

**Entwicklung eines Kerntransferverfahrens für das porcine System als
Grundlage für weiterführende medizinische Anwendungen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.- Chem. Tatjana Reich

geboren am 14.08.1966 in Hannover

2001

Referent:

Prof. Dr. K. Bauer, Max-Planck Institut, Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. H. Müller, Zentrum für Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 21.05.2001

Datum der Veröffentlichung: 15.06.2001

Hiermit versichere ich eidesstattlich, daß die Dissertation von mir selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie gegebenenfalls die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden.

Ich versichere, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Tatjana Reich

Schlagwörter: Kerntransfer, Schwein, Fusion, Parthenogenese, Fragmentierung

Abstract

Reich, Tatjana

Entwicklung eines Kerntransferverfahrens für das porcine System als Grundlage für weiterführende medizinische Anwendungen

Unter Betrachtung der Einzelschritte, die für den Kerntransfer notwendig waren, erfolgte nach dem Vergleich verschiedener Entkumulierungsmethoden die Bestimmung der Trypsineinwirkzeit zur Generierung besonders fusionsgeeigneter Fibroblasten und die Erarbeitung der Fusionspulsbedingungen. Es zeigte sich, daß letztere sehr gerätespezifisch, von den Literaturdaten stark verschieden, nur in einem eng begrenzten Spannungsbereich zu finden waren. Die Geometrie der Fusionselektroden stellte sich als entscheidender Faktor für die Fusionsrate dar.

Anschließend erfolgten Untersuchungen zur Aktivierung parthenogenetischer Embryonen als Modell für die Initiierung der Embryonalentwicklung von Kerntransferfusionsprodukten. Verschiedene Stimuli waren gut zur Aktivierung und zum Erreichen von Blastozystenstadien geeignet. Während der *in vitro*- und *in vivo*-Kultur von Kerntransferembryonen trat aber die Fragmentierung stark in den Vordergrund. Durch Zugabe von Cytochalasin B zum Medium (nach erfolgter Fusion für 3-5 Stunden) konnte in der *in vitro*-Kultur (7 Tage) diese unregelmäßige Kern- und Plasmateilung um die Hälfte reduziert werden. Gleichzeitig verdoppelten sich die echten Teilungsstadien ohne Fragmente, wobei der Prozentsatz von Morulae und blastulierten Stadien aber nicht deutlich beeinflußt wurde.

Auch der Vergleich von Fibroblasten verschiedener Passagen bzw. Zellen aus Embryonenpools und Einzelembryoaufarbeitungen ergab nach Kerntransfer keine entscheidenden Unterschiede bezüglich des Fusions- und Entwicklungsverhaltens.

Einen deutlichen Einfluß hatte die Qualität des Oozytenmaterials. *In vivo*-murierte Oozyten besaßen gegenüber *in vitro*-murierten Eizellen die bessere Entwicklungskompetenz. Auch die *in vivo*-Kultur zeigte gegenüber der *in vitro*-Kultur die bessere Entwicklungskapazität, weshalb die besten Ergebnisse nach *in vivo*-Maturierung und *in vivo*-Kultur (Rückspülung am Tag 6) erzielt wurden.

Keywords: nuclear transfer, pig, fusion, parthenogenetic development, fragmentation

Abstract

Reich, Tatjana

Development of a nuclear transfer procedure for the porcine system as base for further medical applications

At the beginning, under consideration of every necessary single step which was required for nuclear transfer several investigations were done to compare different denuding methods, to generate the best trypsinisation conditions for fibroblasts and the best fusion conditions. The results showed that at least the technical equipment parameters had a very big influence on fusion success. Therefore only voltage in a small area and much lower than found in the literature could be used to get positive results. The geometry of fusion electrodes had the main influence on fusion rates.

As a follow up investigations for parthenogenetic activation of oocytes were done to define a model for the initiation of embryonic development of nuclear transfer products. During the in vitro- and in vivo-culture of nuclear transfer embryos fragmentation was observed. The addition of cytochalasin B to the culture media 3-5 h after the fusion proved a 50% reduction of uncontrolled nucleus and cytoplasm division. The doubling of real cell division without fragmentation could be achieved simultaneously without a main influence on morulae- and blastocyst rates.

The comparison of fibroblasts generated after different passages prepared from embryonic pools or single embryo preparation showed no significant differences concerning the fusion and embryonic development behaviour.

The quality of the oocytes had a main influence. In vivo-matured oocytes showed a significantly higher developmental competence in comparison to in vitro-matured ones. The same effect was observed comparing the in vivo- and in vitro-culture systems. Therefore the best results were observed after in vivo-culture of in vivo-matured oocytes.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Dezember 2000 in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig–Völkenrode (FAL) im Institut für Tierzucht und Tierverhalten in der Abteilung Biotechnologie in Mariensee angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich beim Abteilungsleiter, Herrn Prof. Dr. H. Niemann, für die Überlassung des Themas, das große Interesse, die Unterstützung und die allzeit große Bereitschaft zur sachlichen Diskussion in freundlicher, kollegialer Atmosphäre sowie beim Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F. Ellendorff für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Herrn Prof. Dr. K. Bauer vom Max–Planck Institut in Hannover danke ich für die Betreuung der Arbeit. In Diskussionen sind auch hier immer wieder Anregungen für neue Experimente entstanden.

Zu großem Dank bin ich auch Frau Prof. Dr. M. Szamel (MHH) verpflichtet, die mir bei der Orientierung zur Findung des „geeigneten“ Promotionsthemas sehr hilfreich gewesen ist.

Herrn Prof. Dr. Müller (MHH) danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Die vorliegende Arbeit ist durch die DFG im Rahmen des SFB 265 gefördert worden. Für diese finanzielle Unterstützung möchte ich mich bedanken.

Herrn Dr. P. Booth (Danmarks Jordbrugs Forskning Embryoteknologisk Center, Tjele) gilt mein besonderer Dank für lebhafte und sehr lange wissenschaftliche Gespräche, zwischen „Kerntransfermanipulisten“. Da die Einarbeitung in diese Materie meinerseits autodidaktisch erfolgte, war dieser Erfahrungsaustausch durch persönliche Gespräche und den regen e-mail-Kontakt für mich von unschätzbarem Wert. Außerdem hat Herr Dr. Booth mit der von ihm angefertigten Fusionskammer 2 besonderen Anteil an den Ergebnissen.

Da zum Gelingen wissenschaftlicher Experimente auch das Arbeitsumfeld eine große Rolle spielt, danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biotechnologie, ganz besonders Frau Erika Lemme, die Freud und Leid und das Labor mit mir geteilt hat. Viele gute Ratschläge

sind von ihr gekommen, ganz abgesehen von der praktischen Unterstützung und der guten Laune.

Herr Lothar Schindler hat durch seinen nicht nachlassenden Einsatz, auch widrigen Wetterbedingungen zum Trotz, für den stetigen Strom von Schlachthofovarien gesorgt; dafür einen ganz herzlichen Dank.

Frau Antje Frenzel und Frau Birgit Sieg seien hier stellvertretend für alle anderen genannt, mit denen zusammen ich die große Freude des regelmäßig stattfindenden Ovarienpunktierens teilen durfte. Beide waren in „Oozyten-Fragen“ durch ihre Kompetenz die richtigen Ansprechpartner, und in so netter Gesellschaft ging auch diese Tätigkeit leicht von der Hand.

Herrn Klaus–Gerd Hadelar danke ich herzlich für die Durchführung der Superovulation, die in den meisten Fällen von ihm zu so unbeliebten Zeiten, wie Sonnabend- oder Sonntagabend zuverlässig und kommentarlos übernommen wurde. Vielen Dank Klaus–Gerd.

Außerdem möchte ich die Mitarbeiter in der SVA und vom Schlachthaus nicht vergessen, die sehr kooperativ und immer freundlich zu mir „Labormensch“ gewesen sind.

Für die zuverlässige und schnelle Bearbeitung des „hin und wieder“ von mir angefertigten Bilddokumentationsmaterials (Filmentwicklung) möchte ich mich bei Herrn Dieter Bunke bedanken.

Herrn Hans–Hermann Döpke danke ich für seine Unterstützung in allen Fragen zu Labor, Geräten und Chemikalienbestellungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Freund, die mich in jeder Weise unterstützt haben und stets zur Besprechung für sie z.T. unbekannter Sachverhalte bereit waren.

Tatjana Reich, April 2001

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abstract	
Danksagung	
Inhaltsverzeichnis	
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1 Beeinflussung von Tiereigenschaften: Zucht, Klonen, Transfektion	1
1.1.1 Zucht	1
1.1.2 Klonen (Teilung von frühen Embryonalstadien beim Tier; somatisches Klonen bei Pflanzen)	1
1.1.3 Transgene Tier-/Pflanzenzellen im Bioreaktor	2
1.1.4 Vorkerninjektion	2
1.1.5 Kerntransfer	2
1.1.6 Xenotransplantation	7
1.2 Aufgabenstellung	8
1.3 Experimentelles Vorgehen	9
2 THEORETISCHER TEIL	10
2.1 Biologisches Material	10
2.1.1 Fibroblasten	10
2.1.2 Oozyten	10
2.1.2.1 In vitro-Reifung der Oozyten	11
2.1.2.2 Embryonalentwicklung	13
2.1.2.3 Parthenogenese	15
2.2 Kerntransfer	17
2.2.1 Zellzyklussynchronisation	19
2.2.1.1 Anreicherung der Kerndonorzellen in der G0/G1-Phase	19
2.2.2 Die Plasmamembran der Tierzellen	20
2.2.3 Membranfusion durch Elektropuls	21
2.2.4 Reprogrammierung	27
2.2.5 Aktivierung der Oozyte/ des KT-Einzellers	28
2.2.5.1 Aktivierung durch Befruchtung	28
2.2.5.2 Parthenogenetische Aktivierung durch Elektropuls	29
2.2.5.3 Cytochalasin B	30
2.2.5.4 6-Dimethylaminopurin (DMAP)	31
2.2.5.5 Cycloheximid	31
2.2.5.6 Aktivierung mit Thimerosal und Dithiothreitol (DTT)	32
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Fibroblasten	33
3.1.1 Gewinnung	33

3.1.2 Kultur	34
3.1.3 Ablösen und Passagierung	34
3.1.4 Serumreduktion zur Anreicherung der Zellen in den Phasen G0/G1	34
3.1.5 Einfrieren	35
3.1.6 Auftauen	35
3.2 Oozyten	35
3.2.1 Gewinnung und Reifung	35
3.2.1.1 In vitro gereifte Oozyten	35
3.2.1.2 In vivo gereifte Oozyten	36
3.2.2 Entkumulierung	36
3.3 Mikromanipulation	37
3.3.1 Mikromanipulationseinheit	37
3.3.2 Glaspipetten	38
3.3.2.1 Glasbearbeitung	39
3.3.3 Manipulationsmedium	39
3.4 Fusionsgerät	40
3.4.1 Spannungsgeber	40
3.4.2 Fusionskammer 1	40
3.4.3 Fusionskammer 2	41
3.4.4 Fusionsmedien	41
3.5 Aktivierungsmethoden	41
3.5.1 Elektroaktivierung	42
3.5.2 Chemische Aktivierung mit Thimerosal/DTT	42
3.6 Embryonenkultur	43
3.6.1 Verpacken in Agarchips	43
3.6.2 Synchronisierung der Empfängertiere, Transfer und Rückspülung	43
3.6.3 Durchführung der Versuche mit in vivo gereiften Oozyten (s. Kapitel 4.6)	44
3.7 Färbungen	44
3.7.1 Hoechstfärbung	44
3.7.2 Mito Tracker	44
3.7.3 Trypanblau Lebend-/Totfärbung der Fibroblasten	45
3.8 Photographische Dokumentation	46
3.9 Statistik	46
3.10 Definitionen für die Charakterisierung der Entwicklungsstadien	47
3.10.1 Parthenogenese	47
3.10.2 Kerntransferversuche	48
4 VERSUCHE, ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
4.1 Grunduntersuchungen	51
4.1.1 Mitochondrienverteilung in Fibroblasten und Oozyten	51
4.1.1.1 Fibroblastenfärbung	51
4.1.1.2 Verteilung der Mitochondrien in MeII-Oozyten	52
4.1.1.3 Mitochondrienfärbung reifer und unreifer Oozyten	52
4.1.1.4 Mitochondrien degenerierter, fragmentierter und geteilter Entwicklungsstadien	52

4.2 Voruntersuchungen	55
4.2.1 Vergleich verschiedener Entkumulierungsmethoden	55
4.2.1.1 Heftiges Pipettieren ohne Enzyminkubation	55
4.2.1.2 Inkubation in Hyaluronidase	55
4.2.1.3 Inkubation in EDTA/Trypsin	55
4.2.1.4 Nicht entkumulierte Oozyten	56
4.2.1.5 Auswertung	56
4.2.2 Einfluß der Einwirkungszeit von Trypsin auf die Fibroblastenmorphologie und -vitalität	57
4.2.3 Arretierung der Fibroblasten in der G ₀ /G ₁ -Phase durch Serumreduktion	58
4.2.4 Erarbeitung der Fusionsbedingungen	61
4.2.4.1 Untersuchung der Zelllyse an MeII-Oozyten	61
4.2.4.2 Kerntransferkomplexe und Zellfusion	65
4.2.4.3 Mehrfachpulse und Pulsabstand	66
4.2.5 Auswirkung von AC-Feld und DC-Puls auf Fibroblasten in Suspension	70
4.3 Induzierte Parthenogenese	71
4.3.1 Elektroaktivierung mit 0,40kV/cm	71
4.3.1.1 Aktivierung im elektrischen Feld ohne zusätzliche chemische Synchronisation	72
4.3.1.2 Chemische Synchronisation mit DMAP	75
4.3.1.3 Chemische Synchronisation mit Cycloheximid	77
4.3.2 Elektroaktivierung mit 0,70kV/cm	78
4.3.2.1 Ohne zusätzliche chemische Synchronisation	79
4.3.2.2 Chemische Synchronisation mit DMAP	80
4.3.2.3 Zusätzliche Aktivierung mit Thimerosal/DTT	80
4.3.2.4 Einfluß von Oxidationsinhibitoren auf die Aktivierung	81
4.3.3 Chemische Aktivierung mit Thimerosal/DTT	82
4.3.3.1 Einfluß der Oozytenalterung und Inkubation in Cytochalasin B	84
4.3.4 Vergleich von in vivo-/ in vitro-gereiften Oozyten	92
4.4 Kerntransfer, Fusionskammer 1 und verschiedene Aktivierungsmethoden	95
4.4.1 Calciumeinfluß auf die Aktivierung von Kerntransferkomplexen	96
4.4.2 Vergleich von Mannitol und Mannose als Fusionsmedium für Kerntransferkomplexe	97
4.4.3 Einfluß der Fibroblastenpassagen; Vergleich von Fib.-Pools mit Fibroblasten, die aus Einzelembryonen stammen	98
4.4.4 Vergleich verschiedener Aktivierungsmethoden nach Kerntransfer	99
4.5 Kerntransfer, Fusionskammer 2 und verschiedene Aktivierungsmethoden	100
4.5.1 Fusionseffizienz der beiden Kammern 1 und 2 im Vergleich	100
4.5.2 Zellteilung und Fragmentierung	103
4.5.3 Reduktion der Fragmentierung durch Co-Inkubation von Cytochalasin B und DMAP	106
4.5.3.1 Beeinflussung der Fragmentierung von Kerntransferembryonen bei IVC über 7 Tage	108
4.5.3.2 Kontrollgruppen zum Kerntransfer; Co-Inkubation von +/- CB / DMAP	111

4.5.3.3 Parthenogenesevergleich: Zwischeninkubation in PBS10%NBCS oder TCMair	115
4.6 Kerntransfer, Fusionskammer 2 und in vivo gereifte Oozyten	117
4.6.1 Adaption der Fusionspulsbedingungen an in vivo-maturierte Oozyten	117
4.6.2 Zellteilung, Fragmentierung und der Einfluß von CB	118
4.6.3 Einfluß des Manipulationszonaschlitzes auf die Entwicklungskompetenz parthenogenetischer Embryonen nach 6 Tagen in vivo-Kultur	120
4.6.4 Schutz der manipulierten Oozyten durch Verpacken in Agar	122
4.6.4.1 Einfluß durch das Handling mit Agar	122
4.6.4.2 Vergleich von in vitro- / in vivo-Kultur parthenogenetischer Embryonen aus in vivo-Oozyten mit in vitro-maturierten Oozyten nach IVC	123
4.6.5 Kerntransfer mit in vivo-maturierten Oozyten	124
4.6.5.1 Kerntransferembryonen nach 6 Tagen in vivo-Kultur und 24h IVC: Mit/ohne Agar	125
4.6.5.2 Entwicklungskompetenz transferierter Kerntransferembryonen mit Agar	126
4.6.5.3 Transfer in vivo-maturierter Oozyten nach Kerntransfer und Verpacken in Agar ohne Rückspülung	127
4.6.6 Darstellung der verschiedenen Manipulations- und Entwicklungsstadien	135
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	137
6 LITERATURVERZEICHNIS	141
7 ANHANG	146

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Beeinflussung von Tiereigenschaften: Zucht, Klonen, Transfektion

1.1.1 Zucht

Der Gedanke der genetischen Manipulation verschiedener Tierarten ist nicht neu. Der Mensch hat schon immer versucht, bestimmte Eigenschaften und Merkmale der „Haus- und Nutztiere“ durch Zucht gezielt zu seinem Nutzen zu verändern. So entstanden bestimmte Rasse-/Nutzungsmerkmale:

Milchkuhassen	Hohe Milchleistung
Fleischrindrassen	Gute Fleischqualität
Mastschweinrassen	Schnelles Ansetzen von Muskelfleisch
Schafassen	Gute Milchleistung oder Wollqualität
Ziegenrassen	Gute Milch- oder auch Fellerträge

1.1.2 Klonen (Teilung von frühen Embryonalstadien beim Tier; somatisches Klonen bei Pflanzen)

Während es bei Pflanzen schon lange möglich war, aus einer Mutterpflanze durch Teilung des Wurzelstocks oder durch Stecklingsvermehrung viele identische Tochterpflanzen zu erhalten, war dies bei Tieren zunächst unmöglich. Wurde durch die Zucht ein Tier mit herausragenden Qualitäten erzeugt, so war der Erhalt dieser Eigenschaften nur durch die Vererbung an die Nachkommen möglich. Die Nachkommenzahl ist aber bei weiblichen Tieren begrenzt, und bei der Mischung von maternalem und paternalem Erbgut können neue Kombinationen auch zu einem Verlust der gewünschten Eigenschaften führen.

Erst das „Embryosplitting“ machte die Erzeugung von Zwillingen oder Mehrlingen möglich. Dabei werden frühembryonale Stadien (2- bis 8-Zeller) mikrochirurgisch geteilt. Die Blastomeren werden nach ihrer Vereinzelung separat in eine evakuierte Zona pellucida verpackt. Nach Transfer in ein Empfängertier kann es zu einer begrenzten Anzahl identischer Geschwister kommen /1/. Diese Methode hat aber den Nachteil, daß nur kleine Klonzahlen erzeugt werden können, und zwar nur aus Embryonen, deren Eigenschaften noch unbekannt sind und nicht aus qualitätsgeprüften Tieren.

1.1.3 Transgene Tier-/Pflanzenzellen im Bioreaktor

Mit dem Fortschritt in den Wissenschaften und der Entschlüsselung des genetischen Codes, werden die Zusammenhänge zwischen Merkmalen und Gensequenzen erkannt. Es ist möglich, im Labor gezielt genetische Veränderungen an Mikroorganismen/ Zellkulturen durchzuführen. Diese produzieren nach Transfektion auch solche Stoffe, die sie von Natur aus selbst nicht zu bilden in der Lage sind. So können jetzt Stoffe, die bislang lediglich bestimmte Zellen des menschlichen Körpers, tierische oder pflanzliche Zellen bildeten, mittels Mikroorganismen im Bioreaktor produziert und bestimmte Medikamente, Impfstoffe und Enzyme in nie zuvor geahnter Menge und Reinheit biotechnologisch gewonnen werden /2/. Der Anspruch der Mikroorganismen an ihre Kulturbedingungen ist sehr hoch. Die Produktionsprozesse unterliegen ständigen strengen Kontrollen.

1.1.4 Vorkerninjektion

Die Injektion von $1-2 \cdot 10^{-12}$ l DNA-Suspension in einen Vorkern der befruchteten Oozyte stellt eine Methode zur Erzeugung transgener Tiere dar. Ob und an welchem Ort des Genoms eine stabile Integration des fremden Gens stattfindet, ist dabei dem Zufall überlassen und kann erst nach Geburt des Tieres geprüft werden. Die Effektivität der Vorkerninjektion liegt bei ca. 1-4% transgener Nachkommen /1/.

1.1.5 Kerntransfer

Als Kerntransfer bezeichnet man das Verschmelzen einer in die Zona pellucida transferierten Zelle mit einer kernlosen (enukleierten) Oozyte. Die Zelle dient als Kernspender. Sie kann sowohl somatischen, adulten, fetalen oder auch frühembryonalen Ursprungs sein. Das eröffnet verschiedene Möglichkeiten:

- Somatische adulte Zellen können von besonders wertvollen Zuchttieren stammen. Da sie in Zellkultur vermehrt und auch kryokonserviert werden können, ist die Anzahl an identischen Kernen und damit auch an Klonen nahezu unbegrenzt.
- Bei der Fusion von frühembryonalen Blastomeren ist die Klonegröße zunächst begrenzt. Durch Wiederholung des Kerntransferprozesses kann nach mehreren Kerntransferrunden jedoch eine erheblich größere Klonezahl erreicht werden.

- Da es möglich ist, somatische Zellen nach der Transfektion mit einem fremden Gen und vor dem Einsatz im Kerntransfer hinsichtlich Genstabilität und Genexpression zu selektieren, ist diese Methode zur Erzeugung transgener Tiere effektiver als die der Vorkerninjektion, da alle Nachkommen das Transgen stabil exprimieren, obwohl der Anteil an gesunden Nachkommen zur Zeit 3% meist noch nicht übersteigt /3/. Diese transgenen Nutztiere produzieren mit der Milch z.B. pharmazeutische Produkte, die nach Aufreinigung als Medikamente eingesetzt werden. Dieses sogenannte „Pharming“ stellt bereits neben der Erzeugung leistungsfähigerer, krankheitsresistenterer Nutztiere einen großen wirtschaftlichen Faktor dar und ist ein wesentlicher Grund, daß noch intensiver an effektiveren Verfahren geforscht wird. /4, 5/

Gründe für das Interesse sind:

1. Grundlagenforschung zur Pluripotenz adulter DNA
2. „Pharming“ von genetisch manipulierten Tieren.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die geschichtliche Entwicklung des Klonens und den Wandel der bevorzugten Versuchsspezies von Amphibien zu Nutztieren.

Tabelle 1.1.5: Übersicht über die Entwicklung des Klonens

1839	T.Schwann	Entwicklung der Zelltheorie /6/
1892	H.Driesch	Teilung von 2-/4-Zellern (Seeigel) führt zur Entwicklung normaler Larven /6/
1894	J.Loeb	Teilung eines befruchteten Seeigeleis in kernhaltige und kernlose Hälfte mit späterem Transfer des Blastomerenkerns in die kernlose Hälfte /6/
1901	H.Spemann	2-Zellteilung bei Amphibien führt zur Entwicklung von 2 normalen Kaulquappen /6/
	J.Loeb / H.Spemann	Teilung von befruchteten Amphibien- und Seeigeleiern in kernhaltige und kernlose Hälften mit späterem Transfer eines Kerns aus 8-/16-Zellern in die kernlose Hälfte führt zu normalen Embryonen /6/
1952	R.Briggs / T.King	Kerntransfer von undifferenzierten Blastulazellen in entkernte Oozyten führt zu Kaulquappen /6/

1953	J.Watson / F.Crick	Beschreibung der DNA-Struktur /6/
1958	M.Fischberg / T.Elsdale / J.Gurdon	Kerntransfer (ohne Entkernung) von Blastulazellen führte zu fertilen Fröschen /6/
1962	J.Gurdon	Kerntransfer von adulten differenzierten Intestinalzellen führt zu Fröschen /6/
1977	J.Gurdon	Veröffentlichung eines Fotos von 30 Fröschen, die aus Kerntransfer von Albinofroschzellen stammten /6/
1983	D.Berardino / N.Hoffner	Kerntransfer von Roten Blutzellen adulter Frösche in MeII-Oozyten führt zu einer maximalen Entwicklungsstufe des Gastrulastadiums, gleiche Kerne in unreife Oozyten transferiert, werden zu schwimmenden Kaulquappen /6/
<p>J. Gurdon konnte durch seriellen Kerntransfer von adulten Froschhautzellen die Entwicklung bis zur schwimmenden Kaulquappe erreichen. Es ist bis heute allerdings niemandem gelungen, durch Kerntransfer aus adultem Amphibiengewebe adulte Tiere zu erstellen.</p> <p>Bei Säugetieren verlief die Entwicklung wie folgt:</p>		
1942	A.McLaren	Teilung von 2-Zellern (Ratte) führt zu Nachkommen /6/
1968	A.McLaren	Teilung von 8-Zellembryonen (Kaninchen) führt zu Nachkommen /6/
1975	D.Bromhall	Kerntransfer von frühembryonalem Kern (Kaninchen) führt zur Blastozyste /6/
1979	S.Willadsen	Teilung von 8-Zellern (Schaf/ Rind) führt zu kleinen Klonzahlen (2-8) fertiler Tiere /6/
1981	K.Illmensee / P.Hoppe	Kerntransfer von „Inner Cell Mass“(ICM)-Mauszellen führt zu lebendigen Nachkommen, das Experiment ist bisher nicht reproduzierbar /6/

1986	S.Willadsen	Kerntransfer von embryonalen Zellen führt zu einem normalen Schaf. Dieses Experiment wird als <u>erstes positives Kerntransfereperiment an Säugetieren mit gesundem Nachwuchs</u> beschrieben. /6/
1989	Prather et al.	7 Ferkel aus Vorkerntausch zwischen Zygoten /6/
1989	Prather et al	1 Ferkel aus Kerntransfer einer Blastomere im 4-Zellstadium /67/
1991	S.Willadsen et al.	Bericht von 101 Kerntransferkälbern aus Morulaekernen (viele Kälber zeigten abnorme Entwicklung) /6/
1995	K.Campbell et al.	<u>Die ersten geklonten Säugetiere aus frühembryonalen Zellen:</u> 2 adulte Schafe (Megan/ Morag) aus Kerntransfer frühembryonaler Zellen nach mehrmonatiger Kultur /6/
1997	I.Wilmut et al.	<u>Das erste geklonte Säugetier aus adultem Gewebe:</u> Schaf „Dolly“ aus Kerntransfer von adultem Milchdrüsengewebe (Epithelzellen) /6/
1997	I.Wilmut et al.	2 Lämmer aus Kerntransfer von fetalen Tag-26 Fibroblasten /6/
1997	A.Schnieke et al.	<u>5 transgene Lämmer</u> (u.a. „Polly“) aus Kerntransfer von fetalen Fibroblasten mit humanem Transgen (Faktor IX)+Markergen /6/
1997	ABS Global	Rinder-Klone „Gene“ aus wiederholtem Kerntransfer mit Tag-30 „Primordial Germ Cells“ (PGC`s) /7/
1998	J.Cibelli et al.	<u>3 transgene Rinder</u> aus Kerntransfer von transfizierten fetalen Fibroblasten /8/
1998	Kato et al.	<u>5 Rinder</u> aus Kerntransfer mit adulten Cumuluszellen /39/
1999	Wells et al.	<u>10 Rinder</u> aus Kerntransfer mit adulten Granulosazellen /39/
2000	I.Polejaeva et al.	<u>5 Ferkel</u> aus zweistufigem Kerntransfer von adulten somatischen Granulosazellen /9/
2000	A.Onishi et al.	1 Ferkel aus Kerninjektion von fetalen Fibroblasten /10/
2000	J.Betthausen et al.	2 Ferkel und 3 bestehende Trächtigkeiten aus Kerntransfer von fetalen Fibroblasten und PGC`s /11/

/6, 7, 8, 9, 10, 11, 39, 67/

Wie die obige Übersicht zeigt, ist es bei einigen Spezies (Schaf, Rind) bereits heute möglich, Nutztiere mit besonders vorteilhaften Genkombinationen, die z.T. durch traditionelles Züchten, Transfektion (in vitro transfizierten und selektierten Zellen), aber auch durch „Gene Targeting“ (Austausch speziesspezifischer durch speziesspezifische Gensequenzen) mittels Kerntransfer in großer Zahl als genetisch identische Klone zu erstellen.

Für die Pharmaindustrie sind nachstehende Faktoren von großem Interesse:

- Das „Pharming“ genetisch veränderter Kühe und Schafe, die in ihrer Milch oder im Urin wertvolle pharmazeutische Produkte produzieren
- Tiere, deren Milch keine Proteine enthält, die bei Babys und anderen Personen allergische Reaktionen hervorrufen können
- Tiere, deren Milch und Fleisch durch Manipulation nährstoffreicher gemacht wurde
- Die Xenotransplantation, bei der kranke menschliche Organe durch genetisch veränderte porcine Transplantate ersetzt werden sollen /4, 5, 6/.

1.1.6 Xenotransplantation

Das humanmedizinische Interesse, ein effektives Kerntransferverfahren beim Schwein zu etablieren, wird durch die Xenotransplantation begründet. Sie soll den wachsenden Mangel an humanen Allotransplantaten ausgleichen. 1996 warteten 15.000 Patienten in Deutschland auf ein Transplantat, 3.500 konnten aber nur versorgt werden. Das Schwein steht deshalb im Mittelpunkt des Interesses, weil es aufgrund der Größenverhältnisse der Organe als Spender für den Menschen in Frage käme aber auch, weil es leicht in Massentierhaltung zu züchten ist. Da Schweine ein fester Bestandteil der menschlichen Nahrung sind, treten ethische Bedenken bezüglich des Tötens dieser Tiere eher in den Hintergrund.

Nach Überwindung von erheblichen Problemen (Abstoßungsreaktionen und Infektionsrisiken des Transplantats) erschlosse sich eine Vielfalt von Xenotransplantaten: Herz, Leber, Lunge, Niere, Hornhaut des Auges, Haut, Knochenmark, Thymus sowie weitere Organe, Gewebe und Zellen.

Die Abstoßungsreaktion des humanen Immunsystems auf das diskordante (entfernt verwandte) Organ /12/ tritt dabei in Stufen auf und gliedert sich folgendermaßen:

- Die Hyperakute Abstoßung (HAR), Akute Vasculäre Reaktion (AVR), die sofort durch präformierte Antikörper komplementvermittelt auftritt.
- Die „Delayed Xenograft Rejection“ (DXR), die eine zelluläre Immunantwort auf den Fremdkörper darstellt, und
- die chronische Abstoßung, die auch bei Allotransplantaten noch nach Jahren auftreten kann /12, 13, 14, 15/.

Um diese Schwierigkeiten Schritt für Schritt zu überwinden, muß zunächst eine genetische Veränderung des Spendertieres vorgenommen werden.

Auf den Endothelzellen der porcinen Organe befindet sich das Gal-alpha1,3gal-Epitop, welches für die HAR verantwortlich ist. Menschen besitzen dieses Epitop nicht. Daher muß es

durch einen „knock-out“ entfernt oder durch die Integration (Transfektion) eines das humane Komplement ausschaltenden Faktors im Spendertier überdeckt werden. Solche komplementinhibierenden Faktoren sind z.B.: CD46; CD59, CD55 /12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24/

Erste durch Vorkerninjektion erstellte transgene Tiere stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Im Experiment mit Affen (Organempfänger) werden nun weitere Maßnahmen zur Verbesserung der Organakzeptanz durchgeführt .

Ein Grund zur Verzögerung von klinischen Experimenten ist das potentielle Risiko durch die „Porcinen Endogenen Retroviren“ (PERV). Schweine haben wie alle Lebewesen im Laufe der Evolution Retroviren in ihr Genom integriert. Diese sind für den Wirt ungefährlich, jedoch ist nicht bekannt, was möglicherweise geschieht, wenn die Artgrenze übersprungen wird.

Humane Zellkulturen konnten im in vitro-System unter bestimmten Bedingungen mit PERV infiziert werden. Weitere Untersuchungen sollen aber umfangreichere Erkenntnisse in diesem Punkt bringen, bevor klinische Studien mit menschlichen Probanden unternommen werden /26, 27, 28, 29, 30/.

1.2 Aufgabenstellung

Wie die Ausführungen in Kapitel 1.1 zeigen, sind die Möglichkeiten und Effizienzen (1.1.1 bis 1.1.5) der genetischen Veränderung von Nutztieren sehr unterschiedlich und variieren zwischen den verschiedenen Species (Tabelle 1.1.5). Dabei erfordern die jeweiligen Zielsetzungen (Klonen, Transfektion, „knock-out“) verschiedene Manipulationsmethoden.

Bei der Xenotransplantation (1.1.6) macht der „knock-out“ und die Transfektion den Einsatz des Kerntransfers von somatischen Kerndonorzellen (2.2) notwendig.

Wie die Übersicht (Tabelle 1.1.5) zeigt, ist dieses Verfahren für die Species Schaf und Rind schon seit den 90er Jahren reproduzierbar, während mit somatischen Kerndonorzellen Erfolge beim Schwein erst im Jahr 2000 publiziert wurden.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, ein Kerntransferverfahren für das porcine System zu entwickeln. Dazu erfolgte die Adaptierung der bisher bei anderen Species erarbeiteten Verfahren und die Optimierung der einzelnen Schritte im komplexen Manipulationsablauf.

1.3 Experimentelles Vorgehen

Der Einfluß der untersuchten Parameter auf die **Fibroblasten** als Kerndonorzellen wurde morphologisch und/ oder durch Trypanblaufärbung vor und nach dem Versuch ermittelt. Die Veränderung der Konfluenz zeigte den Einfluß des Serumentzuges auf die Kultur.

Das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ließ über die Bestimmung der Zellvitalität die Beurteilung der Auswirkungen von Serumreduktion, Trypsinisierungsdauer und Fusionspuls zu.

Die Beeinflussung der **Metaphase II (MeII)-Oozyten** durch die verschiedenen Experimente wurde morphologisch und durch Hoechst33342-Färbung nach einer bestimmten Kulturdauer bestätigt. Die Kernfärbung gab Aufschluß über die Fusion des Kerns nach Transfer und den Entwicklungszustand von **Embryonen** (Kerntransfer/ Parthenogenese).

Diese analytischen Methoden bildeten die Grundlage, um nachfolgende Parameter zu untersuchen:

- *Vergleich verschiedener Entkumulierungsmethoden*
- *Arretierung der Kerndonorzellen durch Serumreduktion*
- *Anpassung des Mikromanipulationsablaufes*
- *Erarbeitung der Fusionspulsbedingungen*
- *Optimierung der Fusion durch Verbesserung der Fusionskammer*
- *Vergleich verschiedener Aktivierungsmethoden an parthenogenetischen und Kerntransferkomplexen*
- *Bedeutung der Oozytenreifung für den Erfolg des Kerntransfers*
- *Vergleich von in vivo-/ in vitro-Kultur.*

2 Theoretischer Teil

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Fibroblasten

Fibroblasten sind somatische Zellen. Sie durchlaufen einen Zellzyklus, der aus Mitose (M)- und Interphase besteht. Die Interphase wiederum unterteilt man in die G1-, die S- und die G2-Phase. In der relativ kurzen M-Phase findet die Zellteilung statt. In der folgenden G1-Phase liegt die Zelle mit diploidem Chromosomensatz vor. Es entscheidet sich nun, ob eine erneute Zellteilung stattfindet. Stehen der Zelle zu wenig Nährstoffe zur Verfügung oder hat sie enge Berührung mit anderen Zellen (Kontaktinhibierung), bleibt sie in einem Ruhezustand, der auch als G0-Phase bezeichnet wird. In der Synthese (S)-Phase wird der Chromosomensatz verdoppelt; die Zelle ist damit tetraploid. In der G2-Phase werden die Vorbereitungen zur M-Phase getroffen /31/. Bei Zellen in Zellkultur dauert der Zellzyklus im allgemeinen zwischen 16 und 24 Stunden (h).

Dagegen kann das Durchlaufen des Zyklus der einzelnen Zelltypen in einem vielzelligen Organismus je nach Zellart zwischen 8 h und 100 Tagen schwanken. In diesem Falle sind die Unterschiede bei der Dauer der G1-Phase am größten /31/. -

Primäre Fibroblasten sind in Zellkultur adhärent.

2.1.2 Oozyten

Die Oozyte (Eizelle), die weibliche Keimzelle, ist die mit Abstand größte Zelle im Säugerorganismus. Sie entwickelt sich im Ovar während der Oogenese aus einer diploiden Urkeimzelle /32/. Nach einer mitotischen Proliferationsphase differenzieren sich die Oogonien zu primären Oozyten. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die erste meiotische Teilung: Die DNA repliziert sich, so daß jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht. Die homologen Chromosomen paaren sich entlang ihrer Achsen und Crossing Over findet zwischen Chromatiden dieser Chromosomen statt. Anschließend wird die Zelle je nach Species in der Prophase der Teilung I der Meiose für den Zeitraum von wenigen Tagen bis zu vielen Jahren angehalten. In dieser verlängerten Prophase synthetisieren die primären Oozyten die Hülle (Zona pellucida) und die Rindengranula, akkumulieren Ribosomen, Eidotter (Zytoplasmabestandteile), Glycogen, Lipide und mRNA, die später die Synthese der Proteine steuert und für das frühe Embryonalwachstum sowie den Start des Entwicklungsprogramms benötigt werden /33/.

Die nächste Phase der Entwicklung der Oozyten nennt man Oozyten-Reifung; sie beginnt gewöhnlich nach dem Erreichen der geschlechtlichen Reife (Pubertät). Hormone bewirken, daß die Teilung I der Meiose fortgesetzt wird. Die Hypophyse gibt Gonadotropine (Polypeptid-Hormone) an das Blut ab, von wo aus sie die Follikelzellen, welche die Oozyten umgeben, dazu stimulieren, das Steroid Progesteron zu sezernieren. Das Progesteron bindet an Rezeptor-Proteine der Plasmamembran der Oozyte. Die Adenylatcyclase in der Membran wird inaktiviert, wodurch die cyclische AMP-Konzentration sinkt, was wiederum die Aktivität der cyclischen AMP-abhängigen Proteinkinase (A-Kinase) vermindert. Dies führt möglicherweise zur Aktivierung eines Proteins, das M-Phase-Förderfaktor (MPF) genannt wird und für das Fortschreiten der Meiose I von der Prophase I bis zur Metaphase I führt. Die gleichzeitige Inaktivierung des MPF ermöglicht die Kernteilung. Die anschließende Reaktivierung von MPF sorgt für die Weiterentwicklung bis zur Metaphase II. An diesem Punkt verhindert das Arretierungssystem (zytosolische Faktoren, CSF) der Oozyte die Inaktivierung des MPF, wodurch die Eizelle in der MeII gehalten wird. Erst die Befruchtung erhöht die Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Zytosol und löst diese Blockierung, die MPF-Konzentration sinkt und die Embryonalentwicklung beginnt /33/.

Bei der *in vitro*-Reifung der Oozyten werden die Hormone dem Medium zugegeben. Die Chromosomen kondensieren wieder, die Kernhülle verschwindet und die replizierten homologen Chromosomen teilen sich während der Anaphase I in zwei Tochterkerne. Beide enthalten die Hälfte der ursprünglichen Zahl der Chromosomen. Am Ende der Teilung I steht die asymmetrische Zytoplasmateilung, bei der sich ein kleiner Polkörper und eine große, das gesamte Entwicklungspotential enthaltende sekundäre Oozyte bilden. Die Chromosomen bestehen noch aus den zwei Schwester-Chromatiden, die in der folgenden Teilung II der Meiose separiert werden. Dies geschieht mitotisch während der Anaphase II, der die Telophase II folgt, in der eine asymmetrische Zellteilung erneut einen kleinen Polkörper abschnürt. Normalerweise bleibt die gereifte Oozyte aber in der MeII arretiert, bis die Befruchtung die Beendigung der Meiose initiiert /33/.

2.1.2.1 *In vitro*-Reifung der Oozyten

Während der Reifung im Ovar befindet sich die Oozyte in einem Follikel. Sie ist mit Granulosazellen und Kumuluszellen umgeben, die für den Stoffwechsel und die Reifung notwendig sind. Die Menge des Kumulus ist reifungsabhängig. Punktierte unreife Oozyten besitzen nur wenige Lagen dieser Granulosazellen. Der Kumulus nimmt mit Vollendung der

Reifung stark zu, er expandiert. Bei der Gewinnung von unreifen Oozyten für die in vitro-Maturation (IVM) werden deshalb nur größere Follikel ($\geq 2\text{mm}$) punktiert. Bei der folgenden Selektion des Materials wird auf vollständigen Kumulus von möglichst 3 und mehr Lagen geachtet. Die Mechanismen, die für die Regulierung von Oozytenwachstum und -reifung verantwortlich sind, sind noch nicht ganz geklärt. Es ist aber sicher, daß ein Dialog zwischen der Eizelle und den Granulosazellen stattfindet /34/.

Für den Erfolg der IVM ist die Mediumzusammensetzung ein sehr wichtiger Punkt. Es liegen hier - gerade beim Schwein - große Defizite vor, denn die Reifungsergebnisse sind im allgemeinen noch nicht zufriedenstellend. Die Maturation ist auf zwei Ebenen zu betrachten, die im in vitro-System auffällig unterschiedlich sind. So ist es mit immer neu zusammengesetzten Medien zwar gelungen, die Kernreifung, das Ausbilden der MeII-Platte und des Polkörpers, zu erreichen (45-86% /35/), die Zytoplasmareifung ist aber häufig unvollständig.

Über die Plasmamaturation ist bisher wenig bekannt, jedoch sind bestimmte zytosolische Faktoren für die Entwicklungskompetenz der Oozyte nach Fertilisation notwendig.

Im Vergleich mit in vivo-produzierten Embryonen besitzen in vitro-produzierte nach Transfer eine geringere Entwicklungskompetenz und höhere Mortalität. Sie weisen geringere Zellzahlen auf, veränderte ICM/Trophectoderm-Verhältnisse (spezialisierte Zellen für die Ausbildung des Embryos bzw. der Embryonalhüllen /1/), Blastomeren unterschiedlicher Größe sowie Zytoplasmafragmente und die Entwicklung verläuft langsamer. Durch Färbung der DNA und des Zytoskeletts konnte man zeigen, daß sowohl DNA-Brüche wie auch eine veränderte Strukturierung des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Mikrofilamente) bei IVM-Embryonen auftreten, die dann vermehrt zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen /36/. Im Morula-/Blastozystenstadium sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Das Actinmuster in vivo-gereifter Oozyten ist gleichmäßig, während das in vitro-gereifter Oozyten ungleichmäßig ist, Verklumpungen und abnorme Blastomerengrößen zeigt /36/.

Wird eine MeII-Oozyte nicht befruchtet oder aktiviert, altert sie. Dabei degradiert ein Zytosolfaktor (CSF), welcher zur Stabilisierung von „Maturation Promoting Factor“ (MPF) dient und die Eizelle in der MeII arretiert. Der MPF-Level sinkt, und die Aktivierbarkeit der Oozyte nimmt zu /37/.

Die folgende Abbildung zeigt die verschiedenen Selektions- und Reifungsstufen von Schlachthofoozyten (Balken = 150µm) :

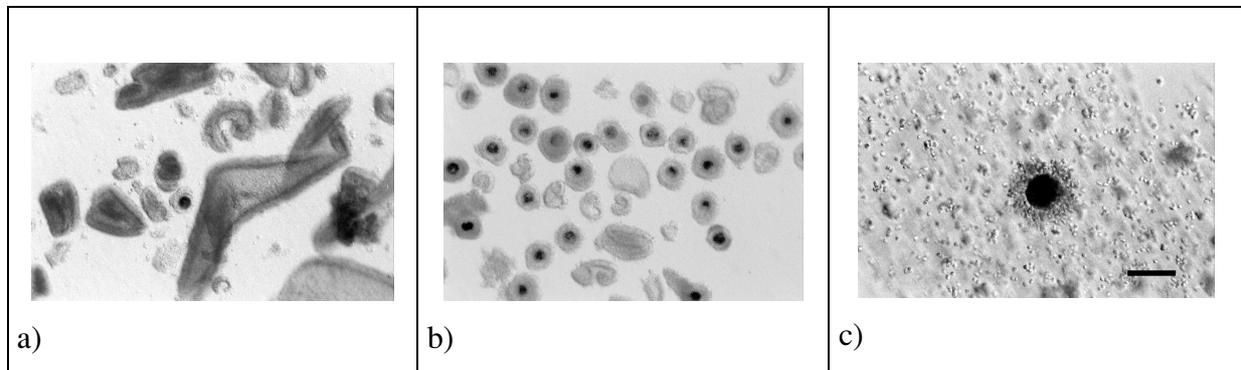


Abb. 2.1.2.1: a) Punktat der Schlachthofovarien; b) selektierte KOK's, c) KOK nach 48h IVM

2.1.2.2 Embryonalentwicklung

Nach der Befruchtung der Oozyte beginnt die Embryonalentwicklung. Die Oozyten-DNA und die DNA des Spermiums dekondensieren, die Vorkerne verschmelzen und der Einzeller beginnt, sich zu teilen. Die frühembryonalen Entwicklungsstadien beinhalten dabei 2- /4- /8- /16-Zeller, Morulae, Blastozysten und schlüpfende Blastozysten. Höhere Stadien können in der in vitro-Kultur (IVC) nicht erreicht werden. In der frühen Entwicklung gibt es einen wichtigen Punkt, an dem maternale mRNA-Transkripte der Oozyte degradiert werden und die embryonale Kontrolle einsetzt. Dieser Wechsel wird „maternal to zygotic transcription transition“ (MZTT) genannt und findet speciespezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Beim Schwein ist dies die Teilung vom 4- zum 8-Zeller und ist durch den „Vierzellblock“ gekennzeichnet. Ca. 30-40% der porcinen 4-Zeller bleiben in ihrer Entwicklung stehen und degenerieren /38/.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Morphologie und Nomenklatur einiger Teilungsstadien:

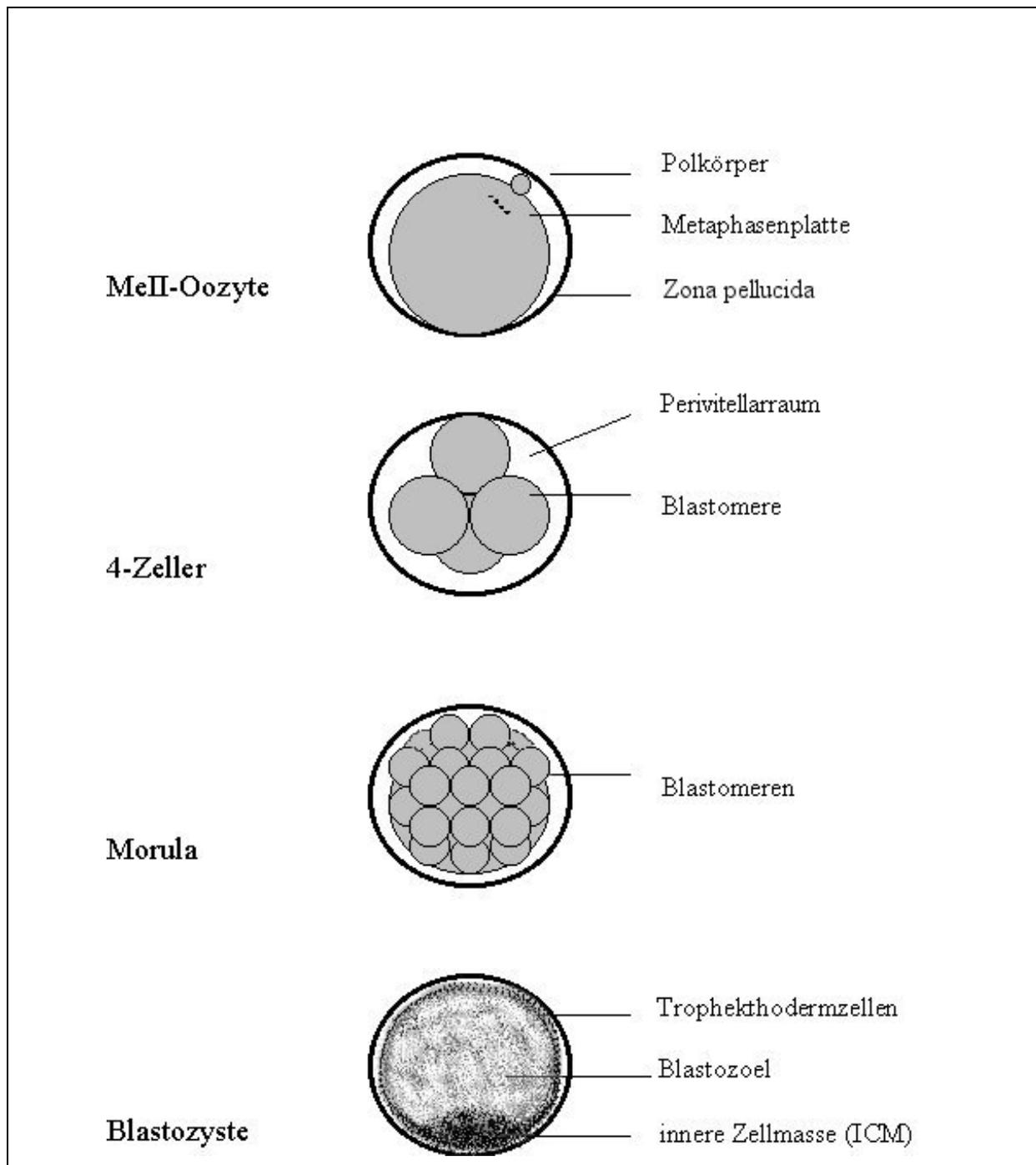


Abb. 2.1.2.2: Entwicklungsstadien

2.1.2.3 Parthenogenese

Bei unbefruchteten Oozyten kann auch ohne die Hilfe von Spermien eine Teilung ausgelöst werden. Unabhängig davon, ob die Aktivierung spontan oder künstlich ausgelöst wurde, kommt es zu einem parthenogenetischen Embryo.

Es gibt in der Natur Species (Eidechsen), die sich entweder immer oder unter ungünstigen Umweltbedingungen (in Ermangelung eines Partners) parthenogenetisch vermehren /33/.

Bei Säugetieren degenerieren parthenogenetische Embryonen ab einem bestimmten Zeitpunkt. Experimente zeigten, daß aus einer Zygote mit zwei paternalen Vorkernen ein Embryo ohne die Strukturen, die normalerweise aus der inneren Zellmasse stammen, entstand. Aus einer Zygote mit zwei maternalen Vorkernen entwickelte sich ein Embryo ohne die Strukturen, die normalerweise aus dem Trophektoderm stammen /33/.

Aufgrund des Imprintings, der Festlegung des Expressionsmusters von maternalen und paternalen Chromosomen, werden bestimmte Gene während der embryonalen Entwicklung nur exprimiert, wenn diese vom Vater oder andere Gene nur, wenn sie von der Mutter stammen. Daher konnten noch keine parthenogenetischen Nachkommen von Species erstellt werden, die sich normalerweise auf geschlechtlichem Wege fortpflanzen und auf die Gene beider Eltern angewiesen sind, wie es z. B. bei Säugetieren der Fall ist. Man nimmt an, daß das Methylierungsmuster der Gene für die Expression ausschlaggebend ist. So wird ein Gen, wenn es von der Mutter stammt und methyliert ist, in einem Tier nicht exprimiert, während das gleiche vom Vater stammende nicht-methylierte Gen exprimiert wird/33/.

Vor der Befruchtung befindet sich die MeII-Oozyte in einem metabolischen Ruhezustand. DNA bzw. RNA werden nicht und Proteine nur in geringem Umfang synthetisiert. Die Befruchtung, die Fusion mit einem Spermium, setzt bei einer Eizelle eine Entwicklung in Gang, die zur DNA-Synthese und Teilung führt. Das Spermium dient dabei nur als Auslöser eines Programms, das bereits im Ei vorhanden ist.

Eine Oozyte kann durch eine Vielzahl von unspezifischen chemischen und physikalischen Behandlungen aktiviert werden (2.2.5).

Die Embryonalentwicklung in Abwesenheit eines Spermiums nennt man Parthenogenese. Die Aktivierung ist von der Bildung neuer Proteine unabhängig, da sie auch in Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren abläuft.

Entscheidend ist vielmehr die Änderung dreier Ionenkonzentrationen in der Oozyte, die bei der Penetration des Spermiums ablaufen:

1. Der Anstieg der Permeabilität der Plasmamembran für Na^+ -Ionen bewirkt eine Depolarisierung der Membran innerhalb weniger Sekunden.
2. Eine massive Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus einem intrazellulären Calcium-Speicher führt in wenigen Sekunden zu einem deutlichen Ca^{2+} -Anstieg im Zytoplasma.
3. Nach ca. 60 Sekunden beginnt ein mit einem Einstrom von Na^+ gekoppelter Ausstrom von H^+ , der zu einem großen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes führt.

Aus diesen Ereignissen resultieren zwei Folgen:

1. Die Eizelle wird für andere Spermien undurchdringbar, Polyspermie wird verhindert.
2. Die ersten Schritte des Entwicklungsprogrammes werden gestartet.

Es scheint am wahrscheinlichsten, daß der vorübergehende Ca^{2+} -Anstieg für die Aktivierung verantwortlich ist. Er breitet sich von der Penetrationsstelle des Spermiums in einer ringförmigen Welle über das ganze Ei aus und setzt dabei das Entwicklungsprogramm in Gang. Die Ca^{2+} -Erhöhung kann künstlich ausgelöst werden, indem man z.B. Ca^{2+} injiziert oder indirekt über Ca^{2+} -tragende Ionophoren (A 23187) überträgt (siehe auch 2.2.5.2, 2.2.5.3, 2.2.5.4, 2.2.5.5, 2.2.5.6).

Der Aktivierungsweg läuft über die Inositol-Phospholipid-Zellkommunikation.

Die Bindung extrazellulärer Liganden an Zelloberflächen-Rezeptorproteine kann zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) in der Plasmamembran führen; es entsteht Inositol-triphosphat (InsP_3) und Diacylglycerin. InsP_3 setzt Ca^{2+} aus einem intrazellulären Speicher ins Zytosol frei, während Diacylglycerin die Proteinkinase C aktiviert. Vermutlich wird der Aktivierungssignalweg des Spermiums durch ein G-Protein vermittelt, welches eine spezifische Phospholipase C zur Hydrolyse des PIP_2 anregt /33/. Da der Calciumanstieg nur von kurzer Dauer ist, stellt er nur die Initiierung der Aktivierung dar; für den späteren (im Minutenbereich) Anstieg der Proteinsynthese und die Initiation der DNA-Synthese (nach ca. 30min.) ist er nicht direkt verantwortlich.

Es scheint, als würde der intrazelluläre pH-Anstieg einen wichtigen Einfluß auf diese späteren Ereignisse ausüben.

Proteinkinase C bewirkt die Aktivierung eines Na^+/H^+ -Austauschers in der Plasmamembran. Das Membrantransportprotein nutzt die Energie, die in dem Na^+ -Gradienten über die Membran gespeichert ist, um H^+ aus der Zelle zu transportieren, wodurch sich der pH-Wert von 6,7 auf 7,2 erhöht. Die Aktivierung parthenogenetischer Embryonen ist also auch durch pH-Wert-Veränderungen möglich.

2.2 Kerntransfer

Beim Kerntransfer wird zunächst eine reife Oozyte entkernt. Dazu wird die DNA (Metaphaseplatte und Polkörper) mit Hilfe einer Mikromanipulationspipette entfernt. Der so erzeugte Ooplast enthält Erbinformationen nur noch in Form der mRNA.

Eine diploide als Kerndonor dienende Zelle wird in den Perivitellarraum der entkernten Oozyte transferiert. Nach erfolgter Fusion des Zytoplasmas der beiden Zellen bringt sie ihr Genom als neue DNA in den Ooplasten ein. Auf diesem Weg erhält man einen Kerntransfereinzeller, der dem Zustand der Zygote nach Vorkernverschmelzung entspricht.

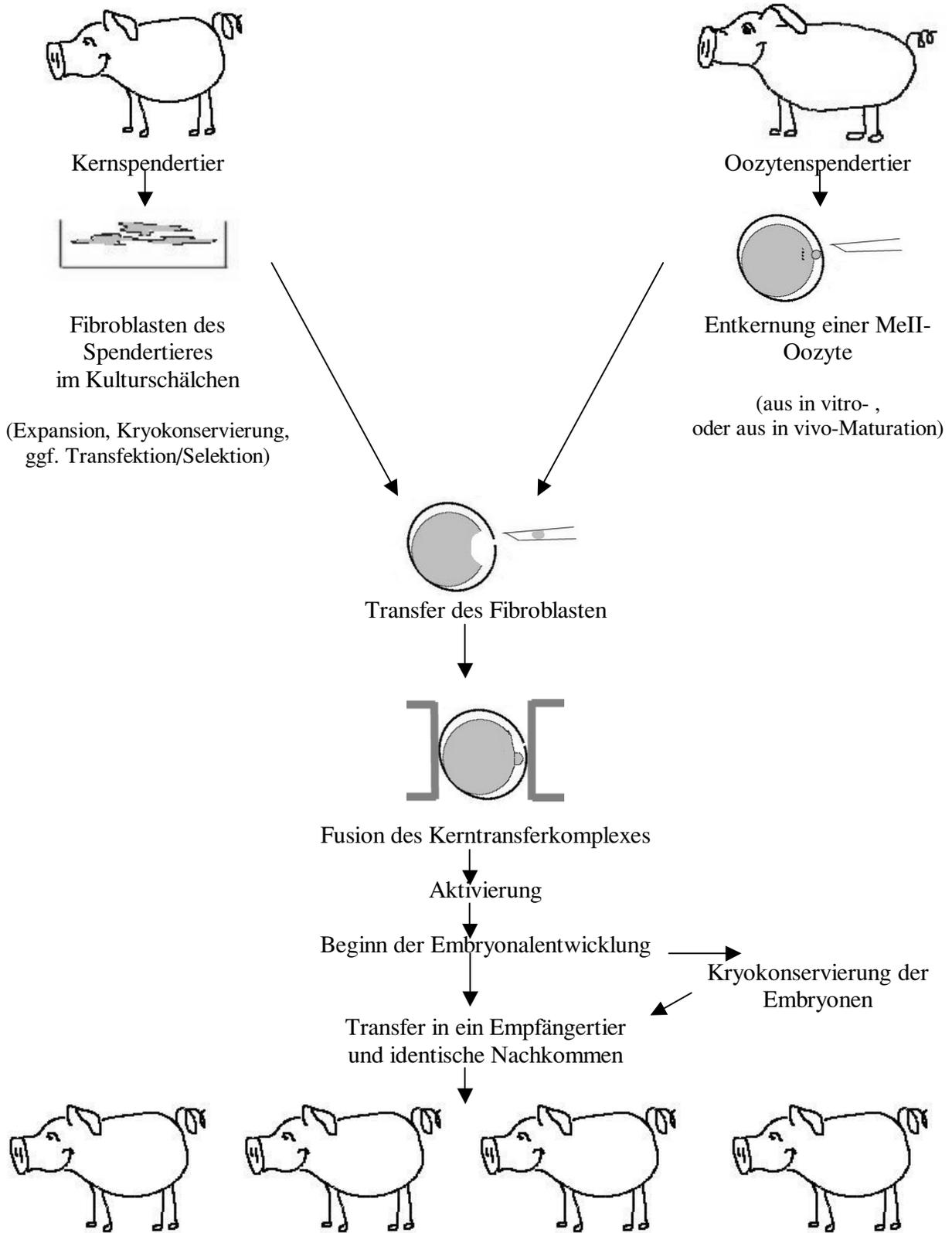
Dabei spielt die Zellzyklussynchronität von Spender und Empfänger eine wichtige Rolle, damit es nicht zu abnormen Ploidien kommt.

Nach artifizieller Aktivierung (Stimulus siehe 2.1.2.3) erfolgt die Zellteilung und die Embryonalentwicklung.

Der Kern des Fusionskomplexes wird nun von der Zelle durch noch nicht bekannte Mechanismen „rückprogrammiert“. Er wird totipotent, denn aus dem Kern einer 8-Zellblastomere, eines fetalen Fibroblasten oder einer adulten Euterepithelzelle, die in unterschiedlichem Maße differenziert waren, wird durch unbekannte Zytoplasmafaktoren ein Kern, der sich zu allen während der Embryonalentwicklung notwendigen Zelltypen entwickeln kann /39/. Der Nachweis einer vollständigen Rückprogrammierung ist erst erbracht, wenn auf dem beschriebenen Wege ein gesundes Tier erzeugt wird.

Die folgende Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Ablauf des Kerntransferprozesses:

Kerntransferschema



2.2.1 Zellzyklussynchronisation

In den meisten Veröffentlichungen wurden MeII-Oozyten als Zytoplasten eingesetzt. Diese besitzen vor der Entkernung einen haploiden Chromosomensatz. Wird ein diploider Kerndonor (z.B. somatische Zelle in der G1-Phase) mit dem Ooplasten fusioniert, so erfolgt nach der Kerndekondensation und der Rückprogrammierung die Replikation der DNA mit anschließender Zellteilung, bei der der Kern mitotisch auf beide Blastomeren des Zweizellers verteilt wird. Jede Blastomere ist dann wieder diploid. Befindet sich der Kerndonor in einem anderen Zellabschnitt mit begonnener oder abgeschlossener DNA-Replikation in der S-/ oder G2-Phase, so wird nach Fusion und Replikation automatisch eine falsche Chromosomenzahl (Ploidie) entstehen, die zur Degeneration und Lyse der frühembryonalen Zellstadien führt /40/. Daher sind die Kernspender in der G0/G1-Phase besonders wichtig für das Gelingen des Versuches.

Es finden sich aber auch andere Beispiele, wie die Fusion von Telophase-entkernten Zytoplasten mit Blastomeren aus dem Morulastadium /37/. Bei dieser Methode liegt der Vorteil in der effizienten E nukleation ohne Kernfärbung durch Entfernung des ersten und zweiten Polkörpers mit wenig dazwischenliegendem Plasma und der Selektion von Oozyten, die positiv auf die bereits durchgeführte Aktivierung reagiert haben. Die Morulablastomeren befinden sich in der Interphase und besitzen einen nicht näher bestimmbareren DNA-Status.

Man hat zwar Fortschritte in der Beeinflussung der Zellphase von Blastomeren gemacht /37/, jedoch ist es nach wie vor schwierig, nicht toxische Verfahren mit guter Effizienz bei den verschiedenen Species anzuwenden. In diesem Fall ist es daher einfacher, die Kern-Plasma-Inkompatibilitäten durch Manipulation der Zellzyklusinasen im Ooplasten zu reduzieren. Der „Maturation Promoting Factor“ (MPF) ist die wichtigste Kinase. Sie ist für die Auflösung der Kernmembran (NEBD) und die Kondensation der DNA bei mitotischen und meiotischen Zellen verantwortlich. MPF arretiert die Oozyten in der MeII und wird kurz nach der Befruchtung abgebaut /37/.

2.2.1.1 Anreicherung der Kerndonorzellen in der G0/G1-Phase

Untersuchungen an kultivierten nicht transfizierten fetalen porcinen Fibroblasten haben gezeigt, daß diese eine lange G1-Phase besitzen. Eine Veränderung der Kulturbedingungen verändert aber die Dynamik des Zellzyklus. Bei normal wachsenden Kulturen beträgt der Anteil der Zellen in der G0-Phase 3% und in der G1-Phase 71%. Damit wären 74% der Zellen diploid und für den Kerntransfer geeignet. Da man aber nur relativ wenige Fibroblasten im

Experiment in den Perivitellarraum der Ooplasten transferiert, ist man bestrebt, den G₀-/G₁-Anteil zu erhöhen. Außerdem sind möglicherweise gerade die G₀-Fibroblasten besonders für eine Reprogrammierung zugänglich. Werden die Zellen serumreduziert kultiviert, so verschiebt sich der Anteil der G₀-Fibroblasten auf 48%, 39% befinden sich in G₁. Damit sind insgesamt 87% der Zellen diploid. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Serumreduktion 5 oder 10 Tage dauert. Werden die Fibroblasten bis zur Kontaktinhibierung mit Serum kultiviert, so haben 6% die G₀- und 79% die G₁-Phase erreicht und ergeben somit insgesamt 85% diploide Zellen. Die Beobachtung, daß der G₀-Anteil bei den kleinen Fibroblasten (72%) am größten ist und die kleinen Zellen während der Serumreduktion zunehmen (42% bei wachsenden Kulturen; 51% nach 5 Tagen Serumreduktion; 66% nach 10 Tagen Serumreduktion), erweist sich bei der morphologischen Selektion der zu transferierenden G₀-Fibroblasten als hilfreich /41/.

2.2.2 Die Plasmamembran der Tierzellen

Die räumliche Begrenzung der Säugetierzellen wird durch die Plasmamembran und durch das Zytoskelett gewährleistet und ist bei weitem nicht so stabil wie etwa die Zellwand eines Pilzes oder eines Bakteriums. Membranen bestehen im allgemeinen aus einer Phospholipiddoppelschicht (siehe Abb. 2.2.2 a).

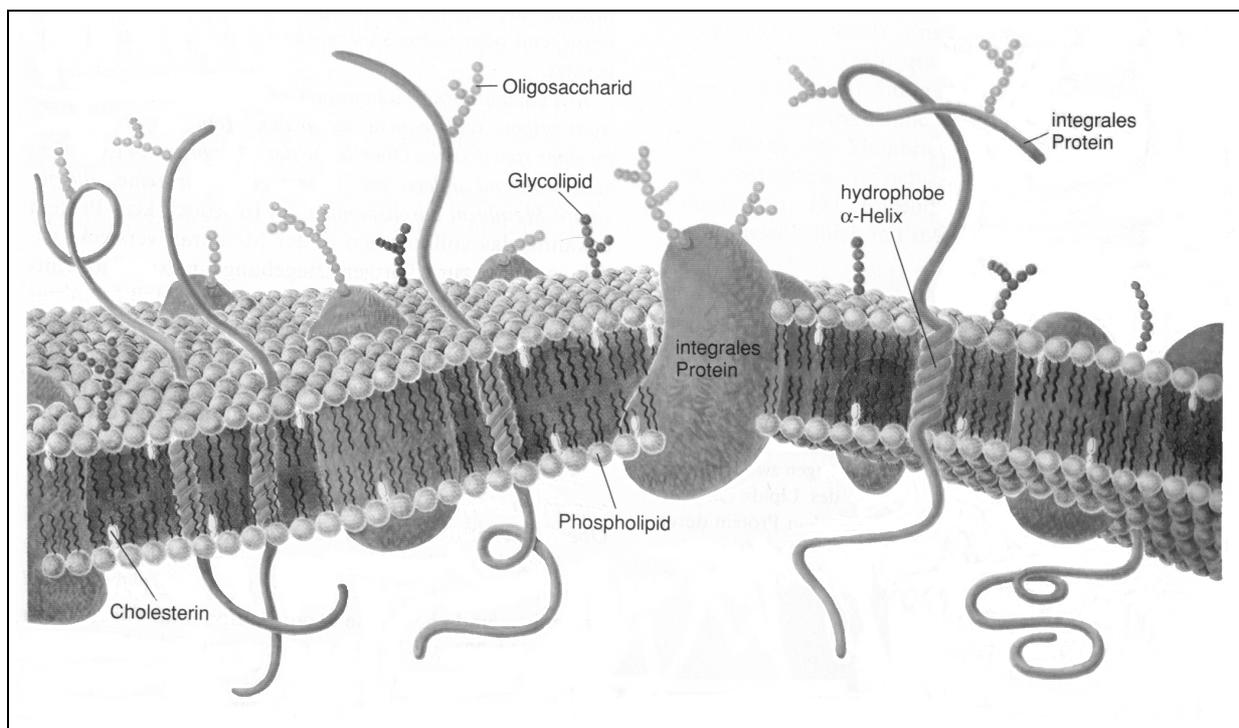


Abb. 2.2.2 a: Schematische Darstellung einer Plasmamembran (integrale Proteine, Phospholipide, Cholesterin und Glycolipide) /31/

Diese Schicht aus natürlich vorkommenden Phospholipiden ist einer Flüssigkeit sehr ähnlich, da sie ebenfalls die für die flüssige Phase charakteristischen zufälligen Bewegungen ausführt. Die Doppelschicht ist weich und flexibel, da die Kohlenwasserstoffketten der Phospholipidmoleküle sehr beweglich sind. So können zwei in der selben Schicht benachbarte Phospholipide einmal pro Mikrosekunde ihre Positionen tauschen (siehe Abb. 2.2.2 b).

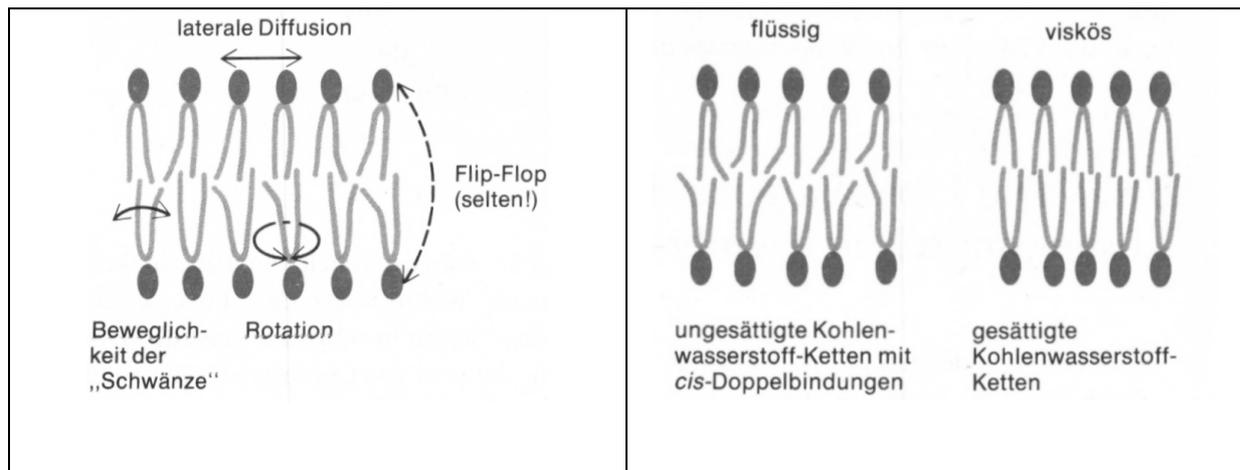


Abb. 2.2.2 b: Verschiedene Bewegungsmöglichkeiten eines Phospholipidmoleküls in einer Lipiddoppelschicht /33/

In den Membranen tierischer Zellen befinden sich außerdem noch zwei weitere Arten von Lipiden: Glycolipide und Cholesterol.

Das Cholesterol zählt zu den Hauptlipiden der Membran. Es ist ein großes scheibenförmiges Molekül aus vier verbundenen Kohlenstoffringen, welche ihm eine starre Struktur verleihen. Mit seinem hydrophoben Teil fügt es sich in den hydrophoben Bereich der Plasmamembran ein.

Wie sich gezeigt hat, vermindert eine zusätzliche Einlagerung dieser Komponente die Flexibilität tierischer Membranen. Eine Temperaturerniedrigung auf z.B. 31°C hat ebenfalls diese Wirkung. Zellen in Suspension werden so unempfindlicher gegen Scherstreß und neigen weniger zur Agglomeratbildung /42/.

2.2.3 Membranfusion durch Elektropuls

Pulse in einem elektrischen Feld können Elektroporation oder Elektrofusion bewirken. Hierbei werden Ladungen getrennt, die zu einer Erhöhung der Flip-Flop-Rate in der Membran und zur Polarisierung der Zelle führen.

Die elektrisch induzierte Zellfusion ist ein physikalischer Vorgang, in dem zwei Zellen gleicher oder unterschiedlicher Art zu einer neuen verschmolzen werden. Meist besteht die Fusion aus einer Kombination eines Wechselstrom (AC)-Feldes geringer Spannung und einem kurzen Gleichstrom (DC)-Puls hoher Spannung. Im inhomogenen elektrischen AC-Feld wird ein enger Membrankontakt zwischen den Fusionspartnern durch Dielektrophorese hergestellt. Der DC-Puls verursacht einen lokalen reversiblen elektrischen Membranzusammenbruch /43/.

AC-Feld = Dielektrophorese

Somatische Zellen in Suspension treten aufgrund der Braunschen Molekularbewegung und der partiellen negativen Ladung ihrer Membranen nicht in engen Membrankontakt. Das AC-Feld generiert Dipole an den Membranen und sorgt so für einen engen Kontakt. Der positive Pol der einen Zelle zieht den negativen Pol der anderen Zelle an, und man kann am Mikroskop eine „Perlschnurbildung“ bei etwa gleich großen Zellen erkennen (Abb. 2.2.3 a und Abb. 2.2.3 b).



Abb. 2.2.3 a: Zellabstoßung aufgrund partiell negativer Membranladung und Anziehung durch Dipolbildung der einzelnen Zellen

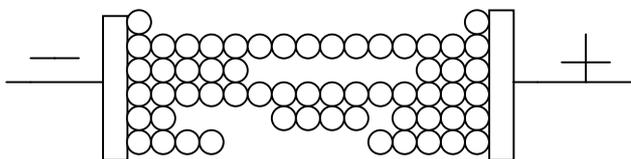


Abb. 2.2.3 b: Perlschnurbildung gleich großer Zellen im inhomogenen elektrischen Feld

Dabei unterscheidet man zwischen Dielektrophorese und Elektrophorese:

Dielektrophorese = Bewegung neutraler Teilchen im inhomogenen Feld (AC-Feld ist möglich)

Elektrophorese = Bewegung geladener Teilchen im homogenen Feld (AC-Feld ist nicht möglich)

Im inhomogenen Feld ist die Feldstärke auf beiden Seiten des Teilchens unterschiedlich, woraus die Bewegung zum Ort größter Ladungsdichte resultiert.

Im homogenen Feld ist die Feldstärke auf beiden Seiten des Teilchens gleich groß; daher bewegen sich ungeladene Teilchen nicht.

Sind die Teilchen unsymmetrisch oder in der Größe sehr verschieden, ist es schwierig; die Fusionspartner im elektrischen Feld auszurichten (dies gilt für das Ausrichten, „alignment“ von Fibroblast und Ooplast).

Dielektrophoresekräfte steigen proportional mit dem Volumen des Teilchens, so überwiegt bei Partikeln $< 0,3\mu\text{m}$ die Diffusionskraft /43/.

Elektrophorese wird bei allen Teilchengrößen beobachtet.

Zellen formen im inhomogenen Feld Aggregate (Perlschnüre), da sich die polarisierten Teilchen auf ihrem Weg zum Ort größter Ladungsdichte annähern. Dabei ziehen sich die polarisierten Membranen aufgrund der Polarisierung an und überwinden so die ursprüngliche elektrostatische Abstoßung der neutralen Teilchen. Es kommt zum Membrankontakt /43/.

Das Fusionsmedium sollte nur eine geringe Leitfähigkeit besitzen [$< 10^{-4}\Omega/\text{cm}$], da eine hohe Elektrolytkonzentration zur „Aufheizung“ des Mediums und zu Turbulenzen führen würde, die den Fusionsprozeß behindern.

Geeignete Fusionslösungen sind: Mannitol, Sorbitol, Glucose, Sucrose, Histidin.

Für einen guten Zellkontakt ist es wichtig, die Frequenz [$> 10\text{kHz}$] des Wechselfeldes nicht zu niedrig einzustellen, da bei Lösungen mit geringer Leitfähigkeit sonst Elektrolyse auftreten kann, die sowohl die Membranfusion wie auch die Zellvitalität negativ beeinflusst. Die Frequenz hat Einfluß auf die Rotation der Teilchen im elektrischen Feld. Rotation tritt auf, weil sich die zu Dipolen gewordenen Zellen gegenseitig beeinflussen. Außerdem entstehen bei der Dipolbildung in der Membran wirkende Kräfte, wie: Polarisierung, Dipolorientierung

der Phospholipide und der Proteine sowie Wechselwirkungen mit natürlichen Dipolen in der Membran, die mit dem Carriertransport zusammenhängen. Die Stärke des AC-Feldes soll zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche der Membranen führen /43/.

DC-Puls = Rechteckpuls

Der reversible elektrische Zusammenbruch der Membran im Bereich des Membrankontaktes zum Fusionspartner ist der primäre Prozeß, der zur Initiierung der Fusion führt. Wird eine Phospholipiddoppelschicht sehr schnell [in 10-100 μ s] mit hoher Spannung polarisiert (dies entspricht einem Rechteckpuls), bewirkt dies einen elektrischen Membranzusammenbruch. Das Membranpotential wird so schnell aufgeladen, daß eine reversible Erhöhung der Leitfähigkeit und der Durchlässigkeit auftritt, die das Membranpotential anschließend auf einen niedrigeren Wert abfallen läßt. Bei zu hoher Spannung, Temperatur oder Pulsdauer geht der reversible elektrische in den irreversiblen mechanischen Membranzusammenbruch über.

Die optimalen Fusionsparameter variieren von Zelle zu Zelle, was bei der Fusion verschiedener Zelltypen miteinander berücksichtigt werden muß. Nach der integrierten Laplace-Gleichung (siehe Gl.2.2.3) ist die kritische Membranspannung (Bereich des reversiblen Membranzusammenbruchs) volumenabhängig und daher bei verschieden großen Zellen unterschiedlich /43/.

Der Zusammenbruch geschieht normalerweise an der Lipid-Proteinverbindung oder innerhalb der Proteine. Die Proteine werden dabei mehr beeinflusst, denn hier dauert die Wiederherstellung der ursprünglichen Formation länger [wenige Minuten bis zu 1/2h in Abhängigkeit von der Temp.]. Durch die plötzliche hohe Spannung des Rechteckpulses wird die Membran 10-20% zusammengedrückt. Die elektrischen Kompressionskräfte wechseln schneller als die elastischen Rückstellkräfte der Membran. Die maximal anlegbare Spannung hängt von den elastischen Druckverhältnissen, der relativen dielektrischen Konstante und von der Grunddicke der Membran ab. Bereits gedehnte Phospholipiddoppelschichten benötigen eine geringere Spannung. Die lokale elektromechanische Kompression führt zur Porenbildung. Diese Poren [Porenradius ≤ 3 nm; Dichte $\cong 10^7$ /cm²; Porenerhalt $\cong \mu$ s-min.] führen zu stark erhöhter Membranpermeabilität, und es kommt zu einem Austausch von intrazellulären und extrazellulären Komponenten durch Diffusion. Die Größe der ausgetauschten Moleküle ist abhängig von der angelegten Spannung und der Pulsdauer. Bei hohen Werten können Moleküle der Größe von Genen die Membran penetrieren. Auf diese Weise werden z.B. Plasmide in permanente Zelllinien gebracht /43/. Die hohe Ladungsdichte

im leitenden Zellinneren sowie der damit im Zusammenhang stehende osmotische Druck bedingen Nebeneffekte auf die Zellorganellen und das Zytoplasma. Die Zunahme der Permeabilität einer Zelle mit gegebenem Radius in Abhängigkeit der zunehmenden Feldstärke kann theoretisch durch die integrierte Laplace-Gleichung angegeben werden.

$$\text{Gleichung 2.2.3: } V_c = 3/2 r * E_c \cos \vartheta$$

V_c : Spannung für den Zusammenbruch; r : Zellradius; E_c : kritische Feldstärke; ϑ : Winkel zwischen einer Membranseite und den Feldlinien /43/

Die benötigte kritische Spannung ist somit proportional zum Zellradius und zum eingeschlossenen Winkel mit der Feldrichtung, wird also bei steigender Feldstärke zuerst am Membranpunkt erreicht, bei dem $\vartheta = 0^\circ$ ist ($\cos 0^\circ = 1$). Mit der Erhöhung der Feldstärke werden dann auch Membranbereiche mit größerem ϑ poriert, bis zu $\vartheta = 90^\circ$ ($\cos 90^\circ = 0$). Das bedeutet, daß die Phospholipiddoppelschicht rundherum immer mehr Poren bekommt, je höher die Feldstärke eingestellt wird und die Porengröße am Ort mit $\vartheta = 0^\circ$ am größten ist. Ist der Kontakt zwischen zwei Fusionspartnern hergestellt, so tritt bei Porenbildung in angrenzenden Membranbereichen eine Kanalbildung auf, durch die ein Massentransport stattfinden kann. An den gegenüberliegenden Zellpunkten kommt es dann zum Austausch mit der Fusionslösung. Da aufgrund der geringen Kontaktfläche nur wenige Poren auftreten, ist ein Fusionieren nur möglich, wenn die runden Zellen im Berührungsbereich abflachen, um die Fläche zu vergrößern (Abb.:2.2.3c).

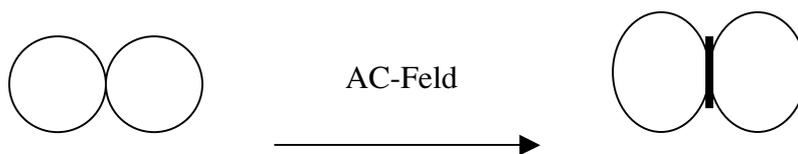


Abb. 2.2.3 c: Vergrößerung der Kontaktfläche der Zellen durch das AC-Feld

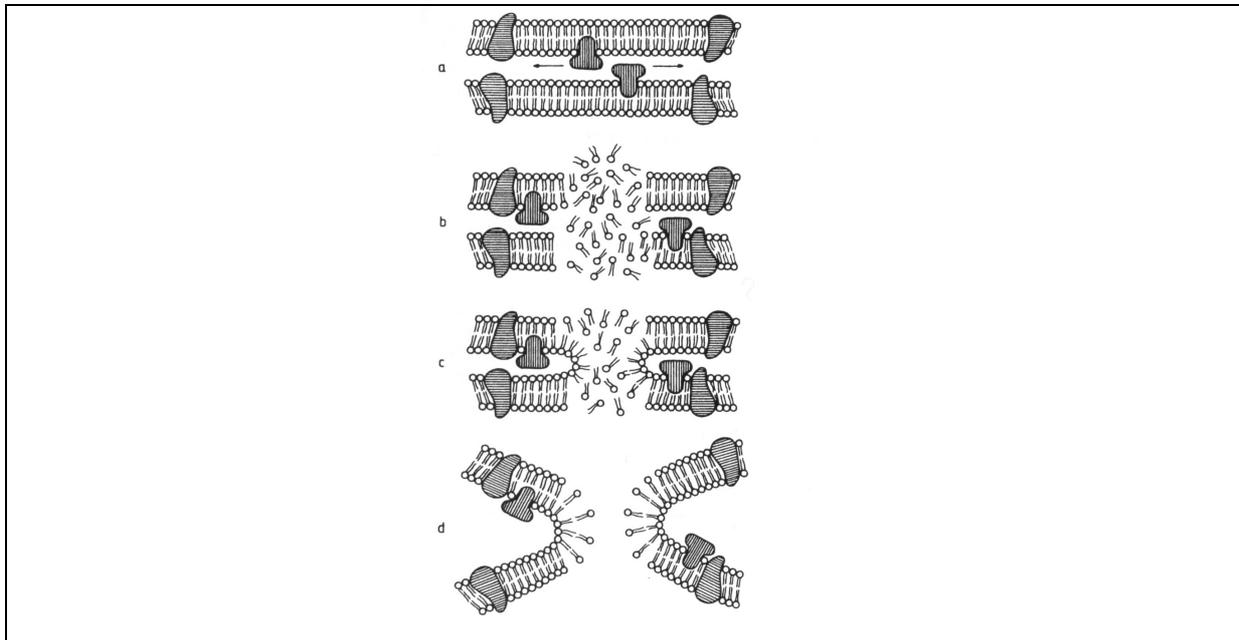
Der Fusionsmechanismus:

Abb. 2.2.3 d: Modell der möglichen molekularen Prozesse beim Erreichen der kritischen Membranspannung; a = Verschiebung integraler Proteine, b = reversibler Membranzusammenbruch, c = Verbindung der Membranen, d = Brückenbildung zwischen den fusionierenden Zellen

Die beim Membranzusammenbruch entstandenen Poren in den Phospholipiddoppelschichten der beiden Fusionspartner grenzen direkt aneinander. Lipidmoleküle, die orientierungslos in den Porenregionen liegen, besitzen die Tendenz zu aggregieren, sich wieder zu ordnen und können dabei Brücken zwischen den beiden Membranen der zu fusionierenden Zellen bilden. Man nimmt an, daß die Zeitkonstante der Brückenbildung kleiner ist als die Rückbildungskonstante der einzelnen Membranen. Wenn die Brückenbildung dominiert, kommt es zur Kanalbildung zwischen den beiden Zytoplasten. Dieser ist thermodynamisch instabil, da er zur Oberflächenvergrößerung führt und die Oberflächenspannung der Membranen zunimmt. Die Brückenbildung kann nur durch Plasmatransport aufrechterhalten werden. Der folgende Prozess der Fusion verkleinert die Oberfläche wieder und läuft ohne weitere Energiezufuhr ab /43/.

Proteinreiche Phospholipiddoppelschichten sind möglicherweise weniger gut zur Fusion geeignet und Membranbereiche mit weniger Proteinen besser, da integrale Proteine den engen Lipidkontakt sterisch behindern (siehe Abb. 2.2.2 a) und selbst nicht zur Brückenbildung fähig sind. Man nimmt deshalb an, daß durch das AC-Feld und die resultierende Annäherung

der Zellen eine Verschiebung der Proteine aus dem Kontaktbereich heraus bewirkt wird. Diese Vorgänge sind noch nicht geklärt /43/.

2.2.4 Reprogrammierung

Die Voraussetzung, differenzierte Zellkerne - nach Kerntransfer totipotent – den normalen Embryoentwicklungsprozeß durchlaufen zu lassen, wird durch die Rückprogrammierung („Reprogramming“) des Kerns ermöglicht. Der Mechanismus ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß bestimmte Zytoplasmafaktoren mit der dekondensierten DNA in Wechselwirkung treten und dafür sorgen, daß die Zellteilung nicht an dem Punkt weiterläuft, an dem sie vor Fusion des Kerns war, sondern auf der Stufe der befruchteten Eizelle /44/. Der Kern muß auf die Zytoplasmaumgebung reagieren und die Entwicklung kontrollieren. Der einzige Nachweis der richtigen Reprogrammierung ist die normale Embryonalentwicklung. Dabei ist das erste sichtbare Anzeichen der „Kommunikation“ zwischen DNA und Plasma die Kernschwellung, die deutlich über das Ausmaß der normalen Dekondensation hinausgeht. Der Kern reduziert oder stellt die Transkription ganz ein und verändert seine Kernstruktur (Änderung der Chromatinstruktur). Es werden andere für die embryonale Phase wichtige Proteine gebildet /45/. Der Zeitpunkt der Reprogrammierung ist spezifisch und führt vermutlich zu den verschiedenen speziesabhängigen Effizienzen im Kerntransfer. Es ist denkbar, daß „schwierige“ Spezies (*) mit einer geringen Kerntransfereffizienz einen sehr frühen Zeitpunkt der kompletten Reprogrammierung benötigen, da sie früher als andere von der maternal gesteuerten zur embryonal gesteuerten Kontrolle übergehen (MZTT; Kapitel 2.1.2.2). Im Vergleich beginnt die Initiierung embryonaler mRNA bei der Maus (*: 1-1,2% gesunder Nachwuchs bezogen auf übertragene Embryonen /39/) im 2-Zellstadium, beim Schwein (*: 0,7-1,2% Kapitel 5) im 4-Zellstadium und beim Rind (>10% /39/) im 8-Zellstadium /46/.

Es gibt verschiedene Anzeichen, die dafür sprechen, daß die Zellzyklussynchronisation für die Reprogrammierung des Kerns eine wichtige Rolle spielt /39/, sich G0-Kerne (siehe Kapitel 2.2.1) leichter rückprogrammieren lassen und ihre DNA besser für die Chromatinrestrukturierung zugänglich ist. Daher kann sich eine verlängerte G0-Phase des Kerns im Ooplasten günstig auswirken. Zu realisieren ist dies, indem man zwischen Fusion und Aktivierung eine gewisse Zeitspanne verstreichen lässt.

In verschiedenen Beispielen wurde gezeigt, daß adulte differenzierte somatische Zellkerne zu lebendigem Nachwuchs führen können /39/. Die meisten Donorzellen waren dabei von sich aus oder durch die Kulturbedingungen in G0 versetzt worden. Einige Autoren vertreten die

Ansicht, daß wachsende, nicht in G0 versetzte Zellen, ebenso gut zum Kerntransfer geeignet sind /8/, allerdings ist der Anteil an G0/G1-Kernen in diesen Kulturen auch sehr hoch ($\cong 74\%$) /41/, so daß der Nachweis, daß es tatsächlich Kerne aus Zellen anderer Zellzyklusstadien waren, die zu lebendigem Nachwuchs führten, nicht angetreten werden konnte.

Eine Serumreduktion wachsender Kulturen zur Induktion der „Ruhephase“ (G0) ist also möglicherweise nicht notwendig. Es ist naheliegend, daß es verschiedene Stadien von G0 gibt, denn künstlich in G0 versetzte Kulturen befinden sich auch immer im Gleichgewicht mit apoptotischen (sterbenden) und sogenannten „sensiblen“ Zellen /39/. Ein G0-spezifischer Promotor, der z.B. mit GFP gekoppelt, dann exprimieren würde, wenn vitale Zellen dieses Stadium erreicht haben, wäre nützlich, um sich über diese Fragen Klarheit zu verschaffen.

2.2.5 Aktivierung der Oozyte/ des KT-Einzellers

Die Aktivierung der befruchteten oder parthenogenetischen Oozyte initiiert die Zellteilung und startet die Embryonalentwicklung.

2.2.5.1 Aktivierung durch Befruchtung

Das Spermium löst einen Ca^{2+} -Anstieg und anschließende Oszillation aus. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, so könnte das Spermium entweder selbst mit bestimmten Rezeptoren (1,4,5-Inositoltriphosphat-Rezeptor = InsP_3R , oder Ryanodinrezeptor) interagieren oder ein cytosolischer Spermafaktor (SF), der bei der Verschmelzung von Spermium und Oozyte freigesetzt wird (/33/, siehe auch 2.1.2.3).

Die Ca^{2+} -Freisetzung bewirkt u.a. die Ausschüttung der Cortikalgranula, die die Zonareaktion („zona hardening“) auslöst /47, 48/. In der Säugetieroozyte wird die Meiose durch eine komplexe Kaskade von Protein-Phosphorylierungen/ Dephosphorylierungen, die durch Proteinkinasen gesteuert werden, kontrolliert und durch den Ca^{2+} -Anstieg fortgesetzt. Die Aktivierung von regulatorischen Proteinen durch Proteinkinasen ermöglicht die optimale Interaktion zwischen Kern und Zytoplasma. So folgen einer Runde der DNA-Replikation zwei aufeinanderfolgende Runden der Chromosomentrennung:

1. Die Reduktionsteilung
2. Nach Befruchtung folgt die 2. Teilung der Meiose, der 2. Polkörper wird ausgeschleust

Die biochemische Umgebung im Zytoplasma erlaubt nach der Spermapenetration die optimale paternale Chromatindekondensation und Umorganisation zur Vorkernbildung. Die DNA-Synthese beginnt, und die Zelle teilt sich /48/.

2.2.5.2 Parthenogenetische Aktivierung durch Elektropuls

Pulse in einem elektrischen Feld wirken innerhalb bestimmter Grenzwerte aktivierend auf MeII-Oozyten. Die Polarisierung und Ladungstrennung in der Membran führt zu einer Erhöhung der Flip-Flop-Rate der Lipide. Nach dielektrischem Zusammenbruch der Phospholipiddoppelschicht und Elektroporation ist der verstärkte Stoffaustausch zwischen dem Fusionsmedium und dem Zytoplasma möglich (siehe Kapitel 2.2.3).

Vermutlich führt das Oszillieren des Oozytendipols im AC-Feld zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und gemeinsam mit dem Einstrom bestimmter Ionen nach DC-Pulsapplikation zur Auslösung der Parthenogenese /48, 49/. Dabei hat man beobachtet, daß nach der Freisetzung des intrazellulären Calciums ein länger andauernder Einstrom (bis zu 2min.) von extrazellulärem Calcium folgt. Daher sollte das Fusionsmedium Ca^{2+} enthalten, jedoch darf die Konzentration nicht zu hoch sein.

Bei porcinen Oozyten ist eine Konzentration von ca. 0,05mM geeignet /49/. Nach der Aktivierung kann sich die DNA der reifen Oozyte dann entweder teilen und in der Telophase den 2. Polkörper ausschleusen, was zu haploiden Embryonen führt, da kein paternales Erbgut hinzukommt, oder man unterdrückt die 2. Teilung der Meiose durch Zugabe von Proteinsyntheseinhibitoren oder von Cytochalasin B (CB) zum Kulturmedium für z.B. 4h. Der Anteil an diploiden Embryonen wird so erhöht. Diese besitzen weit bessere Bedingungen für die parthenogenetische Entwicklung als haploide „Embryonen“ /50/. So konnten durch Kombination von Elektropuls und CB-Inkubation (4h) 73% 3- und 4-Zeller und 4% 16-Zeller an Tag 3 der in vitro Kultur (IVC) erstellt werden /50/. Bei Transfer von 3- und 4-Zellern auf synchronisierte Empfängertiere fand man bei Rückgewinnung an Tag 19 nach Aktivierung einen ähnlichen Entwicklungsverlauf wie bei Feten, die durch Fertilisation entstanden sind. Zum ersten Mal wurde hier berichtet /50/, daß die parthenogenetische Entwicklung von porcinen Embryonen über das Implantationsstadium im Uterus hinaus gegangen ist. 71% der Feten hatten den Status von Tag 19-IVF-Embryonen erreicht. 12 von 15 Embryonen hatten ein schlagendes Herz. Bei anderen Versuchsdurchgängen variierte das Ergebnis in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, wie z.B. der Anzahl übertragener Mehrzeller. Außerdem spielt die Synchronisierung zwischen Aktivierung und Empfängertier eine wichtige Rolle /50/.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Elektroaktivierung ein zur Embryonalentwicklung geeigneter Aktivierungsstimulus ist.

2.2.5.3 Cytochalasin B

$C_{29}H_{37}NO_5$; FW = 479,6 g/mol

Cytochalasin B ist ein pilzliches Stoffwechselprodukt. Es inhibiert die Zellteilung durch Blockade der Ausbildung und Zerstörung von kontraktile Mikrofilamenten und inhibiert den Glucosetransport /51/.

Cytochalasin B ändert den Zustand der Actinpolymerisation und wirkt dadurch auf das Zellverhalten ein.

Die Hauptaufgabe der Cytochalasine ist die spez. Bindung an die schnell wachsenden Plus-Enden der Actinfilamente, wodurch sie das Anfügen von weiteren Actinmolekülen verhindern. Die Cytochalasine lähmen so viele verschiedene Formen der Zellbewegung einschließlich der Fortbewegung der Zelle, Phagocytose, Zytokinese, die Produktion von Microspikes und Lamellipodien sowie die Faltung von Epithelschichten zu Röhren /33/.

Das Cytoskelett ist ein Netz aus Proteinfilamenten im Cytosol und gibt der Zelle die Gestalt. Man unterscheidet dabei 3 versch. Arten von Filamenten: Mikrotubuli, Actinfilamente und Intermediärfilamente.

Cytochalasin B inhibiert die Cytochinese (Zytoplasmateilung; Actinpolymerisation), nicht aber die Kernteilung, bei der hauptsächlich Mikrotubuli beteiligt sind. Kern- und Plasmateilung sind zwar normalerweise gekoppelt, stellen aber unabhängige Vorgänge dar /33/.

Cytochalasin B wird dem Manipulationsmedium beim Kerntransfer zugesetzt, da es das Zytoplasma der Oozyte „gallertartig“ werden lässt und die Entnahme einer definierten Menge an Plasma überhaupt erst möglich macht. Außerdem wird es verwendet, um nach der Aktivierung von Kerntransferprodukten die Zellteilung für eine bestimmte Zeit zu verzögern. Das „Reprogramming“ (siehe Kapitel 2.2.4) soll so verlängert werden und möglichst vollständig ablaufen /52/.

Bei Parthenogeneseversuchen wird Cytochalasin B eingesetzt, um den Anteil an diploiden Embryonen zu erhöhen /50, 53, 54/.

2.2.5.4 6-Dimethylaminopurin (DMAP)

$C_7H_9N_5$; FW = 163,2 g/mol /51/

DMAP ist ein Proteinkinaseinhibitor. Seine Wirkung beruht auf der Inhibierung der Phosphorylierung. Dadurch sinkt die Konzentration verschiedener Kinasen, wie z.B. MPF-Kinase (siehe Kapitel 2.1.2.1) oder „mitogen activated protein“-Kinase (MAP: Mikrotubuli assoziierte Proteine), wodurch die Oozyten die MeII verlassen. DMAP unterbricht die Spindelorganisation (MAP), daher wird der 2. Polkörper meist nicht ausgeschleust und parthenogenetische Embryonen werden diploid /55/. Eine Inkubation der Oozyten allein in DMAP hat kaum aktivierende Wirkung, wohl aber die Kombination aus Ca^{2+} -Freisetzung und DMAP-Inkubation, wobei in der Literatur meist Ionomycin zur Ca^{2+} -Oszillation verwendet wird /11/.

2.2.5.5 Cycloheximid

$C_{15}H_{23}NO_4$; FW = 281,3 g/mol /51/

Cycloheximid zählt zu der Gruppe der Antibiotika. Es unterbricht die Proteinsynthese und wirkt direkt am Translocase-Enzym. Die Kettenverlängerung der Proteinsynthese am Ribosom kann formal in drei Schritte zerlegt werden. Im 1. Schritt wird ein Aminoacetyl-tRNA-Molekül an der A-Bindungsstelle gebunden; im Schritt 2 bildet sich eine neue Peptidbindung; im Schritt 3 bewegt sich das Ribosom um drei Nucleotide auf der mRNA weiter, setzt dabei das alte tRNA-Molekül frei und bringt sich so in die neue Ausgangsstellung, damit ein neues Aminoacetyl-tRNA-Molekül binden kann. Im 3. Schritt blockiert Cycloheximid die Freisetzung des alten tRNA-Moleküls und die Verlängerung der Proteinkette /33/.

Wie DMAP, wirkt auch Cycloheximid von sich aus wenig aktivierend und wird in Kombination mit Ca-freisetzenden Stimuli verwendet. Dies kann z.B. Ethanol-Zusatz zum Medium /56/ oder Calcium-Ionophor /57/ sein.

Im Zusammenhang mit porcinen Oozyten wurde der Einsatz von Cycloheximid noch nicht beschrieben.

2.2.5.6 Aktivierung mit Thimerosal und Dithiothreitol (DTT)

Thimerosal:

$C_9H_9HgO_2SNa$; FW = 404,8 g/mol /51/

Thimerosal oxidiert die Sulfhydrylgruppen an den intrazellulären Ca^{2+} freisetzenden Proteinen (InsP₃R, Ryanodinrezeptor), wodurch Ca^{2+} -Peaks im Ooplasma gemessen werden können. Dies löst die Freisetzung der Cortikalgranula aus, die Polyspermie verhindern. Thimerosal oxidiert aber auch die Sulfhydrylgruppen der Tubuline der Meiosespindel. Die Tubulinpolymerisation wird dadurch unterbunden, und die Oozyte bleibt in der MeII arretiert /58/. Daher muß eine nachfolgende Reduktion der SH-Gruppen die Oxidation wieder rückgängig machen, um eine Aktivierung zu erreichen.

DTT:

$C_4H_{10}O_2S_2$; FW = 154,2 g/mol /51/

DTT reduziert die Sulfhydrylgruppen der genannten Rezeptoren, wodurch die Ca-Kanäle geschlossen werden. Es reduziert ebenfalls die SH-Gruppen an den Tubulinen, so daß ein Fortschreiten der durch das Thimerosal blockierten Kern- und Plasmateilung erfolgen kann /58/. Inkubiert man gereifte porcine Oozyten zunächst in Thimerosal und anschließend in DTT, so werden, falls Ca-haltiges Medium verwendet wird, mehrere Ca^{2+} -Peaks gemessen, ganz ähnlich denen bei der Befruchtung. Das DTT hebt die oxidierende Wirkung des Thimerosals wieder auf. Verwendet man Ca-freies Medium, so ist nur ein Ca-Peak zu messen. Diese Methode wird in der Literatur sehr häufig im Zusammenhang mit porciner Parthenogenese beschrieben und führt dort zu haploiden Blastozysten. /58/.

3 Material und Methoden

3.1 Fibroblasten

Die hier verwandten Kerndonorzellen sind primäre porcine Fibroblasten, die aus ca. 25 Tage alten Feten gewonnen wurden. Die Gewinnung der primären Fibroblasten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr.W. Kues.

3.1.1 Gewinnung

Trächtige Sauen (Deutsche Landrasse) wurden ca. 25 Tage nach der natürlichen Bedeckung geschlachtet, der Genitaltrakt entnommen, die Feten aus dem Uterus entfernt und in warmer phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS, SIGMA D-5773) gewaschen. Nach Abtrennung von Kopf, Herz, Leber, Darmschlingen und Nieren, wurden die Extremitäten sowie das Rückrat und der verbliebene Rumpf als Fibroblasten für die Kultivierung vorbereitet.

Das Ziel der folgenden Arbeitsschritte war die Erzeugung von Einzelzellen bzw. Kleinaggregaten. Dazu war es notwendig, die Gewebeteile kleinstmöglich zu zerschneiden, 30 min. in EDTA/Trypsinlösung (10ml) auf einem Magnetrührer zu rühren, den Überstand in DMEM-Kulturmedium (10ml) mit 10% Fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin (SIGMA P-3032/S-9007) aufzunehmen und mittels einer zweistufigen fraktionierten Sedimentation die Einzelzellen im Überstand von den großen Zellaggregaten zu trennen.

Der zweite Überstand wurde mit dem ersten vereinigt, 30 min. sedimentiert und ohne größere Zellklumpen in frisches Medium überführt, bei 900 rpm 10 min. zentrifugiert und das Pellet (Fibroblasten eines Fetus) in 4,5ml Kulturmedium in einem Monolayer (25 cm²) ausgesät. Die Präparation von Feten-Pools erfolgte wie oben beschrieben, wobei mehrere Feten zusammen in entsprechend größeren Volumina verarbeitet wurden. Alle verwendeten Lösungen sind vor Gebrauch auf 37-38°C angewärmt und das Kulturmedium nach 24h gegen frisches gewechselt worden.

3.1.2 Kultur

Die Kultivierung von Säugetierzellen im Labor erfordert Wachstumsbedingungen, die denen im Ursprungsorganismus entsprechen, d.h., abhängig von der Zellart muß die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im geeigneten pH-Bereich gewährleistet sein.

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte in 24-Well-Platten (TPP) im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C und zur Stabilisierung des pH-Wertes bei einem CO₂-Gehalt von 5%. Als Medium wurde DMEM (SIGMA D-2554 + Zusätze, siehe Anhang) mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

3.1.3 Ablösen und Passagierung

Um die optimalen Wachstumsbedingungen in bezug auf Nährstoff- und Stoffwechselmetabolitkonzentration zu gewährleisten und eine maximale Expansion der angelegten Kultur (Fetenpools, bzw. Einzelfetenzellkultur) zu erreichen, war das Medium alle 3 Tage zu wechseln, und die Zellen mußten bei Konfluentwachsen (Wachstum bis zur Kontaktinhibierung) passagiert werden. Mit Hilfe des Indikators Phenolrot war ein Erkennen der Konzentrationszunahme des Stoffwechselproduktes Milchsäure am Umschlag der Farbe des Mediums von Rot nach Gelb (Absinken des pH-Wertes) möglich. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt. Durch Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline =DPBS, SIGMA D-5652) wurden Mediumreste abgespült und EDTA/Trypsin (0,05%ig) auf die Kultur gegeben. Nach ca. 5min. Inkubation im Brutschrank rundeten sich die Zellen ab und verloren ihre Adhärenz. Die nun in Suspension vorliegenden Fibroblasten wurden in DMEM + 10% FCS aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturgefäße verteilt.

3.1.4 Serumreduktion zur Anreicherung der Zellen in den Phasen G0/G1

Die Serumreduktion der Fibroblasten erfolgte durch zweimaliges Waschen in DMEM + 0,5% FCS und anschließender Kultur in diesem Medium.

3.1.5 Einfrieren

Die Fibroblasten wurden zunächst abgelöst (3.1.3), in kleinen Portionen (ein 24-Well \cong 2cm² Kulturfläche) in 1ml Einfriermedium (DMEM + 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen (Greiner) in flüssigem Stickstoff zur Vorratshaltung gelagert.

3.1.6 Auftauen

Da DMSO für Säugerzellen toxisch ist, mußten die aufgetauten Zellen sofort in frischem Kulturmedium aufgenommen werden. Zum Entfernen des Cryoprotectivums wurde das Zellpellet zentrifugiert (900 Upm; 3 min.) und der Überstand abgesaugt. Alsdann wurden die Fibroblasten im Kulturmedium resuspendiert und ausgesät .

3.2 Oozyten

Die weiblichen Keimzellen durchlaufen in ihrem Reifungsprozeß verschiedene Stadien, die hormonell vom Organismus gesteuert werden /1/.

3.2.1 Gewinnung und Reifung

Beim Schwein steht für Reproduktionstechniken im Labor Oozytenmaterial zwei verschiedener Reifungsstadien zur Verfügung: unreife und im Tier (in vivo-) gereifte Oozyten.

3.2.1.1 In vitro gereifte Oozyten

Unreife Oozyten wurden Schlachttieren - ca. 6 Monate alte, meist präpuberale Sauen (90 – 100 kg) – entnommen, im Schlachthof (Minden oder Lübecke) gesammelt, in einem Thermosgefäß ins Labor transportiert und in vitro maturiert.

Alsdann erfolgte das Waschen der Ovarien mit 0,9%iger NaCl/Pen/Strep-Lösung (siehe Anhang). Die Gewinnung der Oozyten durch Punktion der Follikel (\geq 2mm) mit einer Kanüle (18 GA1 ^{1/2}, Microlance3, Becton Dickinson), die über ein 50ml-Zentrifugenröhrchen an einer Vakuumpumpe (COOK) angeschlossen war, erforderte einen Volumenstrom von 20ml pro min.

Nach zweimaligem Aufgießen des Punktates mit phosphatgepuffertes Kochsalzlösung (D-PBS 5773) + 1% NewBornCalfSerum (NBCS) und Sedimentation wurden Oozyten mit drei und mehr Kumuluslagen (Kumulus-Oozyten-Komplex = KOK) selektiert und je ca. 50 KOK's in 5-Wells (Mini-Tüb, Embryokulturschale) in 500µl Reifungsmedium (TCM 199,

SIGMA M-2520 + Zusätze siehe Anhang) pipettiert. Alle verwendeten Lösungen sind vor Gebrauch auf 38-39°C angewärmt worden.

Nach 44-48 Stunden waren die Oozyten mit einer mittleren Rate von 75% gereift.

3.2.1.2 In vivo gereifte Oozyten

Die Bezeichnung „in vivo“ bezieht sich auf den Reifungsort der Oozyten.

Präpuberale Jungsaugen (90 – 100 kg) wurden durch Injektion von 1500IE PMSG 111h vor Schlachtung und durch eine zweite Injektion von 500IE hCG 36,5h vor Schlachtung im institutseigenen Schlachthaus hormonell stimuliert.

Danach erfolgte die Entnahme des Genitaltraktes, Abtrennung der Ovarien von Uterus und Eileiter, Waschen der Ovarien in 0,9%iger NaCl/Pen/Strep-Lösung und die Punktion/Spülung der Follikel (5-15 mm Durchmesser) auf einer Heizplatte (38,5°C) einzeln mittels einer 1 ml Spritze mit PBS+1%NBCS.

Die Follikelzahl pro Tier sowie die gewonnenen reifen MetaphaseII-Oozyten wurden notiert.

Falls ein Ovar schon frisch ovulierte Follikel zeigte, schloß sich eine Eileiterspülung mit folgenden Schritten an:

Freipräparation des Eileiters und des Fimbrientrichters, so daß beide ohne Krümmung senkrecht hängend gehalten werden konnten, zweimalige Spülung mit je 10ml PBS+1%NBCS vom Uterusende des Eileiters in Richtung Fimbrientrichter und die Ausspülung der frisch ovulierten Eizellen.

Die durch Punktion oder Spülung gewonnenen Oozyten wurden „pro Spendertier“ in frischem PBS+1%NBCS gesammelt und schnellstmöglich weiterverarbeitet.

Alle verwendeten Lösungen sind vor Gebrauch auf 38-39°C angewärmt worden.

3.2.2 Entkumulierung

Sowohl die Kerntransferversuche (Mikromanipulation, Fusion) als auch die Parthenogeneseversuche (wegen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse) erforderten das vollständige Entfernen der Kumulusschichten um die Zona gereifter Oozyten.

In der Literatur werden folgende Methoden genannt /11, 40, 59/:

- Entkumulierung durch heftiges Pipettieren (Abscheren der Kumuluszellen)
- Entkumulierung nach Inkubation in Hyaluronidase
- Entkumulierung nach Inkubation in EDTA/Trypsin.

Im Rahmen der Arbeit wurden diese Methoden miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.2.1 dargestellt.

3.3 Mikromanipulation

Die Mikromanipulation setzte sich aus den Schritten der Oozytenentkernung und dem Fibroblastentransfer in den Perivitellarraum des Ooplasten zusammen.

3.3.1 Mikromanipulationseinheit

Die Mikromanipulationseinheit bestand aus einem Mikroskop (Zeiss Germany, Axiovert-135, Hoffmannoptik E-PL), einem Manipulator (Luigs & Neumann, mini 25 motorisch), der über eine elektronische Steuereinheit (Luigs & Neumann, SM 2/2) betrieben wurde, und einem mechanischen Manipulator (Leitz).

Als Arbeitsschälchen diente eine Petrischale (Greiner, d=60mm), die durch einen Kreuztisch bewegt werden konnte. Eine im Mikroskop integrierte Heizplatte wurde extern über einen Heiztisch (Minitüb, HT 200) temperiert. Zusätzlich konnte von einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (Osram, HBO) und einer Einschubvorrichtung mit entsprechenden Filterblöcken (siehe 3.7) Fluoreszenzlicht verschiedener Wellenlängen eingestrahlt werden.

Die eingesetzten Objektive hatten folgende Vergrößerungen: 5x, 10x, 20x.

Der Luigs & Neumann-Manipulator wurde zur Führung der Manipulationspipette benutzt. Diese konnte in den drei Raumrichtungen bewegt werden. Zusätzlich war durch Ansteuerung einer Hamiltonspritze die Regulierung von Sog- bzw. Druckwirkung der Mineralölsäule (SIGMA, M-3516) in der Pipette möglich.

Die Spritze war über einen Dreiwegehahn (Braun, Angiodyn HD-Hahn, Art.Nr: 05012155) mit einem paraffinölgefüllten Druckschlauch (Braun, Angiodyn HD-Schlauch, Art.Nr.: 05011515) verbunden, der über eine Halterung an der Pipette befestigt war.

Der mechanische Manipulator diente zur Befestigung der Haltepipette, die ebenfalls über eine Halterung mit einem luftgefüllten Schlauch verbunden über eine 1ml-Einmalspritze kontrolliert wurde.

Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau der Mikromanipulationseinheit:

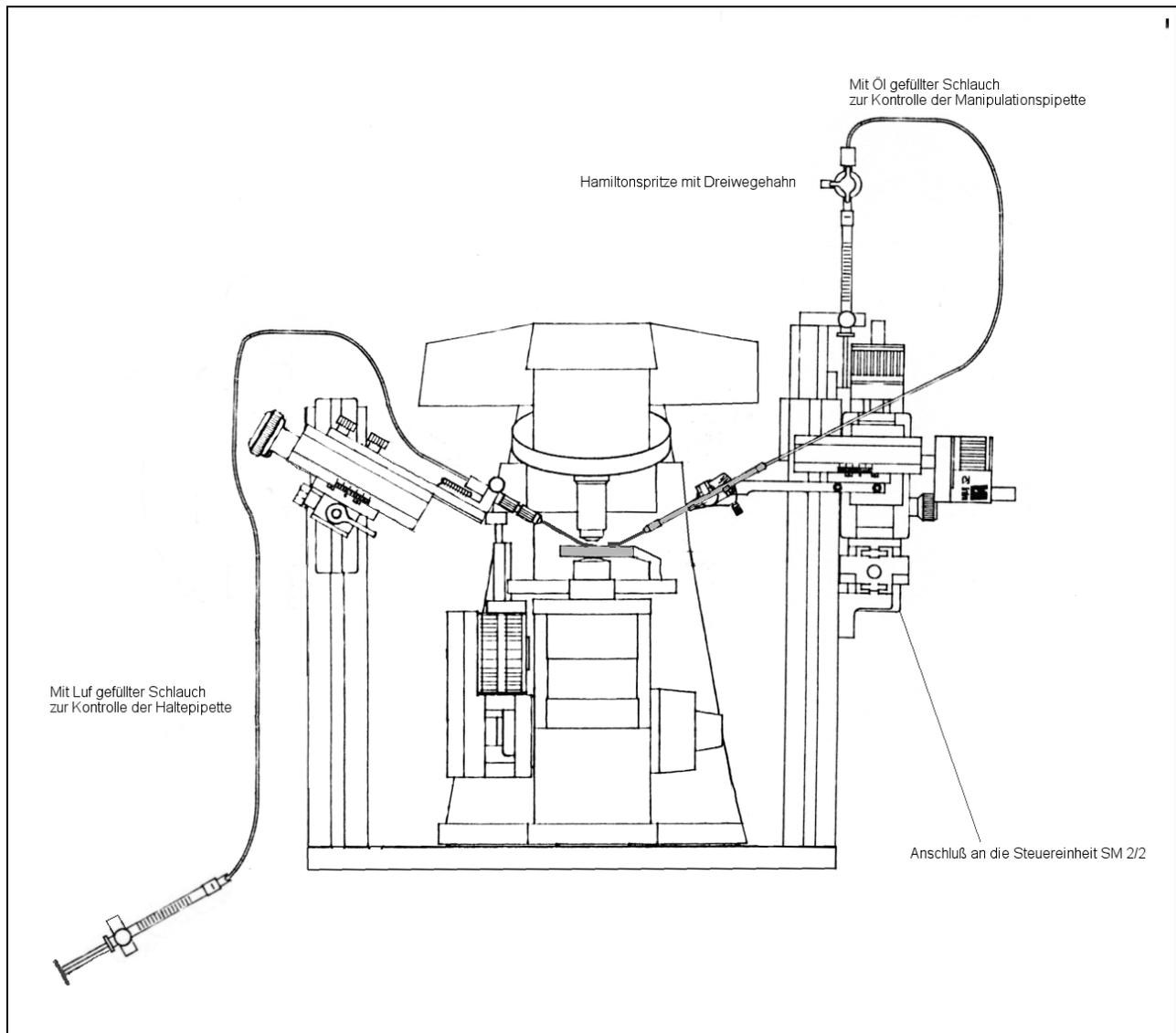


Abbildung 3.3.3: Mikromanipulationseinheit

3.3.2 Glaspipetten

Die Mikromanipulation erforderte verschiedene Glaskapillaren als Pipetten für die unterschiedlichen Versuchsabschnitte, die vor Gebrauch noch bearbeitet werden mußten.

Zum Entkumulieren:

Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, No.3005, Merck, Art.:272811 ($d_{\text{außen}}=175\mu\text{m}$)

Zum Transport von Oozyten, Kerntansferkomplexen, Embryonen:

s.o., Merck, Art.: 272811 ($d_{\text{außen}}= 225\mu\text{m}$)

Zum Entkernen und Fibroblastentransfer: :

Borosilicatglaskapillaren, Hilgenberg, Art.Nr.:1423017 ($d_{\text{au\ss en}}=20-23\mu\text{m}$)

Als Haltepipette am Mikromanipulator:

Merck, Art.: 272811 ($d_{\text{au\ss en}}=100\mu\text{m}$)

3.3.2.1 Glasbearbeitung

Vor Gebrauch der Glaskapillaren waren folgende Arbeiten notwendig:

Anschmelzen und dünnes Ausziehen der Pipetten an einem „Puller“ (Reasurch Instruments Ltd),

anschließendes Abbrechen ggf. Anwinkeln oder auch Rundschmelzen (Kantenabrunden) an einer exakt definierten Stelle (integrierte Skala im Okular des zugehörigen Mikroskopes) an einer Mikroschmiede (Bachofer Laboratoriumsgeräte).

Die Pipetten zum Entkernen und Fibroblastentransfer wurden an einem „Puller“ (Sutter Instrument Co., Model P-87) ausgezogen, zusätzlich an einem Schleifgerät (hauseigene Feinmechanikwerkstatt) schräg im 45°-Winkel angeschliffen und außerdem an der Mikroschmiede durch Aufsetzen eines dünnen „Spike`s“ angespitzt

3.3.3 Manipulationsmedium

Vor dem Entkernen wurden die MeII-Oozyten in PBS+10%NBCS + 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 + 7,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B inkubiert, dann in PBS+1%NBCS manipuliert, in PBS+10%NBCS gesammelt und bis zur Fusion gelagert. Dies betraf alle Versuche mit Ausnahme der Experimente, in denen wie oben verfahren, aber nach Manipulation in TCM-air (SIGMA,T-2520 + Zusätze siehe Anhang) gesammelt wurde.

3.4 Fusionsgerät

Für die Elektrofusion von Ooplast und Fibroblast kamen folgende Geräte zum Einsatz:

3.4.1 Spannungsgeber

Für alle Versuche fand der Spannungsgeber „Krüss, CFA-400“ Verwendung.

Mit diesem Gerät konnte die Spannung von Wechselstrom (AC-Feld) und Gleichstrom (DC-Puls) eingestellt und über ein angeschlossenes Oszilloskop (Hameg Instruments, HM 205-3) verfolgt werden.

Die zuschaltbare „ramp-Funktion“ stellte ein Wechselstromfeld dar, das von einer einstellbaren Stromstärke ausgehend, innerhalb eines einzustellenden Zeitraumes von 100% auf 0% Spannung abfiel.

Dabei fanden die in nachstehender Gleichung genannten Parameter Anwendung:

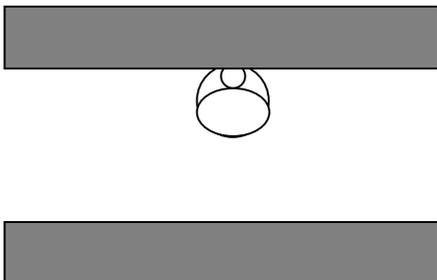
Gleichung 3.4.1:

wirksame Spannung in Abhängigkeit vom Elektrodenabstand $[V/cm] = DC [V] / d [cm]$

3.4.2 Fusionskammer 1

Bei der Fusionskammer 1 handelte es sich um eine handelsübliche Bügelkammer (Krüss), deren Elektrodenabstand auf 300 μ m eingestellt wurde.

Die schematische Darstellung zeigt die beiden Elektroden und den Kerntransferkomplex:



3.4.3 Fusionskammer 2

Die Fusionskammer 2, die in einer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. P. Booth (Danmarks Jordbrugs Forskning Embryoteknologisk Center, Tjele) /57/ von ihm entwickelt wurde, konnte auf jeden beliebigen Elektrodenabstand eingestellt werden, der im Fusionsfall ca.145µm (Durchmesser des Komplexes) betrug.

Die schematische Darstellung zeigt die beiden Elektroden und den Kerntransferkomplex:



3.4.4 Fusionsmedien

0,285M Mannose + 0,1mM MgSO₄ + 0,05mM CaCl₂ + 1%NBSCS. (siehe auch Anhang)

Mannose (SIGMA, M-6020)

MgSO₄ (SIGMA, M-2643)

CaCl₂ (Merck, 2083),

0,285M Mannitol + 0,1mM MgSO₄ + 0,05mM CaCl₂ + 1%NBSCS. (siehe auch Anhang)

Mannitol (SIGMA, M-4125)

MgSO₄ (SIGMA, M-2643)

CaCl₂ (Merck, 2083).

3.5 Aktivierungsmethoden

Definition

Eine Aktivierung ist erfolgt, wenn wenigstens die folgenden Kriterien erfüllt sind:

1. Parthenogenetisch: Die reife Oozyte hat die MeII-Phase verlassen
2. Kerntransfer: Der fusionierte Kern hat sich geteilt.

Für die parthenogenetischen Untersuchungen und zur Aktivierung der Kerntransferfusionsprodukte kamen folgende Methoden zur Anwendung:

3.5.1 Elektroaktivierung

Bei der Elektroaktivierung handelte es sich um eine durch den elektrischen Puls des Fusionsgerätes (siehe 3.4) induzierte Embryonalentwicklung. Sie konnte durch verschiedene synchronisierende Substanzen ergänzt werden, der auslösende Stimulus ging jedoch vom Strompuls aus.

Die Oozyten inkubierten nach dem Waschen 2min. in einem Mediummix aus 50% Fusionsmedium und 50% PBS+10%NBSCS und anschließend 2min. im Fusionsmedium, bevor sie in der Kammer gepulst wurden.

Die verwendeten Einstellungen für die Parthenogenese sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich:

Fusionskammer 1	AC-Feld			DC-Puls		
Parthenogenese Kapitel 4.3.1	8,0 V	60 s	600 kHz	12 V	99 μ s	0,4 kV/cm
Parthenogenese Kapitel 4.3.2	-	-	-	21 V	99 μ s	0,7 kV/cm
Fusionspuls	-	-	-	21 V	99 μ s	0,7 kV/cm

Fusionskammer 2	AC-Feld			DC-Puls		
Parthenogenese	1,4 V	10 s	600 kHz	9 V	99 μ s	0,6 kV/cm
Fusionspuls	1,4 V	10 s	600 kHz	9 V	99 μ s	0,6 kV/cm

3.5.2 Chemische Aktivierung mit Thimerosal/DTT

Die einzig untersuchte, allein auf chemischer Reaktion beruhende Aktivierungsmethode, ist die nacheinander erfolgende Inkubation in Thimerosal (10 min., 200 μ M in PBS10%NBSCS) und DTT (30 min., 8mM in PBS10%NBSCS).

Jedem Substanzwechsel ging ein Waschschritt in der entsprechenden Substanzlösung voraus.

3.6 Embryonenkultur

Die Kultur von parthenogenetischen und Kerntransferembryonen erfolgte in NCSU 23 (siehe Anhang) in 4-Well-Dishes (Nunclon Delta SI, Multidish 4Wells) im Brutschrank (Hereaus) bei 38,5°C, 5% CO₂.

Der Mediumwechsel fand an Tag drei der Kultur statt. Das NCSU 23 mußte im Brutschrank vorinkubiert werden, damit sich Temperatur und pH-Wert einstellen konnten.

3.6.1 Verpacken in Agarchips

Um die bei der Manipulation durchstochene Zona pellucida wieder zu verschließen und so die Embryonen nach Transfer in ein Empfängertier vor Phagozytose (Fresszellen: Makrophagen und Leukozyten zerstören Mikroorganismen oder Zelltrümmer /33/) zu schützen, wurden die Kerntransferkomplexe ca. 13 Stunden nach Fusion und Kultur in NCSU 23 (s.h. Anhang) direkt vor dem Transfer in Agarchips verpackt (Kooperation siehe 3.6.3).

Dazu wurde 1,2%iger Agar (Bacto-Agar, Difco; in physikalischer Kochsalzlösung) zum Sieden erhitzt und bis auf 38,5 - 39°C abgekühlt.

Nach Pipettieren der Embryonen in sterilfiltriertes NBCS und Überführen in die noch flüssige Agarlösung erfolgte die sofortige Aufnahme in einer dünnen Glaspipette (Blaubrand, 708718).

Die Agarlösung erstarrte durch Abkühlung an der Raumluft nach 1-2min. in der Pipette, so daß die Embryonen nun vom Agar umschlossen in eine PBS10%NBCS Lösung pipettiert und mit Hilfe zweier Kanülen in ca. 200µm lange Chips geschnitten werden konnten.

3.6.2 Synchronisierung der Empfängertiere, Transfer und Rückspülung

Die hormonelle Synchronisierung der Empfängertiere erfolgte zum selben Zeitpunkt und nach dem gleichen Schema wie die hormonelle Stimulierung der Oozytenspendertiere für die Gewinnung in vivo gereifter Oozyten (siehe 3.2.1.2). Die Injektion der Hormone sowie der operativ durchgeführte Transfer wurde von Mitarbeiterinnen/Mitarbeitern des Institutes für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee durchgeführt (Methode: /1/).

Die Rückspülung der in vivo kultivierten Embryonen machte eine Tötung des Empfängertieres notwendig, um den Genitaltrakt (Uterus, Eileiter und Ovarien) zu entnehmen. Die beiden Uterushörner wurden jeweils vom Eileiter her, nach dem Abklemmen des Bereiches mit Operationsklammern (Eileiter und Uterushorn einer Seite), mehrfach mit

20ml temperierter PBS+1%NBCS-Lösung gespült, die Spüllösung in Petrischalen aufgefangen und nach Embryonen bzw. Agarchips durchsucht.

3.6.3 Durchführung der Versuche mit in vivo gereiften Oozyten (s. Kapitel 4.6)

Da der Versuchsumfang der in Kapitel 4.6 beschriebenen Experimente aufgrund großer Mengen zu gewinnender und zu verarbeitender Oozyten von einer Person nicht zu bewältigen war, wurden zusätzlich mehrere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biotechnologie des Instituts wechselweise in Teamarbeit involviert (Frau E. Lemme, Frau Dr. A. Lucas-Hahn, Frau Dr. N. Kirchof, Herr T. Brambrink, Frau Dr. S. Klocke).

3.7 Färbungen

3.7.1 Hoechstfärbung

Zur Auswertung der gewonnenen embryonalen Entwicklungsstadien war es notwendig, die Blastomeren auf Vorhandensein eines Kerns zu untersuchen. Es konnte so zwischen „echten“ Teilungen und Fragmentierungen (kernlose Zytoplasmaabschnürungen) unterschieden werden. Hoechst 33342 (SIGMA, B-2261) lagert sich an die DNA an und fluoresziert im eingestrahlten Wellenlängenbereich in blauer Farbe.

Zur Färbung inkubierten die Embryonen 5 min. in einer Lösung aus 5µg/ml Hoechst 33342 in PBS+10%NBCS. Zur Fixierung diente ein Objektträger (Omnilab), dessen Deckgläschen (Omnilab) durch aufgesetzte Vaselinestege (Riedel, 16415) auf Abstand gehalten wurde. Ein Andrücken des Deckgläschens bewirkte ein schrittweises Abflachen der zu untersuchenden Embryonen, ohne diese sofort zu zerquetschen. Auf diese Weise war es auch möglich, die Zellen während der Betrachtung auf dem Objektträger zu drehen.

Bei dem verwendeten UV-Filter handelte es sich um einen Hoechstfilter (Zeiss).

3.7.2 Mito Tracker

Aufgrund eines Ladungspotentials lagert sich der Mito Tracker Red Farbstoff (Molecular Probes, M-7512; Abs-Max: 578nm; Em-Max: 599nm) an der Mitochondrienmembran an.

Zur Betrachtung der Zellen in einem für sie unschädlichen Wellenlängenbereich fand ein Rhodaminefilter (Zeiss) Verwendung.

Die Färbung wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

Waschen der Fibroblasten in der Kulturschale mit PBS+10%NBCS und 2-minütige Inkubierung in der Mito Tracker-Lösung (siehe Anhang),

nochmaliges Waschen zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes und direktes Betrachten in der Kulturschale am Mikroskop (Zeiss Germany, Axiovert-135) mit den Vergrößerungen 5x, 10x, 20x und 40x,

Inkubation der Oozyten und Embryonen für 2min. in der farbstoffhaltigen Lösung, mehrmaliges Waschen in PBS+10%NBCS und Fixierung auf einem Objektträger wie unter 3.7.1 beschrieben.

Wenn die beiden Färbungen (Hoechst33342 und Mito Tracker) in Kombination (Inkubation nacheinander) durchgeführt wurden, konnte nach Austausch des Filterblocks am Mikroskop sowohl eine Kern- (blau) wie auch eine Mitochondrienbetrachtung (rot) erfolgen.

3.7.3 Trypanblau Lebend-/Totfärbung der Fibroblasten

Zur Vitalitätsbestimmung der Fibroblasten kam die Trypanblau-Färbung zum Einsatz.

Die Zelllösung im Verhältnis 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau (SIGMA, T-8154, 0,4%) gemischt, bewirkt ein Eindringen des Farbstoffes in die Zellen mit geschädigten Membranen, wobei dieser bis in das Zytoplasma vordringt und sie unter dem Mikroskop blau erscheinen lässt; intakte Zellen werden nicht verfärbt.

Die Bestimmung des Anteils geschädigter Zellen erfolgte mit einer Thoma-Zählkammer.

Die Kammer wurde mit einem plangeschliffenen Deckgläschen versehen, welches an zwei Seiten auf Stegen aufliegt, wodurch sich zwei definierte Hohlräume ergeben, in deren Bodenflächen Zählfelder eingeritzt sind. Durch Kapillarkräfte wird die so vorbereitete Lösung in die Hohlräume gesaugt, und die Zellzahl an vitalen und geschädigten Zellen kann unter dem Mikroskop ermittelt werden.

Man bestimmt den Mittelwert der mehrfach gezählten Kammern und berechnet so den prozentualen Anteil der geschädigten Zellen.

3.8 Fotografische Dokumentation

Die Auswertung der durchgeführten Versuche wurde sowohl durch morphologische Begutachtung von Teilungsstadien und ergänzende Färbungen (siehe 3.7) vorgenommen als auch durch fotografische Verfahren ergänzt.

Verwendung fand eine am Manipulationsmikroskop (siehe 3.3.1) installierte Kamera (Yashika, Kyocera 108).

Als Filmmaterial wurden eingesetzt: AGFA, APX 100 für Schwarz/Weiß-
Aufnahmen

KODAK, 5077, ET 160 für Farbdia-Aufnahmen

3.9 Statistik

In dieser Arbeit erfolgte die statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Computerprogramms STATISTICA 5.0 unter Anwendung des „T-test for Independent Samples“.

3.10 Definitionen für die Charakterisierung der Entwicklungsstadien

Für die in den Tabellen des Kapitels 4 beschriebenen Entwicklungsstadien wurden die Begriffe wie folgt verwendet:

3.10.1 Parthenogenese

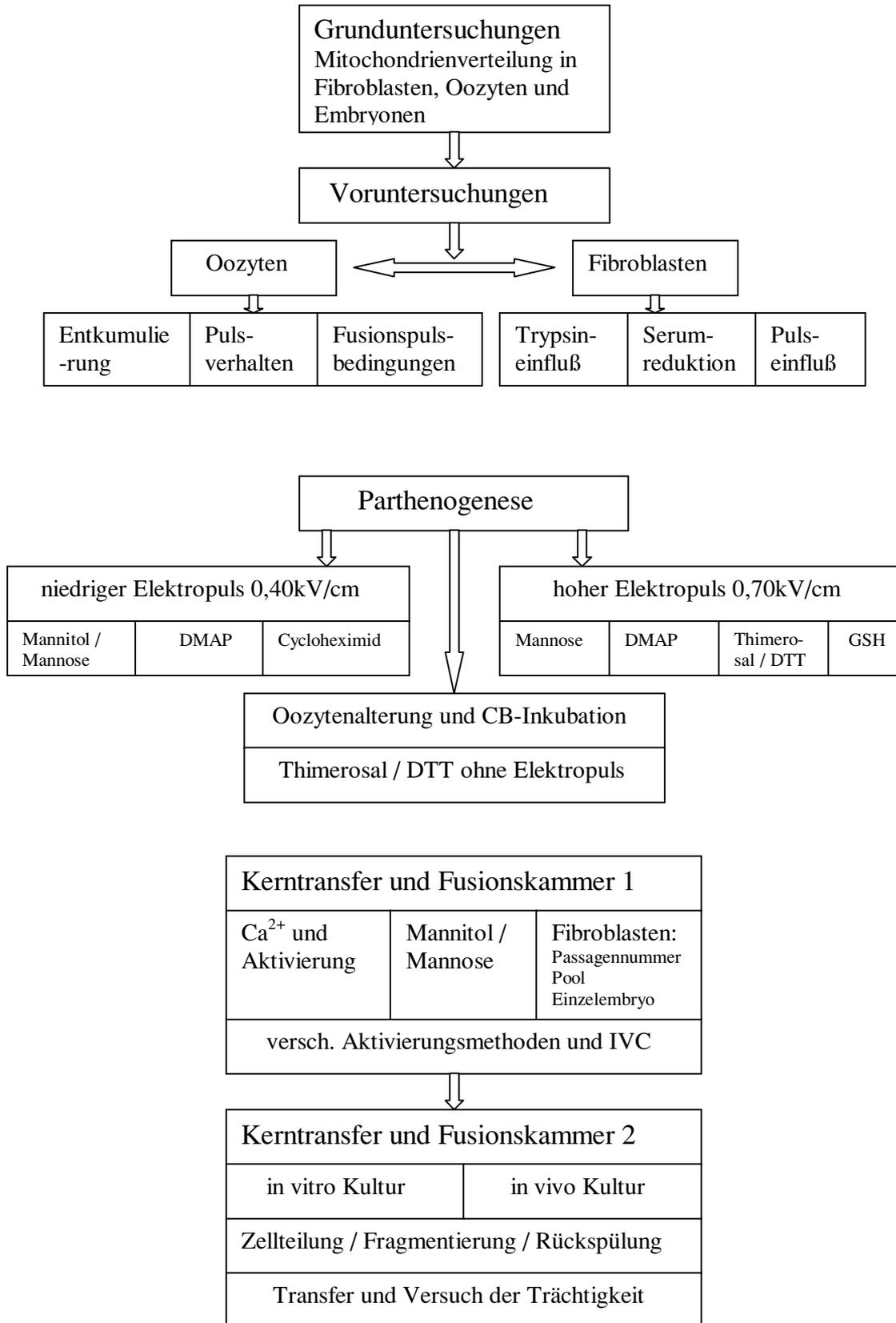
degeneriert; n.a.	=	Anteil der degenerierten <u>nicht auswertbaren</u> Oozyten (n.a.) bezogen auf die angegebene Eizellzahl davon ausgehend, daß die als n.a. gewerteten Oozyten schon vor Versuchsbeginn erste Degenerationserscheinungen und Schädigungen aufgewiesen haben müssen. Daher beziehen sich die prozentualen Angaben der aktivierten Gruppen ($\geq 2K$, 1K, >MeII) auf eine um n.a. verminderte Zellzahl.
aktiviert	=	Alle Zellen, die die MeII verlassen haben (>MeII), waren aktiviert.
$\geq 2K$, 1K	=	Der Teilungsgrad wurde in Embryonen mit wenigstens zwei und mehr Kernen ($\geq 2K$) und in Einzeller mit einem dekondensierten Kern (1K) gegliedert.
fragmentiert	=	Zellen verschiedener Entwicklungsstadien, die neben kernhaltigen auch kernlose Blastomeren enthielten.
Morula (M)	=	Höheres Teilungsstadium, bei dem einzelne Blastomeren kaum noch zu erkennen waren. Die Kernzahl (KZ) wurde mit Hilfe der Kernfärbung ermittelt.
teilblastuliert (t-bl)	=	Einige Blastomeren gehörten nicht /noch nicht zum blastulierten Zellverband. (Ermittlung der Kernzahl siehe Morula)
Blastozyste	=	Als Blastozysten wurden in dieser Arbeit alle vollständig blastulierten Embryonen (Unterschied zu t-bl) gewertet gleichgültig, ob diese noch früh, expandiert oder kollabiert waren.
Teilungsrate	=	Die Teilungsrate erfaßt den Anteil der geteilten Zellen, unabhängig von echter Teilung und/oder Fragmentierung.
M/t-bl/Bl	=	Summe aus Morulae, teilblastulierten und Blastozysten-Stadien.
Kernzahlmin.-max	=	Angabe der kleinsten und größten ermittelten Kernzahl.

3.10.2 Kerntransferversuche

Komplexe	=	Kerntransferkomplexe, die sich vor Fusion morphologisch vital darstellten.
Fusion	=	Komplexe, die nach Kulturabbruch durch Kernfärbung als fusioniert identifiziert wurden.
Kernschwellung	=	Die Kernschwellung stellte die erste positive Reaktion des Kerns nach Fusion mit dem Ooplasten dar. Sie ging der Kernteilung voraus und wurde als Vorstufe echter Teilungsstadien angenommen /69/. Eine Kernschwellung konnte direkt nur durch Hoechst33342-Färbung bei Einzellern nachgewiesen werden.
aktiviert	=	Alle Fusionskomplexe, die wenigstens eine Kernteilung durchlaufen hatten, wurden als aktiviert betrachtet.
fragmentiert	=	Fragmentierte Zellen verschiedener Entwicklungsstadien, die neben kernhaltigen auch kernlose Blastomeren enthielten.
morulaartig fragmentiert	=	Embryonen, deren Teilungsstadien morphologisch als Morula eingeordnet wurden, aber nur 1-3 Kerne enthielten und fragmentiert waren.
Morula (M)	=	Höheres Teilungsstadium, bei dem einzelne Blastomeren kaum noch zu erkennen waren. Die Kernzahl (KZ) wurde mit Hilfe der Kernfärbung ermittelt.
teilblastuliert (t-bl)	=	Einige Blastomeren gehörten nicht /noch nicht zum blastulierten Zellverband. (Ermittlung der Kernzahl siehe Morula)
Blastozyste	=	Als Blastozysten wurden in dieser Arbeit alle vollständig blastulierten Embryonen (Unterschied zu t-bl) gewertet, gleichgültig, ob diese noch früh, expandiert oder kollabiert waren.
M/t-bl/Bl	=	Summe aus Morulae, teilblastulierten und Blastozysten-Stadien.
Kernzahlmin.- max.	=	Angabe der kleinsten und größten ermittelten Kernzahl.
KZ	=	Mittlere Kernzahl
*	=	Falls nicht alle Fusionen morphologisch erkannt wurden, bezieht sich die Prozentangabe auf die zur Aktivierung eingesetzten Zellen, die dann kleiner ist als „n Fusion“.

Kontrollen	=	<p>Die Pulskontrolle durchläuft alle Inkubationsschritte entsprechend der Kerntransfergruppe.</p> <p>Medienkontrolle: siehe Pulskontrolle, aber kein Elektropuls/ keine DMAP-Inkubation.</p> <p>0-Kontrolle: Die Oozyten werden nur entkumuliert.</p>
Besonderheit bei den auf Spendertiere übertragenen Embryonen (4.6)	=	<p>Die Degenerationsrate bezieht sich auf die rückgespülten, alle folgenden Raten auf die vitalen Oozyten ($\text{Oozyten}_{\text{rückgespült}} - \text{Oozyten}_{\text{degeneriert}} = \text{Oozyten}_{\text{vital}}$).</p> <p>Es wurden auch leere Agarchips und nicht verpackte Embryonen rückgespült. Eine eindeutige Identifikation von übertragenen und empfängertiereigenen Embryonen war nicht immer zweifelsfrei möglich. Daher wurden alle ausgespülten Zellen aufgelistet.</p>

Übersicht der Experimentstaffelung



4 Versuche, Ergebnisse und Diskussion

4.1 Grunduntersuchungen

4.1.1 Mitochondrienverteilung in Fibroblasten und Oozyten

Die Mitochondrien sind die Energielieferanten der Zelle. Es war daher besonders interessant ihre Anzahl und deren Verteilungsmuster in den verschiedenen „Zellphasen“ der verwendeten Fibroblasten, Oozyten und Embryonen zu untersuchen.

Daher wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Kann man anhand der MitoTracker-Färbung (3.7.2) Fibroblasten, die sich in der G1/G0-Phase befinden und einen niedrigeren Energiegehalt besitzen, von aktiv proliferierenden Fibroblasten aufgrund einer schwächeren Rotfärbung unterscheiden und sie gezielt für die Mikromanipulation an der Manipulationseinheit selektieren?
2. Wie viele Mitochondrien besitzt eine gereifte MeII-Oozyte, wo sind diese lokalisiert, stellt die Entkernung eine starke Verminderung der Energielieferanten dar?
3. Kann man die Qualität der Oozyten (Zytoplasmareifung) am Verteilungsmuster der Mitochondrien erkennen?
4. Wie stellt sich die Fragmentierung und Degeneration bis zur Zelllyse anhand der MitoTracker-Färbung dar?

Um diese Fragen zu klären, schlossen sich folgende Untersuchungen an:

4.1.1.1 Fibroblastenfärbung

Fibroblasten wurden wie für den Kerntransferversuch 4-6 Tage in serumreduziertem Medium kultiviert und mit nicht serumreduzierten proliferierenden Fibroblastenkulturen verglichen.

Am Mikroskop konnte man die Mitochondrien durch die Färbung rot darstellen. Sie durchzogen die adhärensten stark gespreiteten Fibroblasten wie ein feines Netzwerk, welches an der Kernmembran immer dichter wurde und den Kern so als nicht fluoreszierenden Bereich deutlich abgrenzte.

Es war nicht möglich, zwischen den beiden untersuchten Gruppen aufgrund der MitoTracker-Färbung zu unterscheiden. Abgelöste Fibroblasten zeigten aufgrund der größeren Schichtdicke des Zytoplasmas kein Muster, sondern stellten sich als grell leuchtender roter Punkt dar.

Somit war eine gezielte Selektion von abgelösten G0/G1-Fibroblasten mit dieser Färbung nicht möglich.

4.1.1.2 Verteilung der Mitochondrien in MeII-Oozyten

MeII-Oozyten wurden gefärbt, die Hälfte der Oozyten entkernt und mit der nicht entkernten Gruppe verglichen.

Es zeigte sich, daß Oozyten sehr viele Mitochondrien besaßen, die gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma verteilt waren und kein Muster aufwiesen.

Die entkernte Gruppe zeigte daher keine starke Verminderung der Mitochondrienzahl, da diese nicht überwiegend in Kernnähe, wie etwa bei den Fibroblasten, zu finden waren.

4.1.1.3 Mitochondrienfärbung reifer und unreifer Oozyten

Reife und unreife Oozyten wurden morphologisch anhand des Polkörpers sortiert und beide Gruppen, sowohl mit Hoechst (3.7.1) als auch mit MitoTracker gefärbt.

Die Hoechstoffärbung bestätigte den Zustand der Kernreifung, die MitoTrackertifärbung zeigte aber keine Unterschiede im „Energieniveau“ der Zellen.

4.1.1.4 Mitochondrien degenerierter, fragmentierter und geteilter Entwicklungsstadien

Folgende Gruppen von Zell- und Entwicklungsstadien von Oozyten /Embryonen wurden parallel mit Hoechst und MitoTracker gefärbt:

- Kerntransfer 2- und 4-Zeller mit und ohne Fragmente
- parthenogenetische 2- und 4-Zeller sowie Blastozysten ohne Fragmente
- degenerierte, lysierte Oozyten nach Auflösung der Zytoplasmamembran.

Sowohl Blastozysten, die mit Hoechst 33342 keine Hintergrundfärbung des Zytoplasmas zeigten, wie auch stark degeneriert/lysierte Oozyten, die eine starke Hoechstoffärbung des Zytoplasmas aufwiesen und ohne erkennbare DNA (na: ein nicht auswertbarer Befund) waren, zeigten keine Unterschiede in der Mitochondrienfärbung.

Kerntransfer 2- und 4-Zeller unterschieden sich nicht von parthenogenetischen 2- und 4-Zellern und kernhaltige nicht von kernlosen, fragmentierten Blastomeren.

Man fand aber bei den dekondensierten Kernen der verschiedenen Teilungsstadien von Kerntransfer- und parthenogenetischen Embryonen einschließlich der Blastozysten die Abgrenzung des Kernbereiches vom Zytoplasma. Wie bei den adhärennten Fibroblasten war auch hier keine MitoTracker-Fluoreszenz innerhalb der Kernmembran sichtbar.

Die MitoTracker-Färbung ist also nicht dazu geeignet, Degenerationserscheinungen sichtbar zu machen.

Die Tatsache, daß eine Hoechstfärbung im Gegensatz zur MitoTracker-Färbung die Degeneration sichtbar werden ließ, lässt darauf schließen, daß sich die DNA schneller auflöst und damit in der Kette der Apoptose weiter vorne steht als dies bei den Mitochondrien der Fall ist. Die Abbildungen 4.1.1/ 4.1.2 veranschaulichen die bisherigen Beschreibungen:

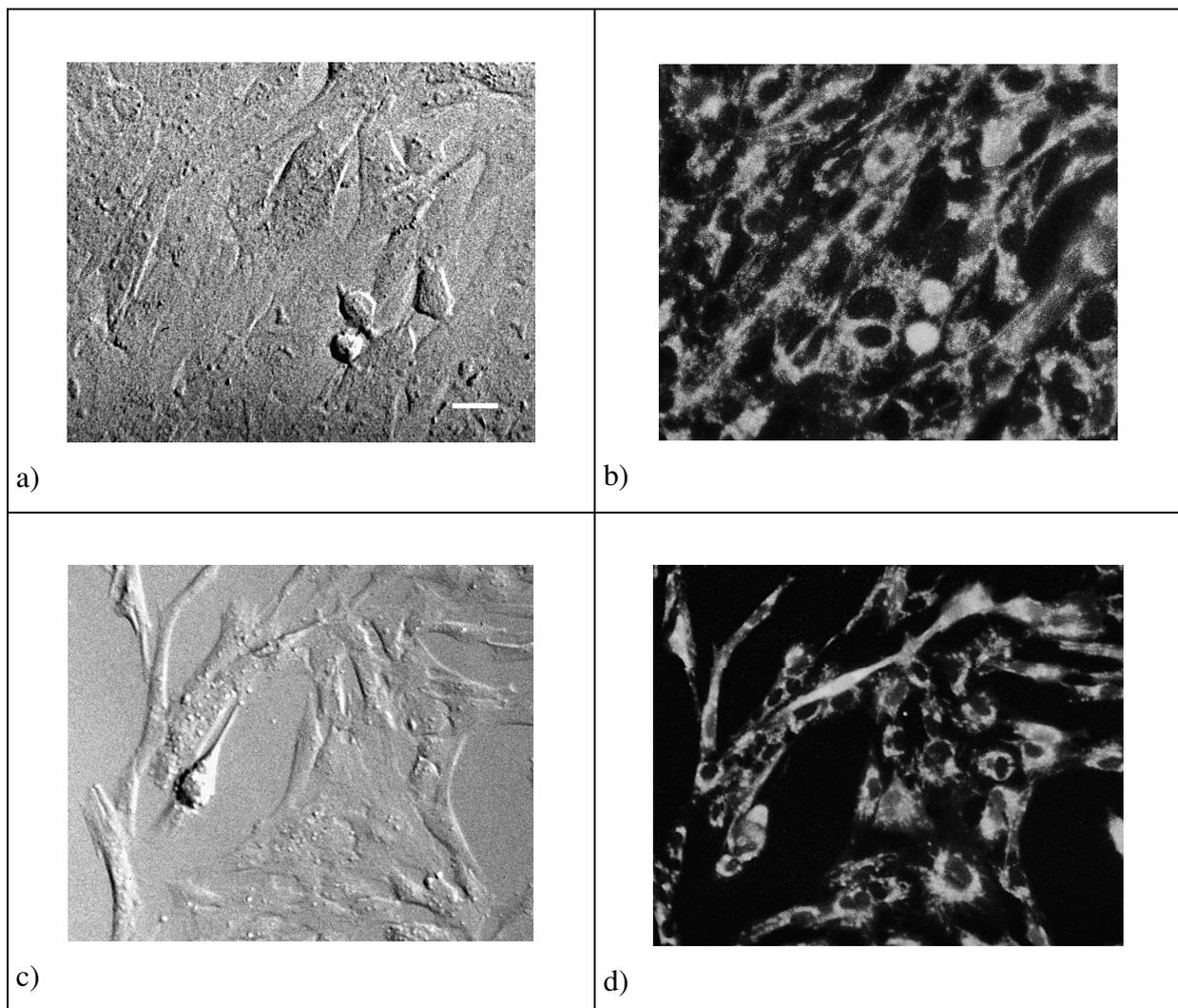


Abb. 4.1.1: Morphologie und Mitochondrienfärbung von wachsenden (a, b) und serumreduziert kultivierten Fibroblastenkulturen (c, d) (siehe 4.1.1.1); Balken = 20µm

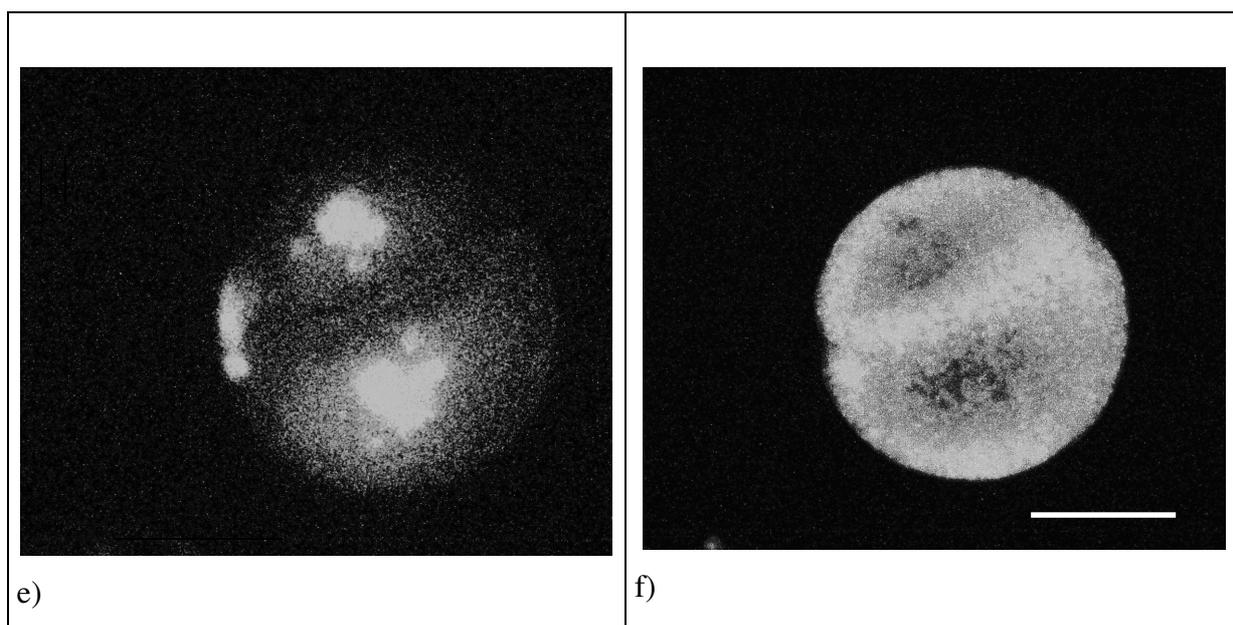


Abb. 4.1.2: Parthenogenetischer 2-Zeller mit Polkörper nach Hoechst33342-Färbung (e) und nach Mito Tracker-Färbung (f); Balken = 70 μ m

4.2 Voruntersuchungen

4.2.1 Vergleich verschiedener Entkumulierungsmethoden

Die MeII-Oozyten waren nach in vivo- und nach in vitro-Reifung von Kumuluszellen umgeben. Damit die Manipulationspipetten nicht verklebten und die Oozyten an der Haltepipette und an den Fusionselektroden leichter orientiert werden konnten, mußten alle Kumuluszellen entfernt werden. Da für jeden durchgeführten Versuch zwischen 150 und 250 in vitro-Oozyten, bzw. 50-150 in vivo-Oozyten gewonnen und entkumuliert wurden, erforderte die Entkumulierung eine effektive und zugleich schonende Methode. Zugleich sollten die Scherstreßreize dabei möglichst wenig aktivierend wirken.

Hierzu wurden Oozyten willkürlich in drei Gruppen aufgeteilt, mit den folgenden Methoden entkumuliert (3.2.2), anschließend 24 Stunden in NCSU23 kultiviert und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen :

1. Heftiges Pipettieren ohne Enzyminkubation
2. Inkubation in Hyaluronidase
3. Inkubation in EDTA/Trypsin
4. Nicht entkumulierte Oozyten (Kontrollgruppe).

4.2.1.1 Heftiges Pipettieren ohne Enzyminkubation

Die Oozyten wurden in 2ml PBS+1%NBSCS mit einer 500µl Eppendorfpipette gut durchgewirbelt, um lockere Kumulusschichten abzulösen und anschließend mit einer Kumuluspipette (3.3.2) fest haftende Kumulusreste zu entfernen.

4.2.1.2 Inkubation in Hyaluronidase

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden 2mal in PBS/PVA gewaschen, für ein bis zwei min. in Hyaluronidase inkubiert, in PBS+1%NBSCS gewaschen, für 30 min. in PBS+10%NBSCS in den Brutschrank gestellt und anschließend mit der Kumuluspipette entkumuliert.

4.2.1.3 Inkubation in EDTA/Trypsin

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden zweimal in PBS+1%NBSCS gewaschen, um anhaftendes Reifungsmedium und lockere Kumuluslagen zu entfernen. Darauf folgte eine 10-

20 minütige Inkubation in 0,1%EDTA/Trypsin, Durchwirbeln mit einer 500 μ l Eppendorffpipette und Entkumulierung unter Zuhilfenahme einer Kumuluspipette, ebenfalls in EDTA/Trypsin. Die Trypsinaktivität mußte durch Waschen in PBS+10%NBCS gestoppt werden.

4.2.1.4 Nicht entkumulierte Oozyten

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe sind weder mit einer Pipette noch enzymatisch entkumuliert, sondern direkt vom Reifungsmedium ins Kulturmedium überführt worden.

4.2.1.5 Auswertung

Die folgende Tabelle (Tab.4.2.1.5) zeigt die Ergebnisse nach 24 h Kultur und anschließender Färbung mit Hoechst 33342.

Tabelle 4.2.1.5: Entkumulierungsvergleich

Methode	n _{ges} Oozyten	Lyse		n _{gereift=} (n _{ges} - n _{MeI})	Aktivierung	
		n	[%]		n	[%]
Pipettieren	193	36	18,65 ^a	143	85	79,4 ^a
Hyaluronidase	200	12	6,0 ^b	150	23	16,7 ^b
EDTA/Trypsin	200	8	4,0 ^b	146	19	13,8 ^b
nicht entkumuliert	200	4	2,0 ^b	144	18	12,7 ^b

^{ab}:Werte einer Spalte mit versch. Indices sind hochsignifikant unterschiedlich, p< 0,001

Die mechanische Belastung (häufiges Scheren und Quetschen) der Oozyten hatte durch das heftige Pipettieren (4.2.1.1) eine im Vergleich zu den anderen Methoden stark aktivierende Wirkung (79,4 % gegenüber 16,7 % und 13,8 %). Der Polkörper wurde oft verschoben, so daß er nicht mehr neben der Metaphasenplatte lag. Viele Zellen konnten nicht vollständig entkumuliert werden und waren von klebrigen Restschichten umgeben, die zu großen Schwierigkeiten bei der Mikromanipulation führten und die Lyserate in der „Pipettiergruppe“ ebenfalls erhöhte (18,7 % gegenüber 6,0 % und 4,0 %).

Beide enzymatisch behandelten Gruppen (4.2.1.2 und 4.2.1.3) ließen sich wesentlich besser und vollständiger entkumulieren. Die Oozyten verloren ohne viel Scheren vergleichsweise

leicht ihre Kumulusschichten und waren später gut zu manipulieren, da auch der Polkörper nur selten verschoben wurde.

Sowohl die Lyse- wie auch die Aktivierungsrate war von der nicht entkumulierten Gruppe (4.2.1.4) wenig verschieden (6,0% und 4,0 % gegenüber 2,0% Lyse; 16,7 % und 13,8 % gegenüber 12,7 % Aktivierung).

Für die durchgeführten Versuche erwies sich EDTA/Trypsin als effektivste und schonendste Methode und wurde daher in allen weiteren Versuchen zur Kumulusentfernung eingesetzt.

4.2.2 Einfluß der Einwirkungszeit von Trypsin auf die Fibroblastenmorphologie und -vitalität

Fibroblasten sind adhärente Zellen, die vor der Mikromanipulation vom Boden der Kulturschalen abgelöst werden mußten (3.1.3). Die Einwirkungszeit des dazu verwendeten Enzyms Trypsin betrug ca. 5 min.; danach war ein Grossteil der Zellen durch leichtes Schwenken der Kulturschale abzulösen. Morphologisch betrachtet waren die meisten Fibroblasten aber nicht glatt, abgerundet und kugelförmig – wie es für eine Fusion optimal wäre - , sondern besaßen eine „igelige“, rauhe Membran.

Diese Oberflächenstruktur verhinderte einen engen Membrankontakt und wirkte sich auf die Fusion ungünstig aus.

Die Fusion durch Elektropuls stellt eine Belastung der Zelle dar, so daß die Fibroblastenmembran nicht schon durch zu lange Einwirkung des Trypsins geschädigt werden sollte.

Um die richtige Inkubationszeit des Trypsins zu finden, bei der möglichst viele runde und vitale Fibroblasten generiert werden konnten, wurden konfluent gewachsene nicht serumreduzierte Kulturen der Passage 6 unterschiedlich lange inkubiert, abgelöst und mit der Trypanblau-Färbung auf ihren Anteil an toten Zellen untersucht (3.7.4).

Die untersuchten Inkubationsgruppen hatten jeweils eine Größe von ca. 400 Fibroblasten.

Tabelle 4.2.2: Vitalität der Fibroblasten in Abhängigkeit der Trypsin-Inkubationszeit

Inkubationszeit [min.]	Vitalität [%] ($n_{vit} \times 100 / n_{ges.}$)	Standardabweichung
5	98 ^a	0,3
10	98 ^a	0,3
15	99 ^a	0,7
20	90 ^b	1,4
30	75 ^c	3,4

^{abc}: Werte einer Spalte mit versch. Indices sind hochsignifikant unterschiedlich, $p < 0,001$

Wie in der Tabelle 4.2.2 zu sehen ist, wurde die Vitalität der Fibroblasten bei Inkubationszeiten von 5-15 min. nicht nennenswert durch das Trypsin beeinträchtigt (Vitalität: 99-98%), während längere Einwirkzeiten zu einer Zellschädigung führten.

Morphologisch konnte man feststellen, daß sich die Membranen bei 10-minütiger Inkubation deutlich glatter darstellten; Einwirkungszeiten von 15min. bzw. 20min. (99%; 90% Vitalität) brachten keine Veränderung bezüglich des Abrundungsverhaltens, nach 30min. zeigten sich zum Teil unscharfe Abgrenzungen der Membran und einige Fibroblasten sahen heller („glasig“) aus.

Für die Kerntransferversuche wurde eine Trypsininkubationszeit von 10 bis 15min. gewählt.

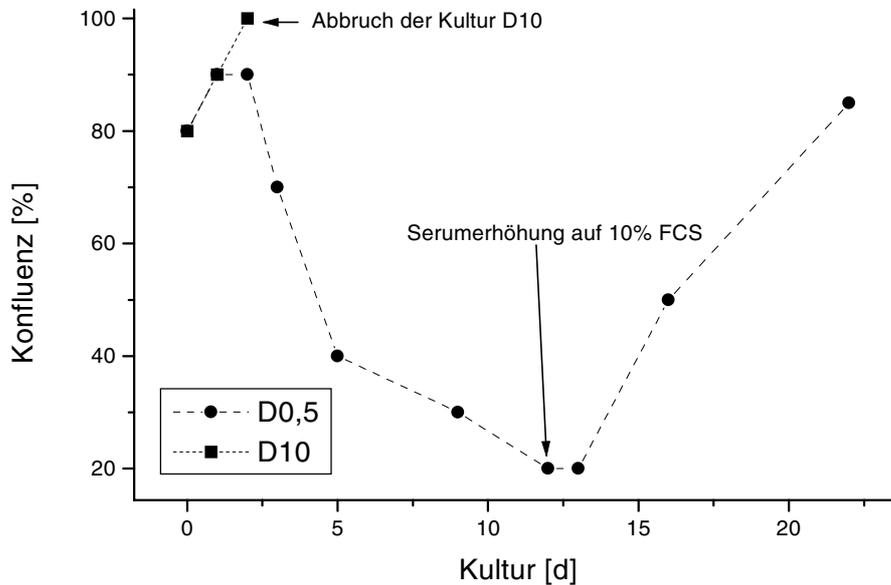
4.2.3 Arretierung der Fibroblasten in der G₀/G₁-Phase durch Serumreduktion

Da die meisten Autoren, die sich mit Kerntransfer befassen, serumreduzierte Kerndonorzellen einsetzen /39/ (siehe Kapitel 2.2.1.1), ist untersucht worden, wie die Fibroblasten auf eine Serumreduktion reagieren, wie dadurch Vitalität und Wachstum beeinflusst werden.

Hierzu wurden zwei Kulturen angelegt, die eine unterschiedliche Behandlung erfuhren. Fibroblasten der Passage 6 wurden aufgetaut, in Kultur genommen, und Gruppe „D10“ bekam beim Mediumwechsel nach 24h (Tag 0) serumhaltiges Medium (DMEM+10%FCS). Die Gruppe „D0,5“ wurde zweimal mit DMEM+0,5%FCS gewaschen und anschließend darin kultiviert.

Um festzustellen, ob eine Wiederaufnahme des Wachstums möglich war, erfolgte nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen im serumreduzierten Medium die Weiterkultivierung der Gruppe D0,5 in serumreichem Medium.

Abb. 4.2.3.a: Vergleich serumreduzierter/nicht -reduzierter Fibroblastenkulturen



Die Zelldichte war an Tag 0 mit ca. 80% Konfluenz in beiden Gruppen gleich. Da die Zellabnahme untersucht werden sollte, wurde absichtlich mit so großer Dichte angeimpft. Es ging in diesem Falle nicht darum, ein Wachstum, sondern die Einstellung der Zellteilung als Reaktion auf die Serumreduktion zu charakterisieren.

Die D10-Gruppe diente als Kontrolle, erreichte an Tag 2 100% Konfluenz, was auf gute Zellvitalität schließen ließ, und wurde nicht weiterkultiviert.

An Tag 1 war bei der D0,5-Gruppe ca. 90% Konfluenz aufgetreten; ein weiteres Wachstum der Kultur konnte aber nicht festgestellt werden. Die Zelldichte nahm von Tag 2 (90%) stetig ab und erreichte an Tag 12 in serumreduziertem Medium ca. 20%.

Das Medium wurde alle 3-4 Tage erneuert. Dabei fiel auf, daß der Farbwechsel des Mediums in der D0,5-Gruppe anders verlief als dies normalerweise bei wachsenden Kulturen der Fall war. Proliferierende Zellen zeigen einen Farbwechsel des Mediums von orangerot nach gelb, was eine Lactatproduktion im Zuge der Verstoffwechslung bestimmter Nährstoffe des Mediums anzeigt und auf einer Senkung des pH-Wertes beruht. Im Gegensatz dazu änderte

jedoch das Medium in der D0,5-Gruppe die Farbe zu einem Rot-Violett, was eine Erhöhung des pH-Wertes erkennen ließ. Möglicherweise stellten die reduziert wachsenden Fibroblasten ihren Stoffwechsel aufgrund der veränderten Bedingungen um.

Die anschließende Kultivierung in serumreichem Medium ließ die Zellen nur sehr langsam wieder in den Zellzyklus zurückkehren. Nach 4 Tagen in DMEM+10%FCS war eine Konfluenz von ca. 50% und nach weiteren 6 Tagen von 85% erreicht.

Es zeigte sich, daß ein so langer Zeitraum der Serumreduktion von 12 Tagen die Zellpopulation streng nach der Fähigkeit selektierte, mit wenig Serum und den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren auszukommen und möglicherweise den Stoffwechselweg zu ändern. Aufgrund der geringen Zelldichte war ein erneutes Wachstum der Kultur nur schwer zu erreichen.

Abb. 4.2.3.b: Vergleich der Wiederaufnahme des Zellwachstums nach serumreduzierter Kultur von 4 bzw. 7 Tagen (Fibroblasten der Passage P6)

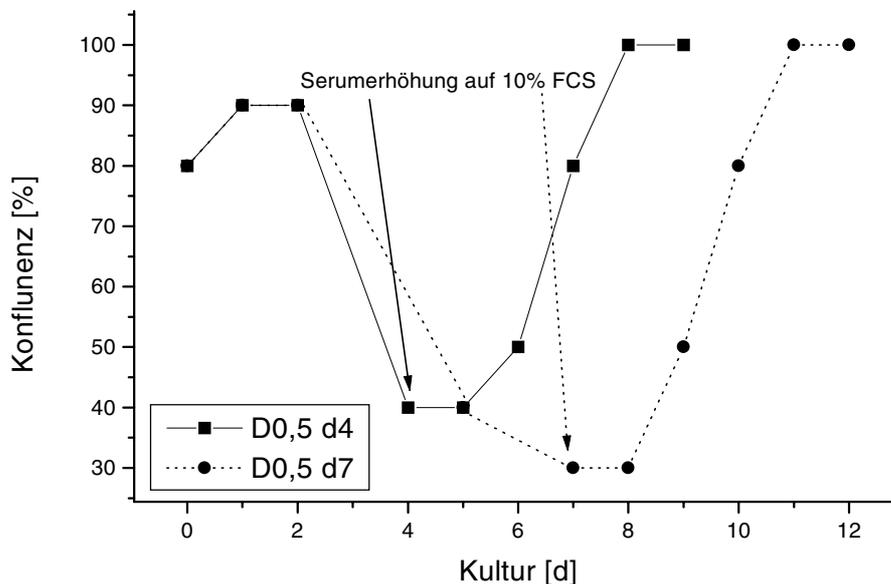


Abb. 4.2.3.b zeigt einen ähnlichen Verlauf der Abnahme der Zelldichte durch Serumreduktion wie die vorige Abb. 4.2.3.a. Mit einer Animpfdichte von ca. 80% an Tag 0 nahm hier die Konfluenz bis ca. 40% (Tag 4) bzw. 30% (Tag 7) ab. Bei Serumerhöhung (auf 10% FCS) zeigten beide Gruppen 24h später noch kein Wachstum. 48h nach Serumgabe allerdings hatten beide Kulturen die Konfluenz auf 50% erhöht. Da beide Versuchsgruppen einen

ähnlichen Wachstumsverlauf in bezug auf das Verhalten nach Rückkehr in den Zellzyklus zeigten und wesentlich schneller auf die Serumerhöhung reagierten als die Fibroblasten aus Abb. 4.2.3.a nach 12 Tagen in DMEM+0,5%FCS, wurde für die Kerntransferversuche ein Serumreduktionszeitraum der Kerndonorzellen von 4-7 Tagen gewählt.

4.2.4 Erarbeitung der Fusionsbedingungen

Die Verschmelzung des Ooplasten (entkernte Oozyte) mit dem Kerndonor erfolgte aufgrund eines Gleichstrompulses (DC: Direct Current). Die Membranen wurden polarisiert, bis sich bei einer kritischen Spannung große Poren in den Zytoplasmamembranen bildeten und das Zytoplasma der Fusionspartner ineinanderfloß. Die anzulegende Spannung war dabei von verschiedenen Parametern abhängig. Die Größe der verwendeten Zellen, der Elektrodenabstand der Fusionskammer, die Bauart des Spannungsgebers (Innenwiderstände), wie auch die Zusammensetzung des Fusionsmediums waren dabei zu berücksichtigen (2.2.3; 3.4).

In der Literatur findet man bei verschiedenen Autoren verschiedene Fusionsgeräte (BTX, Zimmermann, Shimadzu). Die angegebenen Pulsbedingungen variieren dabei von Gerät zu Gerät und von Spezies zu Spezies.

Für das Schwein gab es zunächst folgende Richtwerte:

Autor	Spannung pro cm Elektrodenabstand [kV/cm]	Pulszahl	Δt zwischen den Pulsen [s]	AC-Feld: ja/ nein
Nagashima /61/	1,25	2	5	ja
Liu /62/	1,0	2	300	ja
Prather /63/	1,20	1	-	ja

4.2.4.1 Untersuchung der Zellyse an MeII-Oozyten

Da es bisher keine Literaturstelle zur Fusion porciner Kerntransferkomplexe mit einem Gerät der Firma Krüss gab, wurde zunächst parallel in kleinen Gruppen untersucht, in welchem Spannungsbereich (Stromstärke, Pulslänge, -zahl) mit porcinen Oozyten gearbeitet werden konnte, ohne daß die Zellen dabei lysierten. Die verwendete Fusionskammer ist in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

Tabelle 4.2.4.1.a: Vergleich verschiedener DC-Pulse bei gleicher Pulslänge von 600 μ s und einem Elektrodenabstand von 400 μ m ohne AC-Feld (MeII-Oozyten)

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl ($\Delta t=2s$)	Anzahl MeII- Oozyten	Lyse	
			n	[%]
2,50	1	21	21	100
1,88	1	20	20	100
1,25	1	26	26	100
0,25	2	22	4	18
Medienkontrolle	-	40	5	13

Das verwendete Fusionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Fusionsmedium 1 (312mOsm)	
0,3 M	Mannitol
0,1 mM	MgSO ₄
0,1 mM	CaCl ₂
0,01%	PVA

Die oben dargestellten Untersuchungen erfolgten an MeII-Oozyten, die 24h nach Puls morphologisch beurteilt wurden.

Eine mitlaufende Medienkontrolle (Inkubation der Oozyten in allen Medien) zeigte 13% Lyse, obwohl die Zellen nicht gepulst wurden.

Das Fusionsmedium 1 bewirkte bei allen Oozyten ein „Schrumpeln“ des Zytoplasmas nach Inkubation von 2min. und wurde in den nächsten Versuchsreihen modifiziert. Die Osmolarität (Osm) spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie ist dafür verantwortlich, daß bei einer Erhöhung des Wertes im Medium über den physiologischen Wert (ca.290mOsm im Plasma; /32/) Flüssigkeit aus der Zelle in das Medium fließt und das Zytoplasma dabei „zusammenschrumpelt“ (siehe Kapitel 2.4.1). Da die Oozyten vor der Inkubation im Fusionsmedium in PBS+10%NBCS (ca. 290mOsm) gelagert wurden, stellte eine Erhöhung um ca. 22mOsm eine starke Veränderung von ca. 10% dar. Auch die Lyserate lag bei 1,25kV/cm viel zu hoch. Ein Bereich zwischen 1,25kV/cm und 0,25kV/cm wurde im weiteren Verlauf genauer untersucht und dabei das AC-Feld, wie in der Literatur angegeben (s.o.), zugeschaltet.

Tabelle 4.2.4.1.b: Vergleich verschiedener DC-Pulse bei gleicher Pulslänge von 300 μ s und einem Elektrodenabstand von 400 μ m ohne AC-Feld, aber mit ramp-Funktion (AC-Feld nur nach DC-Puls in 5s von 5V auf 0V ausklingend) (MeII-Oozyten)

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl ($\Delta t=2s$)	Anzahl MeII- Oozyten	Lyse	
			n	[%]
1,25	1	20	20	100
1,20	1	33	33	100
0,50	3	10	8	80
0,50	2	27	22	81
0,50	1	12	8	67
0,25	2	11	3	27
0,20	2	10	4	40
0,20	1	10	3	30
0,13	3	12	0	0
0,13	2	10	0	0
Medienkontrolle	-	62	1	2
0,50 (600 μ s)	1	15	15	100

Das verwendete Fusionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Fusionsmedium 2 (300mOsm)	
0,3 M	Mannitol
0,1 mM	MgSO ₄
0,1 mM	CaCl ₂

Die Tabellen 4.2.4.1.a und b zeigen im Vergleich der Pulslängen (600 μ s; 300 μ s) bei der gleichen Spannung von 1,25kV/cm (Literaturwert /61/) in beiden Fällen 100% Lyse 24h nach Puls. Bei den vergleichbaren 0,25kV/cm Parametern ist die Lyserate (600 μ s: 18%) bei 300 μ s mit 27% sogar leicht erhöht. Möglicherweise wirkte sich das AC-Feld in der zugeschalteten ramp-Funktion negativ aus. Die Medienkontrolle war in der Lyserate mit 2% unauffällig, allerdings ließ sich noch immer der Effekt des „Schrumpelns“, wenn auch weniger stark, beobachten.

Daher wurden für die nächsten Versuche die Pulsdauer und das Fusionsmedium in bezug auf die Ca-Konzentration nochmals geändert. Auf die ramp-Funktion wurde verzichtet, da sich daraus kein Vorteil ableiten ließ.

Tabelle 4.2.4.1.c: Vergleich verschiedener DC-Pulse bei gleicher Pulslänge von 30 μ s und einem Elektrodenabstand von 300 μ m ohne AC-Feld (MeII-Oozyten)

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl	Anzahl MeII- Oozyten	Lyse	
			n	[%]
1,00	1	20	18	90
0,83	1	20	5	25
0,67	1	20	1	5
0,50	1	20	0	0
Medienkontrolle	-	18	0	0

Das verwendete Fusionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Fusionsmedium 3 (300mOsm)	
0,3 M	Mannitol
0,1 mM	MgSO ₄
0,05 mM	CaCl ₂

Die in Tabelle 4.2.4.1.c dargestellten Pulsversuche an MeII-Oozyten zeigen den Einfluß der Pulslänge auf die Lyserate. Auch wenn die Fusionsmedien in den Tabellen 4.2.4.1.b und c unterschiedlich sind, macht der 0,50kV/cm-Wert die Abnahme der Lyserate von 100% bei 600 μ s über 67% bei 300 μ s auf 0% bei 30 μ s beispielhaft deutlich. Das hier verwendete Fusionsmedium 3 verändert die Oozyten weit weniger als die vorangegangenen Medien (1 und 2). Die gesenkte Ca-Konzentration ließ die Ooplasten nach dem Puls weniger aufquellen als bisher. Das Verhalten der Zellen im elektrischen Feld ist u.a. von der elektrischen Feldstärke abhängig. Diese wird wesentlich von der Leitfähigkeit des Fusionsmediums beeinflusst, welche wiederum von Konzentration und Art der vorhandenen Ionen (Ladungszahl; Ionenbeweglichkeit; usw.) abhängt.

4.2.4.2 Kerntransferkomplexe und Zellfusion

Parallel zu den MeII-Oozyten wurden auch Versuche mit Kerntransferkomplexen gemacht, um ggf. einen Unterschied in der Lyserate, aber vor allem auch die Fusionsrate zu ermitteln.

Nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse mit den schon erwähnten Fusionsmedien und weiteren Varianten. Die Kerntransferkomplexe wurden in den aus den Tabellen 4.2.4.1.a -c untersuchten Bereichen geringer Lyse und einem aus der Literatur bekannten Wert (1,20kV/cm; 30 μ s) gepulst und 24h später morphologisch und mit Hoechst33342-Färbung ausgewertet.

Tabelle 4.2.4.2: Vergleich verschiedener DC-Pulse an Kerntransferkomplexen

Spannung/ Abstand [kV/cm]	Puls-			AC- Feld ja/nein	Anzahl Komplexe	Lyse		Fusion		Fusions- medium
	länge [μ s]	zahl n	Δt [s]			n	[%]	n	[%]	
1,20	300	1	-	ja	10	10	100	0	0	1
1,20	30	1	-	ja	3	3	100	0	0	2
0,70-0,77	30	1-3	1800	nein	112	34	30	22	20	3
0,67-0,73	30	1-3	1800	nein	80	34	43	11	14	4
0,50	30	1	-	ja	19	13	68	2	11	2
0,10	300	1	-	ja	38	29	76	0	0	1

AC-Feld ja: als ramp-Funktion (AC-Feld nur nach DC-Puls in 5s von 5V auf 0V ausklingend)

Das genannte Fusionsmedium 4 hatte folgende Zusammensetzung:

Fusionsmedium 4 (300mOsm)	
0,3 M	Mannitol
0,1 mM	MgSO ₄

Als Ergebnis der Untersuchung ließ sich feststellen, daß der Literaturwert von 1,20kV/cm; 30 μ s zu hoch war und zur Lyse aller eingesetzten Komplexe führte. Dies zeigt eindeutig den Einfluß des Gerätes. Ein langer Puls von 300 μ s führte auch bei nur 0,10kV/cm zu 76% Lyse, ohne daß eine Fusion eintrat. Die kurzen 30 μ s-Pulse führten zwischen 0,50kV/cm und 0,77kV/cm zu Fusionen, die prozentual unter der jeweiligen Lyserate lagen. Die Pulsstärke im

Bereich um $0,70\text{kV/cm} \pm 0,03$ ist dabei am genauesten untersucht worden, die Fusionsraten betragen maximal 20% und standen einer Lyserate von 30% gegenüber.

Eine Erhöhung der Pulsstärke führte zu mehr Lyse, eine Reduzierung zu weniger Fusionen. Das Fehlen von CaCl_2 im Fusionsmedium 4 stellte dabei keine Verbesserung der Fusionsrate dar.

Im Vergleich erwies sich die ramp-Funktion als negativer Faktor, der die Lyse erhöhte, ohne die Fusion zu verbessern. Obwohl das AC-Feld mit nur 5V sehr niedrig war, wirkte es nicht wie in der Literatur beschrieben als „Ausheilphase“ der Membran [43], sondern zeigte eine Erhöhung der Lyse von 30% ($0,70\text{-}0,77\text{kV/cm}$) auf 68% ($0,50\text{kV/cm}$) bei gleicher Pulslänge von $30\mu\text{s}$, wenngleich die angelegte DC-Spannung im selben Verlauf niedriger war.

Ein Hauptproblem war die Ausrichtung der Komplexe an den Elektroden, denn die Fusionsfläche zwischen Fibroblast und Ooplast mußte möglichst parallel zu den Elektroden ausgerichtet sein. Die Fusionskammer 1 (Kapitel 3.4.2) hatte aber einen minimalen Elektrodenabstand von $300\mu\text{m}$, was dem doppelten Oozytendurchmesser entsprach. Zusätzlich mußten die Komplexe leicht angehoben werden, da die Elektroden eine fixierte Höhe größer dem Oozytendurchmesser hatten.

4.2.4.3 Mehrfachpulse und Pulsabstand

Zur Fusion der Komplexe war es oft notwendig, nach einem ersten Puls mit folgender negativer Beurteilung des Fusionsergebnisses ein zweites, in seltenen Fällen auch drittes Mal zu Pulsen ($\Delta t \geq 30\text{min.}$). Daher wurde im folgenden an MeII-Oozyten die Auswirkung von Mehrfachpulsen mit unterschiedlichen Intervallzeiträumen und eine Verlängerung des DC-Pulses auf $99\mu\text{s}$ untersucht sowie zusätzlich 1% NBCS (mündliche Absprache mit Dr.P.Booth, siehe 3.4.3) zum Fusionsmedium gegeben.

Tabelle 4.2.4.3.a: Vergleich verschiedener DC-Pulse bei gleicher Pulslänge von $99\mu\text{s}$ und einem Elektrodenabstand von $300\mu\text{m}$ ohne AC-Feld (MeII-Oozyten)

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl	Δt [s]	Anzahl MeII- Oozyten	Lyse	
				n	[%]
0,70	1	-	10	0	0
0,70	2	0,1	10	0	0
0,70	2	9	10	5	50
0,73	1	-	6	1	17
0,73	2	0,1	7	3	48
0,73	2	9	10	7	70
Medienkontrolle	-	-	20	0	0

Das verwendete Fusionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Fusionsmedium 5 (285mOsm)	
0,285 M	Mannitol
0,1 mM	MgSO ₄
0,05 mM	CaCl ₂
1%	NBCS

Die Beibehaltung der in der Tabelle angegebenen Spannung bei einem DC-Puls bzw. zwei unterschiedlichen Doppelpulsabständen (Δt) zeigt sowohl bei $0,70\text{kV/cm}$ als auch bei $0,73\text{kV/cm}$ deutlich den Anstieg der Lyserate vom Einfachpuls (0% bzw. 17%) über den Doppelpuls mit $0,1\text{s}$ -Intervall (0% bzw. 48%) zum 9s -Intervall (50% bzw. 70%).

Offenbar wurde ein Doppelpuls in $0,1\text{s}$ besser toleriert als ein Doppelpuls im 9s Abstand.

Da die Pulslänge von $99\mu\text{s}$ in dem fusionsrelevanten Bereich um $0,7\text{kV/cm}$ bei MeII-Oozyten wenig Lyse zeigte (Einfachpuls), wurden die gleichen Parameter für alle nachfolgenden Fusionsversuche bei Kerntransferkomplexen eingesetzt bis zur Nutzung der Fusionskammer 2 (siehe Kapitel 4.5), die eine erneute Fusionspulsanpassung erforderte. Eine Ausnahme, die Fusionspulsereinstellungen mit Kammer 1 weiter zu optimieren, bilden die Versuche der Tabelle 4.2.4.3.c.

Tabelle 4.2.4.3.b: Darstellung des Verhaltens von Kerntransferkomplexen bei gegebenem DC-Puls, einer Pulslänge von $99\mu\text{s}$ und einem Elektrodenabstand von $300\mu\text{m}$ ohne AC-Feld

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl ($\Delta t \cong 1800\text{s}$)	Anzahl Kerntransfer- komplexe	Lyse		Fusion	
			n	[%]	n	[%]
0,67-0,73	1-2	368	178	48	121	33

Es wurde Fusionsmedium 5 verwendet.

Im Verlauf der Untersuchung zeigte es sich, daß Doppelpulse in kurzer Folge zur sofortigen Lyse des Komplexes meist noch in der Fusionskammer führten. Die Ergebnisse sind nicht in Tabellenform dargestellt, da dieser Versuch an nur wenigen Komplexen ($n=5$: Bedingungen wie in 4.2.4.3.b mit $\Delta t=0,1\text{s}$; 100% Lyse) durchgeführt wurde.

Aufgrund der durch die Mikromanipulation (Entkernung+Fibroblastentransfer) entstandenen Öffnung in der Zona pellucida verhielten sich diese Komplexe fragiler als nicht manipulierte MeII-Oozyten. Bei letztgenannten verursachte der Elektropuls kurzzeitig größere Poren in der Membran, die vermutlich einen vermehrten Ionenfluß zwischen Ooplasma und Fusionsmedium bewirkten, ohne daß ein starkes Aufquellen im Fusionsmedium 5 (bei $0,7\text{kV/cm} \pm 0,03$) zu erkennen war. Zwar wurde der Perivitellarraum kleiner, die Druckunterschiede wurden aber durch die intakte Zona pellucida in Grenzen gehalten, wie bereits in Tabelle 4.2.4.3.a dargestellt.

Die Komplexe zeigten aufgrund der Zonaöffnung ein anderes Verhalten. Im Mikroskop konnte hier deutlich ein kurzes Zucken des Ooplasten bei Elektropuls beobachtet werden. Bei anschließender Lyse zeigte sich nach dem Aufquellen des Plasmas bis zum Verschwinden des Perivitellarraumes ein Bersten der Zytoplasmamembran mit Austritt von Plasma durch das Zonaloch. Dies bedeutet, daß ein massiver Flüssigkeitsaustausch zwischen der Zelle und dem umgebenden Medium stattfand, und es liegt die Vermutung nahe, daß dies eine Folge des osmotischen Gefälles war.

Aufgrund dieser Unterschiede im Verhalten konnte ein zweiter Puls erst 30min. nach dem ersten gegeben werden.

Im Vergleich zu Tabelle 4.2.4.2, wo bei $0,70-0,73\text{kV/cm}$ und $30\mu\text{s}$ eine Fusion von 20% erreicht wurde, zeigt die obige Tabelle 4.2.4.3.b bei gleicher Spannung und $99\mu\text{s}$ eine Erhöhung der Fusionsrate auf 33%, aber auch die Lyserate erhöhte sich dabei von 30% auf 48%.

Zur Reduktion der Lyse wurden mit der Pulsdauer von 99 μ s weitere Untersuchungen mit nicht entkernten, aber Kerndonorzellen (Fibroblast) enthaltenden MeII-Oozyten (keine Entkernung) gemacht, die durch eine Öffnung der Zona pellucida ähnlich fragil wie die Kerntransferkomplexe, aber schneller und in größerer Zahl anzufertigen waren.

Zusätzlich wurde hier noch die Wirkung eines vor den DC-Puls geschalteten AC-Feldes untersucht, das die Anlagerung der Fibroblastenmembran an die Ooplasmamembran verbessern sollte. Das AC-Feld betrug 8V, 600kHz und wurde 60s appliziert, bevor der DC-Puls geschaltet wurde.

Tabelle 4.2.4.3.c: Vergleich verschiedener DC-Pulse bei gleicher Pulslänge von 99 μ s und einem Elektrodenabstand von 300 μ m mit vorgeschaltetem AC-Feld (MeII-Oozyten+Fibroblast/keine Entkernung)

Spannung/Abstand [kV/cm]	Pulszahl	Δt [s]	Anzahl manip. MeII-Oozyten	Lyse		Fusion	
				n	[%]	n	[%]
0,40	1	-	6	0	0	0	0
0,40	2	0,1	5	0	0	0	0
0,43	1	-	12	0	0	0	0
0,43	2	0,1	5	0	0	0	0
0,47	1	-	11	0	0	0	0
0,50	1	-	3	0	0	0	0
0,53	1	-	6	0	0	0	0
0,56	1	-	12	0	0	0	0
0,60	1	-	9	0	0	0	0
0,63	1	-	10	0	0	0	0

Es wurde Fusionsmedium 5 verwendet.

Auch hier fand 24h nach Puls eine Hoechstfärbung statt, die den Fibroblasten im Perivitellarraum, gleichzeitig aber auch ein Verlassen der MeII-Phase und somit eine Aktivierung der Oozyten erkennen ließ.

Es waren deutlich ein oder mehrere dekondensierte Kerne und auch 2-Zeller mit kernhaltigen Blastomeren sichtbar. Eine Fusion wurde aber in keinem Fall festgestellt.

Der fusionsrelevante Bereich war, wie die oben dargestellten Ergebnisse belegen, sehr eng und unmittelbar mit dem Auftreten von Lyse verknüpft. Er beträgt nur wenige kV/cm (0,67-0,73kV/cm) in einem untersuchten Bereich von 30 und 99 μ s. Längere Pulszeiten, schnell folgende Doppelpulse, oder Erhöhung der Pulsstärke führten zum steilen Anstieg der Zelllyse.

4.2.5 Auswirkung von AC-Feld und DC-Puls auf Fibroblasten in Suspension

Im folgenden wurde untersucht, ob die im Verhältnis zu den Oozyten ($d \approx 150 \mu\text{m}$) kleinen Fibroblasten ($d \approx 15-20 \mu\text{m}$) durch den angelegten Fusionspuls Membranschäden und damit Vitalitätsverluste erlitten, gleichzeitig sollte aber auch das Verhalten im AC-Feld charakterisiert werden.

Nach dem Ablösen der serumreduziert kultivierten Fibroblasten (4.2.3) während des Kerntransferversuches wurde immer auch deren Vitalität mit Hilfe der Trypanblaufärbung (3.7.4) geprüft und mit den Werten nach Einfluß des elektrischen Feldes verglichen.

Da eine Vitalitätsbeurteilung der Fibroblasten (Passage 6) nach Kerntransfer durch Färbung nicht möglich war, erfolgte hierzu das „Handeln“ der Fibroblasten wie für den Versuch, ohne sie zu transferieren, sondern im Fusionsmedium suspendiert, in die Fusionskammer zu pipettieren und sie dort den entsprechenden Pulsen auszusetzen.

Tabelle 4.2.5: Vitalitätsänderung serumreduzierter Fibroblasten aufgrund des elektrischen Feldes

Art des Pulses	n ges	n tot	n vital	Vitalität [%]
0-Kontrolle	8751	249	8502	97 ^a
AC [8V; 90s]	1701	575	1126	66 ^{b c}
DC [1x 21V; 99 μ s]	1631	60	1571	96 ^d
DC + ramp [s.o.; 8V in 30s auf 0V]	1940	68	1872	96 ^d

0-Kontrolle: nur abgelöst (4.2.2)

^{a b}: Werte in einer Spalte mit versch. Indices sind hochsignifikant unterschiedlich, $p < 0,001$

^{c d}: Werte in einer Spalte mit versch. Indices sind signifikant unterschiedlich, $p < 0,01$

Wie die Tabelle 4.2.5 zeigt, war die Vitalität der Fibroblasten nach der für den Kerntransfer erarbeiteten Standardvorbereitung (4.2.2 und 4.2.3) mit 97% gut. Die in 4.2.4 ermittelten Fusionsbedingungen (DC: 0,70kV/cm; 99 μ s) übten keinen negativen Einfluß auf die Vitalität (96%) aus. Eine zugeschaltete ramp-Funktion verminderte die Qualität der Fibroblasten nicht (96%). Das AC-Feld allein hatte aber einen messbaren negativen Einfluß und führte zu einer Vitalitätsabnahme von 30%.

Optisch konnte man im Mikroskop erkennen, wie es beim Anlegen des AC-Wechselstroms (8V; 90s) zu einer Wanderung der Fibroblasten im elektrischen Feld kam. Die Zellen zwischen den Elektroden zeigten eine „Perlschnurbildung“ von einem Pol zum anderen. Die Zellen, die hinter den Elektroden lagen, begannen im Kreis um die Elektroden zu rotieren.

In der zum DC-Puls zugeschalteten ramp-Funktion trat dieser Effekt nicht auf, da die Stromstärke hier schnell von 8V in 30s auf 0V abnahm.

Vermutlich lag der schädigende Einfluß des AC-Feldes in der Bewegung der Zellen. Während die Membranen bei einem DC-Puls nur in einer bestimmten Richtung polarisiert wurden, erfolgte in der Bewegung eine ständige Änderung der Polarisationsrichtung der Zellen. Möglicherweise stand dies auch im Zusammenhang mit dem negativen Einfluß von AC-Feld und Doppelpulsen auf Oozyten, die sich hier auch in ihrer Ausrichtung im elektrischen Feld drehten (4.2.4). Für die Kerntransferversuche in Kapitel 4.4 wurde daher auf das AC-Feld verzichtet (siehe auch Elektropulsübersicht 3.5.1).

4.3 Induzierte Parthenogenese

Wie in Kapitel 2.3.2.2 dargestellt, kann es auch ohne Befruchtung der Oocyte zu deren Verlassen der MetaphaseII und zur Bildung frühembryonaler Zellstadien kommen.

4.3.1 Elektroaktivierung mit 0,40kV/cm

Bei der Elektroaktivierung geht der Aktivierungsstimulus von dem applizierten elektrischen Puls aus. Die Aktivierung wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Dabei sollte zunächst der Einfluß auf die Zellyse, vor allem aber auf die Aktivierung mit folgender Zellteilung und maximal erreichtem Entwicklungsstadium in der in vitro-Kultur untersucht werden. Die Daten stammen aus Versuchen mit in vivo-, in vitro (TCM199 und NCSU37)-gereiftem Oozytenmaterial.

Die Elektropulseinstellung betrug:

AC: 8V 600kHz 1min. + DC: 12V 99 μ s (\approx DC=0,4kV/cm)

4.3.1.1 Aktivierung im elektrischen Feld ohne zusätzliche chemische Synchronisation

Es sollte hier untersucht werden, inwieweit das Fusionsmedium Mannitol oder Mannose (siehe auch Kapitel 4.2.4) mit und ohne CaCl₂ im elektrischen Feld aktivierend wirkt. Dazu wurden die MeII-Oozyten im Fusions-/Aktivierungsmedium gewaschen, 2min. inkubiert, gepulst, im Kulturmedium gewaschen und kultiviert.

Nachstehende Übersicht zeigt die verschiedenen Versuchsgruppen:

- 1 **Elektrischer Puls** (Es fand ein Vergleich verschiedener 0,285M Fusions-/Aktivierungsmedien miteinander statt.)
 - 1a Mannitol mit Ca
 - 1b Mannitol ohne Ca
 - 1c Mannose mit Ca
 - 1d Mannose ohne Ca
 - 1e 0-Kontrolle (diese Oozyten erfuhren außer der Entkumulierung keine weitere Inkubation, sie kamen direkt in Kultur)

Fusionsmedium (285mOsm)	
0,285 M	Mannitol oder Mannose
0,1 mM	MgSO ₄
+/-0,05 mM	CaCl ₂
1%	NBCS

Die MeII-Oozyten wurden nach der Applikation des Aktivierungsstimulus in NCSU23 kultiviert. Die 0-Kontrollen verliefen in allen Versuchsabschnitten gleich, weshalb sie zahlenmäßig zusammengefaßt wurden. Es ergibt sich als Summe (Σ) eine große Oozytenzahl von 1019 (fixiert nach 18h IVC), die in den Tabellen zu den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.3 zum Vergleich mit den Aktivierungsgruppen immer wieder dargestellt wurde. Die Oozytenzahl der 0-Kontrolle nach 7 Tagen IVC war mit insgesamt 179 geringer, da ihre Bedeutung aufgrund der vollständigen Degeneration nach dieser Kulturdauer abnahm.

Eine Hoechst33342-Färbung 18 Stunden später zeigte folgende Ergebnisse:

Tabelle 4.3.1.1.a: Färbung nach 18h Kultur

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert; n.a. n (%)	>MeII n (%)	1K n (%)	≥2K n (%)
1a	25	0 (0)	20 (80)	15 (60)	4 (16)
1b	25	2 (8)	17 (71)	13 (54)	1 (4)
1c	99	5 (5)	70 (74)	57 (61)	3 (3)
1d	25	1 (4)	22 (92)	16 (67)	2 (8)
Σ 0-Kontrolle	1019	31 (3)	145 (15)	20 (2)	20 (2)

Erläuterung der einzelnen Spalten siehe 3.10.1

Die Tabelle 4.3.1.1.a zeigt deutlich den geringen Anteil der Degeneration. Er lag zwischen 0% und 8%, wobei er sich kaum von der 0-Kontrolle mit 3% unterschied. Das bedeutet, daß das Fusionsmedium und der Aktivierungspuls keinen negativen, zellschädigenden Effekt auf nicht manipulierte MeII-Oozyten hatten und deckt sich auch mit den in Tabelle 4.2.4.3.c gefundenen Ergebnissen.

Weiterhin ist festzustellen, daß 18h nach Puls zwischen 71% und 92% der Oozyten die MeII verlassen hatten. Dieser Prozentsatz war hier viel höher als bei der 0-Kontrolle (15%) und zeigt deutlich, daß diese Entwicklung auf dem Puls basierte. Nach dieser kurzen Kulturzeit hatten in den Gruppen 1a-d 54-67% der Oozyten einen dekondensierten Kern gebildet, in der Gruppe 1a waren es sogar schon 16% mit zwei Kernen.

Von 988 Oozyten der 0-Kontrolle hatten 15% die MeII verlassen. Dieser Wert stimmt gut mit den in 4.2.1.5 ermittelten Ergebnissen überein. Insgesamt hatten 4% wenigstens einen dekondensierten Kern ausgebildet, die verbliebenen 9% befanden sich in der Anaphase bzw. TelophaseII.

Es wurden außerdem nach obigem Protokoll aktivierte Gruppen bis zum Tag 7 in NCSU23 Medium weiter kultiviert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 4.3.1.1.b: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
1a	54	0			
1b	52	0			
1c	206	6 (3)	8	4-10	9-38
1d	54	4 (7)	9		6-12
Σ 0-Kontrolle	179	0			

Definitionen siehe 3.10.1

In Tabelle 4.3.1.1.b sind die höchsten Entwicklungsstadien der IVC zusammengefasst. Die 0-Kontrolle wies keine höheren über das 2-Zellstadium hinausgehenden Teilungen auf. Alle spontan aktivierten Zellen der 0-Kontrolle degenerierten, und der Anteil an Fragmentierungen war sehr hoch. Zu Morula- und Blastozystenbildung kam es nur in mannosehaltigem Medium, auch wenn der Anteil mit 3-7% nur gering war. Die erreichten Kernzahlen lagen aber für parthenogenetische Embryonen aus in vitro-Kultur im normalen Bereich [Kernzahl:22±12] /48/, [Kernzahl:17-44] /53/, [Kernzahl≈29] /58/.

Außerdem konnte morphologisch direkt nach Inkubation und Puls in diesem Medium die wenigsten Veränderung in bezug auf ein „Aufquellen“ oder „Schrumpfen“ des Zytoplasmas der Oozyten erkannt werden. (siehe auch Kapitel 4.2.4)

Die gefundenen Ergebnisse ließen Mannose im Vergleich zu Mannitol besser abschneiden.

Die Auswahl eines für alle weiteren Versuche benutzten Mediums fiel daher auf 1c.

Fusionsmedium 1c) (285mOsm)	
0,285 M	Mannose
0,1 mM	MgSO ₄
+0,05 mM	CaCl ₂
1%	NBCS

4.3.1.2 Chemische Synchronisation mit DMAP

Da DMAP als Synchronisationsmittel im Zusammenhang mit bovinen Kerntransferuntersuchungen in der Literatur erwähnt wird, sollte im folgenden untersucht werden, inwieweit die Inkubation porciner Oozyten nach Elektropuls in DMAP einen positiven Einfluß auf die Entwicklung parthenogenetischer Embryonen hatte.

Nachstehende Übersicht zeigt die unterschiedlich behandelten Gruppen auf:

- 2 **Elektrischer Puls + 2mM DMAP** (Inkubation = 3h, gelöst in NCSU23)
 - 2a Puls und sofortige Inkubation in DMAP
 - 2b Puls 3h Zwischenkultur und danach Inkubation in DMAP
 - 2c Puls 6h Zwischenkultur und danach Inkubation in DMAP
 - 2d Pulskontrolle ohne Inkubation in DMAP
 - 2e 0-Kontrolle

Die Oozyten wurden 18h nach Puls gefärbt und ausgewertet.

Tabelle 4.3.1.2.a: Färbung nach 18h Kultur

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert, n.a. n (%)	>MeII n (%)	1K n (%)	≥2K n (%)
2a	30	1 (3)	29 (100)	13 (45)	16 (55)
2b	30	2 (7)	22 (79)	18 (64)	3 (11)
2c	30	2 (7)	22 (79)	19 (68)	2 (7)
Σ 0-Kontrolle	1019	31 (3)	145 (15)	20 (2)	20 (2)

Definitionen siehe 3.10.1.

Die Degeneration lag auch bei DMAP-Inkubation nur im Bereich der 0-Kontrolle zwischen 3-7%. Die Konzentration der Substanz und die Inkubationsdauer waren damit nicht toxisch. Es fiel auf, daß bei sofortiger Einwirkung direkt nach Puls (2a) das Verlassen der MeII bei 100% lag, bei Zwischenkultur für 3 bzw. 6h (2b, c) etwas niedriger, bei 79%. Dieser Trend setzte sich in bezug auf die Ausbildung von 2 Kernen deutlich fort. Hier sank der Prozentsatz von 55% (2a) über 11% (2b) bis auf 7% (2c) mit Zunahme der Zeitdifferenz.

Zusätzlich bis Tag 7 weiterkultivierte Gruppen ergaben folgende Ergebnisse nach Färbung:

Tabelle 4.3.1.2.b: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
2a	113	25 (22)	9-21	7-18	11-44
2b	56	4 (7)	10-11	10-15	
2c	46	3 (7)	9	26	
Σ 0-Kontrolle	179	0			

Definitionen siehe 3.10.1.

Die Entwicklung, die sich in Tabelle a schon angekündigt hatte, setzte sich hier deutlich fort. So lag die Morula-/Blastozystenrate bei 2a mit 22% um 15% höher als in den anderen Aktivierungsgruppen. Verzögerte DMAP-Inkubation (2b, c) reduzierte die Weiterentwicklung auf 7% und zeigte damit keinen Vorteil gegenüber nicht inkubierten Oozyten.

4.3.1.3 Chemische Synchronisation mit Cycloheximid

Cycloheximid wird ebenfalls als Mittel zur Synchronisation im Zusammenhang mit bovinen Kerntransferuntersuchungen in der Literatur erwähnt und sollte hier auch auf Anwendbarkeit im porcinen System untersucht werden.

Nachstehende Übersicht zeigt die unterschiedlich behandelten Gruppen auf:

- 3 **Elektrischer Puls + 10µg/ml Cycloheximid** (Inkubation = 5h, gelöst in NCSU23)
 - 3a Puls und sofortige Inkubation in Cycloheximid
 - 3b Puls 3h Zwischenkultur und danach Inkubation in Cycloheximid
 - 3c Pulskontrolle ohne zusätzliche Inkubation
 - 3d 0-Kontrolle

Die Oozyten wurden 18h nach Puls gefärbt und ausgewertet.

Tabelle 4.3.1.3.a: Färbung nach 18h Kultur

Aktivierungsmethode	Oozyten n	degeneriert, n.a. n (%)	>MeII n (%)	1K n (%)	≥2K n (%)
3a	30	1 (3)	24 (83)	15 (52)	4 (14)
3b	30	1 (3)	25 (86)	15 (52)	2 (7)
Σ 0-Kontrolle	1019	31 (3)	145 (15)	20 (2)	20 (2)

Definitionen siehe 3.10.1.

Die Degeneration in den beiden Cycloheximid-Gruppen lag mit 3% genau bei dem Wert der 0-Kontrolle. Der Anteil der aktivierten Zellen, die die MeII verlassen hatten, befand sich mit 83% und 86% verglichen mit den anderen Gruppen (1a bis 2c: 71-100%) in einem mittleren Bereich und deutlich höher als die 0-Kontrolle. Beide Cycloheximid-Gruppen (3a und b) hatten 18h nach Aktivierung zu 52% einen Kern und zu 14% und 7% 2 Kerne gebildet.

Auch hier wurde bis Tag 7 weiterkultiviert und anschließend gefärbt:

Tabelle 4.3.1.3.b: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	M/t-bl/Bl n (%)
3a	63	0
3b	65	0
Σ 0-Kontrolle	179	0

Definitionen siehe 3.10.1.

Es ist sehr gut zu erkennen, daß Cycloheximid nicht für das porcine System geeignet war, da keine Entwicklungsstadien der Morula oder Blastozyste auftraten. Zwar fanden sich vereinzelt 6- oder 8-Zeller, die jedoch nach Hoechst33342-Färbung neben kernhaltigen auch kernlose Blastomeren und starke Degenerationserscheinungen zeigten.

Diese Methode wurde nicht weiter untersucht, da DMAP als Synchronisationsmittel in Kombination mit dem elektrischen Puls zu guten Ergebnissen geführt hatte.

Die Auswertung der 0-Kontrolle zeigte degenerierte und meist auch fragmentierte Zellen, so daß sie als Kontrolle für Tag 7-Färbungen ungeeignet war. Aus diesem Grunde wurde bei weiteren Versuchen in diesem Zusammenhang auf sie verzichtet.

4.3.2 Elektroaktivierung mit 0,70kV/cm

Die in 4.3.1 benutzte niedrigere Spannung von 0,40kV/cm diente zur Untersuchung der dort beschriebenen Methoden. Hier sollte nun der Vergleich mit 0,70kV/cm unter fusionsrelevanten Bedingungen zeigen, inwieweit sich die Aktivierung mit steigender Pulsstärke verbessern läßt und die M/t-bl/Bl-Raten zunehmen.

Zusätzlich wurden auch noch neue Kombinationen von Substanzen auf die Verbesserung der parthenogenetischen Entwicklung untersucht.

Die Versuchsgruppen wurden bis Tag 7 in NCSU23 kultiviert und dann durch Hoechst33342-Färbung ausgewertet.

Es ist zu beachten, daß nach 18h keine Färbung durchgeführt wurde, da eine Aussage über Auswirkungen nach diesem kurzen Zeitraum nur begrenzt möglich war (siehe Cycloheximid 4.3.1.3). Aus diesem Grund wurden auch 0-Kontrollen nicht mit durchgeführt, da eine Auswertung dieser Kontrollgruppe nach 7 Tagen Kultur nur Degeneration und Fragmentation ergab.

Die Daten umfassen in vivo- und in vitro (TCM199)-gereiftes Oozytenmaterial.

Elektropulseinstellung:

Ein AC-Feld wurde nicht verwendet! DC: 21V 99µs (≈DC=0,70kV/cm)

4.3.2.1 Ohne zusätzliche chemische Synchronisation

1 Elektrischer Puls

Mannose + Ca (siehe 4.3.1.1)

Tabelle 4.3.2.1: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungsmethode	Oozyten n	degeneriert n (%)	TR n (%)	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
1	155	6 (4)	135/149 (91)	82 (55)	7-20	4-18	10-64

Definitionen siehe 3.10.1.

Es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Aktivierungsspannung von 0,40kV/cm (Tab. 4.3.1.1, Spalte 1c) auf 0,70kV/cm (Tab. 4.3.2.1) zu einer deutlichen Erhöhung der M/t-bl/Bl-Rate von 3% auf 55% führte.

Offenbar verbesserte sich die parthenogenetische Aktivierung im untersuchten Bereich mit dem verstärkten Stimulus erheblich. Die Degeneration (Tag 7) war mit 4% niedrig.

4.3.2.2 Chemische Synchronisation mit DMAP

Da sich die Erhöhung der Spannung in 4.3.2.1 wesentlich bemerkbar machte (Verbesserung der M/t-bl/Bl-Rate um 52%), wurde die in 4.3.1.2 als gut befundene Methode mit DMAP-Inkubation direkt nach Puls unter den fusionsrelevanten Bedingungen nochmals wiederholt.

2 **Elektrischer Puls + 2mM DMAP** (Inkubation = 3h, gelöst in NCSU23)

Puls und sofortige Inkubation in DMAP

Tabelle 4.3.2.2: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert n (%)	TR n (%)	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
2	146	3 (2)	131/143 (92)	73 (51)	9-17	7-22	10-48

Definitionen siehe 3.10.1.

Bei der Betrachtung der M/t-bl/Bl-Rate ist auch hier der in 4.3.2.1 beobachtete Anstieg von 22% (0,40kV/cm) auf 51% (0,70kV/cm) zu sehen. Die Degeneration blieb auch bei DMAP mit 2% gering. Dieser Versuch bestätigte, daß DMAP in Kombination mit dem Puls gut zur Initiierung der Parthenogenese im porcinen System geeignet war.

4.3.2.3 Zusätzliche Aktivierung mit Thimerosal/DTT

Im weiteren Verlauf wurde geprüft, ob es sinnvoll wäre, nach appliziertem Puls noch zusätzlich auf chemischem Wege zu aktivieren.

3 **Elektrischer Puls + Thimerosal / DTT** (10min. 200µM Thimerosal / 30min. 8mM DTT, gelöst in PBS10%NBS)

3a Inkubation 4h nach Puls

3b Inkubation 18h nach Puls

Tabelle 4.3.2.3: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert n (%)	TR n (%)	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
3 a	76	5 (7)	58/71 (82)	30 (42)	8-21	13-25	10-48
3 b	140	1 (1)	133/139 (96)	63 (45)	7-24	10-17	8-47

Definitionen siehe 3.10.1.

Wie in der Tabelle 4.3.2.3 zu sehen ist, stellte die doppelte Aktivierung keine Verbesserung der Ergebnisse dar. Die M/t-bl/Bl-Rate lag hier bei ca. 44%, wobei die Zwischeninkubationszeit keinen Einfluß zeigte. Beide Werte lagen dabei unter denen des Elektropulses mit und ohne zusätzliche DMAP-Inkubation (51% und 55%).

Die Degeneration lag beim 4h-Intervall mit 7% nur wenig über den bisher ermittelten Degenerationen in den anderen Gruppen (2-4%; Tab. 4.3.2.1 und 4.3.2.2).

4.3.2.4 Einfluß von Oxidationsinhibitoren auf die Aktivierung

Da die Aktivierung incl. der Waschschrte ein häufiges Pipettieren ohne CO₂-Begasung außerhalb des Brutschrankes beinhaltete, sollte der Einfluß des Oxidationsinhibitors Glutathionsulphhydryl untersucht werden. Dieser wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten dem Kulturmedium zugegeben.

- 4 **Elektrischer Puls** + anschließender Inkubation in **GSH** (1mM Glutathionsulphhydryl, gelöst in NCSU23)
 - 4a Zugabe zum Kulturmedium für die ersten drei Tage
 - 4b Zugabe zum Kulturmedium für 7 Tage

Tabelle 4.3.2.4: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert n (%)	TR n (%)	M/t-bl/Bl n (%)
4 a	87	10 (11)	56/77 (73)	0
4 b	192	8 (4)	163/184 (89)	0

Definitionen siehe 3.10.1.

Die M/t-bl/Bl-Rate in diesem Versuchsabschnitt betrug 0%. Es konnten hier keine höheren Entwicklungsstadien gefunden werden. Die meisten Zellen blieben in ihrer Teilung im 2-, 3- und 4-Zellstadium stehen und degenerierten anschließend. Interessanterweise wirkte sich ein Wechsel der Mediumzusammensetzung nach 3 Tagen (4a) dabei negativer auf die Degeneration und die Teilungsrate aus als durchgehende Kultur in GSH-haltigem Medium. Entgegen der in der Literatur für das bovine System positiv beschriebenen Wirkung von GSH /64, 65/, ist dessen Zusatz für das porcine System nicht geeignet.

4.3.3 Chemische Aktivierung mit Thimerosal/DTT

Aktivierung durch Thimerosal / DTT (10min. 200µM Thimerosal / 30min. 8mM DTT, gelöst in PBS10%NBCS)

- a Aktivierung frischer MeII-Oozyten
- b Aktivierung 24h gealterter MeII-Oozyten
- c 0-Kontrolle

Die MeII-Oozyten wurden nach der Applikation des Aktivierungsstimulus in NCSU23 kultiviert. Die Daten sind aus in vivo- und in vitro (TCM199)-gereiftem Oozytenmaterial gewonnen worden.

Eine Hoechst33342-Färbung 18 Stunden später zeigte die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 4.3.3.a: Färbung nach 18h Kultur

Aktivierungs- methode	Oozyten n	degeneriert n (%)	>MeII n (%)	1K n (%)	≥2K n (%)
a	96	5 (5)	72 (79)	21 (23)	30 (33)
b	335	13 (4)	265 (82)	48 (15)	172 (53)
Σ 0-Kontrolle	1019	31 (3)	145 (15)	20 (2)	20 (2)

Definitionen siehe 3.10.1.

In beiden Gruppen war der Anteil an degenerierten Zellen mit 5% und 4% gering und unterschied sich damit nicht von dem der 0-Kontrolle. Der Prozentsatz der aktivierten Oozyten war in beiden Gruppen etwa gleich und lag bei ca. 80% in einem mit den Tabellen 4.3.1.1-3a vergleichbaren Bereich, jedoch verringerte sich deutlich die Zahl der Oozyten mit einem Zellkern (1K), 23% (a) und 15% (b), gegenüber den elektrisch aktivierten Gruppen (Tabellen 4.3.1.1-3a). Insgesamt hatten durch Elektroaktivierung 181 von 309 Oozyten (59%) einen Zellkern gebildet.

Der Anteil der Zellen mit zwei und mehr Zellkernen lag bei den chemisch aktivierten Oozyten der frisch aktivierten Gruppe bei 33% und damit 20% niedriger als bei den gealterten Oozyten (53%). Im Vergleich mit der Elektroaktivierung schnitten beide Gruppen gut ab und lagen über dem Durchschnittswert von 12% (37 von 309). Die DMAP-Gruppe 2a (Tab. 4.3.1.2 a) erreichte dabei mit 55% den größten Wert. Dieser wurde nur von den gealterten, Thimerosal/DTT-aktivierten Oozyten mit 53% beinahe erreicht.

Tabelle 4.3.3.b: Ergebnisse der Kultur an Tag 7

Aktivierungs- methode	Oozyten n	M/t-bl/Bl n (%)	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
a	95	18 (19)	7-16	6-7	13-48
b	127	53 (42)	6-18	5-18	9-35
Σ 0-Kontrolle	179	0			

Definitionen siehe 3.10.1.

Die M/Bl-Rate lag mit 19% (a) etwa so hoch wie die der DMAP-Gruppe (22%) bei 0,40kV/cm (2a; Tab. 4.3.1.2.b). Die gealterten, aktivierten Oozyten (b) lagen mit 42% ca.

doppelt so hoch. Vergleicht man diese, allein durch chemische Aktivierung, erreichte Rate mit den durch 0,70kV/cm erzielten Werten (Tab. 4.3.2.1-3), so befindet sich Gruppe b etwa auf gleicher Höhe mit der Kombination aus elektrischer und chemischer Aktivierung (Tab. 4.3.2.3; 3b). Diese Kombination erreichte 45% Morulae, teilblastulierte- und Blastozystenstadien.

Man kann daraus ablesen, daß eine doppelte Aktivierung bei einer Zwischenkultur von 18h bei MeII-Oozyten gut mit 24h gealterten und nur chemisch aktivierten Oozyten vergleichbar ist.

Gealterte Oozyten ließen sich leichter aktivieren als frisch gereifte und waren bei 18h verzögertem Aktivierungsstimulus keineswegs zu stark gealtert, um gute M/BI-Raten zu erreichen.

4.3.3.1 Einfluß der Oozytenalterung und Inkubation in Cytochalasin B

Die Aktivierungsuntersuchungen an MeII-Oozyten sind als Entwicklung geeigneter Verfahren zur Aktivierung von Kerntransferkomplexen zu sehen. Die reifen Oozyten dienten als Ooplast der Kerntransferkomplexe und waren in nicht-manipuliertem Zustand in großer Zahl verfügbar. Daher sollten im folgenden der Einfluß der Alterung von reifen Oozyten und die Auswirkungen einer vorangegangenen Cytochalasin B-Inkubation auf das Teilungsverhalten beobachtet werden.

Eine Alterung der Oozyten trat zwangsläufig während der Mikromanipulation auf, und eine Entkernung ohne Cytochalasin B-Inkubation war unmöglich.

Die Aktivierung wurde wie folgt durchgeführt:

Die Oozyten wurden 10min. in 200 μ M Thimerosal inkubiert, gewaschen und verblieben für weitere 30min. in 8mM Dithiothreitol (DTT).

Das Verdünnen, Waschen und Kultivieren wurde jeweils in PBS+10% NBCS durchgeführt.

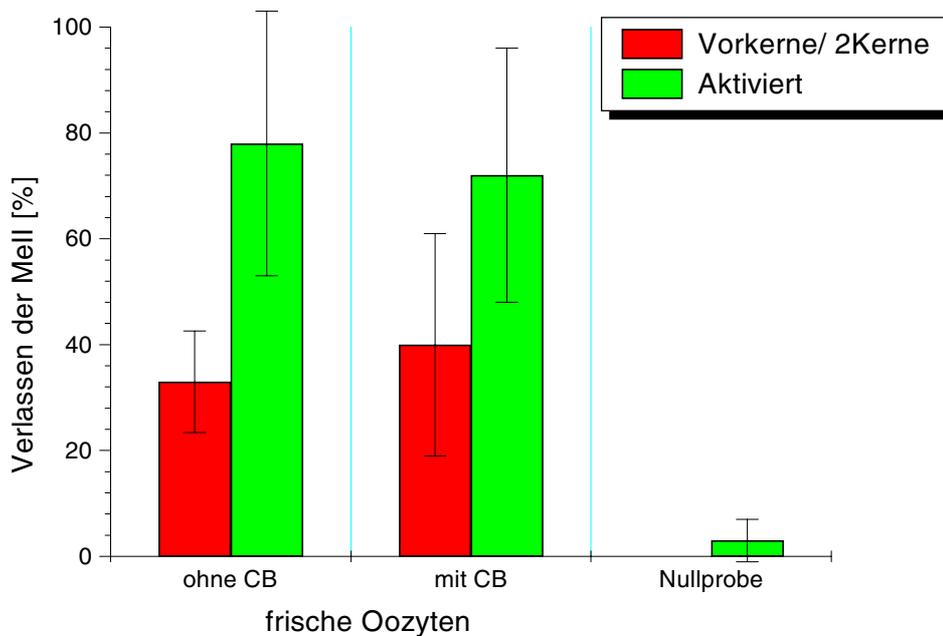
22h nach der Aktivierung erfolgte das Färben der Oozyten in Hoechst33342 mit nachfolgender Auswertung.

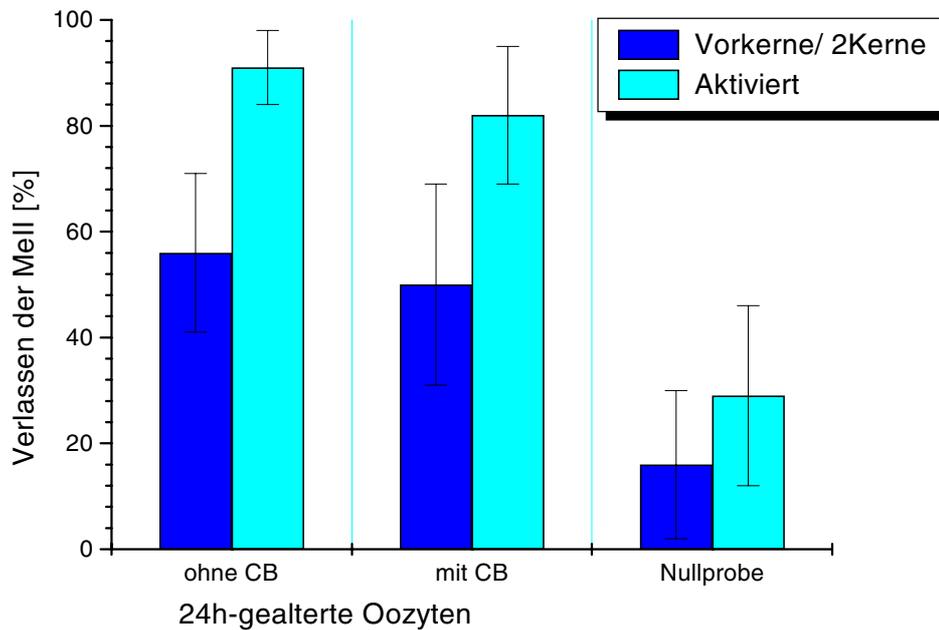
Die verschiedenen Versuchsgruppen wurden gemeinsam entkumuliert, unterschieden sich dann aber wie folgt:

1. in vitro gereifte, **frische** Oozyten ohne CB-Inkubation, in Thimerosal/DTT aktiviert
2. in vitro gereifte, **frische** Oozyten, vor der Aktivierung in Cytochalasin B inkubiert
3. in vitro gereifte, **frische** Oozyten, die nicht aktiviert wurden und als **0-Kontrolle** dienen
4. in vitro gereifte, **24h gealterte** Oozyten ohne CB-Inkubation, in Thimerosal/DTT aktiviert
5. in vitro gereifte, **24h gealterte** Oozyten, vor der Aktivierung in Cytochalasin B inkubiert
6. in vitro gereifte, **24h gealterte** Oozyten, die nicht aktiviert wurden und als **0-Kontrolle** dienen

Die nachfolgende Graphik 4.3.3.1 zeigt die Ergebnisse aus 6 Versuchsdurchgängen mit insgesamt 663 MeII-Oozyten:

(Die Abkürzung CB bedeutet Cytochalasin B)





Graphik 4.3.3.1

Als Vorkerne/ 2 Kerne gelten Ein- und Zweizeller mit 2 Kernen.

Als aktiviert gelten alle Oozyten, die die MeII verlassen haben.

33% der frisch aktivierten Oozyten ohne CB-Inkubation hatten zwei und mehr Kerne. Gealterte Oozyten ohne CB wiesen hier mit 57% einen schwach signifikant um 24% höheren Wert auf. Die entsprechenden Aktivierungsraten (Verlassen der MeII) stiegen in gleicher Weise von 78% auf 91% an.

Frisch aktivierte Oozyten mit CB-Inkubation hatten zu 40% zwei und mehr Kerne und zu 72% die MeII verlassen. Gealterte Oozyten mit CB-Inkubation zeigten mit 50% und 82% jeweils eine Erhöhung um 10% dieser Werte durch Alterung.

Die Graphik 4.3.3.1 zeigt deutlich den Anstieg der spontanen Teilung in der gealterten 0-Kontrolle. Während sich in der frischen 0-Kontrolle nach 22h Kultur keine Kernteilung beobachten ließ und 3% die MeII verlassen hatten, waren in der 24h gealterten 0-Kontrolle 16% Kernteilung und 29% Aktivierung zu verzeichnen. Beide Veränderungen durch die Alterung sind signifikant, $p < 0,01$.

Die Alterung (24h) hatte einen signifikanten Einfluß auf nicht aktivierte Zellen. Die Konzentration an „Maturation Promoting Factor“ (MPF) nahm mit der Zeit ab, und die Oozyten verließen spontan die MeII /37/.

Trotzdem blieb ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen frischer 0-Kontrolle und den frischen Gruppen mit/ohne CB.

Der Unterschied zwischen der gealterten 0-Kontrolle und den gealterten Gruppen mit/ohne CB war bei der Ausbildung von zwei und mehr Kernen signifikant und bei Betrachtung des Verlassens der MeII wieder hochsignifikant (statistische Methoden siehe 3.9).

Die stimulierten Gruppen mit/ohne CB waren durch die Alterung (verzögerte Thimerosal/DTT-Inkubation) wie folgt beeinflusst worden:

Die Erhöhung der Werte war mit 10% bzw. 24% (2 und mehr Kernen) nur schwach oder nicht signifikant; die Alterung der MeII-Oozyten zeigte aber im betrachteten Alterungszeitraum von 24h eine Verbesserung der Aktivierbarkeit und ist daher positiv zu bewerten. Eine negative Beeinflussung durch den zum Kerntransfer benötigten Manipulationszeitraum, der weniger als 24h betrug, war aber auf keinen Fall zu erwarten.

Diese Untersuchung stimmt sowohl gut mit der in 4.3.2.3 gefundenen Aussage überein, wo unter ähnlichen Bedingungen die M/t-bl/BI-Rate an Tag 7 in der 18h gealterten Gruppe 3% höher lag als in der 4h gealterten Gruppe, als auch mit der Tabelle 4.3.3.b, wo die M/t-bl/BI-Rate der 24h gealterten Gruppe sogar um 23% über der frisch aktivierten Gruppe lag.

Das Cytochalasin B beeinflusste die Aktivierbarkeit offenbar nicht. Auch wenn die frische Gruppe mit CB 18% (zwei und mehr Kerne) über der ohne CB-Inkubation lag, war dieser Unterschied nicht signifikant. Die Verwendung von CB im Manipulationsmedium hat also keinen negativen Effekt.

Abschließend ist zu allen durchgeführten Aktivierungsuntersuchungen festzustellen, daß sich porcine MeII-Oozyten leicht aktivieren lassen. Ihr Aktivierungspotential nahm sogar nach einer kurzen Alterung von 18 bis 24h noch einmal zu und führte, falls kein beabsichtigter Stimulus ausgelöst wurde, zu spontanen Teilungen und Fragmentierungen. Eine geregelte Teilung von Kern und Zytoplasma konnte jedoch nur durch chemische Aktivierung mit Thimerosal/DTT wie auch durch Elektropuls mit und ohne DMAP erreicht werden. Eine M/t-

bl/Bl-Rate von 51% (236 von 462 Oozyten: Tab. 4.3.2.1-3) wurde mit diesen Methoden als gutes mit der Literatur [M/Bl-Raten: 3-34%] /48, 53, 58/ vergleichbares Ergebnis erzielt.

Die Qualität des Aktivierungsstimulus ist also für die anschließende Embryonalentwicklung von großer Bedeutung. Ein spontanes nur durch Alterung oder aufgrund zu heftigen Pipettierens beim Entkumulieren erzielt Verlassen der MetaphaseII führte in den Experimenten nie zu echten höheren Entwicklungsstadien, wie Morulae oder Blastozysten. Hier war vielmehr eine unkontrollierte asynchrone Kern- und Plasmateilung der Grund für die komplette Fragmentierung.

Obwohl die genauen Abläufe und Erfordernisse bei einer Aktivierung der Oozyte durch die Befruchtung (Kapitel 2.2.5.1) noch nicht ganz geklärt sind, ist es mit Hilfe parthenogenetischer Stimuli, wie z.B. Elektropuls ohne / in Kombination mit synchronisierenden Substanzen (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) oder auch ausschließlich durch chemische Aktivierung (Kapitel 4.3.3) möglich, Morulae und Blastozysten zu erstellen, die sich nach in vivo-Kultur sogar bis zu einem mit Tag 19-IVF-Embryonen vergleichbaren Stadium entwickelten und z.T. über schlagende Herzen verfügten /50/.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Parthenogeneseversuche (4.3 und den Pulskontrollen zu den Kerntransferversuchen: 4.5 und 4.6) mit guten Entwicklungsergebnissen:

Tabelle 4.3.3.1.a: Parthenogeneseversuche

Elektropuls	Methode (Substanz)	Reifungs- art	M/t-bl/Bl %	Kernzahl M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	-----	vivo/vitro	55	7-20	4-18	10-64
AC: 8V, 60s DC: 0,4kV/cm, 99µs	+ DMAP (3h)	s.o.	22	9-21	7-18	11-44
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	+ DMAP (3h)	s.o.	51	9-17	7-22	10-48
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	Δt=4h + Thim/DTT	s.o.	42	8-21	13-25	10-48
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	Δt=18h + Thim/DTT	s.o.	45	7-24	10-17	8-47
-----	Thim/DTT frisch	s.o.	19	7-16	6-7	13-48
-----	Thim/DTT 24h gealtert	s.o.	42	6-18	5-18	9-35
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	+ DMAP (3h)	vitro	23 [*]	4-12	4-14	6-29
AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	+ DMAP (3h)	vivo	25 [*]	8	3-20	6-83

Ergebnisse nach 7 Tagen IVC

AC: ----- DC: 0,7kV/cm, 99µs	+ DMAP (3h)	vivo	50 [*]	20	6-24	12-120
---------------------------------	----------------	-------------	-----------------	----	------	--------

Ergebnisse nach 6 Tagen in **vivo**-Kultur + 24h IVC

M/t-bl/Bl = Morulae/teil-blastulierte/Blastozysten-Rate

* : Mit der Fusionskammer 2 gepulste Oozyten

Tabelle 4.3.3.1.b: Vergleich mit Literaturdaten zur Parthenogenese

Elektropuls	Methode (Substanz)	Reifungs- art /Literatur/	M/t-bl/Bl %	Kernzah M	Kernzahl t-bl	Kernzahl Bl
AC: ----- DC: 1,2kV/cm, 30µs	-----	vitro /54/	32	keine Angaben		
AC: ----- DC: 1,2kV/cm, 30µs	+ 6h CB	vitro /54/	25	s.o.		
AC: 5V, 10s DC: 1,2kV/cm, 30µs	-----	vitro /53/	3	17-44		
AC: 4V, 10s DC: 1,2kV/cm, 30µs	-----	vitro /48/	11	[22]		
AC: ----- DC: 1,2kV/cm, 30µs	-----	vitro /66/	15	keine Angaben		
AC: ----- 2DC: 1,5kV/cm, 60µs	+ DMAP	vivo /60/	83	s.o.	s.o.	[28]
-----	A23187/6 DMAP	vitro /54/	33	s.o.		
-----	Thim/DTT	vitro /54/	34	s.o.		
-----	Thim/DTT	vitro /66/	15	s.o.		
-----	Thim/DTT	vivo /66/	60	[20]		
-----	Thim/DTT	vitro /58/	42	[29]		

Ergebnisse nach 7 Tagen IVC

-----	Thim/DTT	vitro /58/	43	[77]		
-------	----------	---------------	----	------	--	--

Ergebnisse nach 6 Tagen in **vivo**-Kultur

Kernzahl oder [mittlere Kernzahl] entsprechend der Literaturangabe

In Tabelle 4.3.3.1.b wird deutlich, wie unterschiedlich die Ergebnisse der gleichen Methoden bei verschiedenen Autoren ausfallen.

Der Vergleich der Tabellen 4.3.3.1.a und b zeigt folgendes:

Die Aktivierung ausschließlich mit Elektropuls (DC-Puls +/-AC-Feld) erreicht in der Literatur eine M/BI-Rate zwischen 3% und 32%, obwohl nur in vitro-gereifte Oozyten verwendet und alle in vitro-kultiviert wurden. Die DC-Pulsstärke ist bei den Literaturdaten identisch, unterscheidet sich aber deutlich um 0,5kV/cm von der in dieser Arbeit ermittelten erforderlichen Fusionspulsstärke. Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, führte ein Puls von 1,2kV/cm sowohl bei parthenogenetischer Aktivierung wie auch bei Fusionsversuchen an Kerntransferkomplexen zu 100% Lyse. Es ist zwar davon auszugehen, daß eine geringfügige Erhöhung des DC-Pulses eine Steigerung der M/t-bl/BL-Rate parthenogenetischer Aktivierungsversuche bewirkt hätte, jedoch wäre die Lyserate - vor allem bei mikromanipulierten Komplexen - gestiegen, weshalb die fusionsrelevante Pulseinstellung verwendet wurde.

Der große Einfluß laborspezifischer Methoden und verwendeter Geräte wird damit deutlich. In den hier zur Parthenogenese durchgeführten Versuchen ergab eine reine Elektroaktivierung zu 55% M/t-bl/BL mit BI-Kernzahlen im Bereich von 10-64 und erreichte damit ein besseres Ergebnis aus in vivo- und in vitro-gewonnenem Material als die Angaben in der Literatur /54, 53, 48, 66/.

Das in dieser Arbeit auch für die Kerntransferversuche angewandte Verfahren der Kombination aus Puls + DMAP ergab nach 7 Tagen IVC je nach verwendeter Kammer unterschiedliche Werte für Morulae, teilblastulierte Stadien und Blastozysten. Mit Kammer 1 aktivierte Gruppen erreichten in Abhängigkeit von der Pulsstärke zwischen 22% und 51%.

Die Kammer 2 ließ die M/t-bl/BI-Rate mit der gleichen hohen DC-Pulsstärke auf 23% (in vitro-maturierte Eizellen, IVC, mittlere BI-Kernzahl:18) sinken und ergab aus in vivo-maturierten Oozyten 25% (IVC, mittlere BL-Kernzahl: 22) und nach in vivo-Kultur in vivo-gereifter Oozyten 50% M/t-bl/BI (mittlere BI-Kernzahl: 66). Offenbar war die Kammer 1 besser zur Aktivierung, aber schlechter zur Fusion geeignet.

In der Literatur ist diese Aktivierungsmethode nur einmal zu finden und erreicht nach zweifachem DC-Puls eine M/BI-Rate von 83% (in vivo-maturiert, in vitro-kultiviert) mit einer mittleren BI-Kernzahl von 28. Der DC-Puls ist sogar um 0,8kV/cm größer als der in dieser Arbeit verwendete, was den laborspezifischen Einfluß besonders verdeutlicht /60/.

Die M/t-bl/BI-Raten der Thimerosal/DTT Methode bewegen sich für in vitro-maturierte Oozyten in der Literatur zwischen 15% und 42% (mittlere Kernzahl: 29 oder keine Angaben /66, 54, 58/) und betragen für in vivo-gereifte Oozyten 60% (mittlere Kernzahl: 20 /66/) nach 7 Tagen IVC. In vitro-maturierte und in vivo-kultivierte Oozyten ergeben Raten von 43% (mittlere Kernzahl: 77 /58/).

In den durchgeführten Parthenogeneseversuchen mit in vivo- und in vitro-Material konnte eine M/t-bl/BI-Rate von 19% (BI-Kernzahl: 13-48) nach 7 Tagen IVC erreicht werden. 24h gealterte MeII-Oozyten ergaben eine höhere Rate (42%, BI-Kernzahl: 9-35).

Insgesamt entsprechen diese Daten den genannten Literaturwerten.

Ob und welche der parthenogenetischen Aktivierungsmethoden zur Erstellung von Kerntransferferkeln geeignet ist, wird von den verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet /9, 10, 11, 67/.

4.3.4 Vergleich von in vivo-/ in vitro-gereiften Oozyten

Die „Qualität“ des Oozytenmaterials war sehr unterschiedlich, wobei die Schwankungen innerhalb der verschiedenen Reifungsmethoden (vivo/ vitro) von vielen Faktoren abhingen.

Die Gruppe der in vitro-gereiften Oozyten bestand aus großen Pools am Schlachthof gesammelten Materials (ca. 150-600 Ovarien pro Termin). Diese Oozyten wurden, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, in großer Zahl in Reifungsmedium im Brutschrank gereift. Obwohl sich Einzeltiereffekte (kleinere, schwächere Tiere) hier eigentlich nicht bemerkbar machen sollten, war die Anzahl der zur Reifung eingesetzten Oozyten und die erzielte Reifungsrate versuchstags- und jahreszeitlich abhängig. Das im Labor durchgeführte „Handling“ war immer gleich, die Qualität der Reifung schwankte aber trotzdem. Da die Tiere in größeren Gruppen vom Mäster zum Schlachthof kamen, war es nicht auszuschließen, daß man bei den gesammelten Ovarien überwiegend Material der Tiere eines Mastbetriebes sammelte. Schweine reagieren sensibel auf ihre Umwelt, daher spielen Streß und Haltungsfaktoren eine wichtige Rolle. Es kann hier nur gemutmaßt werden, welche positiven und negativen Einflüsse (Licht, Futterzusammensetzung, Aufstallung, Länge des Transportweges zum Schlachthof, Alter und Gesundheitszustand der Tiere,.....) eine Rolle spielten.

In vivo-gereifte Oozyten waren trotz Ausschluß mäter- und transportabhängiger Faktoren auch nicht homogen. Die Tiere kamen aus einem Stall des Institutes und wurden gleich behandelt. Hier war aber der Einzeltiereffekt aufgrund geringer Tierzahlen (ca. 4 Tiere pro Termin) vergleichsweise groß. Im Sommer war die jahreszeitlich bedingte Reifung wie bei den in vitro-gereiften Oozyten schlechter als im Winter.

Morphologisch betrachtet unterschieden sich die Oozyten der beiden Reifungsgruppen darin, daß die Zona oft dünner schien, der Perivitellarraum der in vitro-maturierten Eizellen kleiner, der Polkörper ebenfalls kleiner war, flach von innen an der Zona klebte und bei der Mikromanipulation schlechter entnommen werden konnte.

Die Reifungsrate lag bei den in vivo-maturierten Oozyten mit 96% (890 von 923) deutlich höher als bei den TCM-gereiften Eizellen mit 72% (1900 von 2624). Eine Vergleichsgruppe von NCSU37-gereiften Oozyten ergab 19% Reifung (166 von 870). Diese letzte Gruppe wurde aufgrund der schlechten Effizienz und der Tatsache, daß ein Vorsortieren der MeII-Oozyten unter einem normalen Stereomikroskop wegen eines zu kleinen Perivitellarraumes unmöglich war, nicht weiter verwendet.

Da sich aufgrund der Unterschiede in der Morphologie und Reifung auch Unterschiede in der Entwicklungskapazität vermuten ließen, aber nicht ausreichend in vivo-gereiftes Material zur Verfügung stand, um ausschließlich dieses zu verwenden, wurden alle Untersuchungen der Kapitel 4.3 und 4.4 im Wechsel mit in vivo- und TCM-in vitro-maturierten Oozyten durchgeführt.

Bei parthenogenetischen Untersuchungen ließ sich dabei folgendes feststellen:

Tabelle 4.3.4.a: Reifungsart und Entwicklungsfähigkeit

Art der Reifung	n _{ges}	M/BI		Standard- abweichung
		n	Mittelwert [%]	
in vivo	347	206	59 ^a	15,0
in vitro	155	48	31 ^b	13,0

^{ab}: Werte in der selben Spalte mit verschiedenen Indices unterscheiden sich hochsignifikant, p<0,001

Die obige Tabelle zeigt deutlich, daß in vivo-gereifte Oozyten in der untersuchten in vitro-Kultur die bessere Entwicklungskapazität besaßen. Die Standardabweichung macht aber auch

die „Qualitätsschwankung“ innerhalb der beiden Gruppen offensichtlich, denn die Handhabung erfolgte stets nach dem Standardprotokoll, um den bestmöglichen Vergleich zu gewährleisten.

In der Literatur ist bezüglich der Oozytenqualität der folgende Vergleich zu finden:

Tabelle 4.3.4.b: Oozytenqualitätsvergleich in der Literatur /11/

KT ja/nein	Aktivierungs- methode	Reifungsart	Oozytenart	Bl %	Kernzahl Bl
ja	Ionomycin/ DMAP	in vitro	präpuberale Jungsau	4	keine Angaben
ja	Ionomycin/ DMAP	in vitro	geschlechtsreife Sau	7	16-125
nein	in vitro- Fertilisation	in vitro	präpuberale Jungsau	14	keine Angaben
nein	in vitro- Fertilisation	in vitro	geschlechtsreife Sau	19	34-124
nein	Ionomycin/ DMAP	in vitro	geschlechtsreife Sau	23	13-132

7 Tage IVC

nein	in vivo- Befruchtung	in vivo	geschlechtsreife Sau	keine Angaben	200-300
------	-------------------------	---------	-------------------------	------------------	---------

7 Tage in vivo-Kultur

KT = Kerntransfer

Die obige Tabelle zeigt die Unterschiede der Entwicklungskapazitäten von MeII-Oozyten, die verschieden maturiert waren bzw. aus Spendertieren zweier Reifegrade stammten. In vivo-maturierte und -fertilisierte Eizellen, die zu in vivo-kultivierten Embryonen wurden, besaßen die beste Entwicklungskapazität, wie die Kernzahl von 200-300 aufzeigt.

Da aus verschiedensten Gründen (unreife Oozyten sind in großen Mengen am Schlachthof verfügbar, Tiere müssen nicht extra für den Versuch hormonell stimuliert und geschlachtet werden \cong Kostenreduktion, ethisch weniger problematisch) die Verwendung von in vitro-maturierten Oozyten nach wie vor wünschenswert ist, werden Experimente mit diesem

Material fortgesetzt, auch wenn die bisherigen Ergebnisse weniger gut waren, als dies bei in vivo-Maturation der Fall war. Der Vergleich beim Einsatz präpuberaler Jungsauen mit geschlechtsreifen Zuchttieren zeigt deutlich den Einfluß der Geschlechtsreife auf die Möglichkeit und Effizienz der in vitro-Maturation.

Sowohl beim Kerntransfer wie auch beim IVF war die BI-Rate der Embryonen aus Oozyten geschlechtsreifer Tiere höher, und die Blastozysten erreichten Kernzahlen über 120 /11/.

Diese Unterschiede ergaben sich vermutlich durch den Grad der Zytoplasmareifung, der bei in vivo- und in vitro-maturierten Eizellen zu abweichendem Verhalten führte und nicht automatisch mit der Kernreifung (MeII) einherging (2.1.2.1, 4.6.1) /1, 36/.

Offenbar werden bestimmte zytosolische Faktoren erst im Laufe der Entwicklung des Tieres (über das Schlachalter von ca. 6 Monaten hinaus) gebildet. Diese Verbesserung der Entwicklungskompetenz der Oozyten mit der geschlechtlichen Reifung des Spendertieres (eine mögliche Kontrolle wäre eine bereits erfolgreiche Trächtigkeit des Spendertieres) gilt nicht nur für die in vitro-Reifung von Schlachthofoozyten, sondern auch für in vivo-maturierte Eizellen nach Superovulation. Die durchgeführten Versuche mit in vivo-maturierten Oozyten von präpuberalen Jungsauen zeigten auch hier große Unterschiede des geschlechtlichen Reifungszustandes der einzelnen Tiere. Obwohl diese zum selben Schlachtermin zumeist aus einem Wurf stammten (also das gleiche Alter hatten), war die Entwicklung des Genitaltraktes (Uterus, Ovarien und Eileiter), aber auch die Oozytenreifung und -qualität z.T. sehr unterschiedlich.

Möglicherweise würde ein direkter Vergleich von adultem in vitro-maturiertem und präpuberalem in vivo-gereiftem Oozytenmaterial überraschende Ergebnisse bringen und die Oozytenqualität der geschlechtsreifen Tiere als homogener, insgesamt von besserer Entwicklungskapazität ausweisen.

4.4 Kerntransfer, Fusionskammer 1 und verschiedene

Aktivierungsmethoden

Da zunächst nur die Bügelkammer der Firma Krüss für die Fusion zur Verfügung stand (Kammer I, siehe Kapitel 3.4.2), fanden die Voruntersuchungen (4.2.4, 4.2.5) und auch erste Untersuchungen zur Aktivierung fusionierter Kerntransferkomplexe mit diesem System statt. Die folgenden Tabellen stellen die ermittelten Ergebnisse unter Berücksichtigung

verschiedener Parameter dar. Die Auswertung erfolgte nach Hoechst33342-Färbung nach 48-stündiger *in vitro*-Kultur (IVC). Kriterien waren sowohl das Fusionsverhalten bei verschiedenen Fusionsmedien, die Kerndekondensation (-schwellung), die Kernteilung sowie der Anteil an frühembryonalen Stadien (2- und 4-Zeller) nach verschiedenen Aktivierungsmethoden.

Die Kerntransferversuche liefen parallel zu parthenogenetischen Kontrollen, die im Kapitel 4.3.2 aufgeführt und diskutiert wurden. Letztere sind hier nicht noch einmal dargestellt. Um eine Aussage über die Eignung der Aktivierungsmethoden bis zur Ausbildung von Blastozysten machen zu können, blieben die Kontrollen bis Tag 7 in Kultur.

4.4.1 Calciumeinfluß auf die Aktivierung von Kerntransferkomplexen

Zunächst wurde der Einfluß des Calciums auf die Aktivierung beim Fusionspuls ermittelt.

Tabelle 4.4.1: Calciumeinfluß auf die Aktivierung/ Zellteilung bei zusätzlicher Stimulierung mit Thimerosal/ DTT 18h nach Puls

Fusionsmedium: Mannitol	+Ca ²⁺ 0,05mM	-Ca ²⁺
n Komplexe	49	62
n Fusion (%)	16 (33) ^a	11 (18) ^b
n Kernschwellung (%)	14 (88)	11 (100)
n Aktivierung (%)*	10/14 (71)	6/10 (60)
n 2-Zeller (%)*	4/14 (29) ^a	0/10 (0) ^b
n 4-Zeller (%)*	2/14 (14)	0/10 (0)

Die Fibroblasten stammten aus Passage 3-10 und sind serumreduziert kultiviert worden.

Definitionen siehe 3.10.2 und, wie folgt:

^{a,b}: Werte einer Zeile mit versch. Indices unterscheiden sich schwach signifikant, $p < 0,05$ (siehe 3.9)

Das Vorhandensein von Ca²⁺-Ionen im Fusionsmedium hatte nur einen schwachen Einfluß auf die Fusionsrate; Kernschwellung und Kernteilung (Aktivierung) wurden nicht beeinflusst. Der Unterschied bei den 2-Zellern war nur schwach signifikant und bei den 4-Zellern war keine Signifikanz vorhanden, da hohe Standardabweichungen innerhalb der Ca-haltigen Gruppe eine statistisch signifikante Aussage verhinderten. Man kann aber sehen, daß in der Gruppe ohne Calcium keinerlei 2- und 4-Zellbildung stattfand, obwohl in beiden Gruppen der selbe Aktivierungsstimulus 18h nach Fusionspuls appliziert wurde.

4.4.2 Vergleich von Mannitol und Mannose als Fusionsmedium für Kerntransferkomplexe

Tabelle 4.4.2: Vergleich von Mannitol und Mannose; Fusion und Aktivierung bei zusätzlicher Stimulierung mit Thimerosal/ DTT 18h nach Puls

Fusionsmedium:	Mannitol	Mannose
n Komplexe	49	61
n Fusion (%)	16 (33)	17 (28)
n Kernschwellung (%)	14 (88)	17 (100)
n Aktivierung (%)*	10/14 (71)	12/16 (75)
n 2-Zeller (%)*	4/14 (29)	6/16 (38)
n 4-Zeller (%)*	2/14 (14)	2/16 (13)

Die Fibroblasten stammten aus Passage 6-10 und sind serumreduziert kultiviert worden.

Definitionen siehe 3.10.2.

Wie obige Tabelle zeigt, waren die mit den beiden unterschiedlichen Fusionsmedien (Mannitol/ Mannose) erzielten Ergebnisse sehr gut vergleichbar. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

In jedem durchgeführten Einzelversuch kam es zur 2- oder 4-Zellteilung. Die Mannitolgruppe ergab insgesamt 6 (43%) und die Mannosegruppe 8 (50%) 2- und 4-Zeller.

Eine bei den Parthenogeneseuntersuchungen (Kapitel 4.3.1.1) beobachtete bessere Morphologie der in Mannose gepulsten Oozyten zeigte sich hier ebenfalls. Daher wurde im weiteren Verlauf das Fusionsmedium mit Mannose (siehe Kapitel 4.3.1.1) verwendet.

4.4.3 Einfluß der Fibroblastenpassagen; Vergleich von Fib.-Pools mit Fibroblasten, die aus Einzelebryonen stammen

Tabelle 4.4.3: Einfluß verschiedener Fibroblastenpassagen bzw. die Auswirkung bei der Verwendung von Pools gegenüber Einzelebryonen auf die Aktivierung und Zellteilung bei zusätzlicher Stimulierung mit Thimerosal/ DTT 18h nach Puls

Fibroblastenart	Fib.-Pool P6	Fib.-Pool P3	Einzelebryo P3
n Komplexe	61	48	83
n Fusion (%)	17 (28) ^a	18 (38) ^b	34 (41) ^b
n Kernschwellung (%)	17 (100)	18 (100)	32 (94)
n Aktivierung (%)*	12/16 (75) ^a	17/18 (94) ^a	21/34 (62) ^b
n 2-Zeller (%)*	6/16 (38)	7/18 (39)	9/34 (26)
n 4-Zeller (%)*	2/16 (13)	1/18 (6)	5/34 (15)

Die Fibroblasten stammten aus Passage (P) 3 oder 6 und sind serumreduziert kultiviert worden.

Definitionen siehe 3.10.2. Statistik siehe 3.9

^{a,b}: Werte einer Zeile mit versch. Indices unterscheiden sich schwach signifikant, $p < 0,05$

Die Tabelle 4.4.3 zeigt einen schwachen Einfluß der Passagennummer (P) auf die Fusionsrate. Fibroblasten der P3 ließen sich hier besser fusionieren (38-41%) als die in P6 (28%). Dabei war kein Unterschied zwischen dem Pool (P3) und den Fibroblasten aus einem Einzelebryo (P3) festzustellen. Ein abweichendes Verhalten trat aber schwach signifikant bei der Kernteilung (Aktivierung) zwischen Einzelebryo (62%) und Pool (94%) auf. Die Pools (P6 und P3) zeigten auch eine höhere 2-Zellrate (38%, 39% gegenüber 26%). Insgesamt war aber kein deutlicher Unterschied zwischen den drei untersuchten Gruppen zu finden.

4.4.4 Vergleich verschiedener Aktivierungsmethoden nach Kerntransfer

Tabelle 4.4.4: Verschiedene Aktivierungsmethoden im Vergleich

Aktivierungsmethode	Fusionspuls	+ DMAP	+Thim/DTT $\Delta t = 18h$	+Thim/DTT $\Delta t = 4h$	+Thim/DTT $\Delta t = 4h$ + GSH
n Komplexe	63	64	61	59	62
n Fusion (%)	23 (37)	25 (39)	17 (28)	24 (41)	23 (37)
n Kernschwellung (%)	20 (87)	24 (96)	17 (100)	24 (100)	23 (100)
n Aktivierung (%)*	16/20 (80)	15/25 (60)	12/16 (75)	20/24 (83)	15/22 (68)
n 2-Zeller (%)*	7/20 (35)	11/25 (44)	6/16 (38)	5/24 (21)	4/22 (18)
n 4-Zeller (%)*	0	0	2/16 (13)	2/24 (8)	0

Die Fibroblasten stammten aus Passage (P) 6 und sind serumreduziert kultiviert worden.

Definitionen siehe 3.10.2.

Die Aktivierung wurde wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben durchgeführt. GSH war dem Kulturmedium zugegeben.

Die jeweils mit durchgeführten Aktivierungskontrollen führten zu den im Kapitel 4.3.2 dargestellten parthenogenetischen Ergebnissen.

Die Fusionsbedingungen waren in allen Versuchen gleich, und die Rate lag insgesamt bei 36% (112 von 309). Im Vergleich mit der in Mannitol erhaltenen Rate von 33% (121 von 368, Kapitel 4.2.4.3) gab es keinen Unterschied; es spiegelt sich das Ergebnis aus 4.4.2 wider.

Der Wert für die Kerndekondensation und -schwellung lag in allen Gruppen gleich hoch und war für den Kerntransferversuch nicht limitierend.

Die Aktivierung (Kernteilung) lag zwischen 60 und 83% und gab keiner der untersuchten Methoden statistisch gesichert den Vorzug. Wie bei den parthenogenetischen Untersuchungen zeigte sich, daß die Aktivierbarkeit bei porcinen Kerntransferkomplexen durch die dargestellten Verfahren leicht zu induzieren war. Die 2-Zellrate war in Tab. 4.4.4 mit 18-44% aufgrund größerer Schwankungen innerhalb der Gruppen nicht signifikant verschieden. Dies galt auch für die 4-Zellstadien, welche nur in den Gruppen mit Thimerosal/ DTT erreicht wurden (13% bei $\Delta t = 18h$ und 8% bei $\Delta t = 4h$). Eine GSH-Inkubation zur Reduktion der

Radikale im Kulturmedium verringerte die Ausbeute nicht signifikant. In Übereinstimmung mit den zur Parthenogenese erhaltenen Daten (Kapitel 4.3.2.4) hatte Glutathionsulfhydryl keinen positiven Effekt.

In den folgenden Versuchen wurde die DMAP-Inkubation im Anschluß an die Elektroaktivierung angewendet, da sie einerseits die Spindelorganisation des Kerns blockiert (Kapitel 2.2.5.4) und eine Kernteilung verzögert, wodurch das „Reprogramming“ möglicherweise erleichtert wird (Kapitel 2.2.4), und andererseits keine zusätzliche Stimulierung darstellt (keine Ca-freisetzende Wirkung hat), sondern das Verlassen der MeII erleichtert (Senkung von MPF und MAP; 2.2.5.4).

Wie die Versuche in den Kapiteln 4.2.4, 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3 gezeigt haben, war die Fusionseffizienz der Komplexe mit der untersuchten Fusionskammer 1 durch die Variation der Elektropulseinstellung und Fusionsmedien oder Passagennummer der Kerndonorzellen nur bedingt beeinflussbar und über einen oberen Grenzwert von 33% bzw. 41% (Einzlembryofibroblasten der Passage 3) nicht zu steigern.

Als limitierender Faktor auf die Fusionsrate ist eindeutig die Bügelkammer (Fusionskammer 1) anzusehen, da insgesamt nur 36% (4.5.1) der manipulierten Komplexe zum Kerntransfereinzeller fusioniert werden konnten.

Diese Kammer ist zwar für parthenogenetische Zwecke gut verwendbar, da die Oozyten leicht in den Elektrodenzwischenraum pipettiert werden können. Für die effiziente Fusion und darauf aufbauende weiterführende Versuche ist sie wegen des großen Elektrodenabstandes nicht geeignet, weil ein optimales Ausrichten der Komplexe, die mit der Kontaktfläche (Fibroblast/Ooplast) parallel zu den Elektroden liegen müssen, nur in geringem Umfang erreicht werden konnte.

Mit dem zum damaligen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden System war eine weitere Optimierung daher nicht erreichbar.

4.5 Kerntransfer, Fusionskammer 2 und verschiedene Aktivierungsmethoden

4.5.1 Fusionseffizienz der beiden Kammern 1 und 2 im Vergleich

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. P. Booth (Danmarks Jordbrugs Forskning Embryoteknologisk Center, Tjele) /57/ wurde eine 2. Fusionskammer entwickelt.

Der wesentliche Vorteil dieser Kammer lag in der Beweglichkeit der Elektroden. Die Komplexe konnten mit den Elektroden orientiert und in der gewünschten Position fixiert werden, wobei der Elektrodenabstand vom Zonadurchmesser vorgegeben wurde. Aufgrund des nun geringeren Elektrodenabstandes (Gleichung 3.4.1) mußte eine erneute Anpassung der Pulsbedingungen (von Kammer 1 auf 2) erfolgen und zusätzlich ein AC-Feld dem DC-Puls vorgeschaltet werden.

Die Aktivierung erfolgte durch Elektropuls und anschließender DMAP-Inkubation (4.3.2.2). Die IVC wurde nach 48h abgebrochen und durch Hoechst33342-Färbung der erreichte Entwicklungszustand festgestellt.

Tabelle 4.5.1.a: Anpassung der Pulsbedingungen für die Fusionskammer 2

Protokollnummer:	1	2	3	4
AC-Feld	10s 1,4V	-	5s 1,4V	-
DC-Puls	99µs 9V	99µs 9V	99µs 9V	99µs 10V
n Komplexe	75	60	12	12
n Fusion (%)	68 (91)	57 (95)	10 (83)	11 (92)
n Kernschwellung (%)	68 (100)	57 (100)	10 (100)	11 (100)
n Aktivierung (%) [*]	64 (94) ^a	39 (68) ^b	7 (70) ^c	8 (73)
n 2-Zeller (%) [*]	6 (9)	13 (23)	1 (10)	3 (27)
n 4-Zeller (%) [*]	9 (13)	-	-	-

Um eine bessere Aussage durch homogenere Zellqualität zu erreichen, wurden ausschließlich Fibroblastenpools der Passage 6 nach Serumreduktion und TCM199-gereifte in vitro-maturierte Oozyten eingesetzt. Definitionen siehe 3.10.2.

^{a b} : Werte einer Zeile unterscheiden sich schwach signifikant, $p < 0,05$ (3.9)

^{a c} : Werte einer Zeile unterscheiden sich signifikant, $p < 0,01$

Wie obige Tabelle zeigt, ist die Fusionsrate mit 92% (146 von 159) gegenüber der mit Kammer 1 (36%: 112 von 309) gravierend verbessert. Die Kernschwellung ist mit 100% optimal, die Aktivierung liegt zwischen 68 und 94%. Das Ergebnis des Versuches mit dem 10s-AC-Feld (94%) unterscheidet sich deutlich von denen mit kürzerem oder ohne Wechselstrom (70%, 68% und 73%) sowie dem Ergebnis aus Tab.4.4.4 (DMAP ohne AC-Feld 60%). Eine verbesserte Aktivierung lässt sich eindeutig auf das „lange“ AC-Feld zurückführen.

Obwohl die Aussagen zu den Versuchen bezüglich der 2- und 4-Zeller nicht signifikant verschieden sind, fällt auf, daß nur die Pulseinstellung mit „langem“ AC-Feld zu 4-Zellentwicklung (13%) führte, die keinen negativen Einfluß durch das Wechselstromfeld erkennen ließ. Die in 4.2.5 angestellte Vermutung, daß der schädigende Effekt des Wechselstromfeldes mit der Rotation der darin befindlichen Zellen zu tun hat, scheint dadurch bestätigt zu werden, denn in der Fusionskammer 2 sind die Komplexe fixiert. Dies ermöglicht einen engen Membrankontakt, wie in 2.2.3 beschrieben. Aus diesen Gründen wurde die Fusionseinstellung (10s 1,4V AC + 99µs 9-10V DC) für die weiteren Experimente eingesetzt.

Tabelle 4.5.1.b: Effizienzvergleich des Kerntransfers mit den beiden Kammern

Fusionskammer:	Kammer 1	Kammer 2
AC-Feld	-	0 - 10s; 0 – 1,4V
DC-Puls	≅ 0,70kV/cm (d=300µm; 21V)	≅ 0,62kV/cm (d=145µm; 9V)
n Komplexe	309	159
n Fusion (%)	112 (36)	146 (92)
n Kernschwellung (%)	108 (96)	146 (100)
n Aktivierung (%)*	78 (70)	118 (80)
n 2-Zeller (%)*	33 (29)	23 (16)
n 4-Zeller (%)*	4 (4)	9 (6)
Effizienz: 2+4-Zeller bezogen auf n Komplexe (%)	37 (12)	32 (20)

Definitionen siehe 3.10.2. (IVC für 48h)

Der Effizienzvergleich belegt den großen Vorteil der Kammer 2 bezogen auf die Fusion. Insgesamt waren 118 von 159 Komplexen = 74% aktiviert. Obwohl die Fusionsrate 92% betrug, die Kernschwellung zu 100% und die Aktivierung der fusionierten Komplexe zu 80% erfolgte, betrug der Anteil der 2- und 4-Zeller nur 20% der eingesetzten Komplexe. Der Aufwand die 32 2- und 4-Zeller aus insgesamt 159 erstellten Komplexen zu generieren, war jedoch nur halb so groß wie mit der Kammer 1, bei der 309 mikromanipulierte Komplexe zur Gewinnung von 37 2- und 4-Zellern erforderlich waren. Der limitierende Schritt der Embryonalentwicklung ist damit eindeutig die korrekte Zellteilung.

4.5.2 Zellteilung und Fragmentierung

Das vorherige Kapitel zeigt, daß verbesserte Fusionsbedingungen nicht automatisch die 2- und 4-Zellentwicklung begünstigen, daher wurde das Problem der nicht korrekt geteilten Zellen, der Fragmentierung genauer untersucht.

Tabelle 4.5.2.a: Zellteilung und Fragmentierung bei Kerntransferkomplexen

Protokollnummer:	1	2	3	4
AC-Feld	10s 1,4V	-	5s 1,4V	-
DC-Puls	99µs 9V	99µs 9V	99µs 9V	99µs 10V
n Fusion	68	57	10	11
n Aktivierung (%) ^a	64 (94) ^a	39 (68) ^b	7 (70) ^c	8 (73)
n Fragmentierung (%) [*]	55 (81)	42 (74)	9 (90)	7 (64)
n 2-Zeller (%) [*]	6 (9)	13 (23)	1 (10)	3 (27)
n 4-Zeller (%) [*]	9 (13)	(0)	(0)	(0)
n 2-Zeller + Fragmente (%) [*]	26 (38)	13 (23)	2 (20)	4 (36)
n 4-Zeller + Fragmente (%) [*]	(0)	4 (7)	(0)	(0)
n morulaartig fragmentiert (%) [*]	20 (29)	18 (32)	6 (60)	3 (27)

Definitionen siehe 3.10.2. (IVC für 48h).

^a^b : Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$. (3.9)

^a^c : Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$.

Im Vergleich mit den Kontrollgruppen (Tabelle 4.5.2.b) soll die Unterteilung der fragmentierten Zellen in 2-Zeller/4-Zeller mit Fragmenten und morulaartig fragmentierte Formen helfen, den Zeitpunkt und damit möglicherweise den Grund der Ausbildung kernloser Blastomeren zu bestimmen. Auf diese Weise kann ggf. Einfluß auf den Anteil der normalen Embryonalentwicklung genommen werden.

Da die Werte der Fragmentierung insgesamt sehr hoch lagen, zeigten die verschiedenen Stufen der Fragmentierung keine signifikanten Unterschiede. Die allgemeine Gruppe der „Fragmentierung“ zeigte, daß der Anteil der Zellen mit kernlosen Blastomeren beinahe so groß oder noch größer war als der Anteil der Aktivierung. Dabei war kein Zusammenhang mit

dem AC-Feld festzustellen. Der Prozentsatz der fragmentierten 2- und 4-Zeller war höher (Protokollnummer: 1, 3 und 4) oder genau so groß wie der Anteil der echten 2- und 4-Zeller ohne Fragmente (Protokollnummer: 2). Die morulaartige Fragmentierung (totale Fragmentierung) trat sehr schnell auf. Man fand sie bereits wenige Stunden nach Fusionspuls (3-5h später); im Verlauf der IVC nahm diese Zahl ebenfalls zu. Der Anteil lag zwischen 29 und 60%.

Aus obiger Tabelle 4.5.2.a ist deutlich ersichtlich, daß der hohe Anteil der Fragmentierung der Grund für die geringe Zahl der korrekt geteilten 2- und 4-Zeller trotz guter Aktivierungsrate war.

Viele Embryonen, die bei den 2- und 4-Zellern nicht aufgeführt wurden, wiesen zusätzlich zur normalen Teilung noch Zytoplasmaabschnürungen auf. Dies beeinträchtigt die weitere Entwicklung und führt später zur Degeneration /36/. Das Problem der Fragmentierung (unkoordinierte Plasmateilung) wird in der Literatur häufig diskutiert, und es wird vermutet, daß ein Grund die mangelhafte Zytoskelettorganisation, und vor allem bei in vitro-gereiften Oozyten, der geringe Anteil wichtiger zytosolischer Faktoren ist /37/.

Die folgende Tabelle soll Aufschluß über die Fragmentierung bei den Kontrollgruppen geben.

Tabelle 4.5.2.b: Zellteilung und Fragmentierung der Kontrollen

Gruppe:	Pulskontrolle	Medienkontrolle	0-Kontrolle
AC-Feld	10s 1,4V	-	-
DC-Puls	99µs 9V	-	-
n Oozyten	83	75	79
n Aktivierung (%)	80 (96) ^a	55 (73)	57 (72) ^b
n Fragmentierung (%)	14 (17) ^a	47 (63) ^c	50 (63) ^c
n 2-Zeller (%)	38 (46) ^a	3 (4) ^d	(0) ^c
n 4-Zeller (%)	14 (17) ^a	2 (3)	(0) ^b
n 2-Zeller + Fragmente (%)	5 (6)	2 (3)	4 (5)
n 4-Zeller + Fragmente (%)	(0)	(0)	(0)
n morulaartig fragmentiert (%)	6 (7) ^a	29 (39) ^d	46 (58) ^c

Definitionen siehe 3.10.1. (IVC für 48h).

Die Pulskontrolle durchläuft alle Inkubationsschritte entsprechend der Kerntransfergruppe.

Medienkontrolle: siehe Pulskontrolle, aber kein Elektropuls/ keine DMAP-Inkubation.

0-Kontrolle: Die Oozyten werden nur entkumuliert.

^{a b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{a c}: Werte einer Zeile sind hochsignifikant verschieden, $p < 0,001$

^{a d}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Die Tabelle 4.5.2.b zeigt keine wesentlichen Unterschiede bezüglich den Gruppen der 0-Kontrolle und der Medienkontrolle. Sie verhielten sich ganz ähnlich, und es kann davon ausgegangen werden, daß die verschiedenen Medien- und Substanzwechsel, die für den Kerntransfer und die Mikromanipulation notwendig waren, keine negativen Einflüsse hatten (3.3.3).

Zwischen der Pulskontrolle und den nicht gepulsten Kontrollen traten deutliche Unterschiede auf. Die Pulskontrolle hatte eine niedrigere Fragmentierungsrate (17% gegenüber 63%), der Anteil morulaartig fragmentierten Zellen war ebenfalls wesentlich niedriger (7% gegenüber 39% und 58%).

Entsprechend unterschieden sich die frühembryonalen Stadien. Die Pulskontrolle zeigte erheblich mehr 2-Zeller (46% gegenüber 4, bzw. 0%).

Die Fragmentierung der Kontrollen ist wie folgt zu bewerten:

Erfolgt kein eindeutiger Aktivierungsstimulus (Medien-, 0-Kontrolle), so beginnt durch degenerative Prozesse die Fragmentierung und die unkontrollierte Zellteilung (Abbau zytosolischer Faktoren, die MPF stabilisieren) (2.1.2.1; /37/).

Erhält die Oozyte einen geeigneten Aktivierungsstimulus (4.3), so beginnt die kontrollierte Zellteilung, die Embryonalentwicklung. Dabei fragmentiert ein geringer Anteil der Zellen, der möglicherweise weniger entwicklungs kompetent ist und Oozyten weniger guter Qualität repräsentiert. Dies ist eine gewisse „Grundfragmentierung“ und stellt die normale Qualitätsselektion dar.

Vergleicht man die Tabellen 4.5.2.a und b, so stellt man fest, daß die Fragmentierung der Kerntransferembryonen deutlich über der Qualitätsselektion der Pulskontrolle lag und eher den spontan fragmentierten Gruppen der Medien- und 0-Kontrolle zugeordnet werden kann.

Daher war es das Ziel der folgenden Untersuchungen, den Anteil der Fragmentierung zu senken.

4.5.3 Reduktion der Fragmentierung durch Co-Inkubation von Cytochalasin B und DMAP

Die Abschnürung kernloser Blastomeren konnte nicht durch die Fusionspulsbedingungen beeinflusst werden (4.5.2.a). Eine Inkubation mit DMAP sorgt nur für die Inhibierung der Kernteilung während der Inkubationsdauer (2.2.5.4), sie hat aber keinen Einfluß auf die Plasmateilung. Es wurde daher im folgenden versucht, gleichzeitig auch die Plasmateilung zu blockieren.

Die Pulskontrolle zeigt in 4.5.2.b nur wenig morulaartig fragmentierte Zellen. Da diese nach wenigen Stunden als erste Fragmentierungsform, z.T. noch während der DMAP-Inkubation auftrat, sollte die zusätzliche Inkubation von Cytochalasin B (CB) zumindest diesen Anteil reduzieren. Die Versuche wurden wie in 4.5.2.a (Protokoll 1) durchgeführt, allerdings nicht nur in DMAP, sondern gleichzeitig auch in DMAP +/- CB (7,5µg/ml) inkubiert.

Tabelle 4.5.3.a: Zellteilung und Fragmentierung von Kerntransferkomplexen bei Co-Inkubation von CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP - CB 3h	DMAP + CB 3h	DMAP + CB 5h
n Fusion	68	48	157
n Aktivierung (%) [*]	64 (94) ^a	41 (85)	127 (81) ^d
n Fragmentierung (%) [*]	55 (81) ^a	23 (48) ^b	47 (30) ^c
n 2-Zeller (%) [*]	6 (9) ^a	10 (21) ^b	47 (30) ^c
n 4-Zeller (%) [*]	9 (13)	7 (15)	35 (22)
n 2-Zeller + Fragmente (%) [*]	26 (38)	15 (31)	16 (10)
n 4-Zeller + Fragmente (%) [*]	(0)	(0)	3 (2)
n morulaartig fragmentiert (%) [*]	20 (29)	5 (10)	16 (10)

Definitionen siehe 3.10.2. (IVC für 48h).

^{a,b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{a,c}: Werte einer Zeile sind hochsignifikant verschieden, $p < 0,001$

^{a,d}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

In obiger Tabelle wird das Ergebnis der Co-Inkubation von Cytochalasin B und DMAP den Versuchen ohne CB gegenübergestellt.

Der CB-Einfluß ist deutlich zu sehen. Bei jeweils dreistündiger Inkubation hatte CB keine negative Auswirkung auf die Aktivierung. Es konnte die Fragmentierung um 33% (von 81 auf 48%) senken. Der Anteil an 2-Zellern nahm ebenfalls um 12% (von 9 auf 21%) zu. Der Anteil morulaartig fragmentierter Zellen verringerte sich um 1/3 und erreicht mit 10% etwa den Wert der Pulskontrolle (Tab. 4.5.2.b).

Eine Verlängerung der Co-Inkubationszeit von 3h auf 5h verdeutlichte den Einfluß des CB's noch einmal. Der Vergleich mit den Werten ohne CB (3h) ergibt einen niedrigeren Aktivierungsanteil von 81%. Die Fragmentierung war allerdings hochsignifikant zurückgedrängt und betrug nur noch 30%. Der 2-Zellanteil ließ sich ebenfalls hochsignifikant auf 30% und die 4-Zellrate von 13 auf 22% steigern.

Die Kombination von Cytochalasin B (Inhibierung der Zytoplasmateilung; 2.2.5.3) und DMAP (Inhibierung der Kernteilung; 2.2.5.4) erwies sich als sinnvoll und positiv. Es wirkte synchronisierend auf die Zellteilung und die Embryonalentwicklung.

Ein erneuter Effizienzvergleich sieht nun wie folgt aus:

Tabelle 4.5.3.b: Effizienzvergleich beim Kerntransfer mit und ohne CB-Co-Inkubation

Inkubationsart:	DMAP - CB 3h	DMAP + CB 3h	DMAP + CB 5h
n Komplexe	159	59	190
n Fusion (%)	146 (92)	48 (82)	157 (83)
Effizienz: 2+4- Zeller bezogen auf n Komplexe (%)	32 (20)	17 (29)	82 (43)

Definitionen siehe 3.10.2. (IVC für 48h)

AC-Feld: 0 - 10s; 0 – 1,4V

DC-Puls: $\cong 0,62\text{kV/cm}$ ($d=145\mu\text{m}$; 9V)

Obwohl sich am Fusionsprozeß nichts geändert hat und das „Handling“ immer gleich war, sind die Fusionsraten schwankend (92%; 82%; 83%). Die Steigerung der 2- und 4-Zellraten ist aber ganz deutlich zu sehen. Vergleicht man die Tabellen 4.5.1.b und 4.5.3.b, wird die Optimierung der Versuchsbedingungen deutlich. Der Anteil an 2- und 4-Zellern konnte von anfangs 12% (Kammer 1) auf nunmehr 43% (DMAP+CB; 5h) ver-3,5-facht werden.

Im weiteren Verlauf sollten Versuche über 7 Tage IVC Aufschluß über die Entwicklungskompetenz geben.

4.5.3.1 Beeinflussung der Fragmentierung von Kerntransferembryonen bei IVC über 7 Tage

Die Versuche wurden wie in 4.5.3 durchgeführt und erst nach 7 Tagen IVC durch Hoechst33342-Färbung ausgewertet. Um die Gruppen möglichst homogen zu halten, fanden wieder nur in vitro-TCM-gereifte Oozyten und Fibroblasten aus einem Pool der P6 Verwendung.

Tabelle 4.5.3.1.a: Entwicklungskompetenz nach Kerntransfer bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB	DMAP + CB	DMAP - CB
	3h	5h	5h
n Komplexe	124	154	125
n Fusion (%)	108 (87)	106 (69)	108 (86)
n Aktivierung (%)*	76 (70)	78 (74)	70 (65)
n M (%)* [KZ]	2 (2) [5]	0	0
n t-bl (%)* [KZ]	0	1 (1) [8]	1 (1) [5]
n Bl (%)* [KZ]	0	1 (1) [4]	0
n M/t-bl/Bl (%)	2 (2)	2 (2)	1 (1)

Definitionen siehe 3.10.2.

Die Fusionsraten lagen insgesamt bei 80% (322 von 403 Komplexen) und damit unter den in 4.5.1. erreichten Werten. Am Fusionsprotokoll wurde aber nichts geändert. Die Inkubation von Cytochalasin B und auch die verlängerte Inkubationszeit von 3 auf 5h veränderte die Aktivierung (Kernteilung) in den untersuchten Gruppen nicht signifikant. Interessanterweise war die Gruppe ohne CB die mit der niedrigsten Aktivierungsrate; CB wirkt also nicht hemmend auf die Kernteilung.

Der Wert der Kerndekondensation wurde in die Tabelle nicht mit aufgenommen, da er mit 99-100% keine Unterschiede zeigt.

Nach 7 Tagen Kultur sollte bei normaler Entwicklung das Teilungsstadium der Morula oder Blastozyste erreicht werden. Es gab hier keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, da die M/t-bl/Bl-Rate bei ein - 2% lag. Dieser Wert war sehr niedrig, und die

mittlere Kernzahl zeigt, daß es große Defizite in der Embryonalentwicklung gab. Ein Vergleich mit der Literatur hilft, diese Werte einzuordnen. Die Blastozystenraten liegen dort bei 3% (in vivo-Maturation, IVC /70/), 1% (TCM-maturierte Oozyten, IVC /71/) und 2,6% (in vitro-Maturation, IVC /72/), die mittleren Kernzahlen bei 26 /70/ und 16 /71/ (keine Angaben bei /72/).

Tabelle 4.5.3.1.b: Fragmentierung nach Kerntransfer bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB 3h	DMAP + CB 5h	DMAP - CB 5h
n Fusion	108	106	108
n Fragmentierung (%)*	37 (34) ^a	34 (32) ^a	72 (67) ^d
n 2-Zeller + Fragmente (%)*	11 (10) ^a	10 (9) ^a	22 (20) ^b
n 4-Zeller + Fragmente (%)*	0	0	2 (2)
n morulaartig fragmentiert (%)*	17 (16)	12 (11) ^a	16 (15) ^b

Definitionen siehe 3.10.2.

^{a,b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{a,d}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Cytochalasin B hatte einen signifikanten Einfluß auf die Fragmentierung der Zellen. Der Anteil der Fragmentierung verringerte sich von 67% auf \cong 33%. Dabei spielte eine Inkubationsdauer von 3 oder 5h keine Rolle.

CB senkte den Anteil an 2-Zellern mit Fragmenten um die Hälfte (von 20% auf 10%), wobei die Inkubationszeit keinen Einfluß hatte. Der Anteil fragmentierter 4-Zeller war mit 0-2% sehr gering und in den untersuchten Gruppen vergleichbar. Ein direkter Vergleich von CB-Zusatz bei 5h Inkubationsdauer zeigte eine schwach signifikante Reduktion der morulaartig fragmentierten Zellen.

Tabelle 4.5.3.1.c: Sonstige Teilungsstadien nach Kerntransfer bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB 3h	DMAP + CB 5h	DMAP - CB 5h
n 2-Zeller (%) [*]	25 (23)	32 (30)	13 (12)
n 4-Zeller (%) [*]	10 (9)	12 (11) ^a	1 (1) ^b
n 6-Zeller (%) [*]	1 (1)	3 (3)	1 (1)
n 8-Zeller (%) [*]	1 (1)	1 (1)	0
n 2-/4-/>4-Zeller (%) [*]	39 (36)	50 (47) ^a	16 (15) ^d

Definitionen siehe 3.10.2. Es sind hier nur echte Teilungsstadien aufgeführt.

^{a,b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{a,d}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Die Tabelle 4.5.3.1.c soll Aufschluß über die retardierten und in der Entwicklung stehen gebliebenen Teilungsstadien geben.

Der Anteil der im 2-Zellstadium arretierten Embryonen betrug 23% (+CB, 3h), 30% (+CB, 5h) und 12% (-CB, 5h).

In den CB-Gruppen entwickelten sich 9% (3h) und 11% (5h) nur bis zum 4-Zellstadium, in der Gruppe ohne CB nur 1% (5h).

Unterschiede bei 6- und 8-Zellern waren nicht vorhanden, ihr Auftreten war mit 0-3% gering. Die Frage, ob CB doch einen entwicklungshemmenden Einfluß hat, wurde aber dadurch widerlegt, daß der Anteil aller korrekt geteilten Embryonen ohne Fragmente (n 2-/4-/>4-Zeller) in der „5h+CB-Gruppe“ signifikant dreimal so hoch war wie der mit gleicher Inkubationszeit ohne CB (47% gegenüber 15%). Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Ergebnissen der Tab. 4.5.3.1.a und b.

Bisher ist eindeutig festzustellen, daß Cytochalasin B die Fragmentierung reduzierte und die koordinierte Zellteilung förderte. Die Verlängerung der Inkubationszeit von 3 auf 5h zeigte bei kurzer IVC von 48h noch einmal eine Verbesserung der Resultate, die nach 7 Tagen Kultur aber keine Zunahme der M/t-bl/Bl-Rate erkennen ließ.

4.5.3.2 Kontrollgruppen zum Kerntransfer; Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Um eindeutig zwischen den suboptimalen Bedingungen der IVC, den Einflüssen der Reprogrammierung nach Kerntransfer und den Auswirkungen von CB unterscheiden zu können, wurden die folgenden Kontrollen parallel durchgeführt:

Tabelle 4.5.3.2.a: Entwicklungskompetenz der Pulskontrolle bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB 3h	DMAP - CB 3h	DMAP + CB 5h	DMAP - CB 5h
n MeII-Oozyten	175	64	157	186
n Aktivierung (%)	174 (99)	64 (100)	153 (97)	186 (100)
n M (%) [KZ]	9 (5) [8]	3 (5) [11]	7 (4) [10]	6 (3) [8]
n t-bl (%) [KZ]	17 (10) [7]	6 (9) [11]	11 (7) [6]	13 (7) [7]
n Bl (%) [KZ]	15 (9) [15]	6 (9) [18]	13 (8) [13]	7 (4) [14]
n M/t-bl/Bl (%)	41 (23)	15 (23)	31 (20)	25 (13)

Definitionen siehe 3.10.1.

0-Kontrollen ergaben, wie in 4.3 an Tag 7 der IVC 100% degenerierte Zellen.

Die Aktivierung war in allen 4 Gruppen unabhängig vom Cytochalasin oder der unterschiedlichen Inkubationszeit (3 oder 5h) mit 97-100% sehr hoch. Der Anteil, der Morulae (3-5%), der teilblastulierten Embryonen (7-10%) und der Blastozysten (4-9%) war jeweils vergleichbar. Auch bei der M/t-bl/Bl-Rate gab es keine Unterschiede, daher hatte Cytochalasin B oder eine verlängerte Inkubation in DMAP keine negativen Einflüsse auf die Entwicklungskompetenz von Parthenogenesekontrollen.

Die Unterschiede zwischen den Kerntransfergruppen (Tab. 4.5.3.1.a) und den entsprechenden obigen Kontrollen sind offensichtlich. Auch anhand der erreichten Zellkernzahlen wird dies noch einmal deutlich.

Tabelle 4.5.3.2.b: Fragmentierung der Pulskontrolle bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB	DMAP - CB	DMAP + CB	DMAP - CB
	3h	3h	5h	5h
n MeII-Oozyten	175	64	157	186
n Fragmentierung (%)	30 (17) ^a	28 (44) ^b	18 (11) ^c	46 (25) ^d
n 2-Zeller + Fragmente (%)	6 (3) ^e	10 (16) ^f	11 (7)	7 (4) ^e
n 4-Zeller + Fragmente (%)	10 (6)	3 (5)	3 (2)	9 (5)
n morulaartig fragmentiert (%)	6 (3) ^g	11 (17) ^h	4 (3) ^g	18 (10)

Definitionen siehe 3.10.1.

^{a b} und ^{c d}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{e f}: Werte einer Zeile sind hochsignifikant verschieden, $p < 0,001$

^{g h}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Die Tabelle 4.5.3.2.b zeigt, ob CB auch einen Einfluß auf die Fragmentierung der Kontrollen hatte. Man erkennt hier, daß sowohl in den „3h-Gruppen“ wie auch in den „5h-Gruppen“ das CB eine Verringerung der kernlosen Blastomeren bewirkte. Bei den fragmentierten 2-Zellern war der Unterschied zwischen der „3h+CB-Gruppe“ und der entsprechenden Gruppe ohne CB sogar hochsignifikant. Der Anteil der fragmentierten 4-Zeller lag zwischen 2-6%. Die morulaartig fragmentierten Zellen mit CB-Inkubation unterschieden sich deutlich von der „5h-Gruppe“ ohne CB.

Zwischen dem 3- und 5-stündigen CB-Zusatz gab es nach 7 Tagen IVC keine wesentlichen Unterschiede.

Im Vergleich der Kerntransfergruppen (Tab. 4.5.3.1.b) und den zugehörigen Kontrollen war festzustellen, daß die Kerntransferembryonen schwach bis hochsignifikant (3h+CB; 5h+CB und 5h-CB) stärker fragmentierten. Bei dem Vergleich zeigte sich auch, daß die Fragmentierung der 2-Zeller in der Kerntransfergruppe „5h-CB“ mit 20% hochsignifikant größer war als in der zugehörigen Kontrolle (5h-CB) mit 4%. Bei den Kerntransfergruppen mit CB (3 und 5h) gab es hier keine deutlichen Unterschiede zu den entsprechenden

Kontrollen (10% zu 3% und 9% zu 7%). Bei den morulaartig fragmentierten Zellen war der Anteil der Kerntransferembryonen (5h+CB) mit 11% höher als der Anteil der zugehörigen Kontrollgruppe (5h+CB) mit 3%, sie war aber gleich groß mit dem Anteil der Kontrollgruppe (5h-CB) mit 10%.

Tabelle 4.5.3.2.c: Sonstige Teilungsstadien der Pulskontrolle bei Co-Inkubation von +/- CB / DMAP

Inkubationsart	DMAP + CB 3h	DMAP - CB 3h	DMAP + CB 5h	DMAP - CB 5h
n 2-Zeller (%)	43 (25)	7 (11)	51 (32)	48 (26)
n 4-Zeller (%)	20 (11) ^d	9 (14) ^a	4 (3) ^b	23 (12) ^a
n 6-Zeller (%)	2 (1)	0	1 (1)	2 (1)
n 8-Zeller (%)	1 (0,6)	0	1 (1)	0
n 2-/4-/>4-Zeller (%)	108 (62)	31 (48)	88 (56)	99 (53)

Definitionen siehe 3.10.1. Es sind hier nur echte Teilungsstadien aufgeführt.

^{a,b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{b,d}: Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Der 2-Zellanteil war in keiner der Gruppen deutlich verschieden. Er reichte von 11-32% und zeigte damit, daß der bei den Kerntransferkomplexen in Tab. 4.5.3.1.c ermittelte arretierte 2-Zellanteil von 12-30% nicht durch den Kerntransfer oder das CB bewirkt wurde. Der retardierte 4-Zellanteil in der obigen Tabelle war bei 5h+CB signifikant niedriger als nach 3h in CB und ebenfalls geringer als in den beiden Gruppen ohne CB.

Die Unterschiede zu den entsprechenden Kerntransferkomplexen waren in den Gruppen 5h+/-CB jeweils schwach signifikant (Kerntr. / Kontr.: +CB 11% zu 3% und ohne CB: 1% zu 12%).

Der 6- und 8-Zellanteil war auch bei den Kontrollgruppen sehr niedrig. Insgesamt gab es innerhalb der Kontrollgruppen keinerlei deutliche Unterschiede bezüglich der 2-/4-/>4-Zellrate. Sie lag zwischen 48% und 62%. Bei den Kerntransferkomplexen lag sie bei 15-47% (Tab.4.5.3.1.c). Im Vergleich (Kerntr. / Kontr.) zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 15% auf 53% (5h-CB) und jeweils ein schwach signifikanter Anstieg bei 3h+CB (36% zu 62%) und 5h+CB (47% zu 56%). Die Co-Inkubation über 5h (Kerntr.: 47% 2-/4-/>4-Zeller) unterschied sich dabei nicht einmal mehr schwach signifikant von den Kontrollen ohne CB (3 und 5h: 48% und 53%).

Die durchgeführten Versuche zeigten eindeutig, daß Cytochalasin B in Kombination mit DMAP keine negative, sondern synchronisierende Wirkung hatte, die die Bildung kernloser Blastomeren bei in vitro-gereiften Oozyten unterdrückte. Die Zugabe von CB vermochte die Fragmentierungsraten inkubierter Kerntransferkomplexe auf den „normal auftretenden“ Anteil (Qualitätsselektion) der auch bei nicht inkubierten parthenogenetischen Kontrollen vorhanden war, zu senken.

Der Vergleich der Tabellen 4.5.3.2.b und c zeigt, wie CB den Anteil fragmentierter Parthenogenesen reduzierte und durch Synchronisation als „Starthilfe“ für die Embryonalentwicklung anzusehen war. Inwieweit diese bis zur M/BL fortgesetzt wurde oder vorzeitig arretierte, war aber von der Zellqualität abhängig, daher veränderte CB die M/t-bl/Bl-Rate der Kontrollen nicht (Tab. 4.5.3.2.a).

Bei der folgenden Erläuterung muß berücksichtigt werden, daß der Prozentsatz der Aktivierung bei den Kontrollen um 100% (Tab. 4.5.3.2.a) und der der Kerntransferembryonen nur bei ca. 70% (Tab. 4.5.3.1.a) lag, d.h., daß viel mehr Kerntransfereinzeller (30%) mit einem Kern als parthenogenetische MeII-Stadien arretierten.

Darauf basierend wirkte sich der 4-Zellblock (2.1.2.2) bei den Kerntransferkomplexen (7%) ähnlich aus wie bei den Parthenogenesen (10%).

Kerntransferembryonen blieben zu 29% (93 von 322) im 2- und 4-Zellstadium stehen und parthenogenetische Embryonen zu 35% (205 von 582).

Ein großer Anteil der Zellen arretierte also schon auf der 2-Zellstufe mit 22% (70 beim Kerntransfer) und 26% (149 bei Parthenogenesen).

Bei den Kerntransferembryonen entstanden nur wenige (2-6%) höhere über den 4-Zeller hinausgehende Entwicklungsstadien (6-, 8-Zeller, M/t-bl/Bl).

Bei den Parthenogenesen fand man zwar auch nur wenige 6- und 8-Zeller (0-2%), dafür erreichten die Embryonen, die den 4-Zellblock überschritten hatten, aber leichter M/t-bl/Bl-Stadien (13-23%).

4.5.3.3 Parthenogenesevergleich: Zwischeninkubation in PBS10%NBCS oder TCMair

In den hier beschriebenen Versuchen sind 2 Gruppen von MeII-Oozyten auf unterschiedliche Weise nach dem Entkumulieren für ca. 2h zwischeninkubiert worden:

1. TCMair-Gruppe Zwischeninkubation der Pulskontrolle in TCMair
2. PBS10%NBCS-Gruppe Zwischeninkubation der Pulskontrolle in PBS10%NBCS

Anschließend erfolgte die Aktivierung durch Elektropuls und Inkubation in DMAP (siehe Kapitel 4.3.2.2 ; Fusionspuleinstellung der Kammer 2: AC-Feld=1,4V; DC-Puls=9V) mit einer weiteren Aufteilung der oben genannten Gruppen durch Co-Inkubation +/- CB.

Nach Hoechst33342-Färbung an Tag 7 wurden folgende Resultate ermittelt:

Tabelle 4.5.3.3: Entwicklungskompetenz der Pulskontrolle bei Co-Inkubation von DMAP +/- CB

Zwischeninkubation	TCMair		PBS10%NBCS	
	DMAP + CB	DMAP - CB	DMAP + CB	DMAP - CB
Inkubationsart	5h	5h	5h	5h
n MeII-Oozyten	70	88	157	186
n Aktivierung (%)	70 (100)	88 (100)	153 (97)	186 (100)
n Fragmentierung (%)	20 (29)	24 (27) ^b	18 (11) ^a	46 (25) ^b
n 2-Zeller (%)	22 (31)	19 (22)	51 (32)	48 (26)
n 4-Zeller (%)	7 (10)	14 (16) ^c	4 (3) ^a	23 (12) ^b
n M (%) [KZ]	0	6 (7) [7]	7 (4) [10]	6 (3) [8]
n t-bl (%) [KZ]	0	3 (3) [12]	11 (7) [6]	13 (7) [7]
n Bl (%) [KZ]	0	1 (1) [12]	13 (8) [13]	7 (4) [14]
n M/t-bl/Bl (%)	0 ^a	10 (11)	31 (20) ^b	25 (13)

Definitionen siehe 3.10.1.

0-Kontrollen ergaben, wie in 4.3 an Tag 7 der IVC 100% degenerierte Zellen.

^{a,b} : Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$ (3.9)

^{a,c} : Werte einer Zeile sind signifikant verschieden, $p < 0,01$

Die obige Tabelle zeigt, daß es keine Unterschiede in der Aktivierung (Verlassen der MetaphaseII) zwischen den TCMair- und den PBS-Gruppen gab.

Bei den Parametern Fragmentierung, 4-Zeller und M/t-bl/Bl-Rate traten statistisch gesicherte Unterschiede von 16%, 13% und 20% auf. Der CB-Einfluß wirkte sich in der TCMair – Gruppe nicht positiv aus. Eine Fragmentbildung war nur wenig vermindert und eine Weiterentwicklung bis zum M/t-bl/Bl-Stadium in der TCMair+CB-Gruppe erfolgte nicht.

Diese höchsten in der IVC erreichbaren Stadien waren in der TCMair-CB-Gruppe zu 11% erreicht worden und lagen damit nur 2% niedriger als in der direkt vergleichbaren PBS-CB-Gruppe. Auch die jeweils erreichten mittleren Kernzahlen der beiden letztgenannten Gruppen waren gut vergleichbar.

Der Versuch, die Oozyten zwischenzeitlich in einem für die IVC (bovines System) konzipierten und für das Handling ohne CO₂-Begasung angepassten Medium (TCMair, siehe Anhang) zu lagern, um möglicherweise vorhandene Nachteile der sonst verwendeten PBS10%NBCS-Lösung zu umgehen, ergab für das porcine System keine Vorteile. Die Morphologie der inkubierten Zellen war sehr gut, das Ergebnis der erreichten parthenogenetischen Entwicklungsstadien, vor allem verglichen mit der PBS/+CB-Gruppe, aber weniger gut. Da ein zu häufiger zusätzlich zu den notwendigen Mikromanipulationsschritten notwendiger Mediumwechsel vermieden werden sollte, blieb es daher in den folgenden Experimenten bei der Basislösung PBS.

Um die Entwicklungskompetenz von Kerntransferembryonen genauer zu untersuchen und den Einfluß der IVM / IVC zu klären, wurden Untersuchungen mit in vivo-gereiften und später auch in vivo-kultivierten Eizellen durchgeführt.

4.6 Kerntransfer, Fusionskammer 2 und in vivo gereifte Oozyten

Zur Gewährleistung einer guten Oozytenqualität wurden hier ausschließlich in vivo-maturierte Eizellen verwendet. Die Fibroblasten stammten aus getrennt verarbeiteten porcinen Embryonen (Einzelembryofibroblasten).

4.6.1 Adaption der Fusionspulsbedingungen an in vivo-maturierte Oozyten

Eine Anpassung der Pulsbedingungen an die in vivo-gereiften Oozyten war notwendig, da diese Eizellen aufgrund der veränderten Reifungsbedingungen ein verändertes Fusionsverhalten zeigten. Nach der Fusion der Kerntransferkomplexe erfolgte eine IVC mit morphologischer Beurteilung nach 48h. Die Hoechst33342-Färbung ergab den Kernstatus der untersuchten Zellen.

Tabelle 4.6.1.a: Anpassung der Pulsbedingungen und Einfluß der Co-Inkubation mit CB

Protokollnummer:	1	2	3	4
Inkubation nach Fusionspuls	3h DMAP	3h DMAP	3h DMAP	3h DMAP +CB
DC-Puls	99µs 9V	99µs 10V	99µs 11V	99µs 11V
n Komplexe	32	20	54	26
n Fusion (%)	14 (44)	10 (50)	36 (67)	17 (65)
n Kernschwellung (%)	11 (79)	10 (100)	36 (100)	13 (76)

AC-Feld: 10s 1,4V; Definitionen siehe 3.10.2.

Es wurden Fibroblasten der Passage 6 nach Serumreduktion und in vivo-maturierte Oozyten eingesetzt.

Obige Tabelle zeigt, daß die DC-Spannung bei in vivo-maturierten Oozyten 1-2V höher gewählt werden mußte als bei in vitro-gereiften Eizellen (9-10V). Die Fusionsrate war mit 65-67% gegenüber den „in vitro“-Oozyten (Tab. 4.5.3.b: 82-92%) geringer. Im weiteren Verlauf der Versuche konnten die Fusionsergebnisse nur morphologisch (ohne spätere Kernfärbung) ermittelt werden, da die Fusionskomplexe auf Empfängertiere übertragen wurden. Die morphologische Beurteilung ergab schwankende Fusionsraten von 23-89% mit einer mittleren

Rate von 53%. Diese verdeutlicht, daß zwischen den verschiedenen gereiften Eizellen (in vivo/in vitro) unter anderem ein Zytoplasmaunterschied bestand, der für das unterschiedliche Verhalten verantwortlich war (mittlere Fusionsrate der in vitro-maturierten Oozytenkomplexe = 80%, Tab. 4.5.3.1.a). Das Plasma der in vivo-gereiften Oozyten war zähflüssiger, wodurch sich die in die Membran gerissenen Poren nach Pulsapplikation schließen konnten, bevor sich Zytoplasmabrücken zwischen den Fusionspartnern ausbildeten (2.2.3). Auch bei der Mikromanipulation entstand der Eindruck, daß das Plasma der in vivo-maturierten MeII-Oozyten meist fester und zähflüssiger zu sein schien, was vermutlich auf einen höheren Vernetzungsgrad des Zytoskeletts zurückzuführen war. Unreife Oozyten (durch Kernfärbung nachgewiesen) zeigten sich trotz CB-Inkubation vor dem „Anstechen“ der Zytoplasmamembran stets ausgesprochen fluid und lysierten sofort. Der Vernetzungsgrad steht damit in direktem Zusammenhang mit einer „gut“ gereiften Eizelle (siehe auch 2.1.2.1 /36/).

4.6.2 Zellteilung, Fragmentierung und der Einfluß von CB

Tabelle 4.6.2.a: Zellteilung, Fragmentierung und der Einfluß von CB auf Kerntransferembryonen

Protokollnummer:	1	2	3	4
Inkubation nach Fusionspuls	3h DMAP	3h DMAP	3h DMAP	3h DMAP +CB
DC-Puls	99µs 9V	99µs 10V	99µs 11V	99µs 11V
n Fusion	14	10	36	17
n Aktivierung (%)*	6 (43)	7 (70)	21 (58)	11 (65)
n Fragmentierung (%)*	5 (34)	4 (40)	17 (47)	5 (29)
n 2-Zeller (%)*	5 (34)	3 (30)	10 (28)	4 (24)
n 4-Zeller (%)*	-	2 (20)	2 (6)	4 (24)
n 2-Zeller + Fragmente (%)*	-	-	3 (8)	-
n 4-Zeller + Fragmente (%)*	-	-	-	-
n morulaartig fragmentiert (%)*	-	2 (20)	4 (11)	-

AC-Feld: 10s 1,4V; Definitionen siehe 3.10.2. (IVC für 48h)

Die obige Tabelle zeigt, daß die Werte der in CB inkubierten Gruppe sich nicht deutlich von denen der Vergleichsgruppen unterscheiden. Die Fragmentierung war zwar in der CB-Gruppe am geringsten, der Unterschied zur Gruppe mit der Protokoll-Nr.:1 betrug aber nur 5%. 2- und 4-Zeller mit Fragmenten traten in der CB-Gruppe nicht auf, in den Vergleichsgruppen war diese Fragmentierungsform aber ebenfalls selten. Vergleicht man diese Tabelle mit der Tabelle 4.5.3.a (in vitro-gereifte Oozyten), so ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil der Fragmentierung bei den in vivo-maturierten Oozyten mit 43% (26 von 60; Protokoll-Nr.:1-3) halb so groß war wie der der in vitro-gereiften Eizellen mit 81% (55 von 68).

Ein Vergleich mit den Kontrollgruppen in der folgenden Tabelle 4.6.2.b soll den Einfluß der Reifungsart auf die Fragmentierung weiter untermauern.

Tabelle 4.6.2.b: Zellteilung und Fragmentierung der Kontrollen

Gruppe:	Pulskontrolle	Pulsk. + CB 3h	Medienkontrolle	0-Kontrolle
AC-Feld	10s 1,4V	10s 1,4V	-	-
DC-Puls	99µs 11V	99µs 11V	-	-
n Oozyten	34	9	10	9
n Aktivierung (%)	34 (100)	9 (100)	10 (100)	1 (11)
n Fragmentierung (%)	7 (21)	3 (33)	0	1 (11)
n 2-Zeller (%)	11 (32)	0	0	0
n 4-Zeller (%)	15 (44)	6 (67)	0	0
n 2-Zeller + Fragmente (%)	2 (6)	2 (22)	0	0
n 4-Zeller + Fragmente (%)	0	1 (11)	0	0
n morulaartig fragmentiert (%)	0	0	0	1 (11)

Definitionen siehe 3.10.1. (IVC für 48h).

Die Fragmentierung der Pulskontrollen ohne CB-Inkubation war mit 21% halb so groß wie der entsprechende Wert der zugehörigen Kerntransfergruppe (Tab.4.6.2.a: 47%). Die Fragmentierung der Pulskontrolle mit CB (33%) war etwa so groß wie der Anteil der

Kerntransfergruppe mit CB (29%). Der 2- + 4-Zellanteil der Pulskontrollen war mit 76% (ohne CB) und 67% (mit CB) höher als der 2- + 4-Zellanteil der zugehörigen Kerntransfergruppen (33% ohne CB und 47% mit CB).

Es fällt auf, daß der Anteil der fragmentierten Medien- und 0-Kontrolle mit 0% und 11% sehr gering war und sich deutlich von den Pulskontrollen, aber auch deutlich von den in vitro-gereiften Oozyten (Tab. 4.5.2.b: 63% und 63%) unterschied. Bei genauerer Analyse war es gerade die morulaartige Fragmentierungsform, die bei den in vivo-gereiften Oozyten kaum vorkam. Dies war die frühe Form der Fragmentierung, die auf der Degeneration der Zelle beruhte (4.5.2) und somit die bessere Reifungs- und Zellqualität der in vivo-gereiften Eizellen dokumentierte.

Diese entwicklungs kompetenteren Oozyten verwischten daher den Einfluß von Cytochalasin B im Vergleich zu dem großen Effekt bei den in vitro-gereiften Oozyten.

Die Co-Inkubation zeigte nach 48h IVC keine deutliche Verbesserung.

4.6.3 Einfluß des Manipulationszonaschlitzes auf die Entwicklungskompetenz parthenogenetischer Embryonen nach 6 Tagen in vivo-Kultur

Die folgenden Versuche sollten sowohl Aufschluß über die Entwicklungskompetenz von parthenogenetischen Embryonen im „in vivo-System“ geben wie auch über den Einfluß des Zonaschlitzes, der für den Kerntransfer notwendig war. Hierzu wurden Oozyten wie in 4.5.2.b beschrieben aktiviert und nach ca. 18-20h IVC in ein synchronisiertes Empfängertier übertragen (3.6.2). Nach sechs Tagen in vivo-Kultur erfolgte die Rückspülung der Embryonen mit anschließender IVC (24h), bevor durch eine Hoechst33342-Färbung die erreichten Entwicklungsstadien festgestellt wurden.

Tabelle 4.6.3: Entwicklungskompetenz von Parthenogenesen: Mit / ohne Zonaschlitz

Behandlung	+ Schlitz	- Schlitz
n MeII-Oozyten übertragen	94	185
n MeII-Oozyten rückgespült (%)	54 (57)	136 (74)
n degeneriert (%)	24 (44)	29 (21)
n Aktivierung (%)	28 (93)	104 (97)
n Fragmentierung (%)	8 (27)	26 (24)
n M (%) [KZ]	0	1 (1) [20]
n t-bl (%) [KZ]	1 (3) [33]	16 (15) [15]
n Bl (%) [KZ]	7 (23) [69]	36 (34) [66]
n M/t-bl/Bl (%)	8 (27)	53 (50)

Definitionen siehe 3.10.2. Die Degenerationsrate bezieht sich auf die rückgespülten, alle folgenden Raten auf die vitalen Oozyten ($\text{Oozyten}_{\text{rückgespült}} - \text{Oozyten}_{\text{degeneriert}} = \text{Oozyten}_{\text{vital}}$).

Es ist zu beachten, daß auch empfängertiereigene Oozyten rückgespült wurden, die sich nicht von den übertragenen unterscheiden ließen. Da angenommen wurde, daß die tiereigenen Eizellen sich nicht parthenogenetisch entwickelten, sondern degenerierten und resorbiert wurden, wurde nicht davon ausgegangen, daß vitale, über das 4-Zellstadium hinausgehende Embryonen vom Empfänger stammten.

Die Tabelle 4.6.3 zeigt zwar eine um 17% höhere Rückspülungsrate bei den übertragenen parthenogenetischen Embryonen ohne Schlitz. Aufgrund der Schwankungen zwischen den Einzelversuchen ließ sich aber für keinen der untersuchten Parameter eine statistische Signifikanz bestimmen.

In der Gruppe mit Schlitz trat im Mittel doppelt so viel Degeneration aller rückgespülten Zellen auf (44% gegenüber 21%). Möglicherweise gibt es im Uterus aktive Abbaumechanismen die defekte Embryonen sehr schnell erkennen und selektieren. Die Aktivierungsrate der vitalen Embryonen war mit 93% und 97% gleich hoch, ebenso wie die Fragmentierungsrate von 27% und 24%. Morulae traten kaum auf, da diese an Tag 7 fast alle in das Blastozystenstadium übergegangen waren. Die Gruppe mit Schlitz hatte um 12% weniger teilblastulierte und um 11% weniger Blastozystenstadien erreicht. Daher ergab sich

insgesamt eine bessere Entwicklungskapazität der Gruppe ohne Zonaschlitz, wie die M/t-bl/Bl-Rate auch noch einmal verdeutlichte (27% gegenüber 50%).

4.6.4 Schutz der manipulierten Oozyten durch Verpacken in Agar

Das Verpacken der manipulierten Kerntransferembryonen stellte einen Schutz der fragilen Zellen gegenüber mechanischen Scherkräften und zellulären Abbaumechanismen des Empfängertieres dar (3.6.1).

Um die mikromanipulierten Oozyten (mit Zonaschlitz) vor Degeneration, die durch den Transfer und/oder das Immunsystem des Empfängertieres verursacht wurden zu schützen, wurden Komplexe und Parthenogenesen mit Agar umhüllt /44, 52, 68/.

4.6.4.1 Einfluß durch das Handling mit Agar

Ein Vergleich in vitro-kultivierter Parthenogenesen mit/ohne Agar sollte zeigen, inwieweit der Vorgang des Verpackens und der Agarchip selbst eventuell einen entwicklungshemmenden Einfluß hatten.

Tabelle 4.6.4.1: Entwicklungskompetenz von Parthenogenesen: Mit / ohne Agar

Behandlung	+ Agar	- Agar
n MeII-Oozyten	96	245
n degeneriert (%)	13 (14)	31 (13)
n Aktivierung (%)	77 (93)	211 (99)
n Fragmentierung (%)	10 (12) ^a	53 (25) ^b
n M (%) [KZ]	0	1 (1) [8]
n t-bl (%) [KZ]	8 (10) [12]	25 (12) [10]
n Bl (%) [KZ]	3 (4) [15]	28 (13) [22]
n M/t-bl/Bl (%)	11 (13) ^a	54 (25) ^c

Definitionen siehe 3.10.1. Die Embryonen wurden 7 Tage in vitro-kultiviert.

^{a,b}: Werte einer Zeile unterscheiden sich signifikant, $p < 0,01$. (3.9)

^{a,c}: Werte einer Zeile unterscheiden sich schwach signifikant, $p < 0,05$.

Die Tabelle 4.6.4.1 zeigt, daß ein Verpacken die Degeneration nicht förderte (14% und 13%), und das Handling keinen negativen Einfluß auf die Aktivierung hatte (93% und 99%). Es war allerdings deutlich eine geringere Fragmentierung nach Verpackung zu sehen, die mit 12%

halb so groß wie der Vergleichswert war. Auch bei der IVC waren an Tag 7 kaum noch entwicklungs kompetente parthenogenetische Embryonen im Morulastadium zu finden, da sich diese wie in Tabelle 4.6.3 dargestellt zu Blastozysten weiterentwickelt hatten. Die M/t-bl/Bl-Rate war bei den verpackten Embryonen mit 13% deutlich niedriger als bei den nicht verpackten (25%). Dabei waren teilblastulierte Stadien mit 10% und 12% gleich, aber der Anteil an Blastozysten war in der Verpackten Gruppe um 9% geringer.

4.6.4.2 Vergleich von in vitro- / in vivo-Kultur parthenogenetischer Embryonen aus in vivo-Oozyten mit in vitro-maturierten Oozyten nach IVC

Tabelle 4.6.4.2.a: Entwicklungskompetenz von Parthenogenesen: in vitro- / in vivo-Kultur

Reifung	in vivo	in vivo	in vitro
Kultur	in vivo	in vitro	in vitro
Behandlung	- Agar/ - Schlitz	- Agar/ - Schlitz	- Agar/ - Schlitz
Inkubation	3h DMAP	3h DMAP	3h DMAP
n MeII-Oozyten	136	245	64
n Aktivierung (%)	104 (97)	211 (99)	64 (100)
n Fragmentierung (%)	26 (24)	53 (25)	28 (44)
n M (%) [KZ]	1 (1) [20]	1 (1) [8]	3 (5) [11]
n t-bl (%) [KZ]	16 (15) [15]	25 (12) [10]	6 (9) [11]
n Bl (%) [KZ]	36 (34) ^a [66]	28 (13) ^b [22]	6 (9) ^b [18]
n M/t-bl/Bl (%)	53 (50)	54 (25)	15 (23)

Definitionen siehe 3.10.1.

in vivo Kultur: 6 Tage + 24h IVC

in vitro Kultur: 7 Tage

^{a b}: Werte einer Zeile sind schwach signifikant verschieden, $p < 0,05$. (3.9)

Wie die obige Tabelle zeigt, war die Aktivierungsrate in allen Gruppen vergleichbar. Die Fragmentierung war in den in vivo-gereiften Gruppen mit 24% und 25% gleich und ca. 20% niedriger als in der in vitro-gereiften Gruppe. Entscheidend war hier die Reifungsart und nicht die Kultur.

Nach 7 Tagen waren in allen drei Gruppen nur wenige Embryonen im Morulastadium (1-5%). Der Anteil an teilblastulierten Embryonen war ebenfalls in allen Gruppen vergleichbar und offenbar keine Folge der Reifungs- oder Kulturbedingung (11-15%). Die Blastozystenrate war

in der in vivo-gereiften und -kultivierten Gruppe deutlich am größten (34%) und nahm über die IVC (13%) bis zur in vitro-gereiften und -kultivierten Gruppe auf 9% ab. Die Qualität der Blastozysten, die über die mittlere Kernzahl [KZ] angegeben ist, hatte ein Gefälle in der gleichen Richtung und nahm von 66 (um den Faktor 3,7) auf 18 ab; die M/t-bl/BI-Rate sank um die Hälfte, von 50% auf 23%.

Der Unterschied der M/t-bl/BI-Rate war zwischen in vitro-gereiften und in vivo-gereiften Oozyten nach IVC nur noch gering (13% und 9%). Auch die mittleren Kernzahlen waren mit 22 und 18 ähnlich.

Die bessere Entwicklungskapazität in vivo-gereifter Eizellen ging also durch die in vitro-Kultur (IVC) verloren. Es war daher in jedem Fall von Vorteil, sowohl in vivo-maturierte Oozyten wie auch in vivo-Kultur einzusetzen, solange das Kulturmedium (die IVC-Bedingungen) für das Schwein nicht grundlegend verbessert worden sind.

4.6.5 Kerntransfer mit in vivo-maturierten Oozyten

Die vorangegangenen Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 haben Aufschluß über die Entwicklungskompetenz parthenogenetischer Kontrollen unter verschiedenen Bedingungen, die für die Mikromanipulation notwendig waren, nach 7 Tagen Kultur gegeben. In den folgenden Kapiteln soll nun der Vergleich zu Kerntransferprodukten gezogen werden. Die DMAP-Inkubationszeit konnte aus technischen Gründen nicht für alle Komplexe eines Versuchstages genau 3h betragen. Daher wird die Inkubationsdauer im folgenden mit 3-max. 5h angegeben.

4.6.5.1 Kerntransferembryonen nach 6 Tagen in vivo-Kultur und 24h IVC: Mit/ohne Agar

Tabelle 4.6.5.1: Entwicklungskompetenz transferierter Kerntransferembryonen: Mit / ohne Agar

Reifung	in vivo	in vivo
Behandlung	+ Agar/ + Schlitz	- Agar/ + Schlitz
Inkubation	3-5h DMAP	3-5h DMAP
n Fusionen übertragen	20	16
n Rückspülung (%)	16 (80)	16 (100)
n degeneriert (%)	1 (6)	4 (25)
n Aktivierung (%)	4/15 (27)	1/12 (8)
n Fragmentierung (%)	11 (73)	9 (75)
n M (%) [KZ]	0	0
n t-bl (%) [KZ]	0	0
n Bl (%) [KZ]	3 (20) [36]	1 (8) [10]
n M/t-bl/Bl (%)	3 (20)	1 (8)

Definitionen siehe 3.10.2.

in vivo Kultur: 6 Tage + 24h IVC

Wie die obige Tabelle zeigt, war die Rückspülungsrate in der Gruppe mit Agar 20% niedriger, der Anteil degenerierter Zellen 19% geringer und sowohl die Blastozystenanzahl wie auch deren mittlere Kernzahl größer. Eine statistische Signifikanz ließ sich nicht bestimmen, da dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Die „Schutzhülle“ hatte offenbar keinen negativen Einfluß auf die Blastulierung der Embryonen, denn sowohl in diesem Versuch wie auch in weiteren Experimenten, in denen der Agar nicht entfernt wurde, konnte die Ausbildung des Blastozoels und die Expansion der Blastozyste beobachtet werden. In einigen Fällen waren die Blastozysten sogar, wenn auch nur z.T., im Agar geschlüpft, falls die Zelle am Rand und nicht genau in der Mitte des Chips lag. Einige Blastozysten wurden ohne Agar rückgespült, was dafür sprach, daß das Einpacken in möglichst kleinen Chips möglicherweise das spätere Entfernen des Agars, welches eine schwierige und für die fragile Blastozyste gefährliche Manipulation darstellte, erübrigte.

Dieser Punkt sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

4.6.5.2 Entwicklungskompetenz transferierter Kerntransferembryonen mit Agar

Tabelle 4.6.5.2: Entwicklungskompetenz transferierter Kerntransferembryonen: Mit Agar

Reifung	in vivo
Behandlung	+ Agar/ + Schlitz
Inkubation	3-5h DMAP
n Fusionen übertragen	170
n Rückspülung (%)	137 (81)
n degeneriert (%)	17 (12)
n Aktivierung (%)	38/120 (32)
n Fragmentierung (%)	65 (54)
n M (%) [KZ]	0
n t-bl (%) [KZ]	1 (1) [7]
n Bl (%) [KZ]	8 (7) [43]
n M/t-bl/Bl (%)	9 (8)

Definitionen siehe 3.10.2.

in vivo Kultur: 6 Tage + 24h IVC

Die Tabelle 4.6.5.2 zeigt, daß die Rückspülungsrate mit 81% sehr hoch war, der Anteil an degenerierten Zellen mit 12% gering gehalten werden konnte, aber nur 32% der nicht degeneriert/lysierten Embryonen eine Kernteilung (Aktivierung) vollzogen hatten. Dieser Wert ist im Vergleich mit den in vitro-maturierten und -kultivierten Embryonen (Tab.: 4.5.3.1.a, Aktivierungsrate nicht unter 65%) auffallend niedrig. Die Fragmentierung lag mit 54% höher als die IVC + CB-Werte und niedriger als der IVC – CB-Wert in Tab.: 4.5.3.1.a (34% und 32% gegenüber 67%). Der Anteil an teilblastulierten und blastulierten Stadien konnte in der obigen Tabelle mit 1% und 7% gegenüber den IVC-Gruppen aus Tab.: 4.5.3.1.a (1% und 0,3%) gesteigert werden, so daß die M/t-bl/Bl-Rate hier bei 8% lag (gegenüber 1%). Wesentlich zu beachten ist aber die Erhöhung der mittleren Blastozystenkerzahl. Diese lag bei den IVC-Gruppen bei 4 und in der obigen Tabelle bei 43.

10% der Embryonen aus obiger Versuchsreihe arretierten im 2-Zellstadium und nur 3% im 4-Zellstadium, 6- und 8-Zeller waren nicht zu verzeichnen. In der Tabelle 4.5.3.1.c waren noch 26% in Teilungsstadien von 2- bis 8-Zellern verblieben.

Es ist denkbar, daß die besser maturierten in vivo-Oozyten Mechanismen besitzen, die eine unzureichende Synchronisation von Kern und Plasma nach Fusion sehr schnell erkennen und die weitere Entwicklung schon vor der Aktivierung stoppen. So werden kompetente Embryonen selektiert, die in ihrer Zellteilung das Blastozystenstadium erreichen. Bei in vitro-maturierten Oozyten tritt diese Selektion möglicherweise erst auf, wenn wichtige Stoffwechselfunktionen aufgrund fehlender DNA-Information nicht ablaufen können.

4.6.5.3 **Transfer in vivo-maturierter Oozyten nach Kerntransfer und Verpacken in Agar ohne Rückspülung**

Tabelle 4.6.5.3.a: Versuch zur Etablierung einer Trächtigkeit mit Kerntransferembryonen

Reifung	in vivo
Behandlung	+ Agar
Inkubation	3-5h DMAP
n hormonell stimulierte Tiere zur Gewinnung der Oozyten	16
n gewonnene MeII-Oozyten	289
n Komplexe (gesamt)	217
n fusionstaugliche Komplexe	177
n Fusionen (morphologisch)	108
n Fusionen übertragen	89
n Empfängertiere	2
n Trächtigkeiten	0

Definitionen siehe 3.10.2.

Die Tabelle beinhaltet zwei Wiederholungen: In vivo-Kultur ohne Rückspülung; Trächtigkeitskontrollen durch Ultraschalluntersuchungen in verschiedenen Abständen.

Tabelle 4.6.5.3.b: Pulskontrollgruppe zur Beurteilung der Oozytenqualität der Trächtigkeitsversuche (-Agar)

n MeII-Oozyten	38
n degeneriert (%)	5 (13)
n Aktivierung (%)	25 (76)
n Fragmentierung (%)	2 (6)
n Morulae(%) [KZ]	1 (3) [8]
n teilblastuliert (%) [KZ]	3 (9) [8]
n Blastozysten (%) [KZ]	5 (15) [18]
n M/t-bl/Bl-Rate (%)	9 (27)

Definitionen siehe 3.10.1.

Zwei Wiederholungen; Kultur: 7 Tage IVC

Die Tabelle 4.6.5.3.b zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Werten der Tabelle 4.6.4.1 (Gruppe: -Agar, IVC). Dies war wichtig, da die Oozytenqualitätskontrollgruppe (4.6.5.3) nur klein sein konnte, um möglichst viele Oozyten in der Kerntransfergruppe zur Verfügung zu haben. Aufgrund der Übereinstimmung kann aber eindeutig auf eine normale Eizellqualität geschlossen werden.

Eine normale/durchschnittliche Oozytenqualität bedeutet, daß bei in vivo-Kultur etwa 8% der verpackten, übertragenen Kerntransferembryonen (Tabelle 4.6.5.2) das M/t-bl/Bl-Stadium erreichen konnten.

An zwei Versuchsterminen (Tabelle 4.6.5.3.a) wurden jeweils 8 Oozytenspendertiere geschlachtet und 140 bzw. 149 MeII-Oozyten gewonnen. Diese große Anzahl an Eizellen mußte entkumuliert, manipuliert, fusioniert und aktiviert werden. Vor dem Transfer in das Empfängertier erfolgte das Verpacken in Agar aller als vital beurteilten Embryonen. Obwohl jeder dieser beiden Versuche mit jeweils 5 Personen unter Aufteilung der Arbeitsschritte, z.T. aber auch durch paralleles Vorgehen, durchgeführt wurde, war es nicht möglich, mehr als die angegebene Anzahl an Kerntransferembryonen zu erstellen.

Die Zahlen verdeutlichen, welcher Aufwand notwendig ist, ausreichend viele Kerntransferembryonen zu erzeugen, damit eine Trächtigkeit bei einem synchronisierten Empfängertier möglich wird. Wissenschaftliche Untersuchungen zeigten, daß wenigstens vier Embryonen in der frühen Phase (Tag 12 der Trächtigkeit) im Uterus implantieren müssen, um

ein hormonelles Signal auszusenden, welches dafür sorgt, daß das Muttertier nicht alle Embryonen resorbiert und die Trächtigkeit beendet wird /11/. In zwei Versuchen sind 40 bzw. 49 Kerntransferembryonen auf jeweils ein Empfängertier übertragen worden. Der aus Tabelle 4.6.5.2 ermittelte statistische Wert von ca. 8% M/t-bl/Bl-Stadien hätte für das erste Empfängertier 3 und für das zweite 4 potentielle Embryonen dieser Entwicklungsstadien ergeben.

Zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit stellte dies das absolute Minimum für einen Transfer dar. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß nicht gewährleistet war, daß diese M/t-bl/Blastozysten aus dem sie umgebenden Agar „herausschlüpften“, denn es gibt in der Literatur keinen Hinweis, daß Embryonen im Agar implantieren können, wodurch sich die Anzahl implantationsfähiger Mehrzeller weiter reduzierte.

Inwieweit Agar einen Einfluß auf Kerntransferembryonen hatte, konnte in dieser Arbeit statistisch nicht abgesichert werden, da die in Kapitel 4.6 beschriebenen Experimente im Team (3.6.3) durchgeführt und durch Mehrheitsbeschluß das weitere Vorgehen entschieden wurde. Aufgrund des nicht ausreichend vorhandenen in vivo-maturierten Oozytenmaterials waren weitere Versuche zu dieser Frage und zum Cytochalasin B-Einfluß auf in vivo-maturierte Eizellen, wie in Kapitel 4.5.3.1 nicht möglich.

Es ließ sich zwar bei parthenogenetischen Kontrollen (Tab. 4.6.4.1; 7 Tage IVC) eine signifikante Reduktion der Fragmentierung der „verpackten“ Oozyten um 13% feststellen, gleichzeitig sank aber auch die M/t-bl/Bl-Rate schwach signifikant um 12%.

Die Tabelle 4.6.5.1 (Kerntransfer: +/-Agar) spiegelt dies nicht wider, allerdings stellt sie auch nur die Ergebnisse eines Versuches dar. In der Tabelle 4.6.5.2 (Kerntransfer: +Agar) fehlt die Vergleichsgruppe ohne Agar, so kann sie nur mit in vitro-maturierten Oozyten (Tabelle 4.5.3.1.b; Kerntransfer; 7 Tage IVC) verglichen werden. Die Fragmentierung in vivo-gereifter Oozyten lag mit 54% um 13% unter dem Wert in vitro-maturierter Oozyten ohne CB und um 20 bzw. 22% über den Werten in vitro-maturierter Oozyten mit CB-Inkubation für 3 bzw. 5h. Die M/t-bl/Bl-Rate (Tabelle 4.6.5.2; Kerntransfer: +Agar) betrug 8%, Fusionskomplexe aus in vitro-maturierten Oozyten (Tab. 4.5.3.1.a; Kerntransfer; 5h CB-Inkubation; 7 Tage IVC) zeigten aber eine geringere Rate von 2% und eine deutlich kleinere Blastozystenkerzahl von 4.

Die Co-Inkubation der Kerntransferembryonen aus in vivo-Maturation mit CB ist in Tabelle 4.6.2.a (Vergleich der Protokollnummern: 3 und 4; 48h IVC) dargestellt und zeigt die Reduktion der Fragmentierung um 18% und die Erhöhung des 4-Zellanteils um ebenfalls 18%. Die Gruppengrößen waren aber nur klein, ebenso wie die der Kontrollgruppen der

Tabelle 4.6.2.b, in der die CB-Inkubation die 4-Zellrate um 23% ansteigen ließ. Die abschließende Beurteilung blieb aus oben genanntem Grund auch hier aus.

Die folgende Tabelle zeigt alle Methoden, die bisher zu porcinem Nachwuchs führten:

Tabelle 4.6.5.3.c: In der Literatur veröffentlichte Daten zur Erstellung von Kerntransferferkeln

KI / KT /Lit./	Aktivierungsmethode	Reifungsart	Oozytenart präpuberal/ adult	übertragene Embryonen n (pro Tier)	Anzahl Empfänger n	Ferkel n (%)	aus n Trächtig- keiten
KI /10/	Elektroaktivierung + 2h CB	in vivo	k.A.	110 (?- <u>36</u> -?)	4	1 (0,9) (2,8)*	1
2xKT /9/	Elektroaktivierung	in vivo	k.A.	401 (22- <u>72</u> - 100)	7	5 (1,2) (6,9)*	1
KT /11/	Ionomycin/ DMAP	in vitro	adulte Zuchtsau	k.A. (115- <u>143</u> - <u>164</u>)	23	2 (0,7)*	2
KT /67/	Elektroaktivierung	in vivo	k.A.	88 ^a (4- <u>7</u> -17)	9 ^b	1 (1,1) ^c (14)*	1

KT = Kernttransfer , KI = Kerninjektion

k.A. = keine Angaben

Die unterstrichenen Zahlen in der Spalte der übertragenen Embryonen (pro Tier) markieren die zu Nachwuchs führenden Trächtigkeiten.

^a : Anzahl der übertragenen Blastozysten auf die zweiten Empfängertiere

^b : Summe der unbedeckten (4) + bedeckten (5) Empfängertiere

(%)-Angabe bezieht sich auf die Anzahl der insgesamt übertragenen Embryonen

(%)* = Anzahl der auf die Empfängertiere, die KT-Nachwuchs hatten, übertragenen Embryonen

^c : Angabe bezogen auf alle 88 übertragenen Blastozysten

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, fand einmal Kerninjektion, dreimal Kerntransfer Anwendung, und es wurden Oozyten aus in vivo- oder adultem in vitro-maturiertem Material eingesetzt. Möglicherweise ist die Methode, mit der der Kern der Donorzelle in den Ooplasten gelangt, weniger wichtig als die Ooplastenentwicklungskompetenz.

Das Reprogramming und Aktivierungsverfahren ist in den vier Fällen unterschiedlich.

Bei der Kerninjektion (Kern = Fibroblastenkern) /10/ erfolgte nach dem fusionslosen DNA-Transfer eine Zwischeninkubation von 3-4h in Kulturmedium, bevor der Aktivierungsstimulus (Elektropuls) ausgelöst wurde. Einer Inkubation von 2h mit CB-haltigem NCSU23 folgte die IVC (keine genaueren Angaben) und anschließende Übertragung von Embryonen im 2-8-Zellstadium.

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß ein Co-Transfer von KT- und Helferembryonen (aus IVF) ausschließlich zur Geburt der Helferembryonen führte.

Die Ausgangsmenge der Oozyten und der erstellten Komplexe (nach Fusion) ist nicht bekannt; der Anteil an Ferkeln bezogen auf die übertragenen Embryonen wird mit 0,9% (1 von 110) angegeben.

Bei Polejaeva et al. /9/ wurde der Kerntransfer (Kerndonor = adulte somatische Granulosazelle) mit Fusion + Aktivierung zweimal hintereinander durchgeführt. Die erstellten Fusionen aus der ersten KT-Runde wurden über Nacht in Kulturmedium zwischeninkubiert, die Kerne dekondensierten und erfuhren vermutlich eine erste Reprogrammierung. In der zweiten KT-Runde dienten in vivo-fertilisierte Zygoten als Ooplast, der nach Enucleation mit dem entnommenen Kern + Plasma aus der ersten KT-Runde fusioniert wurde.

Der bereits einmal mit Ooplastenzytoplasmafaktoren in Berührung gekommene Kern wurde mit einer schon durch Fertilisation natürlich aktivierten Zygote fusioniert und zeitgleich aktiviert, worauf nach Kernreplikation die Kern- und Zellteilung folgen konnte. Nach einer sehr kurzen IVC (0,5-1h) schloß sich der Transfer an.

Dieser Methode waren Versuche mit „einfachem Kerntransfer“ vorausgegangen, die nach Fusion von 148 Komplexen und Transfer von 146 Embryonen (2 Empfängertiere: 85 und 61 KT-Produkten) zu keiner Trächtigkeit geführt hatten. Offenbar war die Synchronisation oder Reprogrammierung nicht vollständig /9/.

Deshalb wurde der sehr komplizierte und aufwendige Weg eingeschlagen, der aufgrund der Materialverluste bei jedem Einzelschritt den Versuchsbeginn mit wesentlich größeren Mengen an Oozyten (insgesamt 1869) erforderte. Der Anteil an übertragenen Embryonen,

bezogen auf die in der ersten KT-Runde erstellten Komplexe (nach Fusion), betrug 41% (401 von 975). Der Prozentsatz der Kerntransferferkel, bezogen auf die mit Kerndekondensation reagierenden Fusionsprodukte aus dem ersten KT-Ablauf, betrug 0,9% (5 von 551). Die Effizienz (Ferkel bezogen auf alle transferierten Embryonen) wird mit 1,2% (5 von 401) angegeben.

Die dritte erfolgreiche Methode /11/ basierte auf dem Einsatz in vitro-maturierter Oozyten geschlechtsreifer Tiere. Nach Kerntransfer (Kerndonor = fetale Fibroblasten) und Fusion erfolgte ebenfalls 4h Zwischeninkubation, bevor mit Ionomycin und DMAP (Inkubation: 3-4h) aktiviert wurde, worauf eine 8-76-stündige IVC und erst dann ein Transfer folgten. Es ist nicht auszuschließen, daß der Fusionspuls bereits aktivierend wirkte, da das Fusionsmedium Ca^{2+} -Ionen enthielt.

Aus 307 auf zwei Empfängertiere übertragenen Embryonen konnten 2 Ferkel (0,7%) erstellt werden. 241 weitere übertragene Embryonen ergaben keinen Nachwuchs.

Weitere Trächtigkeiten bestanden zum Zeitpunkt der Publikation.

Die vorgestellten erfolgreichen Methoden unterscheiden sich nicht nur in den bereits beschriebenen Mikromanipulationsabläufen, sondern auch in der Länge der IVC und den übertragenen Entwicklungsstadien. Auch die Anzahl der erfolgreich pro Empfängertier transferierten Embryonen, die zur Geburt von Kerntransfer/-injektionsferkeln führten, differiert stark (72 /9/, 36 /10/, 143 und 164 /11/). Dies hängt möglicherweise von der Qualität der transferierten Embryonen ab.

Inwieweit diese Arbeitsgruppen ihren Erfolg regelmäßig wiederholen, und eine etablierte Methode präsentieren können bleibt abzuwarten. Der beschriebene Aufwand ist sehr groß und die Effizienz mit ca. 1% sehr gering.

Der Arbeitsgruppe um R.Prather war es bereits 1989 gelungen, ein Kerntransferferkel (Donorzelle = 4-Zellblastomere) /67/ aus in vivo-maturierten Oozyten (Fusion = Aktivierung) zu erstellen. Die Embryonen wurden nach 24h IVC auf ein erstes Empfängertier übertragen, nach 6 Tagen rückgespült und Blastozysten auf ein zweites Empfängertier transferiert. Insgesamt kamen Blastomeren aus dem 2-, 4- und 8-Zellstadium für den Kerntransfer zum Einsatz, und ein Teil der zweiten Empfänger war mit einem farbmarkierten Eber gedeckt worden.

42 Blastozysten wurden auf 4 zweite Empfängertiere ohne vorherige Bedeckung transferiert, ohne Trächtigkeiten zu erzielen.

46 Blastozysten wurden auf 5 zweite Empfänger mit vorheriger Bedeckung transferiert, welche zu **einem KT-Ferkel** und 48 „control piglets“ aus der Bedeckung führten.

Die Effizienz lag hier bei 1,1% (1 von 88 übertragenen Embryonen) ohne Berücksichtigung der insgesamt nach Kerntransfer in die ersten Empfängertiere transferierten Embryonen.

Im Gegensatz zu Onishi et al. /10/, bei dem es gerade umgekehrt war und „helper embryos“ aus Fertilisation das Überleben der KT-Embryonen zu verhindern schienen, kam es in der zuletzt beschriebenen Methode /67/ nur mit „helper embryos“ zu gemischtem Nachwuchs (KT-Ferkel und Ferkel aus in vivo-Fertilisation).

Die Aussagen über den Weg zum Erfolg sind zum Teil widersprüchlich.

Der Transfer von Kerntransferblastozysten ist sicher ein Hinweis auf die Entwicklungskompetenz der übertragenen Embryonen, denn schließlich waren nur 7 KT-Blastozysten in Kombination mit „helper embryos“ zur Trächtigkeit und Geburt von einem KT-Ferkel notwendig, was verglichen mit den sonst übertragenen Embryonenzahlen pro Tier sehr gering ist.

Allerdings verwundert es, daß die Arbeitsgruppe um R.Prather seit 12 Jahren diesen Erfolg offenbar nicht reproduzieren kann, obwohl sicher alle Anstrengungen unternommen wurden, da Literaturrecherchen auf dem Gebiet „rund um das Schwein“ zeigen, daß gerade aus dieser Arbeitsgruppe die meisten Veröffentlichungen zur Grundlagenforschung in bezug auf den Kerntransfer geschrieben wurden und werden, angefangen von Oozytenqualität, in vivo-/ in vitro-Maturationsvergleich, Kulturmedien, Parthenogeneseuntersuchungen, Fragmentierung, Polyploidien bis zu Untersuchungen zur Charakterisierung der G0/G1-Phase der Kerndonorfibroblasten u.s.w /35, 41, 48, 49, 53, 54, 58, 63, 66, 67/ .

Es scheint beim Kerntransferverfahren, noch mehr als beim IVF oder der Mikroinjektion, auf die Oozytenqualität anzukommen, da die Manipulationsschritte wesentlich umfangreicher sind und für das empfindliche biologische Material eine größere Belastung darstellen. Außerdem ist die Qualität vermutlich die beste Voraussetzung für die Reprogrammierung des Kerns und die folgende Embryonalentwicklung.

Bei Betthausen et al. /11/ wurden 143 bzw. 164 Kerntransferembryonen mit Erfolg auf jeweils ein Empfängertier übertragen. Diese Zahl scheint sehr hoch, wenn man jedoch die „Qualität“

der Kerntransferembryonen im Vergleich mit in vivo-fertilisierten Embryonen betrachtet, erscheint sie durchaus sinnvoll.

Die mittlere Kernzahl der in den Kerntransferversuchen dieser Arbeit mit in vivo-maturierten Oozyten nach in vivo-Kultur und Rückspülung gefärbten Blastozysten betrug 43 (Tabelle 4.6.5.2), die mittlere Kernzahl der ebenso gereiften und kultivierten Parthenogenesen 66 (Tabelle 4.6.4.2.a).

In der Literatur /11/ (in vitro-maturierte Oozyten aus geschlechtsreifen „Zuchtsauen“) wurde diese mittlere Kernzahl mit 66 (Kerntransfer) und 49 (Parthenogenese) und die für in vivo-fertilisierte „Tag7-Embryonen“ zwischen 200 und 300 angegeben.

In vitro-maturierte Oozyten aus präpuberalen Jungsauen erreichten in dieser Arbeit nach Kerntransfer und 3h Co-Inkubation mit CB zu 2% Morulae mit einer mittleren Kernzahl von 5, nach 5h Co-Inkubation 1% teilblastulierte Entwicklungsstadien mit 8 und 1% Blastozysten mit 4 Kernen (Tabelle 4.5.3.1.a). Ohne CB-Zusatz wurden 1% teilblastulierte Entwicklungsstadien mit 5 Kernen erzeugt, was für eine bessere Entwicklungskapazität nach in vivo-Maturation spricht (siehe 4.3.4). Schlachthofmaterial von „Zuchtsauen“ stand nicht zur Verfügung und konnte nicht eingesetzt werden. Bei Betthausen et al. /11/ wird eine Blastozystenrate für in vitro-Material aus präpuberalen Jungsauen mit 4% (Kerntransfer) angegeben. Die Autoren, denen es bisher gelungen ist, Ferkel über Kerntransfer zu klonieren, geben vor allem in vivo-gereiften Oozyten bzw. in vitro-maturierten Eizellen aus geschlechtsreifen adulten Sauen eindeutig den Vorzug /9, 10, 11, 67/, was sich auch in dieser Arbeit bestätigte.

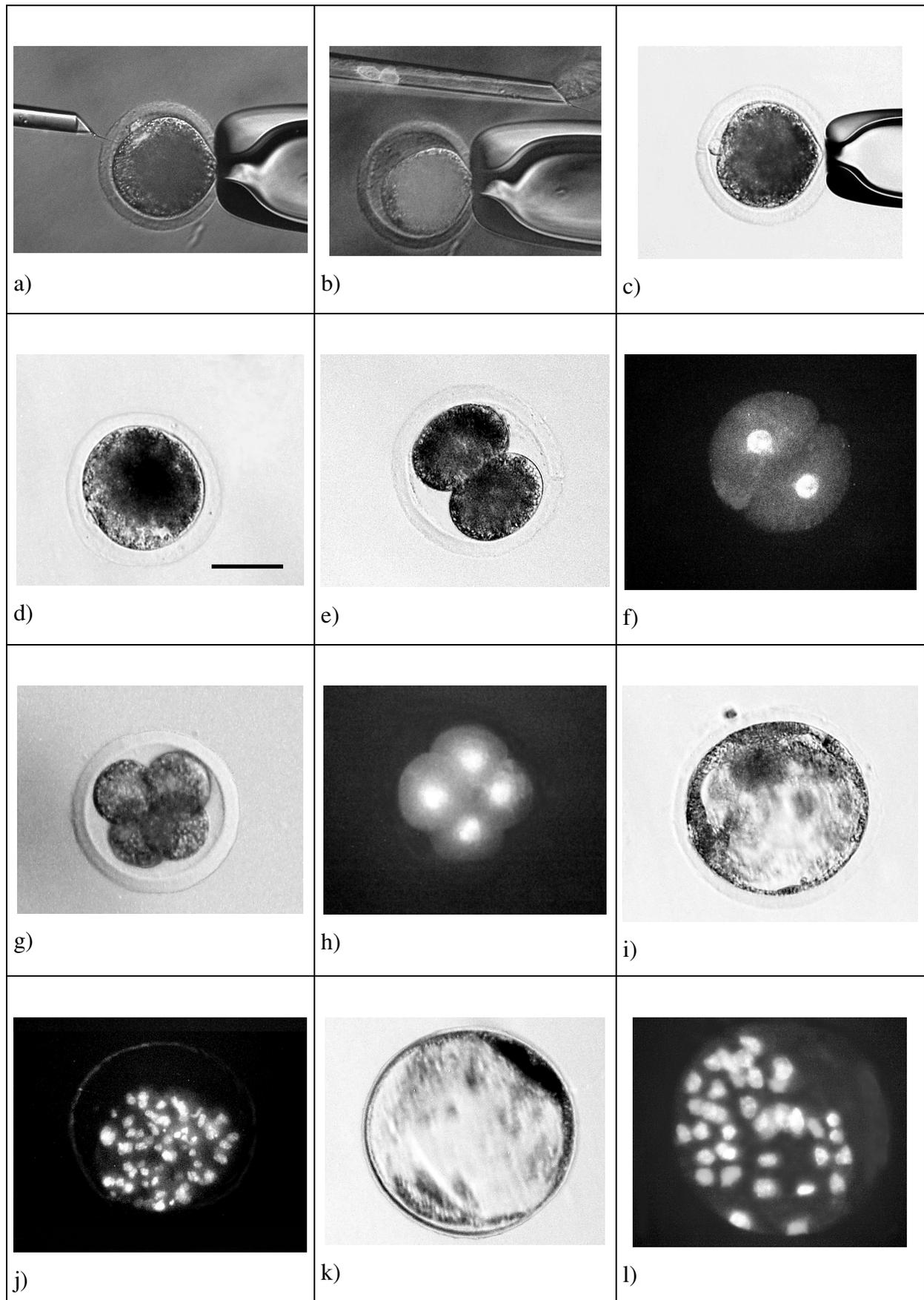
4.6.6 Darstellung der verschiedenen Manipulations- und Entwicklungsstadien

Die abschließende Abbildung 4.6.6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Manipulations- und Entwicklungsstadien:

a)	Hoechst33342-Färbung der Metaphasenplatte + Polkörper des zu entkernenden Komplexes mit Manipulations- und Haltepipette
b)	Hoechst33342-Färbung des entkernten Ooplasten (Metaphasenplatte + Polkörper in der Manipulationspipette)
c)	Kerntransferkomplex vor Fusion (transferierter Fibroblast und Zonaschlitz auf 9 ⁰⁰ Uhr)
d)	Kerntransferkomplex ca. 15min. nach Fusion (abflachender Fibroblast auf 8 ⁰⁰ Uhr)
e)	Kerntransferzweizeller (Zonaschlitz auf 3 ⁰⁰ Uhr)
f)	Kerntransferzweizeller nach Hoechst33342-Färbung
g)	Kerntransfervierzeller
h)	Kerntransfervierzeller nach Hoechst33342-Färbung
i)	frühe Blastozyste (Blastozoele, Trophekthoderm und ICM)
j)	Hoechst33342-Färbung der frühen Blastozyste (der Embryo ist kollabiert, die Zellkerne liegen dicht beieinander in der Gruppe)
k)	expandierte Blastozyste (der Embryo ist deutlich größer und die Zona dünner als in Abb.i, die ICM ist ganz eindeutig zwischen 12 ⁰⁰ Uhr und 2 ⁰⁰ Uhr als dunkle Zellmasse zu erkennen)
l)	Hoechst33342-Färbung der expandierten Blastozyste

Zur Größenorientierung: Der Außendurchmesser der Manipulationspipette beträgt ca. 20-23µm, der Oozytendurchmesser liegt bei ca. 150µm

Wichtige Manipulations- und Entwicklungsschritte

Abb. 4.6.6 Balken = 75 μ m

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein Kerntransferverfahren zu erstellen, welches die einzelnen Schritte von der Gewinnung des Oozyten- und Fibroblastenmaterials über die Entkumulierung, Entkernung, den Fibroblastentransfer, die Fusion bis zur Aktivierung mit anschließendem Beginn der Embryonalentwicklung zusammenfasst.

Es erfolgte eine genaue Betrachtung der Einzelschritte und der jeweilige Vergleich verschiedener Protokolle, die wenn möglich, an nicht manipulierten Oozyten (Parthenogenese) geprüft wurden. Die Kombination der jeweils besten Methoden wurden für den Kerntransfer gewählt.

Die Aktivierung von porcinen MeII-Oozyten ist, wie die Untersuchungen zur Parthenogenese (Kapitel 4.3) zeigten, leicht induzierbar. So ist unbeabsichtigt das Verlassen der MetaphaseII schon durch eine zu heftige Entkumulierung zu erreichen (Kapitel 4.2.1).

Auch die Alterung des Oozytenmaterials kann durch die Degradierung zytosolischer Faktoren, welche für die Stabilisierung von MPF verantwortlich sind, zum Verlassen der MetaphaseII führen (2.1.2.1). Innerhalb eines „kurzen“ Alterungszeitraumes (4h, 18h, Kapitel 4.3.2.3 und 24h, Kapitel 4.3.3.1) kann man sich die Zunahme der Aktivierbarkeit zunutze machen, um so die Blastozystenrate zu erhöhen. Eine zu große Verzögerung der Aktivierung ist aber aufgrund der Degeneration weiterer zytosolischer Faktoren nicht anzustreben. Die Untersuchungen bezüglich der Alterung des Ooplasten waren vorwiegend unter dem Aspekt der für die Mikromanipulation benötigten Zeit betrachtet worden, die in den durchgeführten Kerntransferversuchen 5-9h zwischen Entkumulierung und Fusion nicht überschritt. Eine anschließende „Reprogrammierungszeit“ bis max. 18h zwischen Fusion und Aktivierung zeigte in parthenogenetischen Aktivierungskontrollen keine Beeinträchtigung der Entwicklung.

Obwohl die Wahl des Aktivierungsprotokolls nach Fusion der Kerntransferkomplexe auf die Kombination von Fusionspuls und DMAP-Inkubation fiel, stellte diese Methode nur eine von mehreren durch die Parthenogeneseversuche (4.3.3.1.a) für gut befundenen Verfahren dar.

Die Art des Fusionsgerätes erwies sich für die Erstellung ausreichend großer Gruppen an Fusionskomplexen für Untersuchungen der anschließenden Aktivierung und Embryonalentwicklung als ausschlaggebend. Experimente an zwei verschiedenen Fusionskammern (Tabelle 4.5.1.b) zeigten bei Kammer 2 eine Fusionsratenerhöhung von 56%

und einen Effizienzgewinn bezüglich der 2+4-Zeller von 8%. Versuchsreihen zur Verwendung verschiedener Fibroblastenpassagennummern bzw. zum Einsatz von Fibroblastenpools gegenüber Zellen aus Einzelembryonen (4.4.3) zeigten keine deutliche Verbesserung.

Die genaue Untersuchung in vitro-maturierten Oozytenmaterials auf seine Eignung als Ooplast im Kerntransfer ergab mehrere Schwachstellen, die sich vor allem auf die mangelnde Zytoplasmareifung zurückführen ließen (2.1.2.1). Am deutlichsten zeigte sich dies in dem hohen Anteil fragmentierter Embryonen (4.5.2). Die Gliederung in verschiedene Fragmentierungsformen ließ Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Abschnürung kernloser Blastomeren zu und zeigte daß eine morulaartige totale Fragmentation sehr schnell nach Applikation des Elektropulses erfolgte. Die Co-Inkubation mit Cytochalasin B (CB) für 3 bzw. 5h nach Fusion konnte besonders dieser Fehlentwicklung vorbeugen und damit die Fragmentierung der Kerntransferkomplexe um die Hälfte reduzieren, womit er auf das Niveau der Pulskontrollen fiel (Tabelle 4.5.3.1.b, 4.5.3.2.b). Der Prozentsatz der echten Teilungsstadien nach Fusion konnte durch CB-Inkubation signifikant etwa verdreifacht werden (Tabelle 4.5.3.1.c), und lag damit nur noch 1% unter dem Wert der Pulskontrolle (3h ohne CB: Tab. 4.5.3.2.c). In bezug auf die Menge der in der in vitro-Kultur (IVC) maximal erreichbaren Stadien der Morula und Blastozyste hatte CB keinen signifikanten Einfluß; der Anteil war mit ein - 2% sehr gering, ebenso wie die mittleren Kernzahlen (4-8). Hier spielten vermutlich andere Gründe, wie die Kern/Plasma-Synchronisation und vor allem die Reprogrammierung, eine Rolle. Letztere hängt voraussichtlich von bestimmten bisher unbekanntem Zytoplasmafaktoren ab, welche möglicherweise nach in vitro-Reifung fehlen oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind.

Die Oozytenqualität hing, wie in 4.3.4. beschrieben, mit der Maturationsart zusammen.

In vivo-maturiertes und -kultiviertes Material führte in dieser Arbeit zu 8% blastulierten Stadien (Tabelle 4.6.5.2) mit einer mittleren Kernzahl von 43. Besonders die wesentlich höhere mittlere Kernzahl zeigt den Unterschied zur in vitro-Maturation auf.

In der hier beschriebenen Arbeit wurden zwei Versuche zur Austragung von KT-Ferkeln durch Empfängertiere (40 bzw. 49 Embryonen pro Tier) unternommen. Eine Trächtigkeit wurde jedoch nicht erzielt.

Die Tabelle 4.6.5.3.c zeigt jedoch, daß zwischen 4 und 23 Empfängertiere notwendig waren und insgesamt wenigstens 88 Blastozysten oder 110 und mehr Embryonen (/11/ keine

Angaben über die Anzahl insgesamt übertragenen Embryonen auf 23 Empfängertiere) transferiert wurden, um ein Kerntransferferkel zu erstellen.

In keiner dieser Literaturstellen /9, 10, 11, 67/ ist beschrieben, daß Agar zur „Verpackung“ und zum Schutz porciner Kerntransferembryonen Einsatz fand. Inwieweit Agar einen Einfluß auf Kerntransferembryonen hatte, konnte in dieser Arbeit statistisch nicht nachgewiesen werden. Da die in Kapitel 4.6 beschriebenen Experimente im Team (3.6.3) durchgeführt und durch Mehrheitsbeschluß das weitere Vorgehen entschieden wurde, fand es aber trotzdem Verwendung.

Nach den bisherigen Erkenntnissen führt der Weg zum Kerntransferferkel über eine sehr große Zahl gut gereifter in vivo-Oozyten, um möglichst viele Embryonen (ca. 70-150 pro Empfänger) übertragen zu können, und möglichst viele Transfers, die die Chance auf Erfolg zusätzlich erhöhen.

Für Kalkulationen dieser Art sind immer die laboreigenen Gegebenheiten und bisher erzielte Effizienzen zu berücksichtigen, da diese durchaus von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe sehr stark variieren können.

Die angestellten Berechnungen für obige Arbeitsschritte und den dazu erforderlichen Materialbedarf orientieren sich an den in Tabelle 4.6.5.3.a ermittelten Daten:

89 transferierte Embryonen aus 217 erstellten Komplexen	≅	41%
89 transferierte Embryonen aus 289 gewonnenen Oozyten	≅	31%
289 Oozyten aus insgesamt 16 Oozytenspendertieren	≅	18 Oozyten pro Tier

Basierend auf den ermittelten Effizienzen (4.5.6.3) bedeutet dies pro Termin:

Für 70-150 Embryonen	≅	170-365 benötigte Komplexe
Für 170-365 benötigte Komplexe	≅	226-484 gewonnene Oozyten
Für 226-484 gewonnene Oozyten	≅	13-26 Tiere als Oozytenspender

In den in dieser Arbeit durchgeführten in vivo-Kerntransferversuchen (Kapitel 4.6: in vivo-Maturation und in vivo-Kultur) war der Aufwand, speziell bei den beiden Versuchen in Kapitel 4.6.5.3, derart groß (jeweils 8 Spendertiere, 140 bzw. 149 gewonnene Oozyten, 103 und 114 erstellte Komplexe, 53 und 55 Fusionen), daß ein reibungsloser Ablauf ein Team von 5 Personen erforderte. Unter den gegebenen Bedingungen wäre die Verarbeitung von mehr als

200 Oozyten und das Manipulieren von 170 und mehr Komplexen pro Termin nicht möglich gewesen.

Bei der Verbesserung der Fusionsrate von 50% (89 von 177 fusionstauglichen Komplexen, 4.5.6.3) auf beispielsweise 70%, hätten in den Versuchen pro Tier 59 bzw. 65 fusionierte vitale Komplexe übertragen werden können. Die notwendige Erstellung von mehr als 70 KT-Embryonen pro Tier wäre damit aber immer noch nicht erreicht.

Die Verbesserung der Methode (Reduktion der Degeneration/Fragmentierung oder Erhöhung der Aktivierung, die in Tabelle 4.6.5.2 bei nur 32% lag) durch den Einsatz eines anderen Aktivierungsstimulus (4.3) wäre ein wichtiger Schritt. Beispielsweise hätte die Verwendung von Thimerosal/DTT 4 – 24h nach Fusionspuls mit einer zwischenzeitlichen Zugabe von CB zum Kulturmedium den Vorteil, daß die Reprogrammierungsphase erheblich verlängert würde.

Die bisherigen Effizienzen der genannten Veröffentlichungen sprechen eher für den Faktor „Zufall“ als für ein kontinuierlich reproduzierbares Verfahren.

Da der Kerntransfer beim Schwein sehr komplex ist und von vielen z.T. noch unbekanntem Faktoren abhängt, beruht das Gelingen anderer Arbeitsgruppen offenbar auf großem Arbeits- und Materialeinsatz sowie Personal- und Gerätere Ressourcen, damit möglichst viele Embryonen übertragen werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. H.Niemann, B.Meinecke (1993), Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren, F.Enke Verlag Stuttgart
2. S.Primrose (1990), Biotechnologie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg
3. T.Dominko et al. (1999), Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species, *Biology of Reproduction* 60: 1496-1502
4. Interim Report 1997, PPL Therapeutics plc
5. Annual Report 96 / 97, Rosslin Institut (Edinburgh)
6. A.McLaren (2000), Cloning: Pathway to a pluripotent future, *Science* 288: 1775-1780
7. D.Robertson (1997), „Gene“ another landmark in farmyard cloning, *Nature Biotechnology* 15: 833
8. C.Cibelli et al. (1998), Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science* 280: 1256-1258
9. I.Polejaeva et al. (2000), Cloned pigs by nuclear transfer from adult somatic cells, *Nature* 407: 86-90
10. A.Onishi et al. (2000), Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, *Science* 289:1188-1190
11. J.Betthausen et al. (2000), Production of cloned pigs from in vitro systems, *Nature Biotechnology* 18: 1055-1059
12. D.Cooper (1996), Xenotransplantation – State of the art, *Frontiers in Bioscience* 1, d248-265, September 1,
13. C.Janeway, P. Travers (1995), *Immunologie*, Spektrum akademischer Verlag
14. F.Bach, L.Thomas (1997), Delayed xenograft rejection: An important barrier, IBCs 3rd International Conference on Xenotransplantation
15. R.Michler (1997), Beyond hyperacute rejection: The newborn primate model, IBCs 3rd International Conference on Xenotransplantation
16. R.Lanza et al. (1997), Xenotransplantation, *Spektrum* 9/1997: 70-75
17. M.Sandrin et al. (1995), Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity, *Nature Medicine* Vol.1, 12: 1261-1267

18. A.Sharma et al. (1996), Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fructosyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Immunology 93: 7190-7195
19. W.Fodor (1997), Transgenic cell expressing [alpha]1,2-Fructosyltransferase and hCD59 are completely protected from human serum cytolysis, IBCs 3rd International Conference on Xenotransplantation
20. G.Byrne et al. (1997), Transgenic pigs expressing human CD59 and DAF produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage, Transplantation, Jan 15, 63: 1, 149-155
21. K.McCurry et al. (1995), Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury, Nature Medicine 1, May, 423-427
22. D. Dickson (1995), Pig heart transplant „breakthrough“ stirs debate over timing of trials, Nature 377: 185-186
23. D.White (1995), The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans, Nature Medicine Vol. 1, Number 9, 964-966
24. D.White (1996), hDAF transgenic pig organ: are they concordant for human transplantation?, Xeno June, 50-54
25. J.Fox (1998), FDA seeks „comfort factors“ before removing hold on porcine xenotransplantation trails, Nature Biotechnology 16: 224
26. D.Hunkeler et al. (1999), Bioartificial organs and acceptable risk, Nature Biotechnology 17:1045
27. J.Fox (2000), Blood products part of FDA xenotransplant plan, Nature Biotechnology 18: 258
28. D.Butler (2000), US decides close tabs must be kept on xenotransplants..., Nature 405: 606
29. L.Olsen (2000), Porcine xenotransolants-will they fly?, Nature Biotechnology 18:925-927
30. J.Platt (2000), New risks new gains, Nature 407: 27-30
31. D.Voet, J.Voet (1992), Biochemie, VCH Weinheim
32. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (1990), W de Guyter, Berlin
33. B.Alberts et al. (1990), Molekularbiologie der Zelle, VCH Weinheim
34. E.Telfer (1998), In vitro models for oocyte development, Theriogenology April 1, Vol.49: 451-460

35. R.Abeydeera et al. (1998), Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development in vitro, *Biology of Reproduction* 58: 1316-1320
36. C.Long et al. (1998), Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro, *Molecular Reproduction and Development* 51: 59-65
37. V.Bordignon, L.Smith (1998), Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasm for use in bovine nuclear transfer, *Molecular Reproduction and Development* 49: 29-36
38. J.Anderson et al. (1999), Cyclin B1 transcript quantitation over the maternal to zygotic transition in both in vivo- and in vitro-derived 4-cell porcine embryos, *Biology of Reproduction* 61: 1460-1467
39. A.Colman (2000), Somatic cell nuclear transfer in Mammals: Progress and application, *Cloning* 1: 185-200
40. K.Campbell et al. (1993), Nuclear-cytoplasm interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development, *Biology of Reproduction* 49: 933-942
41. A.Boquest et al. (1999), Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells, *Biology of Reproduction* 60: 1013-1019
42. T.Reich (1996), Untersuchungen zur Schersteßempfindlichkeit von rekombinanten CHO-Suspensionszellen unter Variation verschiedener Parameter, Diplomarbeit, Universität Hannover
43. U.Zimmermann, J. Vienken (1982), Electric field-induced cell-to-cell fusion, *Journal of Membrane Biology* 67: 165-182
44. A.Clement-Sengewald, G.Brem (1990), Zur Embryoklonierung von Nutztieren, *BMTW Heft* 1: 15-21
45. K.Campbell, I.Wilmot (1997), Totipotency or multipotency of cultured cells: Applications and progress, *Theriogenology* 47: 63-72
46. S.Stice, J.Robl et al. (1998), Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunities, *Theriogenology* 49: 129-138
47. R.Fissore et al. (1998), Activation of development in mammals: Is there a role for a sperm cytosolic factor?, *Theriogenology* 49: 43-52

48. W.Wang et al. (1998), Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, Calcium Ionophore, and electrical pulse, *Molecular Reproduction and Development* 51:346-353
49. R.Prather et al. (1991), Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro, *Molecular Reproduction and Development* 28: 405-409
50. S.Kure-bayashi et al. (2000), Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig, *Theriogenology* 53: 1105-1119
51. Sigma-Katalog (1998)
52. K.Campbell et al. (1996), Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature* 380: 64-66
53. W.Jolliff, R.Prather (1997), Parthenogenetic development of in vitro-matured, in vivo-cultured porcine oocytes beyond blastozyst, *Biology of Reproduction* 56: 544-548
54. T.Tao et al. (2000), Optimization of porcine oocyte activation following nuclear transfer, akzeptiert in "Zygote"
55. A.Dinnyes et al. (1999/2000) Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and / or Butyrolactone I treatment, *Cloning* 1: 209-216
56. V.Zakhartchenko et al. (1998), Cultured bovine mammary gland cells as donor for nuclear transfer, *Theriogenology* 49: 332
57. P.Booth et al. (1998), Open pulled straw vitrification of both cytoplasts and day 3 embryo donors in bovine nuclear transfer, *Theriogenology* 49: 384
58. Z.Machaty et al. (1997), Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, Thimerosal; *Biology of Reproduction* 57: 1123-1127
59. J.Hill et al. (1999/2000), The effect of donor cell serum starvation and oocyte activation compounds on the development of somatic cell cloned embryos, *Cloning* 1: 201-208
60. P.Verma et al. (2000), Effect of 6-DMAP on the parthenogenetic development of electrically-activated porcine oocytes, *Theriogenology* 53: 444
61. H.Nagashima et al. (1997), Nuclear transfer of porcine embryos using cryopreserved delipated blastomeres as donor nuclei, *Molecular Reproduction and Development* 48: 339-343
62. L.Liu et al. (1995), Nuclear remodelling and early development in cryopreserved, porcine primordial germ cells following nuclear transfer into in vitro-matured oocytes, *Int. J. Dev. Biol.* 39: 639-644

63. R.Prather et al. (1989), Nuclear transplantation in early pig embryos, *Biology of Reproduction* 41: 414-418
64. G.Luvoni et al. (1996), Improvement in bovine embryo production in vitro by Glutathione-containing culture media, *Molecular Reproduction and Development* 43: 437-443
65. T.McNutt-Scott, C.Harris (1998), Modulation of intracellular Glutathione and Cysteine metabolism in bovine oviduct epithelial cells cultured in vitro, *Biology of Reproduction* 59: 314-320
66. Z.Machaty et al. (1999), Calcium release and subsequent development induced by modification of sulfhydryl groups in oocytes, *Biology of Reproduction* 60: 1384-1391
67. R.Prather et al. (1989), Nuclear transplantation in early pig embryos, *Biology of Reproduction* 41: 414-418
68. S.Willadsen (1986), Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature* 320: 63-65
69. M.Mitalipova et al. (1998), Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species, *Theriogenology* 49: 389
70. P.Verma et al. (2000), In vitro development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts, *Molecular Reproduction and Development* 57: 262-269
71. B.Kühholzer et al. (2000), Porcine nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblasts synchronized in the G0-versus the G1-stage, *Theriogenology* 53: 229
72. L.Lai et al. (2000), Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using tetraploid fibroblasts as donor nuclei, *Theriogenology* 53: 231

7 Anhang

Lösungen und Medienzusammensetzungen für Fibroblasten:

DMEM Kulturmedium:

DMEM (10x)	SIGMA, D-2554	100 ml		End. Konz.
H ₂ O, autoklaviert		839 ml		
NaHCO ₃	Riedel, 31437	50 ml	einer 7,5%igen-Lösung	
L-Glutamine	SIGMA, G-5763	10 ml	einer 2,9%igen Lösung	2mM
β-Mercaptoethanol	SIGMA, M-7522	1 ml	einer 1 M Lösung	0,1mM
Penicillin G	SIGMA, PEN-NA	1125µl	aus 0,6 g Penicillin G +	
Streptomycin Sulfat	SIGMA, S-6501	einer Stocklös.	1,0 g Streptomycin Sulfat	

Fetal Calf Serum (FCS)	Boehringer	10 ml	für die normale Kultur	10%
	Mannheim 210463	0,5 ml	serumreduziertes Medium	0,5%

Lösung bedeutet, in H₂O (autoklaviert) gelöste/verdünnte Substanz.
pH=7,1 - 7,4 (ev. mit 1N HCl einstellen)

Einfriermedium:

DMEM-Mix s.o.	s.o.	10 ml		
FCS	s.o.	1 ml		10%
DMSO	SIGMA, D-2650	1 ml		10%

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung zum Waschen oder Verdünnen :

Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS(-))	SIGMA, D-5652		wird in 1 l autoklaviertem bidestilliertem H ₂ O gelöst	
-----------------------------------------------------	---------------	--	-----------------------------------------------------------------------	--

EDTA/Trypsin:

Trypsin/EDTA (10x = 0,5%)	SIGMA, T-4174	1 ml		0,05%
PBS (-)	SIGMA, D-5652	9 ml		

Lösungen und Medienzusammensetzungen für Oozyten und Embryonen:

Reifungsmedium TCM 199:

TCM 199	SIGMA, M-2520	0,378 g		
NaHCO ₃	Riedel, 31437	0,055 g		
Gentamycin	SIGMA, G-3632	1,25 mg		
Ampuwa	Fresenius	25 ml		
FCS	Boehringer Mannheim 210463	2,78 g		
TCM-Stock			pH=7,3 - 7,4 durch Rühren einstellen	

vor Gebrauch jedes Mal frisch dazugeben:

TCM-Stock, s.o.		10 ml		
Follikelflüssigkeit	-----	1 ml	wird bei der Follikelpunktion gewonnen	
Follicle Stimulating Hormone (FSH)	Vetrepharm, Folltropin	11 µg		

Reifungsmedium NCSU 37:

NaCl	Riedel, 31434	3,178 g		
NaHCO ₃	Riedel, 31437	1,053 g		
KCl	Merck, 4936	0,178 g		
KH ₂ PO ₄	Riedel, 30407	0,081 g		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, 5886	0,147 g		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	SIGMA, C-7902	0,125 g		
Glucose	Riedel, 16301	0,5 g		
Sorbitol	SIGMA, S-1876	1,09 g		
Penicillin G	SIGMA, PEN-NA	0,033 g		
Streptomycin Sulfat	SIGMA, S-6501	0,025 g		
Ampuwa	Fresenius	500 ml		
NCSU 37-Stock			pH=7,4 einstellen	

Vor Gebrauch jedes Mal frisch dazugeben:

TCM-Stock, s.o.		18 ml		
Glutamin	SIGMA, G-1517	0,029 g		
Insulin	SIGMA, I-6634	0,001 g		
Cystein	SIGMA, C-7880	0,002 g		
β-Mercaptoethanol	SIGMA, M-7522	7 µl	einer Stock-Lösung: 10 µl + 990 µl Ampuwa	
Follikelflüssigkeit	s.o.	2 ml		
Epidermal Growth Factor (EGF)	SIGMA, E-4127	200 µl	einer vorverdünnten wässriger Lösung: 1 µg/1 ml	10 ng/ml

Zusätzlich werden noch folgende Komponenten direkt in die Reifungsschälchen pipettiert:

Dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP)	SIGMA, D-0627	5 µl	auf 500 µl Reifungsmedium	1,0 mM
Stutenserumgonadotropin (PMSG)	IDT Impfstoffwerk, Pregmagon	5 µl einer Stocklösg. aus	1000 IU / 1 ml PMSH+ 1000 IU / 1 ml hCG	1000 U/ml
Choriongonadotropin (hCG)	Intervet, Ovogest			1000 U/ml

Kulturmedium NCSU 23:

NaCl	Riedel, 31434	3,175 g		
NaHCO ₃	Riedel, 31437	1,053g		
KCl	Merck, 4936	0,179 g		
KH ₂ PO ₄	Riedel, 30407	0,081 g		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, 5886	0,147 g		
CaCl ₂	Merck, 2083	0,095 g		
Glucose x H ₂ O	Riedel, 16325	0,55 g		
Phenolrot	Merck, 7241	0,5 mg		
Penicillin G	SIGMA, PEN-NA	0,032 g		
Streptomycin Sulfat	SIGMA, S-6501	0,025 g		
Ampuwa	Fresenius	500 ml		
NCSU 23-Stock			pH=7,7	

Vor Gebrauch frisch dazu geben:

NCSU-Stock	s.o.	25 ml		
Glutamin	SIGMA, G-1517	3,7 mg		
Taurin	SIGMA, T-7146	0,0219 g		
Hypotaurin	SIGMA, H-1384	0,0137 g		
BSA Fraktion V	SIGMA, A-9647	0,10 g		

0,9%ige Natriumchloridlösung:

NaCl	Riedel, 31434	9 g		
Penicillin G	SIGMA, PEN-NA	0,06 g		
Streptomycin Sulfat	SIGMA, S-6501	0,131 g		
H ₂ O bidest	-----	1 l		

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung:

PBS	SIGMA, D-5773	9,65 g	in 1 l H ₂ O bidest lösen
Na-Pyruvat	SIGMA, P-4562	0,036 g	
Streptomycin Sulfat	SIGMA, S-6501	0,05 g	
Penicillin G	SIGMA, PEN-NA	0,06 g	
D-Glucose x H ₂ O	Riedel, 16325	1,10 g	
CaCl ₂	Merck, 2083	0,10 g	

Für die Verwendung muß z.B. Serum zugegeben werden:

Newborn Calf Serum (NBCS)	Boehringer Mannheim	10 ml / 100 ml	für längere Inkubation	10%
		1 ml / 100 ml	für kurze Waschschrte	1%

TCM-air:

TCM 199	SIGMA, M-2520	0,755 g		
Na-Pyruvat	SIGMA, P-4562	0,0011 g		
Gentamycin	SIGMA, G-3632	0,0025 g		
NaHCO ₃	Riedel, 31437	0,0175 g		
H ₂ O	SIGMA, W-1503	50 ml		
BSA [FAF]	SIGMA, A-7030	0,050 g		

Medium mit 1M NaOH auf pH=7,2 einstellen

Zusätze zum Kulturmedium NCSU 23 bei den Aktivierungsversuchen:

DMAP:

6-DMAP	SIGMA, D-2629	10 mg	aus DMAP und DMSO wird eine Stocklösung angesetzt
DMSO	SIGMA, D-2650	500 µl	

6-DMAP - Stocklösung	s.o.	16,3 µl		2 mM
NCSU 23	s.o.	1 ml		

Cycloheximid:

Cycloheximid	SIGMA, C-7698	1 mg	aus Cycloheximid und Ampuwa wird eine Stocklösung angesetzt
Ampuwa	Fresenius	1 ml	

Cycloheximid - Stocklösung	s.o.	10 µl		10 µg /ml
NCSU 23	s.o.	1 ml		

Thimerosal:

Thimerosal	SIGMA, T-5125	1 mg	Thimerosal wird in PBS 10% NBBS vorverdünnt
PBS 10% NBBS	s.o.	1 ml	

Thimerosal (vorverdünnt)	s.o.	160 µl		200 µM
PBS 10% NBBS		1840 µl		

DTT:

Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, D-0632	2,46 mg		8 mM
PBS 10% NBBS	s.o.	2 ml		

GSH:

Glutathion (GSH)	SIGMA, G-6013	1,54 mg		1 mM
NCSU 23	s.o.	5 ml		

Cytochalasin B:

Cytochalasin B	SIGMA, C-6762	1 mg	aus Cytochalasin B und ETHO wird eine Stocklösung angesetzt
Ethanol	CG Chemie (≥99,6%)	1 ml	

Cytochalasin B - Stocklösung	s.o.	7,5 µl		7,5 µg / ml
NCSU 23 oder PBS 10% NBBS	s.o.	1 ml	in Abhängigkeit von dem Verwendungszweck, wird das eine oder andere „Medium“ verwendet	

Färbungen:**Hoechst-Färbung**

Hoechst 33342	SIGMA, B-2261	1 mg	aus Hoechst und Ampuwa wird eine Stocklösung angesetzt
Ampuwa	Fresenius	1 ml	

Hoechst - Stocklösung	s.o.	1 µl		5µg/ml
PBS 10% NBBS	s.o.	200 µl	oder ein anderes „Medium“	

Mito Tracker:

Mito Tracker Red CMXRos	Molecular Probes, M-7512	Inhalt des Tubes	aus Mito Tracker und DMSO wird eine	
DMSO	SIGMA, D-2650	74 µl	Stocklösung 1 hergestellt	

Die folgende Lösung muß immer frisch angesetzt werden:

KCl	Merck, 4936	0,0746 g		100 mM
MgCl ₂		0,0019 g		2 mM
Tris-Cl		1 ml	einer 1 M Lösung	10 mM
EGTA	SIGMA, E-3889	0,0190 g		5 mM
bidestilliertes H ₂ O		9 ml		
KMT-Lösung		10 ml	mit 1 M NaOH auf pH=7,0	

Mito Tracker Stock	s.o.	1 µl	aus Stocklösung 1 und	
KMT-Lösung	s.o.	9 µl	KMT-Lösung wird eine	
			Stocklösung 2 hergestellt	

Mito Tracker Stocklösung 2	s.o.	1 µl		400 nM
zellhaltige Lösung, z.B.:PBS 10% NBCS		1 ml		

EDTA / Trypsin zum Entkumulieren:

Trypsin/EDTA (10x = 0,5%)	SIGMA, T-4174	10 ml		0,1%
EDTA, Titriplex III	Merck, 8418	80 mg		
PBS(-) - Lösung	SIGMA, D-5652	40 ml		
PVA	SIGMA, P-8136	50 mg		
EDTA / Trypsin		50 ml		

Hyaluronidase zum Entkumulieren:

Hyaluronidase	SIGMA, H-3506	0,1% (50µl)	in 500µl E-cups Alliquots bei -20°C	
PBS(-) - Lösung	SIGMA, D-5652			
PVA	SIGMA, P-8136			
Hyaluronidase- Alliquots			in 450µl PBS + PVA (mg/ml)	0,1%=80IE

Fusionsmedium:**Mannitol:**

Mannitol	SIGMA, M-4125	2,596 g		0,285 M
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, 5886	50 ml	einer Stocklösung	0,1 mM
CaCl ₂	Merck, 2083			0,05 mM
NBCS	Boehringer Mannheim	500 µl		1%

Mannose:

Mannose	SIGMA, M-6020	2,568 g		0,285 M
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, 5886	50 ml	einer Stocklösung	0,1 mM
CaCl ₂	Merck, 2083			0,05 mM
NBCS	Boehringer Mannheim	500 µl		1%

Agar:

Bacto-Agar	Difco, 0140-01	1,2 g		1,2%
0,9%- NaCl/Pen/Strep- Lösung	s.o.	100 g		

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Reich
Vorname	Tatjana
Geburtsdatum	14.08.1966
Geburtsort	Hannover
Wohnort	31535 Neustadt, Am Stellberg 1
Familienstand	ledig

Schul- und Hochschulausbildung:

08.72 - 06.78	Grundschule in Bordenau und Orientierungsstufe in Neustadt
08.78 - 06.86	Gymnasium in Neustadt mit Abschluß allg. Hochschulreife
08.86 – 06.88	Ausbildung zur „Staatlich geprüften chemisch-technischen Assistentin (CTA)“ an der Berufsbildenden Schule 22 in Hannover
10.88 – 06.95	Studium zur Diplom-Chemikerin an der Universität Hannover
07.95 – 01.96	Diplomarbeit im Institut für Technische Chemie bei Frau PD Dr. G. Kretzmer, Abteilung BIOTECHNOLOGIE <i>Thema: Untersuchung zur Scherstreßempfindlichkeit von rekombinanten CHO-Zellen unter Berücksichtigung relevanter Stoffwechselfparameter</i>
03.97 – 04.97	Laborpraktikum im Institut Klinische Molekularpharmakologie der MHH bei Frau Prof. Dr. Szamel
05.97 – 07.97	Laborpraktikum in der Hautklinik Linden der Landeshauptstadt Hannover bei Herrn PD Dr. T. Werfel
02.98 – 12.2000	Anstellung bei der MHH und Einsatz im SFB 265 in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL) im Institut für Tierzucht und Tierverhalten – Abteilung BIOTECHNOLOGIE - in Mariensee mit der Möglichkeit zur Promotion <i>Thema: Entwicklung eines Kerntransferverfahrens für das porcine System als Grundlage für weiterführende medizinische Anwendungen</i>