genomischen Regionen (siehe Abschnitt 3.1.2, S. 30) ergab signifikante Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer zwischen Proben trächtiger Kühe zu d 40 und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede in der Anzahl der *Tag*-Sequenzen auf funktionellen genomischen Regionen in Proben des frühen Trächtigkeitsverlaufs (d 0, d 20) im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Die Menge an *Tag*- Treffern auf den transkribierten Sequenzen CDS in Proben trächtiger Kühe zu d 40 war verglichen mit der Kontrollgruppe unterrepräsentiert. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus vorherigen Studien, in denen ebenfalls in bovinen und humanen Sera eine Unterrepräsentation von proteinkodierenden DNA-Sequenzen beobachtet wurde (Beck *et al.* 2008; Beck *et al.* 2009). Transkriptionell aktive Bereiche des Genoms sind im Euchromatin lokalisiert, welches weitgehend dekondensiert vorliegt (Li 2002). Dabei enthalten Enhancer- und Promotorbereiche von transkriptionell aktiven Bereichen eine geringere Dichte an Nukleosomen und sind daher empfindlich gegenüber einer Nuklease-Restriktion (Forsberg & Bresnick 2001). Die signifikante Abnahme von proteinkodierenden Sequenzen kann bedeuten, dass diese CNA-Fragmente vor einer Nuklease-Restriktion ungeschützt waren. Die genauen molekularen Mechanismen können nicht eindeutig geklärt werden, warum in Proben trächtiger Kühe zum d 40 *Tag*-Treffer auf CDS unterrepräsentiert waren.

Die Analyse zur Verteilung von *Tag*- Treffern auf den gesamten bovinen Chromosomen ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (siehe Abschnitt 3.1.3, S. 31).

Die Betrachtung der chromosomalen 500.000 bp Sequenz-Abschnitte ergab signifikante Gruppenunterschiede in der Ausprägung der Sequenz-Treffer auf 14 chromosomalen Regionen. Alle erhaltenen Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe der Datenbank für das bovine Genom (NCBI Btau_4.0) auf vorhandene Gene überprüft. Die allgemeinen Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt und in der Anhang-Tab. 1 (S. 68) aufgelistet.

Zwei chromosomale Regionen wiesen am d 0 verglichen mit der Kontrollgruppe eine erhöhte und zwei Regionen eine verringerte Anzahl der *Tag*-Treffer auf ($p < 0,05$). Dabei wurde ein großer Unterschied an *Tag*-Sequenzen für die chromosomale Region des BTA 7 von 43,5 Mbp bis 44,0 Mbp ermittelt ($p = 0,005$). Zusätzlich wurde eine tendenzielle Verringerung in der *Tag*-Anzahl von d 0 zu d 20 und d 40 beobachtet. Innerhalb dieser chromosomalen Region sind insgesamt fünf Gene lokalisiert, von denen *SCAMP4* (secretory carrier membrane protein 4) mit den Entwicklungsprozessen zur Vorbereitung einer Trächtigkeit in Verbindung gebracht werden konnte. Im Verlauf des Östruszyklus wird die Expression vom murinen *Scamp4* während der Follikelreifungsphase durch die hohe Konzentration von Progesteron im Blut unterdrückt (Krebs & Pfaff 2001). Zu Beginn des Östruszyklus ist der Progesteron-Spiegel im Blut niedrig, wobei ebenfalls die Konzentrationen des luteinisierenden Hormons (LH), der Östrogene und des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) sinken (siehe Abschnitt 1.1, S. 6). Dabei bilden sich die Brunstsymptome zurück und es kommt zur Ovulation (Niswender *et al.* 2000).

In der chromosomalen Region des BTA 17 von 11,0 Mbp bis 11,5 Mbp wurde zu d 0 eine erhöhte *Tag*-Treffer Anzahl gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet ($p = 0,05$). Zusätzlich wiesen die *Tag*-Anzahlen aus Proben trächtiger Kühe eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In dieser Region sind vier Gene lokalisiert. *EDNRA* (endothelin receptor type A) wird in den Epithelzellen der Ovarien hoch exprimiert und unterstützt die Initiation der Trächtigkeit. Eine Blockade der Endothelin-Rezeptoren hatte in Mäusen eine starke Reduktion der Anzahl von Embryonen im Zweizellstadium zur Folge (Jeoung *et al.* 2010).

Eine verringerte Anzahl an *Tags* zu d 0 verglichen mit der Kontrollgruppe wurde für die Region des BTA 1 von 117,0 Mbp bis 117,5 Mbp beobachtet ($p = 0,02$). In dieser Region sind zwei Gene lokalisiert. Shimizu *et al.* (2010) beschrieben, dass die Expression von *MBNLI* (muscleblind-like splicing regulator 1) durch Östrogen und Progesteron im bovinen Endometrium herab reguliert wird. Progesteron wird nach der Befruchtung vom Cl weiter gebildet, um den Embryo während des Trächtigkeitsverlaufs zu schützen (Niswender *et al.* 2000).

Insgesamt vier chromosomale Regionen zeigten eine Erhöhung und fünf Regionen eine Verringerung in der Anzahl der *Tag*-Sequenzen am d 20 verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Dabei wurde ein großer Unterschied in der Anzahl an *Tag*-Sequenzen für die chromosomale Region des BTA 13 von 60,0 Mbp bis 60,5 Mbp ermittelt ($p = 0,009$). Zusätzlich wurde eine tendenzielle Erhöhung der *Tag*-Anzahlen

während des Trächtigkeitsverlaufs von d 0 zu d 20 beobachtet. In dieser Region sind sieben Gene lokalisiert, wozu *AURKA* (aurora kinase A) und *TFAP2C* [transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)] gehören.

Aurora A Kinasen spielen eine große Rolle bei der Regulation des Spindelapparates sowie bei der Positionierung von Proteinen an das Zentrosom, die während der Mitose zur Bildung der bipolaren Spindelbildung unerlässlich sind. Ein Mangel an Aurora A Kinasen führt durch Fehlfunktionen des Spindelapparates zu erhöhter Apoptose und schließlich zum embryonalen Frühtod (Cowley *et al.* 2009).

Das murine *Tfap2c* ist für die Reifung und Entwicklung der Plazenta unerlässlich. Das bovine *TFAP2C* wurde sowohl in SCNT-Embryonen (somatic cell nuclear transfer) des Achtzell- und des Morulastadiums als auch in plazentalem Gewebe exprimiert gefunden (Aston *et al.* 2009).

Eine erhöhte Anzahl an *Tags* zu d 20 verglichen mit der Kontrollgruppe wurde für die chromosomale Region des BTA 4 von 4,5 Mbp bis 5,0 Mbp beobachtet ($p = 0,028$). In dieser Region ist ausschließlich das Gen *COBL* [cordon-bleu homolog (mouse)] lokalisiert. Shimizu *et al.* (2010) beschrieben *COBL* als ein Gen, welches durch Östrogen herab und durch Progesteron herauf reguliert wird.

Für den Trächtigkeitstag d 40 wurde eine verringerte Anzahl an *Tag*-Treffern verglichen mit der Kontrollgruppe ausschließlich in der Region des BTA 4 von 102,0 Mbp bis 102,5 Mbp beobachtet ($p = 0,014$). Zusätzlich waren die *Tag*-Treffer aus Proben trächtiger Kühe am d 20 im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht verringert. In dieser Region sind vier Gene lokalisiert, wozu auch *BPGM* (2,3-bisphosphoglycerate mutase) gehört. In der humanen Plazenta wird 2,3-BPGM von Erythrozyten gebildet und synthetisiert 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG), welches die Bindungsfähigkeit von Hämoglobin für Sauerstoff in den Erythrozyten reguliert. Dabei bindet 2,3-BPG eher an adultem als an fetalem Hämoglobin und erleichtert damit den fetomaternalen Sauerstoffaustausch (Pritlove *et al.* 2006). Angesichts der Anatomie der synepitheliochorialen Plazenta der Wiederkäuer ist der fetomaternale Stoffaustausch nicht vergleichbar mit der hämochorialen Plazenta von Menschen. Die bovine Plazenta besitzt eine Interhämalschranke, die aus insgesamt sechs separaten Schichten, den maternalen (Endometrium) und den fetalen (Fruchthüllen) Anteilen, zusammengesetzt ist. Dabei besteht kein direkter Kontakt zwischen Trophoblast und maternalen Blutkreislauf (King *et al.* 1980; Enders & Carter 2004).

Zusätzlich wurden insgesamt sieben chromosomale Regionen mit verringerten Anzahlen der *Tag*-Treffer verglichen mit der Kontrollgruppe zu den Tagen d 0 und d 20

beobachtet ($p < 0,05$). Innerhalb dieser Regionen wurden mehrere Gene lokalisiert, von denen keines mit den Entwicklungsprozessen einer Trächtigkeit in Verbindung gebracht werden konnte. Die signifikante Abnahme an *Tag*- Treffern in diesen chromosomalen Regionen könnte auf einen molekularbiologischen Mechanismus hindeuten, bei dem diese CNA-Fragmente im maternalen Blutkreislauf abgebaut werden. Zirkulierende DNA kann in Form von freier DNA, an Nukleosomen gebunden (Holdenrieder *et al.* 2008) oder in Lipoprotein-Komplexen (Gahan & Stroun 2010) vorliegen. Es wird angenommen, dass zirkulierende Nukleosomen von apoptotischen oder nekrotischen Zellen freigesetzt werden und dass diese Protein-gebundenen DNA-Moleküle vor einer Nuklease-Restriktion geschützt sind (Holdenrieder *et al.* 2008).

Zirkulierende, sequenzspezifische und methylierte Histon / DNA-Komplexe sind bei diversen Tumorerkrankungen (Ballestar & Esteller 2002), während des normalen Schwangerschaftsverlaufs aber auch bei Schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen, wie z.B. Präeklampsie (Müller *et al.* 2004) beobachtet worden. Die signifikante Abnahme der *Tag*-Konzentration in einigen chromosomalen Regionen kann bedeuten, dass diese zirkulierenden DNA-Fragmente keinen Schutz vor einer Nuklease-Restriktion aufwiesen.

Die Untersuchung zur Verteilung von *Tag*- Treffern auf einzelnen Genen ergab signifikante Gruppenunterschiede für insgesamt fünf Gene (siehe Abschnitt 3.1.4, S. 35). Diese *Tag*-Sequenzen wurden ausschließlich in Proben trächtiger Kühe detektiert und wiesen ein erhöhtes Vorkommen zu unterschiedlichen Trächtigkeitstagen auf ($p < 0,01$). Jedoch war die Anzahl der beobachteten *Tag*-Treffer zu diesen Genen deutlich geringer als die ermittelten intergenischen CNA-*Tag*-Sequenzen, die ebenfalls exklusiv in Proben trächtiger Kühe nachgewiesen wurden.

Das höchste Vorkommen der *Tag*-Sequenzen von *GNB4* [guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4; BTA 1] und *TSHZ1* (teashirt zinc finger homeobox 1; BTA 24) wurde in Proben von Kühen zu dem Trächtigkeitstag d 0 ermittelt. Untersuchungen zeigten, dass murine *Gnb4* einen positiven Einfluss auf die G-Protein-Signalwege während der Trächtigkeit hat und somit zu einer erhöhten Fruchtbarkeitsleistung führt (Vanselow *et al.* 2008). *Tshz1* wiederum spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung des Bronchialbogens und des Mittelohres bei Mäusen und ist in der mRNA Expression in dessen mesenchymalen Gewebe hochreguliert (Core *et al.* 2007).

In Proben von Kühen zu dem Trächtigkeitstag d 20 wurde ein erhöhtes Vorkommen der *Tag*-Sequenzen von *NLRP13* (NLR family, pyrin domain containing 13; BTA 18) und *TMED3* (transmembrane emp24 protein transport domain containing 3; BTA 21) beobachtet. Das Gen *NLRP13* beeinflusst nach Tian *et al.* (2009) die erfolgreiche Entwicklung von befruchteten Oozyten bei Säugetieren. *NLRP13* wird vermehrt von heranwachsenden Oozyten und nach der Nidation ausschließlich von maternalen Gewebe gebildet. Shimizu *et al.* (2010) beschrieben, dass die Expression von *TMED3* neben weiteren Genen ausschließlich durch Östrogen im bovinen Endometrium induziert wird und somit bei der Initiierung der Mitose, sowie bei der Proliferation der Gebärmutterschleimhaut im Rahmen des Entwicklungsprozesses des Embryos involviert ist.

Die größte Anzahl der *Tag*-Sequenzen von *NRSN1* (neurensin 1; BTA 23) wurde in Proben von Kühen zu dem Trächtigkeitstag d 40 beobachtet. Dieses Gen spielt in Mäusen eine aktive Rolle in der Entwicklung und des embryonalen Nervenbaus (Suzuki *et al.* 2007).

Da die meisten hier dargestellten Gen-Funktionen auf dem Tiermodell Maus beruhen, ist es diskussionswürdig, ob diese Gene dieselben Funktionen in Kühen aufweisen. Zum Beispiel führte die Zerstörung des murinen *Oct4* oder des *Cdx2* Genes zu einer abnormalen Blastozysten-Bildung. Beide Gene werden von der Blastozyste exprimiert, wobei die inneren Zellmasse mit *Oct4* und das Trophektoderm mit *Cdx2* assoziiert sind. Im Gegensatz dazu erfolgt in der gesamten bovinen Blastozyste eine Ko-Expression von *OCT4* und *CDX2* (Rossant 2011).

Ein weiterer Unterschied besteht in dem Zeitraum, in dem sich die Blastozyste an der Uteruswand einnistet. Dabei erfolgt die Implantation bei Mäusen am Tag 5 der Gestation, bei Menschen zwischen Tag 7 und 8 und bei Kühen, Schafen und Schweinen zwischen zwei und drei Wochen (Rossant 2011).

Zusätzlich bestehen, wie bereits beschrieben, innerhalb der Säugetiergruppe Unterschiede in der Anatomie der Plazenta.

Die Untersuchung zur Verteilung von *Tag*-Treffern auf repetitiven Elementen ergab keine signifikante Gruppenunterschiede (siehe Abschnitt 3.1.5, S. 36). Der Anteil der erhaltenen repetitiven CNA-*Tags* war im Vergleich zum Anteil an Repeats im bovinen Genom unterrepräsentiert (Elsik *et al.* 2009; Adelson *et al.* 2009). Bei $1,25 \times 10^7$ *NlaIII*-Schnittstellen im gesamten bovinen Genom lag der Erwartungswert bei $6,99 \times 10^6$ repetitiven *Tags*. Die Betrachtung der B/E-Verhältnisse ergab, dass die

Tag-Treffer innerhalb der Repeat-Klasse SINE unterrepräsentiert und die *Tag*-Treffer innerhalb der Repeat-Klasse LTR überrepräsentiert waren. Zusätzlich waren die *Tag*-Treffer innerhalb der Repeat-Klassen LINE und DNA-Transposon leicht unterrepräsentiert.

Van der Vaart *et al.* (2011) zeigten in ihrer Studie durch 454-Sequenzierung von humanen CNAs aus Plasma von gesunden und erkrankten Menschen ähnliche Ergebnisse in der Verteilung von repetitiven Sequenzen im Vergleich zum Anteil im Referenzgenom. Im Gegensatz dazu wurde durch eine weitere Studie an apoptotischer und genomischer DNA durch FISH- und SOLiDTM-Sequenzierungsanalysen ein gegenteiliges Ergebnis beschrieben (Morozkin *et al.* 2012).

Die beschriebenen Repeat-Klassen gehören zu den größten Klassen von Sequenzen des Säugetiergenoms. Das bovine Genom besteht zu 46,5 % aus diesen repetitiven Elementen, die als „mobile DNA“ ihre Position im Genom verändern können (Transposition). Häufig liegen diese mobilen DNA-Elemente konzentriert innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe zu Promotorbereichen (Adelson *et al.* 2009; Elsik *et al.* 2009). Das deutet darauf hin, dass diese Repeats die Genexpression beeinflussen können. Wie bereits erwähnt, sind transkriptionell aktive Bereiche, wie z.B. Promotorbereiche, in einer geringen Anzahl mit Histonen besetzt und weisen daher eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Nuklease-Restriktion auf (Forsberg & Bresnick 2001). Die verringerte Sequenzanzahl von SINEs, LINEs und DNA-Transposons gegenüber dem Erwartungswert kann daher bedeuten, dass diese CNA-Fragmente keinen Schutz vor einer Nuklease-Restriktion aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Fan *et al.* (2008) in einer Studie durch 454-Sequenzierung von maternaler Plasma-DNA, dass in der Nähe des Startpunktes der Transkription mehrere Nukleosomen platziert sein können. Dabei wurden CNAs generiert, deren Fragmentlänge von 176 bp mit der Länge von nukleosomal gebundener DNA übereinstimmt. Zirkulierende DNAs können z.B. durch nekrotische Zellen oder durch Apoptose in den Blutkreislauf freigesetzt werden (Gahan & Stroun 2010), wobei die nukleosomale DNA in Anwesenheit von Endonukleasen im Blut in ca. 180 bp-Stücke fragmentiert (= „apoptotische Leiter“) wird (Peitsch *et al.* 1993).

Einige repetitive Elemente der Repeat-Klasse der LTRs spielen eine entscheidende Rolle bei den Wachstumsprozessen des Konzeptus und der Plazenta von Säugetieren (Black *et al.* 2010). In der vorliegenden Analyse wurden jedoch sowohl in Proben trächtiger als auch nicht-trächtiger Kühe LTR-Elemente als überrepräsentiert beobachtet, sodass eine Assoziation zur Trächtigkeit ausgeschlossen werden kann.

Zirkulierende DNA kann im Plasma und Serum unterschiedlich dicht mit Nukleosomen assoziiert und dessen Histone sequenzspezifisch methyliert sein. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass oligonukleosomale DNA in höheren Konzentrationen als mononukleosomale DNA im Plasma zirkulierte. Zusätzlich war nukleosomale DNA mit methylierten Histonen in höheren Konzentrationen vorhanden, verglichen mit unmethylierten Histonen (Deligezer *et al.* 2008). Daher kann eine erhöhte Sequenzanzahl von LTRs im Vergleich zu den vorhandenen *NlaIII*-Erkennungssequenzen auf eine hohe Dichte von Nukleosomen sowie methylierten Histonen zurück zu führen sein, wodurch eine größere Resistenz gegenüber einer Nuklease-Restriktion besteht.

In einer weiteren Analyse wurden *Tag*-Sequenzen herausgefiltert, die exklusiv in Proben trächtiger Kühe vorkamen und ein erhöhtes Vorkommen bzw. eine erhöhte Trefferzahl in trächtigen Tieren am Tag 20 gegenüber Tag 0 und 40 aufwiesen (siehe Abschnitt 3.1.6, S. 37). Dabei wurden sieben Einzelkopie-CNA-*Tags* mit der höchsten Verteilung in Proben trächtiger Kühe zu d 20 entdeckt und mit Hilfe der BLAST-Analyse intergenischen Regionen zugeordnet. Eine Zuordnung zu anderen funktionellen genomischen Regionen (z.B. Genen) konnte nicht aufgezeigt werden. Zusätzlich wurden 13 *Tag*-Sequenzen repetitiven Ursprungs ausgewählt, die ebenfalls ihre höchste *Tag*-Trefferzahl in Proben trächtiger Kühe zu d 20 aufwiesen.

Diese repetitiven *Tag*-Sequenzen wurden durch eine vergleichende BLAST-Analyse als LINEs und SINEs identifiziert. Dabei handelte es sich um Elemente des BovB (LINEs) sowie um Art2A und BovA2 (SINE). Das repetitive Element BovB zählt zu den Retroelementen (RTEs) und beansprucht 10,7 % des gesamten bovinen Genoms. Es wird angenommen, dass RTEs den Mechanismus zur Transposition von SINEs, wie BovAs, Art2As oder SINE RTEs, kodieren (Adelson *et al.* 2009). Vergleichbar zu den humanen Alu-Repeats, gehört Art2A ebenfalls zu den short interspersed Repeats und hat einen Anteil von 4,2 % des bovinen Genoms (Adelson *et al.* 2009; Beck *et al.* 2009).

Während des Trächtigkeitsverlaufs bei Wiederkäuern werden von den Trophoblastzellen der Plazenta verschiedene Gewebs-spezifische Proteine exprimiert, wie z.B. die pregnancy associated glycoproteins (PAGs). Diese spielen eine wichtige Rolle während der Initiierung der Implantation, wie z.B. bei der Verschmelzung der fetomaternalen Zelloberflächen (Hashizume 2007; Kumar *et al.* 2007). Telugu *et al.*

(2009) beschrieben die Integration von unterschiedlichen repetitiven Elementen wie z.B. Art2A und BovA2 innerhalb der Familie der PAG-Gene.

Das innovative Konzept dieser Arbeit beschreibt die genomischen Verteilungen von CNAs in Sera von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen mit Hilfe eines modifizierten SAGE-Verfahrens und der 454-Sequenzierung. Diesen spezifischen CNA-*Tags* kann eine mögliche Verbindung zu Entwicklungsprozessen im Verlauf einer Trächtigkeit zugesprochen werden. Dabei könnten die beobachteten CNA-Fragmente von dem wachsenden Gewebe der Plazenta entstammen. Mit Hilfe vergleichender Transkriptom-Analysen am Trächtigkeitstag 16 und 18 konnten unterschiedliche Genexpressionsmuster und Signalwege im Endometrium trächtiger und nicht-trächtiger Kühe aufgedeckt werden. Dabei waren die Gene in ihrer Expression hochreguliert, die die Zellproliferation und Apoptose kontrollierten (Bauersachs *et al.* 2006; Forde *et al.* 2011). Somit können Änderungen des endometrialen Transkriptoms im Verlauf einer Trächtigkeit voraussichtlich die Zusammensetzung von zirkulierender maternaler DNA beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die CNA-*Tags*, die ausschließlich in Serum-Proben trächtiger Kühe zu d 20 beobachtet wurden, mit Hilfe von qPCR-Experimenten zur näheren Validierung untersucht.

4.2 Validierung

Für die im ersten qPCR-Experiment ermittelten Kopienzahlen mit gepoolten nativen CNAs oder WGA-Amplifikaten als Templates konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede zu den Probenentnahmetagen d 20-23 aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.1, S. 40). Jedoch wiesen die untersuchten repetitiven Elemente Art2A, BovA2 und BovB tendenzielle Unterschiede in der Verteilung der Kopienzahlen auf.

Die Auswertung der Kopienzahlen im zweiten qPCR-Experiment ergab signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Zeitpunkten d 0-3, d 20-23 und d 40-43 (siehe Abschnitt 3.2.2, S. 41). Der Vergleich der ermittelten Kopienzahlen aller untersuchten repetitiven Elemente ergab für die Proben trächtiger Kühe am d 20-23 eine starke Erhöhung ($\geq 2,6$ -fach, $p < 0,005$) gegenüber ihren korrespondierenden Proben am d 0. Zusätzlich wurde ebenfalls ein starker Anstieg (≥ 2 -fach, $p < 0,005$) der Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger Kühe von d 0-3 zu d 40-43 beobachtet. Dabei blieben die Kopienzahlen im gesamten untersuchten Zeitraum innerhalb der nicht-trächtigen Kontrollgruppe konstant. Zusätzlich wurde eine Erhöhung ($p < 0,05$) der Kopienzahlen

in Proben trächtiger Kühe gegenüber Proben nicht-trächtiger Kühe zu d 20-23 beobachtet.

In dieser Analyse wurde demnach eine ansteigende Konzentration von repetitiven CNAs innerhalb der Gruppe „trächtig“ während des Trächtigkeitsverlaufs beobachtet, beginnend vom frühesten Zeitpunkt der Trächtigkeit (d 0-3) bis zur Nidation (d 20-23). Zusätzlich war es möglich zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen am d 20-23 zu unterscheiden.

Die ermittelten Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe von ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) bewertet (siehe Abschnitt 3.2.3, S. 44).

Eine Unterscheidung anhand der ermittelten Kopienzahlen innerhalb der Gruppe „trächtig“ von d 0-3 im Vergleich zu d 20-23 war sehr gut möglich. Bei der Verwendung der ermittelten Cut-off-Werte lag die Rate der falsch positiv bestimmten Kühe (= 1 – Spezifität) bei 0 % bis 8 %. Dabei konnte der Trächtigkeitsstatus in allen Kühen mit Hilfe des Nachweises der 2_3_BovB-Fragmente im qPCR-Experiment richtig zugeordnet werden.

Jedoch ist eine Unterscheidung zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen am d 20-23 nur eingeschränkt möglich. Nur die Kopienzahlen der BovB und Art2A-Fragmente wiesen in dieser Analyse statistisch signifikante Gruppenunterschiede auf. Die Rate der falsch-positiv bestimmten Kühe in den Art2A und BovB-Amplifikationen ist als zu hoch zu betrachten. Bei der Verwendung der ermittelten Cut-off-Werte wurden 25 % bis 37 % der Kühe als trächtig ermittelt, obwohl diese Kühe in Wirklichkeit nicht-trächtig waren. Dabei wies die *Tag*-Kombination 2_3_BovB bei dieser Auswertung die niedrigste Falsch-Positiv-Rate mit 25 % auf.

Die Rate von richtig-negativ bestimmten Kühen (= Spezifität) in den Untersuchten Amplifikationen fällt dabei mäßig gut aus. Es wurden bei der Verwendung der ermittelten Cut-off-Werte 63 % bis 75 % der Kühe als richtig-nicht-trächtig bestimmt. Die *Tag*-Kombination 2_3_BovB wies dabei die höchste Richtig-Negativ-Rate mit 75 % auf.

Nach der ROC-Analyse wäre eine Amplifikation von 2_3_BovB-Fragmenten am besten dazu geeignet, um sowohl eine Entwicklung im Verlauf einer Trächtigkeit von d 0-3 zu d 20-23 zu erkennen, als auch zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23 zu unterscheiden.

Im Vergleich dazu kann mit bereits etablierten biochemischen Methoden der Trächtigkeitsstatus in Kühen zwischen Tag 21 und 30 *p.i.* durch Messung von

Hormon-Konzentrationen in Blut- und Milch-Proben sicher bestimmt werden (Rioux & Rajotte 2004; Friedrich & Holtz 2010).

Zum Beispiel steigt im Verlauf einer Brunst der Progesteron Gehalt parallel mit dem heranwachsenden Gelbkörper (*Corpus luteum*, Cl) an. Im Falle einer Nichtträchtigkeit führt die Rückbildung des Cl zum Abfall der Progesteronkonzentration. Nach der Befruchtung wird Progesteron weiter vom Cl gebildet, um die Implantation vorzubereiten und den Embryo während der Trächtigkeit zu schützen (Niswender *et al.* 2000). Mit der Messung des Progesteron Gehalts am Tag 21 *p.i.* ist die Bestimmung einer Nichtträchtigkeit mit einer Aussagesicherheit von 91 %-100 % möglich (Rioux & Rajotte 2004). Im Gegensatz dazu kann die Aussage „trächtig“ nur mit einer Sicherheit von 59 %-78 % getroffen werden (Pieterse *et al.* 1990). Die geringere Aussagesicherheit für eine Trächtigkeit wird mit embryonalem Früh Tod, gestörter Rückbildung des Cl und einen verkürzten Brunstzyklus in Verbindung gebracht (Ball & Carroll 1963; Abbitt *et al.* 1978; Thurmond & Picanso 1993).

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Trächtigkeitsstatus ist die Messung der PAG-Konzentration (pregnancy-associated glycoprotein) in bovinen Blutproben (Sasser *et al.* 1986). Da in einigen Kühen eine gesteigerte PAG-Sekretion erst ab dem 36. Trächtigkeitstag beginnt, kann eine Trächtigkeit erst am Tag 30 *p.i.* mit einer 90 %igen und am Tag 40 *p.i.* mit einer 100 %igen Sicherheit bestimmt werden (Szenci *et al.* 1998; Friedrich & Holtz 2010).

In dieser Untersuchung wurden durch die Amplifikationen der Art2A und BovB-Fragmente am d 20-23 *p.i.* 63 %-71 % der trächtigen Kühe als richtig-positiv sowie 83 %-86 % der nicht-trächtigen Kühe als richtig-negativ bestimmt. Dabei wies das 2_3_BovB qPCR-Experiment die besten Resultate auf.

Um die Wahrscheinlichkeiten des Ergebnisses „trächtig“ und „nicht-trächtigt“ bei einer möglichen Anwendung der Amplifikationen zu erfassen, wurden positive und negative Vorhersagewerte (PPW, NPW) anhand der ermittelten Sensitivität und Spezifität sowie des Besamungsindex berechnet (Abbildung 20). Dabei beschreibt der Besamungsindex eines Betriebes den Gesamtaufwand an durchgeführten Besamungen für eine Trächtigkeit zur Gesamtanzahl tragender Tiere.

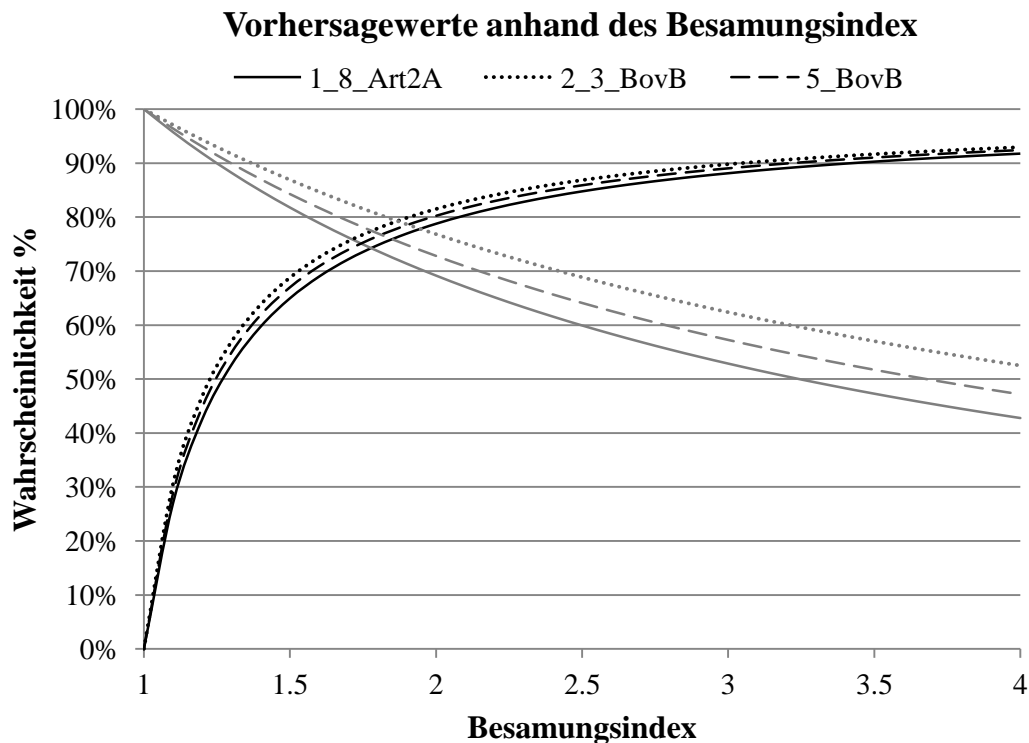


Abbildung 20: Grafische Darstellung der prädiktiven Werte (PPW = grau, NPW = schwarz) für das Ergebnis „nicht-trächtig“ und „trächtig“ am d 20-23 im Zusammenhang mit dem Besamungsindex.

Kühe der Rasse Holstein-Friesian haben in der Regel einen durchschnittlichen Besamungsindex von 2 (Schori 2005). Wird dieser Wert mit der ermittelten Sensitivität und Spezifität korreliert, dann ergibt sich für die Art2A und BovB-Fragmente ein NPW von 79 % bis 82 % und ein PPW von 69 % bis 77 %. Das bedeutet, dass bei einer Anwendung der qPCR-Experimente zur Bestimmung des Trächtigkeitsstatus in einem Betrieb mit einem Besamungsindex von 2, wahrscheinlich um 6 % mehr trächtige Tiere als richtig trächtig bestimmt würden, als vorher angenommen wurde. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses „trächtig“ mit sinkendem Besamungsindex. Im Gegensatz dazu steigt die Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses „nicht-trächtig“ mit steigendem Besamungsindex. Da die Trächtigkeitschancen nach einer Erstbesamung bei etwa 25 % (Besamungsindex = 4) liegen (Friedrich 2006), läge bei der ersten Anwendung die Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses „nicht-trächtig“ bei 92 %.

4.3 SOLiDTM-Sequenzierung methylierter und unmethylierter CNAs

Zur Ermittlung von Veränderungen im Methylierungsgrad während des frühen Verlaufs einer Trächtigkeit wurde die SOLiDTM-Sequenzierung von methylierten und unmethylierten CNAs durchgeführt. Dazu wurde zwischen generierten methylierten und

unmethylierten Sequenzen Verhältnisse gebildet und auf Gruppenunterschiede überprüft (siehe Abschnitt 3.3, S. 45).

Gruppenunterschiede wurden für die bovinen Chromosomen BTA 7 und BTA 8 durch die Bestimmung des Methylierungsgrades ermittelt (siehe Abschnitt 3.3.2, S. 46). Dabei wurde der größte Unterschied im Methylierungsgrad zwischen Sequenzen des BTA 8 von Proben trächtiger Tiere zu d 0-3 und d 36-41 nachgewiesen ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,001$; $p_{\text{korrigiert}} < 0,01$). Dabei stieg im frühen Verlauf der Trächtigkeit die Anzahl an methylierten Sequenzen von d 0-3 zu d 36-41 an. Auf diesem Chromosom ist das bovine Interferon tau (*IFN τ*) lokalisiert (Elsik *et al.* 2009). IFN τ wird von den Trophoblast-Zellen der Blastozyste sezerniert und verhindert dabei zwischen dem 12. und 20. Tag nach der Befruchtung die Luteolyse des Cl. Im Endometrium wird dazu unter dem Einfluss von IFN τ die luteolytische Wirkung von PGF $_{2\alpha}$ durch eine verminderte Ausschüttung von Oxytocin- (OXTR) und Östrogenrezeptoren (ER α) verhindert (Robinson *et al.* 2008). Zusätzlich wird durch IFN τ die Expression einer Reihe von Genen induziert, deren Expression essentiell für die Entwicklung und Implantation des Konzeptus sind (Bauersachs *et al.* 2006).

Gruppenunterschiede im Methylierungsgrad wurden für insgesamt fünf chromosomale 100.000 bp Sequenz-Abschnitte erhalten. Alle erhaltenen Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe der Datenbank für das bovine Genom (NCBI Btau_4.0) auf vorhandene Gene überprüft. Die allgemeinen Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt (Anhang-Tab. 4, S. 70).

Ein verringerter Methylierungsgrad wurde aus Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 im Vergleich zu d 0-3 und den nicht-trächtigen Tieren für insgesamt vier chromosomale Regionen ermittelt ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Der größte Unterschied im Methylierungsgrad wurde dabei zwischen den Sequenzen des BTA 5 von 79,0 Mbp bis 79,1 Mbp aus Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 und nicht-trächtiger Tiere beobachtet ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,001$; $p_{\text{korrigiert}} < 0,01$). In dieser Region ist das Gen *HMOX1* [heme oxygenase (decycling) 1] lokalisiert. Nach Zenclussen *et al.* (2012) führt ein Mangel an Hämoxxygenase-1 bei Mäusen zu einer verspäteten Implantation der Blastozyste an die Uteruswand, einer gestörten Plazentation und fetalem Tod. Zusätzlich wurden von *Hmox*^{-/-}-Mäusen signifikant weniger Oozyten ausgebildet verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (Zenclussen *et al.* 2012).

Ein weiterer Unterschied im Methylierungsgrad wurde von Sequenzen aus Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 verglichen mit d 0-3 und nicht-trächtiger Tiere für die chromosomale Region des BTA 19 von 17,4 Mbp bis 17,5 Mbp beobachtet

($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,01$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). In dieser Region ist das Gen *PSMD11* [proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11] lokalisiert. Das 26S-Proteasom ist essentiell an der Eizellreifung beteiligt, wobei es mit der Meiose assoziiert ist (Holt *et al.* 2010).

In einer weiteren Analyse wurden Gruppenunterschiede im Methylierungsgrad für insgesamt drei Gene erhalten (siehe Abschnitt 3.3.3, S. 48). Dabei wurde ein verringerter Methylierungsgrad in Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 im Vergleich zu d 0-3 und nicht-trächtiger Tiere für Sequenzen des Gens *ERC1* (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1; BTA 5) beobachtet ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Das Protein ERC1 wurde als normaler Bestandteil des humanen Fruchtwassers aus der 17. Schwangerschaftswoche detektiert. Dieses Protein könnte im Verlauf einer Schwangerschaft sowohl in unterschiedlichen maternalen und fetalen Geweben exprimiert werden (Tsangaris *et al.* 2006).

In Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 wurde für das Gen *PDXK* [pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase; BTA 1] ein höherer Methylierungsgrad beobachtet, verglichen mit d 0-3 und nicht-trächtiger Tiere ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Die Expression von *PDXK* wird nach Shimizu *et al.* (2010) im bovinen Endometrium ausschließlich durch Östrogen induziert und ist im Rahmen des Entwicklungsprozesses des Embryos sowohl in die Initiierung der Mitose als auch in die Proliferation der Gebärmutter Schleimhaut involviert. Zusätzlich wurde das bovine *PDXK* im Histotrophe (Nährflüssigkeit) am Tag 13 des Östruszyklus angereichert gefunden. Dabei wird Vitamin B6 ausschließlich maternal exprimiert und ist essentiell für normales fetales Wachstum und die fetale Entwicklung (Mullen *et al.* 2012).

Ein höherer Methylierungsgrad von Sequenzen in Proben trächtiger Tiere zu d 36-41 im Vergleich zu d 0-3 und nicht-trächtiger Tiere wurde für das Gen *MATK* (megakaryocyte-associated tyrosine kinase; BTA 7) detektiert ($p_{\text{unkorrigiert}} < 0,05$; $p_{\text{korrigiert}} > 0,05$). Belot *et al.* (2007) beschrieben, dass unter Einfluss von Progesteron *MATK* in humanen Mastzellen angereichert, dadurch ihre Zellproliferation und somit die körpereigene Immunabwehr gemindert wird.

Im Rahmen der Auswertungen zum Methylierungsgrad generierter Sequenzen war es mehrfach notwendig die Alternativhypothesen nach der Bonferroni-Korrektur der p-Werte zu verwerfen. Dabei wurden zugunsten des Fehlers zweiter Art die Gruppenunterschiede explorativ beschrieben. Aufgrund der begrenzten Gruppengrößen (trächtig zu d 0-3 und d 36-41, N = 12; nicht-trächtig, N = 26) und der hohen Anzahl an

statistischen Tests war häufig nur eine Darstellung eines Trends möglich. Nach Victor *et al.* (2010) sollten explorativ beschriebene Ergebnisse nicht schlechter bewertet werden als „signifikant“ dargestellte Ergebnisse, bei denen das multiple Testen nicht beachtet wurde.

4.4 Fazit und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal mit Methoden der Next-Generation-Sequencing die genomweiten Verteilungen von CNAs aus trächtigen und nicht-trächtigen Kühen untersucht. Dazu wurden die genomischen Verteilungen von CNAs und deren Positionen innerhalb der bovinen Chromosomen mit Hilfe eines modifizierten SAGE-Verfahrens und anschließender 454-Sequenzierung bestimmt. Die Ergebnisse aus der 454-Sequenzierung konnten mit Hilfe von qPCR-Reaktionen bestätigt werden. Ein weiterer Aspekt lag in der Untersuchung der Methylierungsmuster mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und der SOLiDTM-Sequenzierung.

Bei der Analyse der 454-Sequenzierungsdaten konnten *Tag*-Treffer bestimmten chromosomalen Bereichen, sowie repetitiven Elementen des bovinen Genoms zugeordnet und schließlich mit den Entwicklungsprozessen im Verlauf einer Trächtigkeit gegenübergestellt werden. Die Validierung der repetitiven *Tag*-Kombinationen mit nativen CNAs von 12 trächtigen und 16 nicht-trächtigen Kühen zu den Entnahmetagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43 *p.i.* ergab signifikante Gruppenunterschiede. Die Bewertung der qPCR-Ergebnisse durch die ROC-Analyse zeigten für die Art2A und BovB-Fragmente am d 20-23 *p.i.* eine Richtig-Positiv-Rate von 63 %-71 % der trächtigen Kühe sowie eine Richtig-Negativ-Rate von 83 %-86 %. Dabei wies das 2_3_BovB qPCR-Experiment die besten Resultate auf. Eine Anwendung dieser *Tag*-Kombinationen als Biomarker wäre jedoch für eine verlässliche Trächtigkeitsbestimmung noch zu ungenau. Jedoch kann der Einsatz im Verhältnis zum Besamungsindex eine Aussage „nicht-trächtig“ ermöglichen. Eine zweite Validierung mit einer deutlich höheren Stichprobenzahl an Tieren müsste durchgeführt werden, um die Aussagekraft dieser qPCR-Ergebnisse zu verifizieren. Zusätzlich sollten Serum-Proben aus den Zeiträumen zwischen d 0 und d 21 mit Hilfe der *Tag*-Kombinationen quantifiziert werden, um einen möglichst frühen Zeitpunkt für eine Trächtigkeitsbestimmung zu erhalten. Eine Anwendung dieser Biomarker für eine frühzeitige Bestimmung des Trächtigkeitsstatus bei Hausrindern sollte deutlich vor Ablauf des 21-tägigen Brunstzyklus erfolgen, damit eine erneute und zeitnahe Besamung im Falle einer Nicht-Trächtigkeit erfolgen kann.

Die Auswertung der SOLiD™-CNA-Sequenzierungsdaten zeigte sowohl in chromosomalen 100.000 bp Sequenz-Abschnitten als auch innerhalb spezifischer Gen-Sequenzen Unterschiede in der Ausprägung des Methylierungsgrades der Sequenz-Treffer. Innerhalb der fünf chromosomalen 100.000 bp-Fenster wurden zehn Gene identifiziert. Zwei Gene konnten eindeutig mit Entwicklungsprozessen während des Trächtigkeitsverlaufes assoziiert werden. Zusätzlich wurden insgesamt drei Gene identifiziert, deren DNA-Modifikation maßgeblich mit einer Trächtigkeit in Verbindung stehen. Eine quantitative Validierung dieser Ergebnisse kann dabei durch methylierungs-spezifische PCRs (QMSP, MethyLight) nach einer Bisulfit-Konversion erfolgen (Laird 2003).

5 Zusammenfassung

Zirkulierende Nukleinsäuren (CNAs) sind sowohl DNA, als auch RNA-Moleküle, die im Blutkreislauf von gesunden und erkrankten Individuen als freie oder in Mikrovesikeln verpackte Nukleinsäuren existieren.

In dieser Arbeit wurden CNA-Profile im Serum trächtiger und nicht-trächtiger Kühe zu einem frühen Zeitpunkt *post inseminationem* (*p.i.*) erstellt. Dabei sollten diese CNAs als potentielle Biomarker die molekulargenetischen Differenzierungsprozesse im reproduktiven Gewebe widerspiegeln.

Die CNAs wurden mit einem modifizierten SuperSAGE-Verfahren (Serial Analysis of Gene Expression) aufbereitet. Dabei wurden kurze Sequenzabschnitte (*Tags*) generiert und anschließend mit dem Roche/454 GS-FLX Titanium sequenziert.

Die Auswertung der 454-Sequenzierungsdaten ergab in der Verteilung der *Tag*-Treffer auf definierten Bereichen der bovinen Chromosomen, sowie auf repetitiven Elementen signifikante Unterschiede zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe. Die anschließende Validierung der repetitiven *Tag*-Sequenzen bestätigten diese Gruppenunterschiede. Mit Hilfe der ROC-Analyse wurden die qPCR-Ergebnisse bewertet. Dabei wurden für die Art2A und BovB-Fragmente am d 20-23 *p.i.* eine Richtig-Positiv-Rate von 63 %-71 % der trächtigen Kühe sowie eine Richtig-Negativ-Rate von 83 %-86 % ermittelt. Die besten Resultate wies dabei das 2_3_BovB qPCR-Experiment auf.

Zusätzlich erfolgte eine epigenetische Untersuchung der CNA-Methylierungsmuster mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und der SOLiDTM-Sequenzierung.

Die Analyse der SOLiDTM-Sequenzierungsdaten ergab für den frühen Trächtigkeitsverlauf Unterschiede im Methylierungsgrad von Sequenz-Treffern innerhalb von definierten chromosomalen Regionen und in Gen-Bereichen. Dabei wurden Gene ermittelt, die mit Entwicklungsprozessen während des Trächtigkeitsverlaufes assoziiert werden konnten.

Insgesamt konnten spezifische CNA-Fragmente identifiziert werden, die mit einer Trächtigkeit assoziiert sind und mit großer Wahrscheinlichkeit vom wachsenden Gewebe der Plazenta entstammten.

6 Summary

Circulating nucleic acids (CNAs) are specified as DNAs and RNAs outside cells that are circulating in the blood free or wrapped in membrane vesicles of healthy and diseased individuals.

In this study CNA profiles from serum samples of pregnant and non-pregnant dairy cows were generated for early days post fertilization (dpf). These CNAs should be used as potential biomarkers reflecting the molecular genetic mechanisms in cellular differentiation of the reproductive tissues.

CNAs were preprocessed using a modified SuperSAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique. Short sequence tags were generated and sequenced by using Roche/454 GS-FLX Titanium application.

Analysis of the 454 data revealed significant differences for the distribution of tag hits at specific chromosomal regions as well as for repetitive elements. Using specific LINE/SINE repeats qPCR by combining distinct tag sequences in one assay the observed differences during pregnancy were confirmed. ROC analysis was used to evaluate the qPCR results. At 20-23 dpf the Art2A and BovB assays showed a sensitivity of 63 %-71 % and a specificity of 83 %-86 %, respectively. The best performing results were obtained for tag 2 and tag 3 combination of the BovB repeat (2_3_BovB qPCR).

Additionally, methylation patterns were detected by endonuclease restriction and SOLiDTM sequencing. This epigenetic approach characterized pregnancy associated CNA profiles in cows.

The analysis of SOLiDTM sequencing data showed significant group differences regarding methylation grade of sequence hits at well-defined chromosomal regions and gene sequences. This analysis led to the identification of genes, clearly associated with processes of developments during the course of pregnancy.

In summary specific CNA fragment were identified, which are associated with pregnancy and originate most likely from growing placental tissues.

7 Anhang: Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

Anhang-Tab. 1: Tabellarische Auflistung der chromosomalen Regionen sowie der Gene innerhalb dieser Regionen des bovinen Genoms auf denen signifikante Gruppenunterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer detektiert wurden nach NCBI Btau_4.0. Die Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt. Mbp = Megabasenpaar, BTA = bovines Chromosom, d = Tag.

Erhöhte <i>Tag</i> -Konzentration				
Regionen	Tag	p-Wert	Gen	Gen-Funktion
BTA 7: 43,5-44,0 Mbp	d 0	0,005	<i>ATP8B3</i>	Hydrolase-Aktivität
			<i>REXO1</i>	Nukleinsäurebindung
			<i>FAM108A</i>	Hydrolase-Aktivität
			<i>SCAMP4</i>	Proteintransport
			<i>CSNK1G2</i>	Protein-Phosphorylierung
BTA 17: 11,0-11,5 Mbp	d 0	0,050	<i>ARHGAP10</i>	Signaltransduktion
			<i>PRMT10</i>	Protein-Methylierung
			<i>TMEM184C</i>	-
			<i>EDNRA</i>	Signaltransduktion
BTA 4: 4,5-5,0 Mbp	d 20	0,028	<i>COBL</i>	Schluss des Neuralrohres
BTA 4: 17,5-18,0 Mbp	d 20	0,013	-	-
BTA 13: 60,0-60,5 Mbp	d 20	0,009	<i>TFAP2C</i>	Transkriptionsregulation
			<i>C13H20orf106</i>	-
			<i>C13H20orf43</i>	-
			<i>CSTF1</i>	Molekulare Funktion
			<i>AURKA</i>	Protein-Phosphorylierung
			<i>C13H20orf108</i>	-
BTA 20: 62,5-63,0 Mbp	d 20	0,016	-	-
Verringerte <i>Tag</i> -Konzentration				
Regionen	Tag	p-Wert	Gene	Gen-Funktion
BTA 1: 117,0-117,5 Mbp	d 0	0,021	<i>RAP2B</i>	Signaltransduktion
			<i>MBNL1</i>	Nukleinsäurebindung
BTA 24: 2,0-2,5 Mbp	d 0	0,0002	<i>MBP</i>	Molekulare Funktion
BTA 9: 79,5-80,0 Mbp	d 20	0,019	-	-
BTA 14: 20,0-20,5 Mbp	d 20	0,042	<i>SNTG1</i>	Phospholipidbindung
BTA 18: 28,0-28,5 Mbp	d 20	0,025	-	-
BTA 26: 2,0-2,5 Mbp	d 20	0,002	<i>ZWINT</i>	Zellteilung
BTA 29: 11,0-11,5 Mbp	d 20	0,002	-	-
BTA 29: 18,5-19,0 Mbp	d 20	0,027	<i>NARS2</i>	Nukleinsäurebindung
			<i>ALG8</i>	Transferase-Aktivität
			<i>KCTD21</i>	Ionen-Transport
			<i>NDUFC2</i>	Molekulare Funktion
			<i>THRSP</i>	Protein-Homodimerisation
			<i>INTS4</i>	Proteinbindung
BTA 4: 102,0-102,5 Mbp	d 40	0,014	<i>CALD1</i>	Muskelkontraktion
			<i>BPGM</i>	Transferase-Aktivität
			<i>AGBL3</i>	Proteolyse
			<i>TMEM140</i>	-

Anhang-Tab. 2: Zusammenfassung der beobachteten intergenischen *Tag*-Sequenzen und dessen Platzierung auf dem bovinen Genom nach NCBI Btau_4.6.1. Bp = Basenpaar.

Tag-Nummer (bp)	Tag-Sequenz	Chromosom	Contig
<i>Tag</i> 14 (25 bp)	CATGCAATTCCTCAGCTGAATCCTA	11	NW_001492939.3
<i>Tag</i> 18 (26 bp)	CATGCCATAATATGATATGCACAAG	24	NW_001494230.2
<i>Tag</i> 24 (25 bp)	CATGCTGTCCCATTTCTCATCAGCA	8	NW_001495469.3
<i>Tag</i> 28 (25 bp)	CATGGAAATGTTATGGATGAGAAAG	17	NW_001493516.3
<i>Tag</i> 41 (25 bp)	CATGGGGCCTATGGAAGCCCTGATG	X	NW_001508726.3
<i>Tag</i> 47 (25 bp)	CATGGTCAATGCCCCATTCATTGTC	3	NW_001494723.3
<i>Tag</i> 65 (26 bp)	CATGTTTCATAGGGCGTGTATCCCAG	2	NW_001494701.3

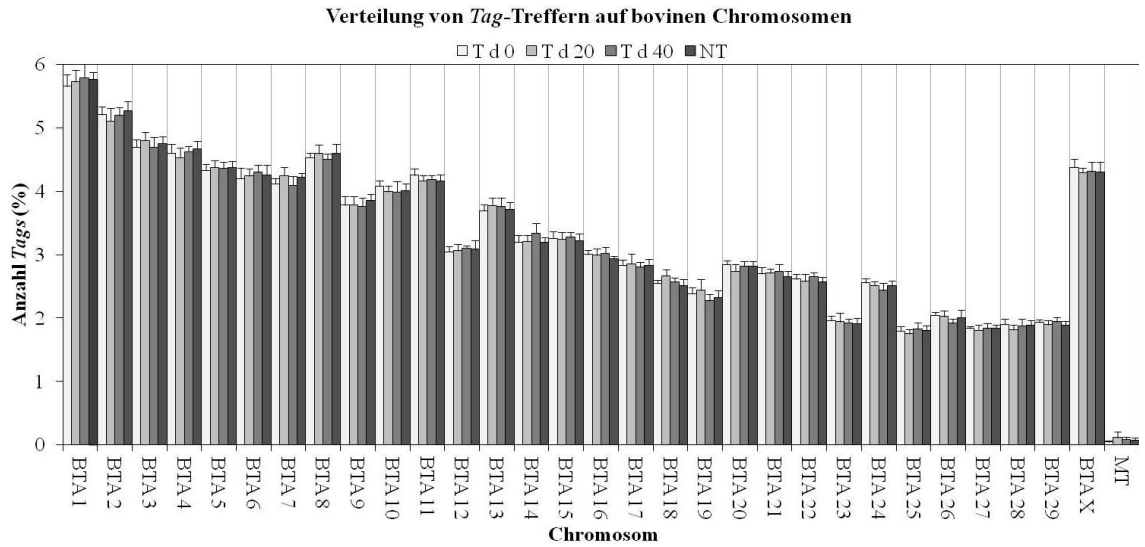
Anhang-Tab. 3: Zusammenfassung der beobachteten repetitive *Tag*-Sequenzen und deren Zuordnung zu den unterschiedlichen repetitiven Elementen nach Repbase ver.12.09. Bp = Basenpaar.

Tag-Nummer (bp)	Tag-Sequenz	Repetitives Element (Klasse)
<i>Tag</i> 1 (25 bp)	CATGAATCACAGCACACCAGGCCTC	Art2A (SINE)
<i>Tag</i> 2 (26 bp)	CATGCAAAGATGGACACAATAAAAGG	BovB (LINE)
<i>Tag</i> 3 (25 bp)	CATGCAAAGATGGGCTCAATAAAGG	BovB (LINE)
<i>Tag</i> 4 (25 bp)	CATGCCACCCACAACCCAAACACAC	unbekannt
<i>Tag</i> 5 (25 bp)	CATGGAATACAGAATGAAGCAGGGC	BovB (LINE)
<i>Tag</i> 6 (25 bp)	CATGGACGGAGGAGCCTGGTAGGCT	BovA2 (SINE)
<i>Tag</i> 7 (25 bp)	CATGGCAAATATATGGGGAAACAAT	BovB (LINE)
<i>Tag</i> 8 (26 bp)	CATGGGGTCACAAAGAGTGGGACAGG	Art2A (SINE)
<i>Tag</i> 9 (25 bp)	CATGGGGTCCCCTGAGGTACAGGTT	FordPrefect (Tip100)
<i>Tag</i> 10 (26 bp)	CATGGGGTTGCAAAGAGTTGGACACG	BovA2 (SINE)
<i>Tag</i> 11 (26 bp)	CATGGGGTTGCAAAGAGTTGGACAC	Bov-tA2 (SINE)
<i>Tag</i> 12 (26 bp)	CATGTCATTTGCAAACAGTGAGAGTT	L1MEf (LINE/L1)
<i>Tag</i> 13 (26 bp)	CATGTCCCCTGCATTGGCAGGCAGAC	CHR-2, CHR-2B (SINE)

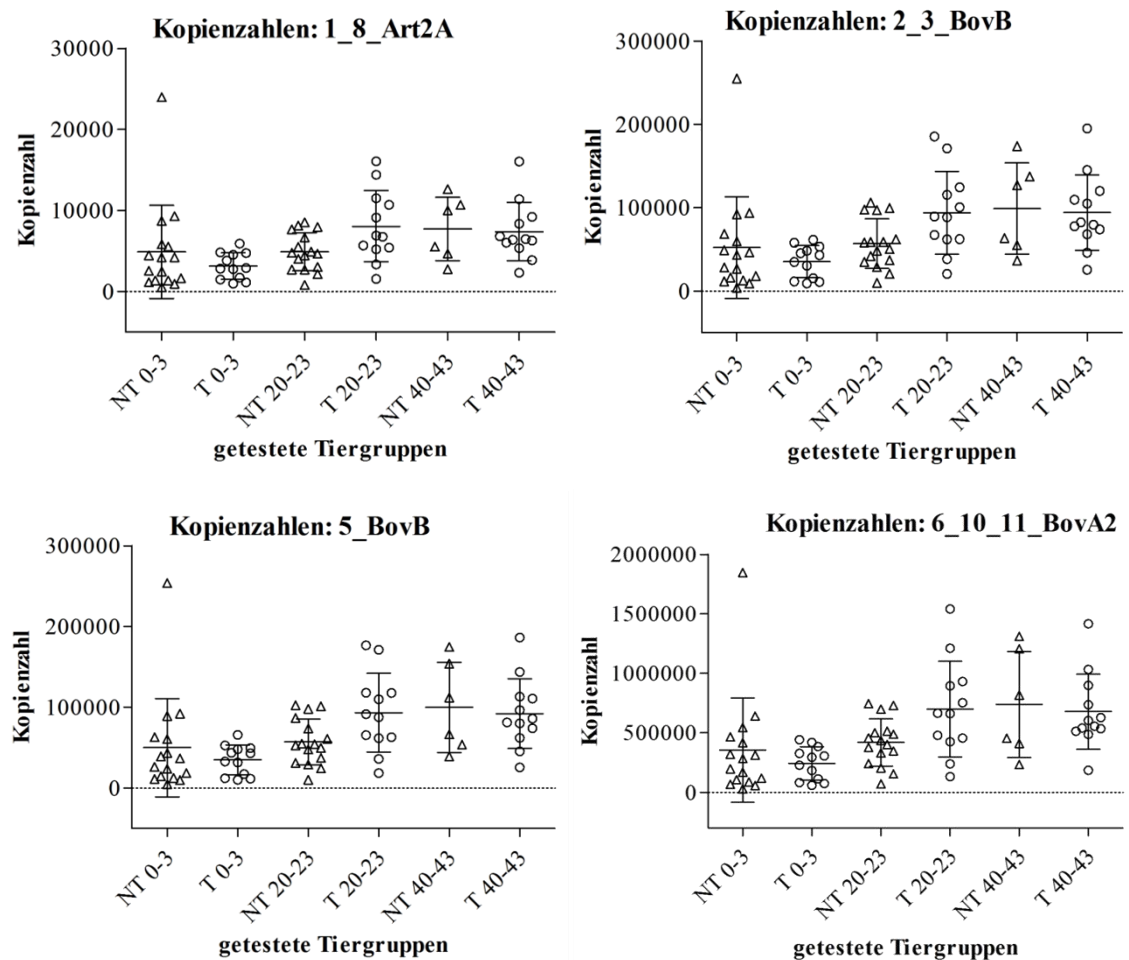
70 | Anhang: Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

Anhang-Tab. 4: Tabellarische Auflistung der Regionen boviner Chromosomen, die Unterschiede im Methylierungsgrad generierter Sequenzen in Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe aufwiesen. Es wurden die Gene in den Regionen und die Anzahlen von der enzymatischen Erkennungssequenz „CCCGGG“ nach NCBI Btau_4.0 aufgelistet. Die Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt. BTA = bovines Chromosom, Mbp = Megabasenpaar, d = Tag, T = trächtig, NT = nicht-trächtig, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $p_{\text{unkorrigiert}}$ = p-Wert nach t-Test, $p_{\text{korrigiert}}$ = p-Wert korrigiert nach Bonferroni.

Regionen	Anzahl „CCCGGG“	Methylierungsgrad in $\bar{x} \pm s$			T d 0-3 vs. d 36-41		T d 36-41 vs. NT		Gen	Gen-Funktion
		T d 0-3	T d 36-41	NT	$p_{\text{unkorrigiert}}$	$p_{\text{korrigiert}}$	$p_{\text{unkorrigiert}}$	$p_{\text{korrigiert}}$		
BTA 5: 79,0-79,1 Mbp	27	0,71 ± 0,25	0,32 ± 0,18	0,74 ± 0,25	0,002	> 0,050	0,000	0,003	<i>HMGXB4</i>	DNA-Bindung
									<i>TOM1</i>	Proteintransport
									<i>HMOX1</i>	Signaltransduktion
									<i>MCM5</i>	DNA-Bindung
BTA 18: 63,0-63,1 Mbp	37	0,75 ± 0,27	0,46 ± 0,26	0,73 ± 0,27	0,007	> 0,050	0,008	> 0,050	<i>LOC407171</i>	-
									<i>LOC790101</i>	-
BTA 19: 17,4-17,5 Mbp	26	0,54 ± 0,34	0,92 ± 0,13	0,71 ± 0,31	0,003	> 0,050	0,004	> 0,050	<i>MYO1D</i>	Nukleotidbindung
									<i>CDK5R1</i>	Phosphorylierung
									<i>PSMD11</i>	Zellzyklus
BTA X: 48,3-48,4 Mbp	13	0,77 ± 0,22	0,48 ± 0,14	0,64 ± 0,21	0,004	> 0,050	0,010	> 0,050	-	-
BTA X: 84,4-84,5 Mbp	3	0,96 ± 0,09	0,60 ± 0,35	0,84 ± 0,18	0,009	> 0,050	0,046	> 0,050	<i>LOC100851297</i>	-

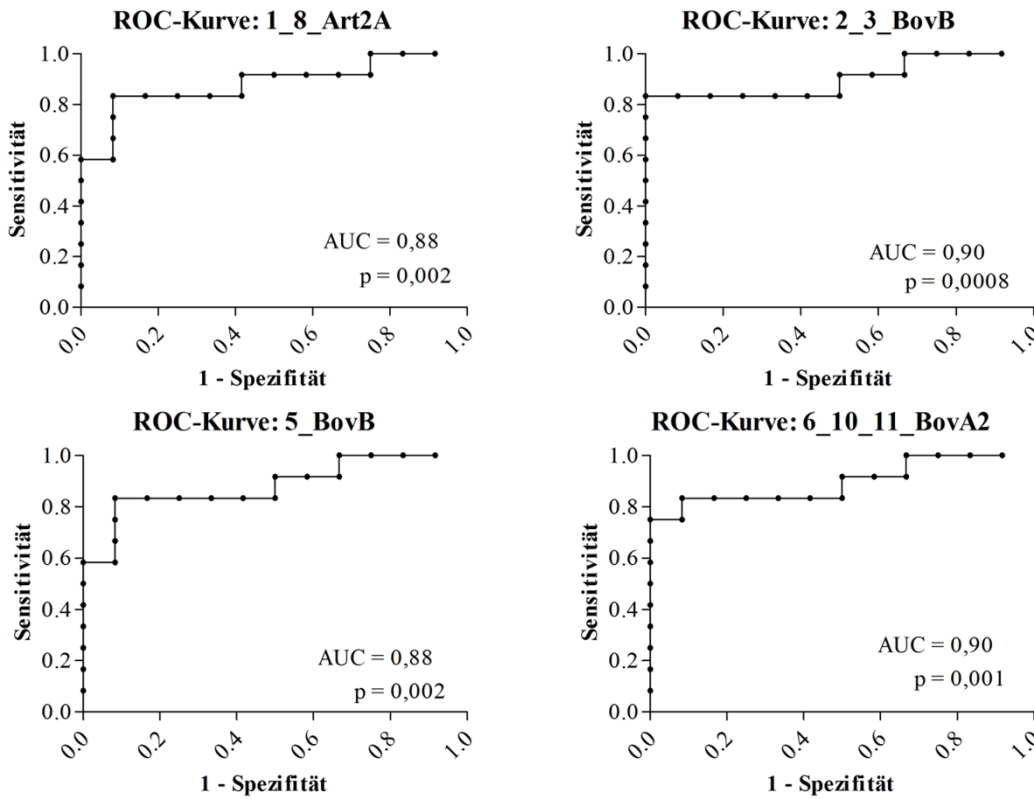


Anhang-Abb. 1: Grafische Darstellung der Verteilung der Tag-Treffer von Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe (Säulen). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. BTA bovines Chromosom, MT = mtDNA.

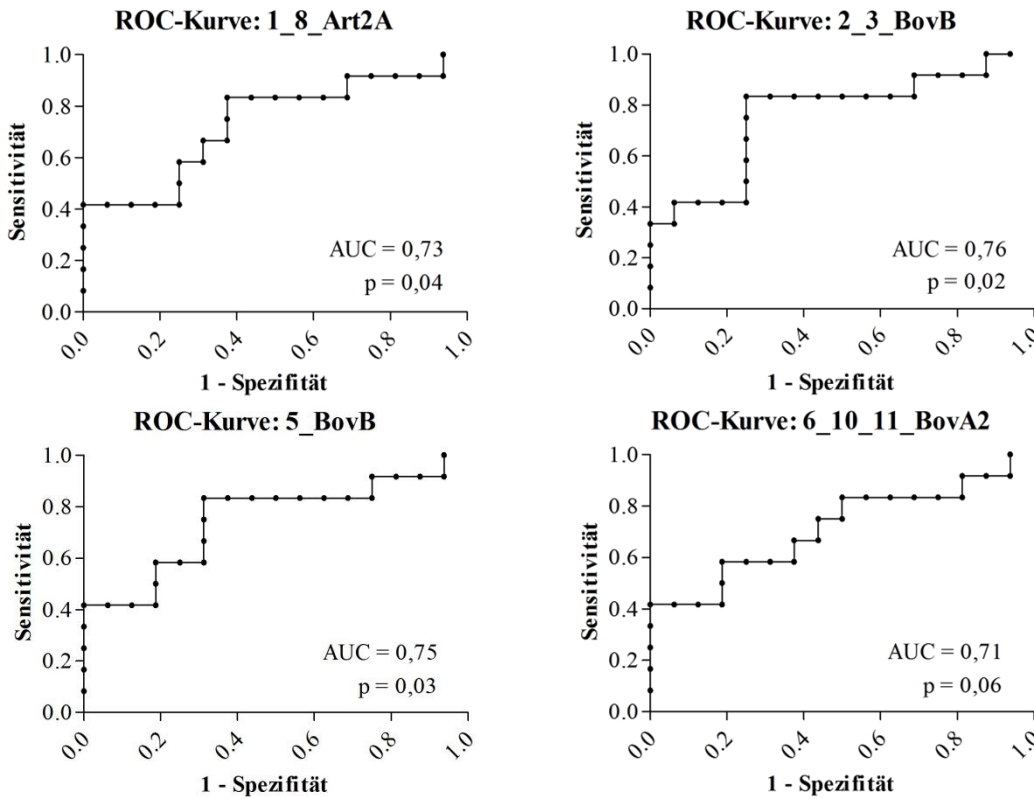


Anhang-Abb. 2: Grafische Darstellung der beobachteten Kopienzahlen in Proben von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen zu den einzelnen Entnahmetagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43. Die Standardabweichung wird durch die Whisker dargestellt. Signifikante Gruppenunterschiede sind unter Abschnitt 3.2.2 (S. 41) erklärt und dargestellt. D = Tag.

ROC-Kurven zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen in Proben trächtiger Kühe von d 0-3 zu d 20-23.



ROC-Kurven zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23.



Anhang-Abb. 3: Darstellung der ROC-Kurven zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen von d 0-3 bis d 20-23 in Proben trächtiger Kühe, sowie zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23. D = Tag, AUC = Area under the ROC curve, p = Signifikanz.

8 Literaturverzeichnis

- Abbitt B., Ball L., Kitto G. P., Sitzman C. G., Wilgenburg B., Raim L. W., Seidel G. E., Jr. (1978) **Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows.** *J Am Vet Med Assoc* 173: 973-977.
- Adelson D. L., Raison J. M., Edgar R. C. (2009) **Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12855-12860.
- Aston K. I., Li G. P., Hicks B. A., Winger Q. A., White K. L. (2009) **Genetic reprogramming of transcription factor ap-2gamma in bovine somatic cell nuclear transfer preimplantation embryos and placentomes.** *Cloning Stem Cells* 11: 177-186.
- Ball L., Carroll E. J. (1963) **Induction of fetal death in cattle by manual rupture of the amniotic vesicle.** *J Am Vet Med Assoc* 142: 373-374.
- Ballestar E., Esteller M. (2002) **The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing.** *Carcinogenesis* 23: 1103-1109.
- Bauersachs S., Ulbrich S. E., Gross K., Schmidt S. E., Meyer H. H., Einspanier R., Wenigerkind H., Vermehren M., Blum H., Sinowatz F., Wolf E. (2005) **Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes.** *J Mol Endocrinol* 34: 889-908.
- Bauersachs S., Ulbrich S. E., Gross K., Schmidt S. E., Meyer H. H., Wenigerkind H., Vermehren M., Sinowatz F., Blum H., Wolf E. (2006) **Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity.** *Reproduction* 132: 319-331.
- Beck J., Urnovitz H., Wemheuer W., Brenig B., Schütz E. (2008) **Profile of the Circulating DNA in Healthy Cattle.** In: *31st Conference of the International Society of Animal Genetics*. Amsterdam, The Netherlands.
- Beck J., Urnovitz H. B., Mitchell W. M., Schütz E. (2010) **Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls.** *Mol Cancer Res* 8: 335-342.

- Beck J., Urnovitz H. B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. (2009) **Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals.** *Clin Chem* 55: 730-738.
- Belot M. P., Abdennebi-Najar L., Gaudin F., Emilie D., Machelon V. (2007) **Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation.** *J Cell Biochem* 102: 1271-1280.
- Bewick V., Cheek L., Ball J. (2004) **Statistics review 13: receiver operating characteristic curves.** *Crit Care* 8: 508-512.
- Binns D., Dimmer E., Huntley R., Barrell D., O'Donovan C., Apweiler R. (2009) **QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching.** *Bioinformatics* 25: 3045-3046.
- Black S. G., Arnaud F., Palmarini M., Spencer T. E. (2010) **Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development.** *Am J Reprod Immunol* 64: 255-264.
- Brenig B., Schütz E., Urnovitz H. (2002) **Cellular nucleic acids in serum and plasma as new diagnostic tools.** *Berl Munch Tierarztl* 115: 122-124.
- Chim S. S., Tong Y. K., Chiu R. W., Lau T. K., Leung T. N., Chan L. Y., Oudejans C. B., Ding C., Lo Y. M. (2005) **Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14753-14758.
- Core N., Caubit X., Metchat A., Boned A., Djabali M., Fasano L. (2007) **Tshz1 is required for axial skeleton, soft palate and middle ear development in mice.** *Dev Biol* 308: 407-420.
- Cowley D. O., Rivera-Perez J. A., Schliekelman M., He Y. J., Oliver T. G., Lu L., O'Quinn R., Salmon E. D., Magnuson T., Van Dyke T. (2009) **Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development.** *Mol Cell Biol* 29: 1059-1071.
- Deligezer U., Akisik E. E., Erten N., Dalay N. (2008) **Sequence-specific histone methylation is detectable on circulating nucleosomes in plasma.** *Clin Chem* 54: 1125-1131.
- Elsik C. G., Tellam R. L., Worley K. C., Gibbs R. A., Muzny D. M., Weinstock G. M., Adelson D. L., Eichler E. E., Elnitski L., Guigo R., Hamernik D. L., Kappes S. M., Lewin H. A., Lynn D. J., Nicholas F. W., Reymond A., Rijnkels M., Skow L. C., Zdobnov E. M., Schook L., Womack J., Alioto T., Antonarakis S. E., Astashyn A., Chapple C. E., Chen H. C., Chrast J., Camara F., Ermolaeva O., Henrichsen C. N., Hlavina W., Kapustin Y., Kiryutin B., Kitts P., Kokocinski F.,

Landrum M., Maglott D., Pruitt K., Sapojnikov V., Searle S. M., Solovyev V., Souvorov A., Ucla C., Wyss C., Anzola J. M., Gerlach D., Elhaik E., Graur D., Reese J. T., Edgar R. C., McEwan J. C., Payne G. M., Raison J. M., Junier T., Kriventseva E. V., Eyraas E., Plass M., Donthu R., Larkin D. M., Reecy J., Yang M. Q., Chen L., Cheng Z., Chitko-McKown C. G., Liu G. E., Matukumalli L. K., Song J., Zhu B., Bradley D. G., Brinkman F. S., Lau L. P., Whiteside M. D., Walker A., Wheeler T. T., Casey T., German J. B., Lemay D. G., Maqbool N. J., Molenaar A. J., Seo S., Stothard P., Baldwin C. L., Baxter R., Brinkmeyer-Langford C. L., Brown W. C., Childers C. P., Connelley T., Ellis S. A., Fritz K., Glass E. J., Herzig C. T., Iivanainen A., Lahmers K. K., Bennett A. K., Dickens C. M., Gilbert J. G., Hagen D. E., Salih H., Aerts J., Caetano A. R., Dalrymple B., Garcia J. F., Gill C. A., Hiendleder S. G., Memili E., Spurlock D., Williams J. L., Alexander L., Brownstein M. J., Guan L., Holt R. A., Jones S. J., Marra M. A., Moore R., Moore S. S., Roberts A., Taniguchi M., Waterman R. C., Chacko J., Chandrabose M. M., Cree A., Dao M. D., Dinh H. H., Gabisi R. A., Hines S., Hume J., Jhangiani S. N., Joshi V., Kovar C. L., Lewis L. R., Liu Y. S., Lopez J., Morgan M. B., Nguyen N. B., Okwuonu G. O., Ruiz S. J., Santibanez J., Wright R. A., Buhay C., Ding Y., Dugan-Rocha S., Herdandez J., Holder M., Sabo A., Egan A., Goodell J., Wilczek-Boney K., Fowler G. R., Hitchens M. E., Lozado R. J., Moen C., Steffen D., Warren J. T., Zhang J., Chiu R., Schein J. E., Durbin K. J., Havlak P., Jiang H., Liu Y., Qin X., Ren Y., Shen Y., Song H., Bell S. N., Davis C., Johnson A. J., Lee S., Nazareth L. V., Patel B. M., Pu L. L., Vattathil S., Williams R. L., Jr., Curry S., Hamilton C., Sodergren E., Wheeler D. A., Barris W., Bennett G. L., Eggen A., Green R. D., Harhay G. P., Hobbs M., Jann O., Keele J. W., Kent M. P., Lien S., McKay S. D., McWilliam S., Ratnakumar A., Schnabel R. D., Smith T., Snelling W. M., Sonstegard T. S., Stone R. T., Sugimoto Y., Takasuga A., Taylor J. F., Van Tassell C. P., Macneil M. D., Abatepaulo A. R., Abbey C. A., Ahola V., Almeida I. G., Amadio A. F., Anatriello E., Bahadue S. M., Biase F. H., Boldt C. R., Carroll J. A., Carvalho W. A., Cervelatti E. P., Chacko E., Chapin J. E., Cheng Y., Choi J., Colley A. J., de Campos T. A., De Donato M., Santos I. K., de Oliveira C. J., Deobald H., Devinoy E., Donohue K. E., Dovc P., Eberlein A., Fitzsimmons C. J., Franzin A. M., Garcia G. R., Genini S., Gladney C. J., Grant J. R., Greaser M. L., Green J. A., Hadsell D. L., Hakimov H. A., Halgren R., Harrow J. L., Hart E. A., Hastings N., Hernandez M., Hu Z. L., Ingham A., Iso-Touru T., Jamis C., Jensen

- K., Kapetis D., Kerr T., Khalil S. S., Khatib H., Kolbehdari D., Kumar C. G., Kumar D., Leach R., Lee J. C., Li C., Logan K. M., Malinverni R., Marques E., Martin W. F., Martins N. F., Maruyama S. R., Mazza R., McLean K. L., Medrano J. F., Moreno B. T., More D. D., Muntean C. T., Nandakumar H. P., Nogueira M. F., Olsaker I., Pant S. D., Panzitta F., Pastor R. C., Poli M. A., Poslusny N., Rachagani S., Ranganathan S., Razpet A., Riggs P. K., Rincon G., Rodriguez-Ororio N., Rodriguez-Zas S. L., Romero N. E., Rosenwald A., Sando L., Schmutz S. M., Shen L., Sherman L., Southey B. R., Lutzow Y. S., Sweedler J. V., Tammen I., Telugu B. P., Urbanski J. M., Utsunomiya Y. T., Verschoor C. P., Waardenberg A. J., Wang Z., Ward R., Weikard R., Welsh T. H., Jr., White S. N., Wilming L. G., Wunderlich K. R., Yang J., Zhao F. Q. (2009) **The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution.** *Science* 324: 522-528.
- Enders A. C., Carter A. M. (2004) **What can comparative studies of placental structure tell us?--A review.** *Placenta* 25 Suppl A: S3-9.
- Fan H. C., Blumenfeld Y. J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S. R. (2008) **Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16266-16271.
- Fleischhacker M., Schmidt B. (2007) **Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey.** *Biochim Biophys Acta* 1775: 181-232.
- Forde N., Carter F., Spencer T. E., Bazer F. W., Sandra O., Mansouri-Attia N., Okumu L. A., McGettigan P. A., Mehta J. P., McBride R., O'Gaora P., Roche J. F., Lonergan P. (2011) **Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?** *Biol Reprod* 85: 144-156.
- Forsberg E. C., Bresnick E. H. (2001) **Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world.** *Bioessays* 23: 820-830.
- Fricke P. M. (2002) **Scanning the future--ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle.** *J Dairy Sci* 85: 1918-1926.
- Friedrich M. (2006) **Enzymimmunologischer Nachweis von "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG) als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind.** Göttingen: Georg August Universität.
- Friedrich M., Holtz W. (2010) **Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection.** *Reprod Domest Anim* 45: 142-146.

- Gahan P. B., Stroun M. (2010) **The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger.** *Cell Biochem Funct* 28: 529-538.
- Gordon P. M., Schütz E., Beck J., Urnovitz H. B., Graham C., Clark R., Dudas S., Czub S., Sensen M., Brenig B., Groschup M. H., Church R. B., Sensen C. W. (2009) **Disease-specific motifs can be identified in circulating nucleic acids from live elk and cattle infected with transmissible spongiform encephalopathies.** *Nucleic Acids Res* 37: 550-556.
- Grunert E., Berchthold M. (1999) **Fertilitätsstörung beim weiblichen Rind.** Berlin: Parey Buchverlag.
- Hashizume K. (2007) **Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine.** *J Reprod Dev* 53: 1-11.
- Holdenrieder S., Nagel D., Schalhorn A., Heinemann V., Wilkowski R., von Pawel J., Raith H., Feldmann K., Kremer A. E., Muller S., Geiger S., Hamann G. F., Seidel D., Stieber P. (2008) **Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer.** *Ann N Y Acad Sci* 1137: 180-189.
- Holford N. C., Ramoutar A., Butt A. N., Swaminathan R. (2008) **Normalization of circulating nucleic acid results.** *Ann N Y Acad Sci* 1137: 112-118.
- Holt J. E., Weaver J., Jones K. T. (2010) **Spatial regulation of APCCdh1-induced cyclin B1 degradation maintains G2 arrest in mouse oocytes.** *Development* 137: 1297-1304.
- Honda H., Miharu N., Ohashi Y., Samura O., Kinutani M., Hara T., Ohama K. (2002) **Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum.** *Hum Genet* 110: 75-79.
- Jeoung M., Lee S., Hawng H. K., Cheon Y. P., Jeong Y. K., Gye M. C., Iglarz M., Ko C., Bridges P. J. (2010) **Identification of a novel role for endothelins within the oviduct.** *Endocrinology* 151: 2858-2867.
- King G. J., Atkinson B. A., Robertson H. A. (1980) **Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation.** *J Reprod Fertil* 59: 95-100.
- Krebs C. J., Pfaff D. W. (2001) **Expression of the SCAMP-4 gene, a new member of the secretory carrier membrane protein family, is repressed by progesterone in brain regions associated with female sexual behavior.** *Brain Res Mol Brain Res* 88: 144-154.

- Kumar C. G., Larson J. H., Band M. R., Lewin H. A. (2007) **Discovery and characterization of 91 novel transcripts expressed in cattle placenta.** *BMC Genomics* 8: 113.
- Laird P. W. (2003) **The power and the promise of DNA methylation markers.** *Nat Rev Cancer* 3: 253-266.
- Lemos D. C., Takeuchi P. L., Rios A. F., Araujo A., Lemos H. C., Ramos E. S. (2011) **Bovine fetal DNA in the maternal circulation: Applications and implications.** *Placenta* 32: 912-913.
- Li E. (2002) **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Nat Rev Genet* 3: 662-673.
- Liu F. M., Wang X. Y., Feng X., Wang W., Ye Y. X., Chen H. (2007) **Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis.** *Acta Obstet Gynecol Scand* 86: 535-541.
- Lo Y. M., Chiu R. W. (2009) **Next-generation sequencing of plasma/serum DNA: an emerging research and molecular diagnostic tool.** *Clin Chem* 55: 607-608.
- Lo Y. M., Corbetta N., Chamberlain P. F., Rai V., Sargent I. L., Redman C. W., Wainscoat J. S. (1997) **Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.** *Lancet* 350: 485-487.
- Lo Y. M., Tein M. S., Lau T. K., Haines C. J., Leung T. N., Poon P. M., Wainscoat J. S., Johnson P. J., Chang A. M., Hjelm N. M. (1998) **Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis.** *Am J Hum Genet* 62: 768-775.
- Mandel P., Metais P. (1948) **Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme.** *C R Seances Soc Biol Fil* 142: 241-243.
- Mandel P., Metais P., Cuny S. (1950) **Les Quantites Dacide Desoxytose-Nucleique Par Leucocyte Chez Diverses Especies De Mammiferes.** *Cr Hebd Acad Sci* 231: 1172-1174.
- Matsumura H., Reich S., Ito A., Saitoh H., Kamoun S., Winter P., Kahl G., Reuter M., Kruger D. H., Terauchi R. (2003) **Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15718-15723.
- Moore K., Thatcher W. W. (2006) **Major advances associated with reproduction in dairy cattle.** *J Dairy Sci* 89: 1254-1266.

- Morozkin E. S., Loseva E. M., Morozov I. V., Kurilshikov A. M., Bondar A. A., Rykova E. Y., Rubtsov N. B., Vlassov V. V., Laktionov P. P. (2012) **A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing.** *Expert Opin Biol Ther.*
- Mullen M. P., Elia G., Hilliard M., Parr M. H., Diskin M. G., Evans A. C., Crowe M. A. (2012) **Proteomic Characterization of Histotroph during the Preimplantation Phase of the Estrous Cycle in Cattle.** *J Proteome Res* 11: 3004-3018.
- Müller H. M., Ivarsson L., Schrocksnadel H., Fiegl H., Widschwendter A., Goebel G., Kilga-Nogler S., Philadelphia H., Gütter W., Marth C., Widschwendter M. (2004) **DNA methylation changes in sera of women in early pregnancy are similar to those in advanced breast cancer patients.** *Clin Chem* 50: 1065-1068.
- Niswender G. D., Juengel J. L., Silva P. J., Rollyson M. K., McIntush E. W. (2000) **Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.** *Physiol Rev* 80: 1-29.
- Pare J., Audet-Grenier M. H., Rouillier P., Sirard M. A. (2008) **Evaluation of the DG29 test for early detection of pregnancy in cattle.** *Can Vet J* 49: 1119-1121.
- Patel O. V., Yamada O., Kizaki K., Takahashi T., Imai K., Takahashi S., Izaïke Y., Schuler L. A., Takezawa T., Hashizume K. (2004) **Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancies.** *Biol Reprod* 70: 1114-1120.
- Peitsch M. C., Muller C., Tschopp J. (1993) **DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts.** *Nucleic Acids Res* 21: 4206-4209.
- Pieterse M. C., Szenci O., Willemse A. H., Bajcsy C. S., Dieleman S. J., Taverne M. A. (1990) **Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test.** *Theriogenology* 33: 697-707.
- Pritlove D. C., Gu M., Boyd C. A., Randeve H. S., Vatish M. (2006) **Novel placental expression of 2,3-bisphosphoglycerate mutase.** *Placenta* 27: 924-927.
- Rioux P., Rajotte D. (2004) **Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay.** *Adv Physiol Educ* 28: 64-67.

- Roberts R. J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2010) **REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes.** *Nucleic Acids Res* 38: D234-236.
- Robertson K. D., Wolffe A. P. (2000) **DNA methylation in health and disease.** *Nat Rev Genet* 1: 11-19.
- Robinson R. S., Hammond A. J., Wathes D. C., Hunter M. G., Mann G. E. (2008) **Corpus Luteum–Endometrium–Embryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance.** *Reprod Domest Anim* 43: 104-112.
- Rossant J. (2011) **Developmental biology: A mouse is not a cow.** *Nature* 471: 457-458.
- Saha S., Sparks A. B., Rago C., Akmaev V., Wang C. J., Vogelstein B., Kinzler K. W., Velculescu V. E. (2002) **Using the transcriptome to annotate the genome.** *Nat Biotechnol* 20: 508-512.
- Sasser R. G., Ruder C. A., Ivani K. A., Butler J. E., Hamilton W. C. (1986) **Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation.** *Biol Reprod* 35: 936-942.
- Schnorr B., Kressin M. (2006) **Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch.** Stuttgart: Enke Verlag.
- Schori F. (2005) **Fütterung und Fruchtbarkeit der Milchkuh. Merkblatt für die Praxis.** *ALP aktuell* 17.
- Schütz E., Urnovitz H. B., Iakoubov L., Schulz-Schaeffer W., Wemheuer W., Brenig B. (2005) **Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE.** *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 814-820.
- Shimizu T., Krebs S., Bauersachs S., Blum H., Wolf E., Miyamoto A. (2010) **Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium.** *Physiol Genomics* 42A: 290-300.
- Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P. A. (1987) **Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients.** *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 707-712.

- Suzuki H., Tohyama K., Nagata K., Taketani S., Araki M. (2007) **Regulatory expression of Neurensin-1 in the spinal motor neurons after mouse sciatic nerve injury.** *Neurosci Lett* 421: 152-157.
- Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. (2008) **Characterization of circulating DNA in healthy human plasma.** *Clin Chim Acta* 387: 55-58.
- Swaminathan R., Butt A. N. (2006) **Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments.** *Ann N Y Acad Sci* 1075: 1-9.
- Swarup V., Rajeswari M. R. (2007) **Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases.** *FEBS Lett* 581: 795-799.
- Szenci O., Beckers J. F., Humblot P., Sulon J., Sasser G., Taverne M. A., Varga J., Baltusen R., Schekk G. (1998) **Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows.** *Theriogenology* 50: 77-88.
- Tan E. M., Schur P. H., Carr R. I., Kunkel H. G. (1966) **Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 45: 1732-1740.
- Telugu B. P., Walker A. M., Green J. A. (2009) **Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family--analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes.** *BMC Genomics* 10: 185.
- Thurmond M. C., Picanso J. P. (1993) **Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows.** *J Am Vet Med Assoc* 203: 432-435.
- Tian X., Pascal G., Monget P. (2009) **Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems.** *BMC Evol Biol* 9: 202.
- Tsangaris G. T., Kolialexi A., Karamessinis P. M., Anagnostopoulos A. K., Antsaklis A., Fountoulakis M., Mavrou A. (2006) **The normal human amniotic fluid supernatant proteome.** *In Vivo* 20: 479-490.
- van der Vaart M., Semenov D. V., Kuligina E. V., Richter V. A., Pretorius P. J. **Advanced Analysis of Human Plasma Circulating DNA Sequences Produced by Parallel Tagged Sequencing on the 454 Platform.** In: *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*, Herausgeber: Gahan P. B. Springer Netherlands, 2011, p. 35-40.

- Vanselow J., Nurnberg G., Koczan D., Langhammer M., Thiesen H. J., Reinsch N. (2008) **Expression profiling of a high-fertility mouse line by microarray analysis and qPCR.** *BMC Genomics* 9: 307.
- Victor A., Elsasser A., Hommel G., Blettner M. (2010) **Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing--part 10 of a series on evaluation of scientific publications.** *Dtsch Arztebl Int* 107: 50-56.
- von Engelhardt W., Breves G. (2010) **Physiologie der Haustiere.** Stuttgart: Enke Verlag.
- Wang G., Cui Q., Cheng K., Zhang X., Xing G., Wu S. (2010) **Prediction of fetal sex by amplification of fetal DNA present in cow plasma.** *J Reprod Dev* 56: 639-642.
- Wolf E., Arnold G. J., Bauersachs S., Blum H., Fröhlich T., Hiendleder S. G., Mitko K., Reichenbach H. D. (2006) **Funktionale Genomforschung - neue Ansätze zur Verbesserung der Fruchtbarkeit beim Rind.** *Züchtungskunde* 78: 428-439.
- Wolf E., Bauersachs S. (2010) **Functional genome research in reproductive biology and biotechnology - a minireview.** *Anim Sci Pap Rep* 28: 123-131.
- Zenclussen M. L., Jensen F., Rebelo S., El-Mousleh T., Casalis P. A., Zenclussen A. C. (2012) **Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance.** *Am J Reprod Immunol* 67: 376-382.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AUC	<u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>R</u> OC- <u>c</u> urve; Fläche unter der ROC-Kurve
<i>AURKA</i>	aurora kinase A; BTA 13
B	Biotin-Markierung
B/E-Verhältnis	Verhältnis zwischen beobachteten und erwarteten Werten
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
bp	Basenpaar
<i>BPGM</i>	2,3-bisphosphoglycerate mutase; BTA 4
BSA	Bovine Serum Albumin
BTA	bovines Chromosom
Btau	Bos taurus
bzw.	beziehungsweise
CDS	Protein-coding sequence; proteinkodierende Sequenz
Cl	<u>C</u> orpus <u>l</u> uteum; Gelbkörper
CNA	<u>c</u> irculating <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid; zirkulierende Nukleinsäure
<i>COBL</i>	cordon-bleu homolog (mouse); BTA 4
C _T	Cycle of threshold
d	Tag
d.h.	dass heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E ₂	Estradiol
<i>EDNRA</i>	endothelin receptor type A; BTA 17
<i>ERC1</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1; BTA 5
Era	Östrogen-Rezeptor alpha
F	Forward Primer
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon

84 | Abkürzungsverzeichnis

<i>GNB4</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4; BTA 1
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decycling) 1; BTA 5
IFN τ	Interferon tau
IGF-1 & -2	insulin-like growth factor 1 & 2
IGFBP-4 & -5	insulin-like growth factor binding protein 4 & 5
J	Youden-Index
JAK	JAK = Januskinase
Kd	Kilodalton; 1 Kd = $1,66 \times 10^{-9}$ pg
LH	luteinisierendes Hormon
LINE	long interspersed nuclear elements
<i>MATK</i>	megakaryocyte-associated tyrosine kinase; BTA 7
<i>MBNLI</i>	muscleblind-like splicing regulator 1; BTA 1
Mbp	Megabasenpaar (1.000.000 bp = 1 Mbp)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MID	molecular identifier; molekulare Identifikationssequenz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
MT	mtDNA
MW	molecular weight; Molekulargewicht
N	Anzahl der Stichproben
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
<i>NLRP13</i>	NLR family, pyrin domain containing 13; BTA 18
NPW	negativ prädiktiver Wert
<i>NRSNI</i>	neurensin 1; BTA 23
NT	nicht-trächtig
OvF	ovulierender Follikel
OXTR	Oxytocinrezeptor

p	Signifikanzniveau
<i>p.i.</i>	<i>post inseminationem</i>
PAG	<u>p</u> regnancy- <u>a</u> ssociated <u>g</u> lycoprotein
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaktion; Polymerase-Kettenreaktion
<i>PDXK</i>	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase; BTA 1
pg	Pikogramm
PGF _{2α}	Prostaglandin
p _{korrigiert}	nach Bonferroni korrigierter p-Wert aus Student's t-Test
pmol	Pikomol
Pos.	Position
PPW	positiv prädiktiver Wert
<i>PSMD11</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11; BTA 19
p _{unkorrigiert}	unkorrigierter p-Wert aus Student's t-Test
qPCR	qantitative Real-Time PCR
R	Reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<u>R</u> eceiver <u>O</u> perating <u>C</u> haracteristic
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTE	Retroelement
s	Standardabweichung
SAGE	<u>S</u> erial <u>A</u> nalysis of <u>G</u> ene <u>E</u> xpression
<i>SCAMP4</i>	secretory carrier membrane protein 4; BTA 7
SCNT	<u>s</u> omatic <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>t</u> ransfer
sek	Sekunde
SINE	<u>s</u> hort <u>i</u> nterspersed <u>n</u> uclear <u>e</u> lements
STAT	STAT = <u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivators of <u>T</u> ranscription
T	trächtig
T _{ANN}	Annealingtemperatur
<i>TFAP2C</i>	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma); BTA 13
T _{MC}	Schmelztemperatur
<i>TMED3</i>	transmembrane emp24 protein transport domain containing 3; BTA 21

86 | Abkürzungsverzeichnis

<i>TSHZI</i>	teashirt zinc finger homeobox 1; BTA 24
U	Unit
UTR	Untranslated Region; nicht-translatierte Region
vs.	versus
WGA	Whole Genome Amplification
x	beliebiger Wert einer Stichprobe
x g	x-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/sek ²)
\bar{x}	Mittelwert
z	z-transformierter Wert
z.B.	zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung der Follikel-Entwicklung im Zusammenhang mit endokrinen Veränderungen im Verlauf eines ovariellen Zyklus nach Moore & Thatcher (2006). Kd = Kilodalton; MW = Molekulargewicht; IGF-1 = insulin-like growth factor; IGFBP-4 & -5 = insulin-like growth factor binding Proteins 4 & 5; E₂ = Estradiol; FSH = Follikel-stimulierendes Hormon; LH = luteinisierendes Hormon; PGF_{2α} = Prostaglandin; OvF = ovulierender Follikel.7
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verlaufs der Follikelreifung, Befruchtung und Furchung bis zum Blastozysten-Stadium nach Schnorr & Kressin (2006).....9
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozesse und korrespondierender Gene, die wahrscheinlich in die Vorbereitung des Endometriums zur Implantation des Konzeptus involviert sind. Boxen mit Umrandungen enthalten Namen von Genen, die im Endometrium von trächtigen Tieren hochreguliert sind. Boxen mit unterbrochenen Umrandungen beinhalten Namen von Genen die herab reguliert werden (Wolf *et al.* 2006; Bauersachs *et al.* 2006). 10
- Abbildung 4: Darstellung des möglichen Ursprungs zirkulierender Nukleinsäuren (CNAs). Bp = Basenpaar. 13
- Abbildung 5: Grafische Darstellung des SAGE-Verfahrens. Mit den Restriktionsenzymen *NlaIII* und *EcoP15I* (NEB) wurde aus jedem Biotin-markierten CNA-Fragment ein kurzer ca. 25 bp langer Sequenzabschnitt (*Tag*) herausgeschnitten. Durch Ligation wurden *DiTags* zu ungefähr 400 bp langen Konkatemeren verknüpft. B = Biotin-Markierung; „CATG“ = Erkennungssequenz von *NlaIII*; bp = Basenpaar. . 19
- Abbildung 6: Grafische Darstellung der *in silico* Auswertung. Die generierten *Tag*-Sequenzen der trächtigen Tiere wurden mit den Sequenzen der nicht-trächtigen Tiere mittels BLAST verglichen (1, 2). Es wurden die Sequenzen herausgefiltert, die ausschließlich in trächtigen Tieren detektiert wurden (3, 4). Ein zweiter BLAST gegen die Datenbank „trächtig“ generierte alle *Tags* und ihre Häufigkeit des Vorkommens (5, 6). *Tag*-Sequenzen wurden nach einem Ranking ausgewählt (7).21

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Alignments der erhaltenen repetitiven *Tag*-Sequenzen und den konstruierten Primern am Beispiel des repetitiven Elements Art2A. Die Sequenzen der *Tags* 1 und 8 werden in einer qPCR-Reaktion amplifiziert. Pos. = Position, bp = Basenpaar, SINE = short interspersed nuclear element..... 22

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung zur Untersuchung von methylierten und unmethylierten CNA-Sequenzen mit Hilfe der SOLiD™-Sequenzierung. Nach der CNA End Repair mit Phosphorylierung (grüner Kreis mit „P“) wurde der SOLiD™ P1-Adapter endständig ligiert. Mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *XmaI* (NEB) wurde jedes CNA-Fragment mit einer Erkennungssequenz geschnitten. Durch Ligation der jeweiligen SOLiD™ P2-Adapter wurden die Proben mit einer individuellen MID-Sequenz versehen. P = Phosphorylierung; „CCCGGG“ = Erkennungssequenz von *SmaI* und *XmaI*; MID = MID-Sequenz/molecular identifier. 26

Abbildung 9: Schematische Darstellung der erhaltenen Sequenzen aus der SOLiD™-Sequenzierung. Von dem Adapter P1 aus wurden 50 bp lange F3-Sequenzen generiert. Von dem Adapter P2 aus wurden 35 bp lange F5-Sequenzen erhalten, die die 10 bp MID-Sequenz und den jeweiligen Enzymcode integriert hatten. µm = Mikrometer, bp = Basenpaar, F3 = 3'-Leserichtung, F5 = 5'-Leserichtung, MID = MID-Sequenz/molecular identifier. 28

Abbildung 10: Grafische Darstellung der Verteilung der normalisierten *Tag*-Treffer-Anzahlen auf chromosomalen Regionen von Proben trächtiger Kühe im Vergleich zur NT Kontrollgruppe (Säulen). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. BTA = bovines Chromosom; Mbp = Megabasenpaar; T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; *, p < 0,05; **, p = 0,01; ***, p = 0,001..... 32

Abbildung 11: Grafische Darstellung der Verteilung von *Tag*-Sequenzen in Genen in Proben trächtiger Kühe. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar (N = 8), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag. 35

Abbildung 12: Grafische Darstellung der Verteilung von *Tag*-Treffern auf intergenischen Regionen in Proben trächtiger Kühe. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar ($N = 8$), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag. 38

Abbildung 13: Grafische Darstellung der Treffer-Verteilung innerhalb der *Tag*-Kombinationen. Die Säulen stellen die Anzahl der Kühe zu den jeweiligen Trächtigkeitstagen dar ($N = 8$), in denen *Tag*-Treffer detektiert wurden. Die weißen Punkte zeigen den Mittelwert und die Fehlerindikatoren zeigen das Minimum und Maximum der erhaltenen *Tag*-Treffer (rechte y-Achse). D = Tag. 39

Abbildung 14: Verteilung der Kopienzahlen aus dem qPCR-Experiment 1 in Proben trächtiger Kühe zu d 20, dargestellt als z-Werte. Die repetitiven Elemente Art2A, BovA2 und BovB wiesen tendenzielle Unterschiede zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen auf. Die gepunktete Nulllinie stellt die NT Kontrollgruppe dar. Die Standardabweichung wird durch die Whisker dargestellt. D = Tag. 40

Abbildung 15: Grafische Darstellung der Verteilung von Kopienzahlen zu den Trächtigkeitstagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43 im Vergleich zur gesamten Kontrollgruppe (Nulllinie). Signifikante Unterschiede wurden zwischen der Kontrollgruppe und den Trächtigkeitstagen d 0-3 und d 40-43 erhalten. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ 42

Abbildung 16: Grafische Darstellung der Verteilung der Kopienzahlen zu den unterschiedlichen Entnahmetagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43. Die Kopienzahlen jedes Entnahmetages wurden zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen (Nulllinie) verglichen. Proben trächtiger Kühe zu d 20-23 wiesen erhöhte Kopienzahlen gegenüber nicht-trächtiger Kühe zu d 20-23 auf ($p < 0,05$). *, $p < 0,05$ 43

Abbildung 17: Grafische Darstellung des Methylierungsgrades (Verhältnis) der bovinen Chromosomen von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; BTA = bovines Chromosom; **, $p_{\text{koriert}} < 0,01$ 46

Abbildung 18: Grafische Darstellung des Grades der Methylierung (Verhältnis) von chromosomalen Regionen an den Tagen d 0-3, d 36-41 trächtiger und nicht-trächtiger Tiere. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Signifikante Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test und anschließender p-Wert-Korrektur nach Bonferroni ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag; BTA = bovines Chromosom; Mbp = Megabasenpaar; **, $p_{\text{koriert}} < 0,01$ 48

Abbildung 19: Grafische Darstellung des Methylierungsgrades (Verhältnis) der Gene von trächtigen und nicht-trächtigen Tieren. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. T = trächtig; NT = nicht-trächtig; d = Tag. 49

Abbildung 20: Grafische Darstellung der prädiktiven Werte (PPW = grau, NPW = schwarz) für das Ergebnis „nicht-trächtig“ und „trächtig“ am d 20-23 im Zusammenhang mit dem Besamungsindex..... 61

Anhang-Abb. 1: Grafische Darstellung der Verteilung der *Tag*-Treffer von Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe (Säulen). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. BTA bovines Chromosom, MT = mtDNA..... 71

Anhang-Abb. 2: Grafische Darstellung der beobachteten Kopienzahlen in Proben von trächtigen und nicht-trächtigen Kühen zu den einzelnen Entnahmetagen d 0-3, d 20-23 und d 40-43. Die Standardabweichung wird durch die Whisker dargestellt. Signifikante Gruppenunterschiede sind unter Abschnitt 3.2.2 (S. 41) erklärt und dargestellt. D = Tag. 71

Anhang-Abb. 3: Darstellung der ROC-Kurven zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen von d 0-3 bis d 20-23 in Proben trächtiger Kühe, sowie zur Bewertung des Anstiegs der Kopienzahlen zwischen Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe am d 20-23. D = Tag, AUC = Area under the ROC curve, p = Signifikanz..... 72

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analyierte Proben bei der 454-Sequenzierung, Validierung und SOLiD™-Sequenzierung.....	16
Tabelle 2: Beschreibung der analysierten genomischen Regionen (modifiziert nach Beck <i>et al.</i> 2009). RNA = Ribonukleinsäure, CDS = proteinkodierende Sequenz, UTR = nicht-translatierte Region, mRNA = messenger RNA.....	20
Tabelle 3: Konstruierte Primer zur Amplifikation von repetitiven und Einzelkopie-Sequenzen in qPCR-Experimenten. F = Forward-Primer, R = Reverse-Primer.....	23
Tabelle 4: Darstellung der individuellen PCR-Parameter der durchgeführten Amplifikationen. Bp = Basenpaar, sek = Sekunden, °C = Grad Celsius, pmol = Pikomol, T _{ANN} = Annealingtemperatur, T _{MC} = Schmelztemperatur.	24
Tabelle 5: Zusammenfassung der Sequenz-Treffer. T = trächtig, NT = nicht-trächtig. .	30
Tabelle 6: Darstellung der beobachteten und erwarteten Häufigkeit (%) von Repeat-Klassen in Proben trächtiger (T) und nicht-trächtiger (NT) Kühe. Aus den ermittelten Häufigkeiten wurden die B/E-Verhältnisse und z-Werte berechnet. Für die ermittelten Häufigkeiten wurde die jeweilige Fläche unter der Standardnormalverteilung errechnet und der p-Wert nach Bonferroni korrigiert. D = Tag; LINE = long interspersed nuclear element; SINE = short interspersed nuclear element; LTR = long terminal repeat; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.....	37
Tabelle 7: Zusammenfassung der Bewertung von Unterschieden in der Verteilung der Kopienzahlen in Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe für jede <i>Tag</i> -Kombination. D = Tag, Cut-off = Schwellenwert, J = Youden Index, AUC = Area under the ROC-curve.	44
Tabelle 8: Zusammenfassung der Sequenz-Treffer nach dem Mapping und Pairing. T = trächtig, NT = nicht-trächtig.....	45

Anhang-Tab. 1: Tabellarische Auflistung der chromosomalen Regionen sowie der Gene innerhalb dieser Regionen des bovinen Genoms auf denen signifikante Gruppenunterschiede in der Anzahl der *Tag*-Treffer detektiert wurden nach NCBI Btau_4.0. Die Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt. Mbp = Megabasenpaar, BTA = bovines Chromosom, d = Tag..... 68

Anhang-Tab. 2: Zusammenfassung der beobachteten intergenischen *Tag*-Sequenzen und dessen Platzierung auf dem bovinen Genom nach NCBI Btau_4.6.1. Bp = Basenpaar..... 69

Anhang-Tab. 3: Zusammenfassung der beobachteten repetitive *Tag*-Sequenzen und deren Zuordnung zu den unterschiedlichen repetitiven Elementen nach Repbase ver.12.09. Bp = Basenpaar. 69

Anhang-Tab. 4: Tabellarische Auflistung der Regionen boviner Chromosomen, die Unterschiede im Methylierungsgrad generierter Sequenzen in Proben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe aufwiesen. Es wurden die Gene in den Regionen und die Anzahlen von der enzymatischen Erkennungssequenz „CCCGGG“ nach NCBI Btau_4.0 aufgelistet. Die Gen-Funktionen wurden mit Hilfe von QuickGO (Binns *et al.* 2009) ermittelt. BTA = bovines Chromosom, Mbp = Megabasenpaar, d = Tag, T = trächtig, NT = nicht-trächtig, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, $p_{\text{unkorrigiert}}$ = p-Wert nach t-Test, $p_{\text{korrigiert}}$ = p-Wert korrigiert nach Bonferroni..... 70

12 Lebenslauf

Personendaten

Jennifer Mayer

geboren am 27. März 1982

in Cottbus, Deutschland

Schulische Ausbildung

1998 – 2001 Fachgymnasium Wirtschaft Berufsbildende Schulen I Northeim, Abitur

Wissenschaftliche Ausbildung

2001 – 2008 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen

Fächer: Anthropologie, Zoologie und Pathologie

2007 – 2008 Diplomarbeit in der Historischen Anthropologie und Humanökologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Thema: „War das Bergbau-Gewerbe in Goslar familientradiert? Identifikation männlicher Familienlinien der frühneuzeitlichen Skelettserie „Hinter den Brüdern“ (Goslar/Harz) über Y-chromosomale Haplotypen“

seit 2008 Wissenschaftliche Hilfskraft im Tierärztlichen Institut der Georg-August-Universität Göttingen im Rahmen der Promotion zum Thema: „Zirkulierende Nukleinsäuren (CNAs) als molekulare Marker zu Trächtigkeitsbestimmung beim Rind“

13 Danksagung

Professor Dr. Rainer Willmann danke ich für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der Biologischen Fakultät als Erstgutachter zu betreuen.

Professor Dr. Dr. Bertram Brenig danke ich für die Bereitstellung des Themas, den Arbeitsplatz und die spannenden Lehraufgaben. Ich danke Professor Brenig für die Geduld und die nützlichen Ratschläge für das Gelingen der Arbeit.

Dem gesamten Chronix Biomedical GmbH Team gilt ganz besonderer Dank. Privatdozent Dr. Ekkehard Schütz und Dr. Julia Beck halfen mir mit Ihrem fundierten Fachwissen und gaben mir sehr viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Ihr Wissen, ihre Ideen und ihre Kritik waren jederzeit äußerst hilfreich. Besonders danke ich Stefan Balzer, Sara Henneke und Sarah Bierau für ihre technische Assistenz und für die Hilfe in labortechnischen Fragen. Carsten Müller, Cord Bielke und Stefan Adeberg danke ich für die *in silico* Verarbeitung der Sequenzierungsdaten und deren Hilfe bei Computerproblemen.

Professor Dr. Frank T. Hufert und Dr. Meik Dilcher aus der Abteilung Virologie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die Bereitstellung des Roche/454 GS-FLX Titaniums.

Dr. Wilhelm Wehmheuer danke ich für die Planung und Durchführung der Blutprobensammlungen, bei denen ich immer Blut und Wasser geschwitzt hatte. In diesem Zusammenhang danke ich Stefan Vogler, der seine Zeit und seine Kühe für unsere Sammlungen zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Vanessa J. Purwins und Dr. Jan T. Soller danke ich ganz herzlich für die geduldige Betreuung, die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche und die Freundschaft.

Ein großer Dank geht aber auch an die zahlreichen Kolleginnen und Kollegen, die mir mit ihrer konstruktiven Kritik und ihrem Fachwissen geholfen haben. Ich bedanke mich bei: Professor Dr. Christoph Knorr, Dr. Carolin Fromm-Dornieden, Dr. Rifat Morina, Dr. Oak Chaorensook, Dr. Yuyun Xing, Dr. Liane Lühmann, Sabrina Pach, Isabel Wiedemann, Claudia Floren, Silvia Hennecke, Yanyu Duan, Stefan Beckmann und Susen Lattermann.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinem Lebensgefährten bedanken, die mich jederzeit unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Dieses Projekt wurde aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE; W2-80025700) gefördert.