

Manon Queudeville

**Uteroglobineexpression in präimplantativen
Kaninchenembryonen**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2008

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7545-7

ISSN 1436-8803

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Uteroglobulinexpression in präimplantativen Kaninchenembryonen

Uteroglobin ist das in der Präimplantationsphase des Kaninchens dominierende Protein des Uterussekrets und wird zum Teil auch vom Embryo aufgenommen (*Beier und Maurer 1975, Dannhorn und Kirchner 1990, Hegele-Hartung et al. 1991*). Es wird seit langem diskutiert, ob Uteroglobin die frühe Embryonalentwicklung positiv beeinflusst und ob eine Uteroglobinsynthese im Embryo stattfindet. Sowohl *Dannhorn et al. (1991)* als auch *Hegele-Hartung et al. (1991)* kamen zu dem Schluss, dass das im Embryo nachzuweisende Uteroglobin ausschliesslich vom maternalen System produziert wird. *Herrler et al. (2000, 2001)* wiesen hingegen das Vorliegen von Uteroglobin mittels RT-PCR-Untersuchungen bereits bei 24 Stunden alten Embryonen nach. Ab Tag 4 soll es zu einer Herunterregulation der Expression speziell im Trophoblasten kommen.

Die von Herrler aufgestellte Arbeitshypothese der unterschiedlichen Expression in den beiden Zelllinien Embryoblast und Trophoblast sollte in diese Arbeit vor allem durch in situ Hybridisierungen an präimplantativen Kaninchenembryonen verifiziert und spezifiziert werden.

Die Experimente wurden an geschlechtsreifen, nulliparen Kaninchen der Rasse „Weisse Neuseeländer“, durchgeführt. Bei den Kaninchen wurde eine Superovulation ausgelöst, um eine möglichst hohe Ausbeute an Embryonen zu gewährleisten. Nach der Autopsie wurden die Embryonen entweder frisch verarbeitet oder in Serra fixiert und in 90%igem Isopropanol bei -20°C gelagert. Die Uteri wurden entweder in Paraffin eingebettet oder schockgefroren. Sowohl von den Embryonen als auch vom Endometrium wurden zur späteren RNA-Isolierung Zellen gewonnen.

Für die in situ Hybridisierungen wurden Digoxigenin-markierte sense- und antisense-Sonden in vitro transkribiert. Nach Validierungsversuchen wurde als Uteroglobinsense-Sonde pUK22 ausgewählt. Die Spezifität der Sonden wurde mittels Northern-Hybridisierungen überprüft.

Trotz unterschiedlicher Hybridisierungsprotokolle und Detektionsverfahren gelang kein Nachweis von Uteroglobulinexpression im Embryo. Die Validität der Methoden wurde über eine in situ Hybridisierung an Kaninchenendometriumschnitten, die bekanntlich eine hohe Uteroglobulinexpression aufweisen, nachgewiesen. Wir übernahmen anschliessend das Hybridisierungsprotokoll mit dem wir bei den Endometriumschnitten den grössten Erfolg hatten auch für die Embryonen. Mit

keiner der eingesetzten in situ Hybridisierungs-Methoden ließ sich eine Uteroglobineexpression in den untersuchten präimplantativen Stadien nachweisen.

Diese Ergebnisse führten schliesslich dazu, dass wir die Ausgangsergebnisse, nämlich den Nachweis einer Uteroglobineexpression im Kaninchenembryo mittels RT-PCR, in Frage stellten. Wir gingen dazu über, die Uteroglobineexpression im Embryo mittels Northern Hybridisierungen zu überprüfen. Auch hiermit ließ sich keine Uteroglobine-mRNA im Embryo, ganz im Gegensatz zu unserer Positivkontrolle Kaninchenendometrium, nachweisen.

Daraufhin entschieden wir uns, die bei uns im Insitu neu etablierte Methode der Real Time PCR anzuwenden, um die Uteroglobineexpression im Kaninchenembryo zu quantifizieren. Während beim Kaninchenendometrium bereits bei 21 Zyklen ein spezifisches Produkt nachweisbar, generierten die Kaninchenembryonen dieses erst ab 32 Zyklen. Das entspricht einem Unterschied in der Expression von 2^{11} , also dem Faktor 2000.

Zusammenfassend kann man sagen, dass man mittels konventioneller PCR Uteroglobine-mRNA im Kaninchenembryo zwar nachweisen kann, es sich aber sicherlich um eine „Low Level“-Expression handelt, da die mRNA in den Northern Hybridisierungen überhaupt nicht nachweisbar ist und bei der Real Time PCR Produkte erst bei extrem hohen Zykluszahlen generiert werden. Es ist also nicht davon auszugehen, dass eine funktionelle Menge an Uteroglobin im Embryo transkribiert wird. Gleichzeitig ist die Menge an vorhandener Uteroglobine-mRNA im Kaninchenembryo wahrscheinlich zu gering, um sie mit derzeit gängigen in situ Hybridisierungs-Methoden nachzuweisen.