

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie.
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)



und aus der Universität Göttingen
Sektion Embryologie
(Leiter: Prof. Dr. med. Christoph Viebahn)

**Mitochondriale Differenzierung als Entwicklungsparameter in normalen,
geklonten und uniparentalen Kaninchenembryonen am Beispiel des
keimzellspezifischen mitochondrialen Markers PG2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Weckelmann

geboren am 03.02.1978 in Haan

Gutachter:

Prof. Dr. med. Christoph Viebahn

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Hollemann

Prof. Dr. med. Martin Bergmann

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 01.02.2005

Datum der Verteidigung: 12.07.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008914

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008914>]

Wir haben an Christus Anteil bekommen, wenn wir die Zuversicht
vom Anfang bis zum Ende festhalten.

Hebräer 3,14

Kurzreferat

Die vorliegende Arbeit soll die Bedeutung biochemischer Differenzierung und zytoplasmatischer Verteilung von Mitochondrien für die frühe embryonale Entwicklung im Modellorganismus Kaninchen untersuchen. Insbesondere soll die frühe Entwicklung von Embryonen untersucht werden, die durch Kerntransfer (durch sog. reproduktive Klonierung) erzeugt wurden, um eine Methode zu entwickeln, die eine frühzeitige Beurteilung der Entwicklungsschritte klonierter Embryonen erlaubt. Hierzu wurden natürlich gezeugte, im Muttertier oder in vitro weiterentwickelte Embryonen mit solchen Embryonen verglichen, die mit Spenderkernen aus fetalen Fibroblasten, Blastomeren oder adulten Cumuluszellen erzeugt wurden und sich dann in vitro weiterentwickelt haben. Als Parameter für die biochemische Differenzierung der Mitochondrien und für die frühzeitige Beurteilung des Entwicklungsstatus der Embryonen wurden 3 monoklonale Antikörper eingesetzt: Der gegen ein keimzellspezifisches mitochondriales Epitop gerichtete Antikörper PG2 und die Antikörper MTC02 oder CoxIV, die gegen konstitutionelle mitochondriale Epitope in allen Zellen des Körpers gerichtet sind. Nach immunhistochemischen Doppelfärbungen an whole-mount-Präparaten wurden Reaktionsintensität, Reaktionsverteilung und das subzelluläre Reaktionsmuster der Antikörper fluoreszenzmikroskopisch verglichen. In normalen Embryonen fiel zwischen dem 4- und 16- Stadium im Vergleich zum granulären MTC02-Muster ein überwiegend diffuses PG2-Reaktionsmuster auf, das im Gegensatz zum granulären PG2-Muster in anderen Stadien stand und deshalb mit dem Zeitpunkt des Wechsels von maternaler zu selbständiger zygotischer Transkriptionsaktivität (die sog. maternal-to-zygotic-transition = MZT) - beim Kaninchen etwa im 4-Zellstadium - in Verbindung gebracht werden konnte. Um diese Korrelation in zukünftigen Untersuchungen näher analysieren zu können, wurden daraufhin Versuchsprotokolle für den Einsatz der Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin und Actinomycin-D, die die zygotische Transkription unterbinden, und für die Untersuchung uniparentalen (parthenogenetischen) Embryonen, bei denen ausschließlich maternale Gene zum Einsatz kommen, entwickelt. Für einen bisher unbekanntes, in frühen Stadien normaler Embryonen auftretenden Randsaum PG2-negativer Mitochondrien konnte kein physiologisches Korrelat gefunden werden. Klonierte Embryonen zeigten in frühen Stadien mit allen 3 Antikörpern im wesentlichen schwächere, inhomogenere und diffusere Färbungen als normale Embryonen, und erst ab dem Morulastadium ähnliche Färbungen wie bei normalen Embryonen. Offensichtliche Korrelationen zwischen immunhistochemischen Färbecharakteristika und der Herkunft der Kernspenderzellen wurden nicht gefunden. Die verwendeten Antikörper, insbesondere PG2, erwiesen sich damit als sensible Marker mitochondrialer Dynamik in der normalen frühen Embryonalentwicklung und bestätigten die starke Variabilität klonierter Embryonen bereits in der Frühphase ihrer Entwicklung.

Weckelmann, Andreas: Mitochondriale Differenzierung als Entwicklungsparameter in normalen, geklonten, und uniparentalen Kaninchenembryonen am Beispiel des keimzellspezifischen mitochondrialen Markers PG2

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die normale embryonale Frühentwicklung des Säugers.....	2
1.1.1 Morphologie	2
1.1.2 Nukleäre Vorgänge	3
1.1.3 Zytoplasmatische Vorgänge.....	6
1.2 Reproduktives Klonieren.....	9
1.3 Nukleäre Reprogrammierung	10
1.4 Das PG2-Epitop, ein mitochondrialer Marker der Keimzellen.....	13
1.5 Zielstellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien, Medien, Hormone und technische Geräte.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2. Medien.....	16
2.1.3. Enzyme, Hormone, Medikamente.....	17
2.1.4 Antikörper	17
2.1.5 Verbrauchsmaterial	17
2.1.6. Geräte und Software.....	18
2.2 Gewebegewinnung und –bearbeitung	18
2.2.1 Gewinnung und Fixierung der Embryonen für die Immunhistochemie	18
2.2.2 Präparation der Embryonen.....	18
2.2.3 In vitro Kultivierung frühembryonaler Stadien.....	19
2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von Kernspenderzellen für den Kerntransfer	20
2.2.5 Kerntransfer und Aktivierung der Eizelle	21
2.3 Färbung, Behandlungen der Embryonen und Auswertung	22
2.3.1 Protokoll für die Immunhistochemie.....	22
2.3.2 Inhibition der zygotischen Transkription durch α -Amanitin und Actinomycin-D	23
2.3.3 Inkubation mit Tyrode´s Säure und Pronase zur enzymatischen Entfernung der Zona Pellucida.....	23
2.3.4 Mikroskopie der Färbungen	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vivo.....	26
3.2 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vitro	28
3.2.1 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c.	28
3.2.2 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c.	32
3.3 Embryonen nach Kerntransfer	34
3.3.1 Kerntransfer mit Blastomeren des 64-Zell-Stadiums.....	34
3.3.2 Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten	36
3.3.3 Kerntransfer mit maternalen Cumuluszellen.....	39
3.3.4 Parthenogenetische Embryonen im Morulastadium	41
3.4 Embryonen nach Behandlung mit Transkriptioninhibitoren	41
3.4.1 α -Amanitin-Behandlung.....	41
3.4.2 Actinomycin-D-Behandlung	42
4. Diskussion	43
4.1 Methodik	44
4.1.1 Gewebearbeitung, Immunhistochemie, Modellorganismus	44
4.1.2 Transkriptioninhibitoren	47

4.1.3 Kerntransfer.....	48
4.2 Funktionelle Aspekte im Vergleich der normalen und künstlichen embryonalen Entwicklung	48
4.2.1 Entwicklung in vitro mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. oder 19h p.c. im Vergleich zur Entwicklung in vivo	49
4.2.2 Entwicklungspotenz verschiedener Klone und ihre Beurteilung nach PG2 immunhistochemischer Färbung	53
4.2.3 Entwicklungspotenz parthenogenetischer Embryonen	58
4.2.4 Die Rolle von Mitochondrien in der Reprogrammierung	59
4.3 Einblicke in natürliche embryonale Entwicklung	60
5. Literaturverzeichnis.....	62
6. Anlage	69
7. Thesen	79