

1. Einleitung

Seit Mitte der 70iger Jahre ist es möglich, Schweineembryonen in vitro zu erzeugen. Nachdem zunächst aus in vivo gereiften Oozyten Nachkommen über Embryotransfer erzeugt wurden, können mittlerweile auch aus in vitro gereiften Oozyten lebende Ferkel produziert werden.

In vitro erzeugte Embryonen haben bei landwirtschaftlichen Nutztieren sehr unterschiedliche Bedeutung. Einerseits ist die In-vitro-Produktion eine hilfreiche Methode, um von besonders wertvollen Ejakulaten Nachkommen zu erzeugen, z. B. im Rahmen von Programmen zur Erhaltung tiergenetischer Ressourcen, wenn nur wenige Spermien zur Verfügung stehen bzw. Methoden der Nachkommenerzeugung sowohl für den männlichen als auch weiblichen Paarungspartner nicht existieren. Auch für besondere Spermienpräparationen, wie z.B. der geschlechtsspezifischen Trennung von Samenzellen, ist die In-vitro-Produktion ein geeignetes Mittel.

Ein vollkommen anderer Einsatzbereich, der insbesondere mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Marienseer Computerized Time-Lapse-System (MCTLS) zur Geltung kommt, ist die Prüfung von Substanzen auf deren embryotoxischen Eigenschaften, die sich sowohl in morphologischer als auch funktioneller Hinsicht äußern können. Damit steht ein sensibles Verfahren zur Verfügung, das zur Reduzierung von Tierversuchen in vielerlei Hinsicht beitragen kann.

Die vorliegende Arbeit soll zwei Anwendungsaspekte mit einem Time-Lapse-System überprüfen. Zum einen soll geklärt werden, wie sich Entwicklungsprozesse von in vivo und in vitro erzeugten Schweineembryonen unterscheiden und inwieweit die morphologischen Entwicklungsprofile von männlichen und weiblichen Schweineembryonen in ihren zeitlichen Abläufen möglicherweise voneinander differieren. Hierzu werden die in Mariensee etablierten Verfahren zur Spermientrennung, In-vitro-Produktion und In-vitro-Kultivierung im Time-Lapse-System miteinander kombiniert. In einem zweiten Schritt, der aber nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, erfolgen molekulare Analysen der verschiedenen Embryonalstadien in Anlehnung an die von Wrenzycki et al. (1998; 1999) und Augustin et al. (2001) berichteten Untersuchungen am Rinderembryo.

2. Schrifttum

2.1. Präimplantatorische Entwicklung von Säugetierembryonen

2.1.1. Entwicklungsverlauf präimplantatorischer Schweineembryonen bis zum Stadium der geschlüpften Blastozyste

Nach der Befruchtung der ovulierten Oozyte finden wesentliche morphologische und chemische Entwicklungsprozesse innerhalb des Embryos statt. Die ersten Zellteilungen erfolgen innerhalb der Zona pellucida, ohne dass die Zellmasse zunimmt (McLaren, 1972) und der Gesamtdurchmesser des Embryos sich bis zum Blastozystenstadium verändert (Lindner und Wright, 1983). Es handelt sich bei den ersten Entwicklungsschritten um total äquale Teilungen, bei denen die entstehenden Blastomere eine geringere Masse aufweisen als die Ursprungszelle, was auch als negatives Wachstum bezeichnet wird (Schnorr, 1989; Bearden und Fuquay, 1992). Frühe Teilungsstadien wurden nach der Anzahl der Zellen benannt und somit eindeutig definiert. Dies ist optisch maximal bis zum 16-Zeller möglich. Insbesondere bei Schweineembryonen ist bereits ab dem Achtzellstadium eine teilweise Kompaktierung zu beobachten, die eine klare Differenzierung der Zellgrenzen unmöglich macht. Es erfolgt ab diesem Stadium eine spezifische Einteilung nach definierten, morphologischen Eigenschaften:

- **Morulastadium:**

Es liegen mehr als 16 Blastomere vor, deren einzelne Konturen nicht mehr zu erkennen sind. Der perivitelline Raum wird überwiegend von der Embryonenmasse ausgefüllt.

- **Kompaktierte Morula:**

32 bis 64 Blastomere sind in einem festen, regelmäßigen Zellverband vorhanden, wobei die Zellgrenzen nicht erkennbar sind. Trophoblastzellen sind gleichgroß und ihr Zytoplasma ist gleichmäßig, feinkörnig granuliert.

- **Frühe Blastozyste:**
Der Embryo beginnt einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastozoele) zu bilden, wobei die Trophoblastzellen noch nicht abgeflacht erscheinen.
- **Blastozyste:**
Die Embryonenmasse zeigt deutlich einen zentralen, flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastozoele) auf. Die Trophoblastzellen sind abgeflacht.
- **Expandierte Blastozyste:**
Der Embryonendurchmesser ist deutlich vergrößert, die Zona pellucida sehr dünn und es liegt ein großes Blastozoele vor. Die Trophektodermzellen sind deutlich von der inneren Zellmasse abgegrenzt.
- **Schlüpfende Blastozyste:**
Die Zona pellucida reißt auf und der Embryo entweicht aus der ihn umgebenden Hülle.
- **Geschlüpfte Blastozyste:**
Der Embryo ist vollständig aus der Zona pellucida geschlüpft. Embryoblast und Trophoblast sind deutlich voneinander unterscheidbar.

(Freitag, 1998)

Der zeitliche Ablauf der Furchungen und Teilungen ist tierartspezifisch und ist als Übersicht in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Zellteilungen der frühen Embryonalentwicklung

	1. Teilung	2. Teilung	Eintritt in den Uterus		Morula	Blastozyste	Schlupf aus der Zona
Spezies	Std.*	Std.*	Std.*	Stadium	Tag*	Tag*	Tag*
Pferd	24	30-36	140-144	Blastozyste	6	8	8
Rind	20-24	32-36	72-84	8-16-Zeller	5-6	7-8	9-11
Schaf/Ziege	16-18	28-30	66-72	8-16-Zeller	4-5	5-6	7-8
Schwein	14-16	20-24	46-48	4-Zeller	3-4	5	6

* nach Befruchtung

(Niemann und Meinecke; 1993)

Ca. 14-16 Stunden nach der Befruchtung teilt sich die Zygote zum ersten Mal und der Schweineembryo tritt in das ca. sechs bis acht Stunden dauernde Zweizellstadium ein (Hunter, 1974, 1991). Die ersten Zellstadien beim Schweineembryo unterscheiden sich wesentlich von den weiteren Teilungsstadien, da in der frühen Phase der Entwicklung keine RNA-Synthese innerhalb der Zellen stattfindet (Telford et al., 1990). Das sich anschließende Vierzellstadium kann in vivo bis zu 48 Stunden andauern, wobei beim Schweineembryo die Aktivierung des embryonalen Genoms bzw. die Neusynthese embryonaler RNA ca. 60 Stunden nach der ovulationsauslösende hCG-Gabe zu beobachten ist (Laurincik et al., 1993; Hyttel et al., 2000a). Gleichzeitig tritt der Embryo in dieser Entwicklungsphase in vivo vom Eileiter in den Uterus über (Murray et al., 1971; Hunter, 1974; Brüssow, 1985; Bavister, 1988a; Hunter, 1991). Bis zu diesem Stadium verlaufen die Zellteilungen synchron, so dass im Vierzellstadium vier gleichgroße Blastomere tetraederförmig aufeinander liegen (Michel, 1983). Teilweise ist bereits hier eine Kompaktierung zu beobachten, in der die Zellen abflachen und sich polar anordnen (Checiu et al., 1990). Alle weiteren Teilungen können durchaus asynchron verlaufen, und daher zeitweise 5-, 6- bzw. 7-Zeller auftreten (Marrable, 1971; Hunter, 1974). Gleichzeitig nimmt die Größe der einzelnen Blastomere ab, so dass Zellgrenzen voneinander nicht mehr zu unterscheiden sind (Hunter, 1974). Da der Embryo innerhalb der Zona pellucida das Aussehen einer Maulbeere hat, wird dieses Stadium als Morulastadium bezeichnet. In vivo ist der Schweineembryo in diesem Stadium am dritten bis vierten Tag nach der Befruchtung im Uterus nachzuweisen (Niemann und Meinecke, 1993). Zum Zeitpunkt der Morulabildung beginnt die Differenzierung der Zellen in die innere Zellmasse (Inner cell mass = ICM) und den außen gruppierten Trophektodermzellen (TE), aus denen sich der spätere Embryo entwickelt (Papaioannou und Ebert, 1988; Van Soom et al., 1997a).

Durch Flüssigkeitsansammlung zwischen den Trophektodermzellen und der inneren Zellmasse wird letztendlich eine Höhle, das Blastozoele, ausgebildet (McLaren, 1972; Michel, 1983; Schnorr, 1989). Die Ausbildung des Blastozoeles ist überwiegend ein Resultat des Ionentransportes durch das Trophektoderm (Zhao et al., 1997). Dieser Vorgang hängt weniger von der Größe des Embryos oder der Zellzahl ab, vielmehr von der Zeitspanne im Bezug auf die Befruchtung. Werden in der frühen Embryonalphase drei von vier Blastomere zerstört, findet eine Blastulation zum

gleichen Zeitpunkt, ca. fünf Tage nach der Befruchtung (Barends et al., 1989), statt, wie sie bei einer normalen Embryonenentwicklung zu beobachten ist (McLaren, 1972; Parrish und First, 1993). Die Entwicklung zur expandierten Blastozyste erfolgt durch einen aktiven Transport von Flüssigkeit aus dem Uteruslumen mittels Natrium-Kalium-Pumpe (Watson, 1992). Während das Volumen des Blastozoels sich vergrößert, flachen die Trophektodermzellen ab und der Embryo vergrößert sich durch Expansion (McLaren, 1972; Michel, 1983; Schnorr, 1989). In der weiteren Entwicklung schlüpft der Embryo aus der ihn umgebenden Zona pellucida. Die Funktionsweise dieses Vorgangs ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird, dass in vivo maternale Enzyme die Zona pellucida andauen (Bavister, 1995; Lin et al., 2001), die Blastozyste aktiv schlüpft (Lin et al., 2001), oder ein Teil der Trophoblastzellen als sogenannte „zona-breaker“-Zellen fungieren, die eine Sollbruchstelle der Zona markieren (Sathananthan et al., 2003). In vitro wird überwiegend der mechanische Druck des expandierenden Embryos für ein einreißen der Zona verantwortlich gemacht. Möglich wäre ebenfalls, dass Enzyme, die der Embryo bildet, die Zona pellucida dünner und brüchig werden lassen (Lindner und Wright, 1978; Parrish und First, 1993).

2.1.2. Genomaktivierung und der Übergang von der mütterlichen zur embryonalen Kontrolle im präimplantatorischen Embryo

Während des Oozytenwachstums und der Reifung werden oogenetische Produkte synthetisiert und gespeichert. Diese Produkte unterstützen die Entwicklung der Zygote nach der Fertilisation. Erst wenn das Embryonengenom transkriptionell aktiv wird (de novo Synthese), wird die Embryonenentwicklung durch den Embryo selbst gesteuert. Somit steht die frühe Säugetierentwicklung unter dem Einfluss maternaler mRNA, (Barnes und Eyerstone, 1990; Bilodeau-Goeseels und Schultz, 1997; Memili und First, 1998; Memili et al., 1998), die während der Oozytenentwicklung vom mütterlichen Genom transkribiert und in der Oozyte gespeichert wurde (Wassermann, 1988; Hunter, 1991; Hyttel et al., 1993; Meirelles et al., 2004). Obwohl die Funktionsweise des Übergangs von der mütterlichen zur Embryonenkontrolle (MET) bis dato nicht vollständig geklärt ist (Memili et al., 1998) ist es offensichtlich, dass dieser durch einen graduellen Abbau mütterlicher RNA und gespeicherten

Proteinen sowie der Aktivierung des embryonalen Genoms (Pavlok et al., 1993) charakterisiert wird. Wesentlich hierfür ist, dass die Embryonengenomaktivierung durch Translation mütterlicher RNA initiiert wird (Hamatani et al., 2004). Wird dieser Übergang bzw. die Initiierung von der mütterlichen zur embryonalen Kontrolle unterbrochen, findet keine vollständige Entwicklung des Embryos statt (King et al., 1988; Kopecny et al., 1989a; Tomanek et al., 1989; Schultz et al., 1995; De Sousa et al., 1998; Memili und First, 1999; Meirelles et al., 2004). Die Umstellung von der maternalen zur embryonalen Kontrolle geht mit einer hohen transkriptionellen Aktivität des Embryonengenoms und einem abrupten, qualitativen Umschwung der Proteinsynthese einher. Diese Entwicklungsphase reagiert sensibel auf Hemmstoffe der Transkription, z.B. α -Amanitin (Kopecny et al., 1989a,b; Telford et al., 1990; Schultz und Heyner, 1992). Trotz eines solchen Hemmstoffes konnte eine Entwicklung von Rinderembryonen bis zum 16-Zellstadium und Schweineembryonen bis zum Vierzellstadium beobachtet werden, dennoch fehlte eine Entwicklung über dieses Stadium hinaus (Barnes und First, 1991; Schoenbeck et al., 1992; Plante et al., 1994; Memili und First, 1998). Dies lässt vermuten, dass die aus der Oogenese stammenden Syntheseprodukte ausreichend für eine Entwicklung des Embryos bis zum Zeitpunkt kurz nach der normalerweise stattfindenden Embryonengenomaktivierung sind (Plante et al., 1994). Interessanterweise konnten Barnes und First (1991) im Gegensatz zu Plante et al. (1994), beobachten, dass die Teilungsraten der Embryonen in Anwesenheit von α -Amanitin höher waren als ohne den RNA-Polymerase-Hemmer. Barnes und First (1991) sprachen dem Hemmstoff somit eine entwicklungsfördernde Eigenschaft zu. Wahrscheinlicher ist aber, dass die embryonale Transkription Zeit benötigt, die durch die Hemmung der entsprechenden RNA-Polymerase nicht in Anspruch genommen wurde. Weiterhin ist denkbar, dass durch die künstliche Inaktivierung der Transkription entwicklungshemmende Stoffe nicht gebildet werden konnten.

Der Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms ist artspezifisch und geht vermutlich mit der Prolongation des Zellzyklus einher (Plante et al., 1994). Im allgemeinen wurde beobachtet, dass embryonale Transkripte bei der Maus und der Ratte im Ein- bis Zweizellstadium (Szollosi, 1966; Flach et al., 1982; Bolton et al., 1984; Genskens und Alexandre, 1984; Schultz, 1993; Aoki et al., 1997; Zeng et al., 2004), beim Schwein und Menschen im Vierzellstadium (Braude et al., 1988;

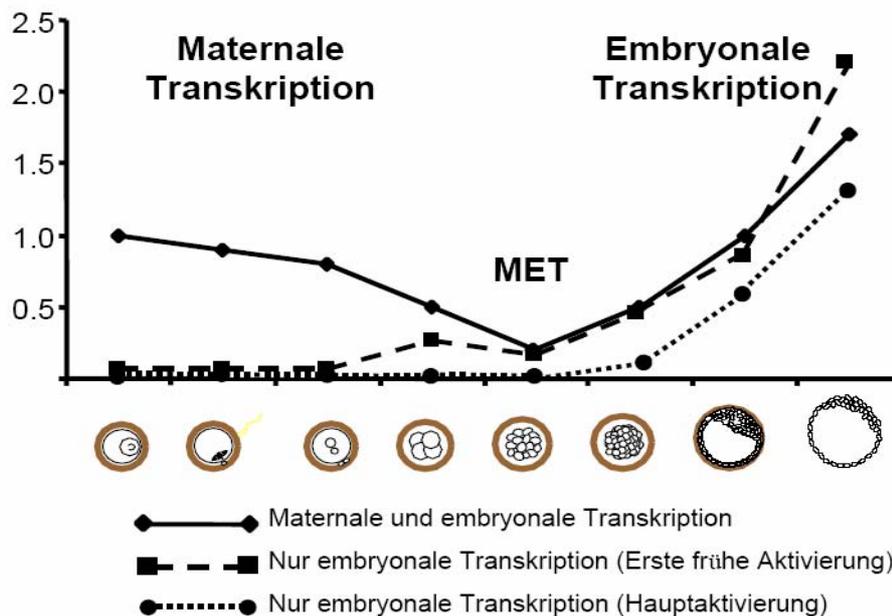
Tomanek et al., 1989; Kopecny et al., 1989a,b; Hyttel et al., 2000a,b; Maddox-Hyttel et al., 2001), beim Rind im Vier- bis Achtzellstadium (Camous et al., 1986; Frei et al., 1989; Antalikova und Fulka, 1990; Barnes und First, 1991; Viuff et al., 1992; Hyttel et al., 2000c; Kanka et al., 2003) und im Achtzellstadium beim Schaf (Crosby et al., 1988) sowie beim Kaninchen (Manes, 1971; Van Blerkom und Manes, 1974; Pacheco-Trigon et al., 2002) vorliegen. Eine gute Übersicht über Ablauf und Funktionsweise des Übergangs von der maternalen zur embryonalen Kontrolle zeigte Schultz (2002) am Beispiel der Maus.

Interessant sind Parallelen zum oft beobachteten Entwicklungsblock bei der Kultivierung von Säugetierembryonen in vitro. Dieser scheint chronologisch mit der Genomaktivierung des Embryos verbunden zu sein (Plante et al., 1994; Viuff, 2002). Einige Untersuchungen am Rinderembryo konnten belegen, dass eine teilweise Genomaktivierung schon vor der Hauptaktivierung des Embryonengenoms geschieht (Viuff et al., 1992; Plante et al., 1994; Hyttel et al., 1996; Viuff et al., 1996; Memili et al., 1998; Hay-Schmidt et al., 2001). Baran et al. (1996) stellten fest, dass die Genomaktivierung in den Blastomeren von Rinderembryonen nicht einheitlich ablief, sondern bei einigen vor und bei anderen nach dem Achtzellstadium eine Aktivierung zu beobachten war. Die Blastomere stellten somit keine homogene Gruppe zu diesem Entwicklungszeitpunkt dar. In Verbindung mit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen kann vermutet werden, dass die Genomaktivierung innerhalb des Rinderembryos kein abrupter, sondern ein gradueller Vorgang ist (Thompson, 1996; Hyttel et al., 2000c) und aus einer frühen geringen Transkriptionsaktivität und einer darauf folgenden hohen Aktivierung des embryonalen Genoms (Thompson, 1996) besteht. Hierbei steigt die Transkriptionsaktivität der Rinderembryonen mit fortlaufender Entwicklung stufenweise an (Barnes und First, 1991; Hyttel et al., 1996; Viuff et al., 1996; Viuff et al., 1998; Natale et al., 2000; Hay-Schmidt et al., 2001). Dennoch konnte in keiner der Untersuchungen ein genauer Zeitpunkt der ersten Genomaktivierung festgelegt werden.

Erfolgte keine Aktivierung des embryonalen Genoms, so war keine Reduzierung der maternalen Proteinsynthese innerhalb des Embryos zu beobachten. Die embryonale Genomtranskription ist damit ein wesentlicher Faktor in der Regulierung der Transkription maternalen Einlagerungsprodukte. Die ersten Zellzyklen des Embryos

werden somit durch maternale und ab der Embryonengenomaktivierung überwiegend durch embryonale Transkripte gesteuert (Freitag et al., 1991; Jarrell et al., 1991; Schoenbeck et al., 1992; DeRenzo und Seydoux, 2004). Neuere Untersuchungen identifizierten ein oozytenspezifisches, maternales Gen (Zar 1), das im Übergang von der mütterlichen zur embryonalen Kontrolle involviert ist (Wu et al., 2003) und vor der Hauptaktivierung des Embryonengenoms transkribiert wird (Brevini et al., 2004). Hierbei übernimmt der Übergang von der maternalen zur embryonalen Transkription drei wesentliche Funktionen in der präimplantatorischen Embryonenentwicklung. Neben dem Abbau oozytenspezifischer Transkripte, z.B. das RNA-Bindungsprotein MSY2 (Yu et al., 2001), werden maternale Transkripte durch embryonale ersetzt, die wesentlich für die weitere embryonale Entwicklung sind und in der Oozyte nicht ausgebildet wurden (Latham et al., 1992), sowie gänzlich neue Transkripte gebildet.

Abb. 1: Beispiel für den Verlauf des Expressionsmusters maternaler und embryonaler Transkripte beim Rind



Da Schweineembryonen vor dem Vierzellstadium keine messbare RNA-Synthese aufwiesen (Tomanek et al., 1989; Freitag et al., 1991; Jarrell et al., 1991; Schoenbeck et al., 1992; Prather, 1993; Hyttel., et al., 2000b; Maddox-Hyttel, 2001; Viuff et al., 2002), kann der Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung auf das Vierzellstadium determiniert werden (Hyttel et al., 2000a,b; Viuff et al., 2002). Freitag et al.(1991) untersuchten am Schweineembryo die ^3H -Uridin-Aufnahme in die RNA

als Maßstab für die RNA-Synthese im präimplantatorischen Embryo. Konnte im Zweizellstadium keine RNA-Synthese festgestellt werden, so wurde im Vierzellstadium durch die ^3H -Uridin-Aufnahme eine de novo Synthese embryonaler RNA angezeigt. Der Anstieg der ^3H -Uridin-Aufnahme vom Vierzell- bis zum Morulastadium zeigte, dass der sich entwickelnde Embryo eine Vielzahl neu transkribierter Substanzen für die Entwicklung benötigte (Freitag et al., 1991). Als weiterer indirekter Marker der ribosomalen RNA (rRNA) Genaktivierung wird die Nucleolusformation innerhalb des Schweineembryos angesehen (Maddox-Hyttel et al., 2001; Hyttel, 2001; Viuff et al., 2002; Laurincik et al., 2004), die parallel zu weiteren Gentranskriptionen stattfindet (Maddox-Hyttel et al., 2001) und frühestens im Vierzellstadium zu beobachten ist (Hyttel et al., 2000b). Dabei kann in vitro die Entwicklung eines funktionellen Nukleus durchaus verzögert auftreten (Laurincik et al., 2004). Daher wird beim Schwein davon ausgegangen, dass die Entwicklung erst ab dem Vierzellstadium durch den Embryo selbst gesteuert wird (Tomanek et al., 1989; Freitag et al., 1991; Jarrell et al., 1991; Hyttel et al., 2000a). Da sich durch neuere Untersuchungen mit genaueren Messmethoden bei einigen Säugetieren (z.B. Rind) geringe Mengen an Transkripten schon in früheren Stadien nachweisen lassen (Viuff et al., 1992; Plante et al., 1994; Viuff et al., 1996; Memili et al., 1998), ist nicht auszuschließen, dass die Erkennung des Zeitpunktes der Genomaktivierung abhängig von der Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens ist (Schultz, 1993; Yadav et al., 1993).

2.2. In-vitro-Produktion von Embryonen

2.2.1. Reifung und Befruchtung

Für die In-vitro-Produktion von Schweineembryonen werden überwiegend Oozyten aus in vivo gereiften Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) (Pavlok, 1981; Yoshida, 1987; Ding et al., 1992; Coy et al., 1993) oder unreife Oozyten aus peri- oder präpuberalen Jungsauen genutzt (Nagai et al., 1984; Park et al., 1990; Wang et al., 1991; Funahashi und Day, 1993; Grupen et al., 1995).

Zur Gewinnung in vivo gereifter Oozyten hat sich die hormonelle Stimulation von präpuberalen Jungsauen zur genaueren Terminierung der Ovulation und der