

**Einfluss von Anti-Inhibin und
Kokultursystemen auf die In-vitro-
Maturation und Befruchtung von
Schweineeizellen**

Manuela Ropeter-Scharfenstein

**Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Universität Göttingen**

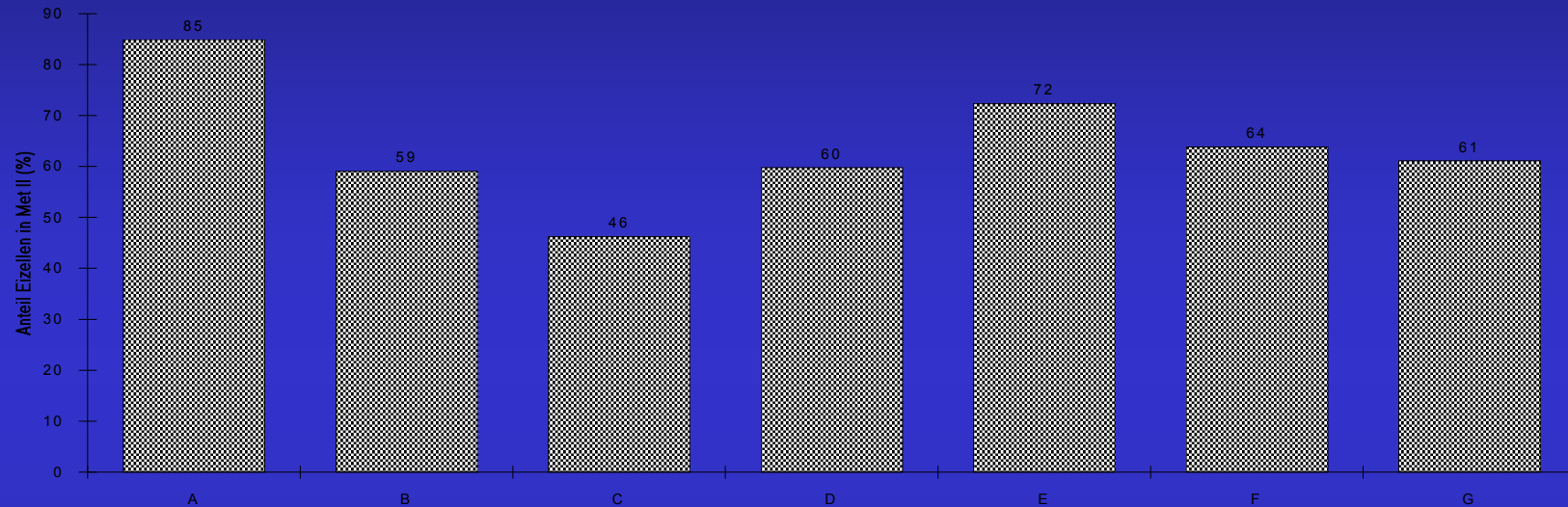
Ziele :

- Beurteilung des Einflusses von Anti-Inhibin auf die In- vitro-Reifung von Schweineeizellen
- Beurteilung der Effizienz von Feederlayer
- Erarbeitung von Methoden zur sicheren Klassifizierung von Eizellen und Embryonen des Schweins.

Eigenschaften von Inhibin

- Inhibin wird im Follikel von den Granulosazellen synthetisiert und akkumuliert in der Follikelflüssigkeit.
- Inhibin ist ein Glykoprotein, das aus zwei disulphid gebundenen Untereinheiten, einer alpha und einer beta-Kette besteht.
- Inhibin wirkt negativ rückkoppelnd auf die FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse.

Anteil (%) der MII Eizellen nach der Reifung in unterschiedlich supplementierten Medien.



A: 10% Porcine Follikelflüssigkeit

B: 10% Fetales Kälberserum

C: 10% Inaktiviertes Ziegen Serum

D: 9% Inaktiviertes Ziegen Serum +1% Anti-

E: 9.9% Inaktiviertes Ziegen Serum +0.1% Anti-

F: 9% Inaktiviertes Ziegen Serum +1%

G: 9.9% Inaktiviertes Ziegen Serum +0.1% akt.

Wirkungsspektrum von Feederlayern:

- Produktion von mitogenen Substanzen
- Förderung der embryonalen Zelldifferenzierung
- Aufnahme embryotoxischer Substanzen
- Entfernung embryosuppressiver Substanzen

Wirkungsspektrum von Eileiter- und BRL Feederlayern

- Sezernierung von spezifischen Wachstumsfaktoren: IGF-1, IGF-2, EGF
- Sezernierung von unspezifischen Wachstumsfaktoren
- Verbesserung der Kumulusexpansion
- Verhinderung von Polyspermie
- Sezernierung von Hyaluronsäure, somit embryovitalitätsfördernd
- Sezernierung von Taurin, Hypotaurin, Glycin
- Reduktion der Sauerstoffkonzentrationen
- Embryotropie und embryoregulierende Faktoren
- Sezernierung von LIF, TGF
- Sezernierung von Multiplication stimulating activity factor (MSA), unterstützt die Proliferation serumabhängiger Zellen

Versuchsaufbau zur In-vitro-Maturation

Gruppe	Serum	Feederlayer
1	10% pFF	ohne Feeder
2	10% pFF	mit Eileiter
3	10% pFF	mit BRL
4	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder
5	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter
6	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL
7	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder
8	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter
9	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL
10	ohne Serum	ohne Feeder
11	ohne Serum	mit Eileiter
12	ohne Serum	mit BRL

Tab. 1a: Einfluss von Feederlayer und Anti-Inhibin auf die nukleare Reifung von Schweineoozyten

Gruppe	n	Serum	Feederlayer	MII (%)
1	103	10% pFF	ohne Feeder	78,3
2	116	10% pFF	mit Eileiter	85,1
3	95	10% pFF	mit BRL	87,9
4	96	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder	68,9
5	93	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter	80,8
6	97	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL	78,4
7	71	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder	63,2
8	98	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter	73,6
9	94	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL	70,0
10	100	ohne Serum	ohne Feeder	39,8
11	74	ohne Serum	mit Eileiter	78,7
12	109	ohne Serum	mit BRL	78,9

Tab. 1b: Einfluss von Feederlayer auf die nukleare und zytoplasmatische Reifung von Schweineoozyten (Teilung)

Gruppe	n	Serum	Feederlayer	Teilung (%)
1	210	10% pFF	ohne Feeder	26,4
2	220	10% pFF	mit Eileiter	24,8
3	191	10% pFF	mit BRL	30,9
4	205	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder	26,9
5	193	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter	30,1
6	186	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL	38,3
7	200	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder	31,8
8	190	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter	28,9
9	158	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL	28,6
10	203	ohne Serum	ohne Feeder	20,5
11	180	ohne Serum	mit Eileiter	30,1
12	181	ohne Serum	mit BRL	27,7

Tab. 2a: Klassifizierung der nuklearen und zytoplasmatischen Reifung: Teilung

Gruppe	n	Serum	Feederlayer	Teilung (%)
1	124	10% pFF	ohne Feeder	30,6
2	137	10% pFF	mit Eileiter	27,2
3	117	10% pFF	mit BRL	28,1
4	110	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder	27,9
5	120	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter	34,6
6	108	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL	38,9
7	119	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder	27,7
8	116	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter	28,9
9	84	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL	34,5
10	124	ohne Serum	ohne Feeder	23,6
11	101	ohne Serum	mit Eileiter	37,4
12	111	ohne Serum	mit BRL	33,6

Tab. 2b: Klassifizierung der nuklearen und zytoplasmatischen Reifung: Vitalität

Gruppe	n	Serum	Feederlayer	Vitale Emb. (%)
1	124	10% pFF	ohne Feeder	92,1
2	137	10% pFF	mit Eileiter	95,5
3	117	10% pFF	mit BRL	93,8
4	110	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder	91,5
5	120	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter	93,9
6	108	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL	89,4
7	119	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder	89,2
8	116	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter	92,8
9	84	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL	96,1
10	124	ohne Serum	ohne Feeder	87,2
11	101	ohne Serum	mit Eileiter	95,1
12	111	ohne Serum	mit BRL	92,2

Tab. 2c: Klassifizierung der nuklearen und zytoplasmatischen Reifung: Nukleusnachweis

Gruppe	n	Serum	Feederlayer	>1 Kern (%)
1	124	10% pFF	ohne Feeder	36,5
2	137	10% pFF	mit Eileiter	48,4
3	117	10% pFF	mit BRL	48,7
4	110	9% pFF + 1% Anti-In.	ohne Feeder	27,3
5	120	9% pFF + 1% Anti-In.	mit Eileiter	50,3
6	108	9% pFF + 1% Anti-In.	mit BRL	39,8
7	119	9% pFF + 1% ZS aktiv	ohne Feeder	24,1
8	116	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit Eileiter	43,9
9	84	9% pFF + 1% ZS aktiv	mit BRL	49,9
10	124	ohne Serum	ohne Feeder	19,9
11	101	ohne Serum	mit Eileiter	54,2
12	111	ohne Serum	mit BRL	44,2

Tab.3: Einfluss von Feederlayern auf Teilung, Vitalität und Nukleusbildung

Gruppe	Maturation	Kultur	n	geteilt (%)	lebend (%)	>1 Kern (%)
1	BRL + pFF	BRL	72	65,6	83,7	77,9
2	BRL + pFF	Eileiter	71	55,4	85,8	74,6
3	BRL + pFF	ohne Feeder	68	32,6	66,7	60,1
4	Eileiter + pFF	BRL	77	44,0	78,5	61,9
5	Eileiter + pFF	Eileiter	84	47,1	84,1	74,7
6	Eileiter + pFF	ohne Feeder	72	38,9	81,7	31,2
7	ohne Feeder	BRL	87	48,1	73,9	39,7
8	ohne Feeder	Eileiter	75	44,3	65,8	59,2
9	ohne Feeder	ohne Feeder	80	18,2	47,6	25,2

Tab. 4: Einfluss von Eileiterfeederlayer

Gruppe	Maturation	Kultur	n	geteilt (%)	lebend (%)	>1 Kern (%)
1	Eileiter + pFF	mit Eileiter	128	42,9	87,6	56,2
2	Eileiter + pFF	ohne Feeder	129	32,2	89,1	44,1
3	ohne Feeder	mit Eileiter	130	42,2	72,8	34,0
4	ohne Feeder	ohne Feeder	127	45,9	50,0	19,4

Schlussfolgerungen:

- An Ziegenserum gekoppeltes Anti-Inhibin hat nur einen geringen Einfluss auf IVM und Befruchtung.
- Der Einsatz von Feederlayer hat sich als positiv erwiesen.
- Der Nutzen von Feederlayersystemen wird potenziert, wenn im homologen System gearbeitet wird (z.B.: Eileiterfeeder in Maturation und Kultur).

Kritische Bemerkungen:

- Der Antikörper gegen Inhibin sollte in aufgereinigter Form (ohne Einfluss von ZS) eingesetzt werden.
- Die Arbeit mit Feederlayern stellt höchste Ansprüche an die Kulturbedingungen, liefert aber dementsprechend extrem gute Ergebnisse.
- Der Nachweis „echter“ Embryonen durch die Geburt lebender Ferkel ist nicht gelungen.

Abb.1: Ausgezeichnet , gut, mäßig expandierte Kumulus- Oozyten-Komplexe, sowie eine Oozyte ohne Expansion des Kumulus oophorus (Vergrößerung 100x).

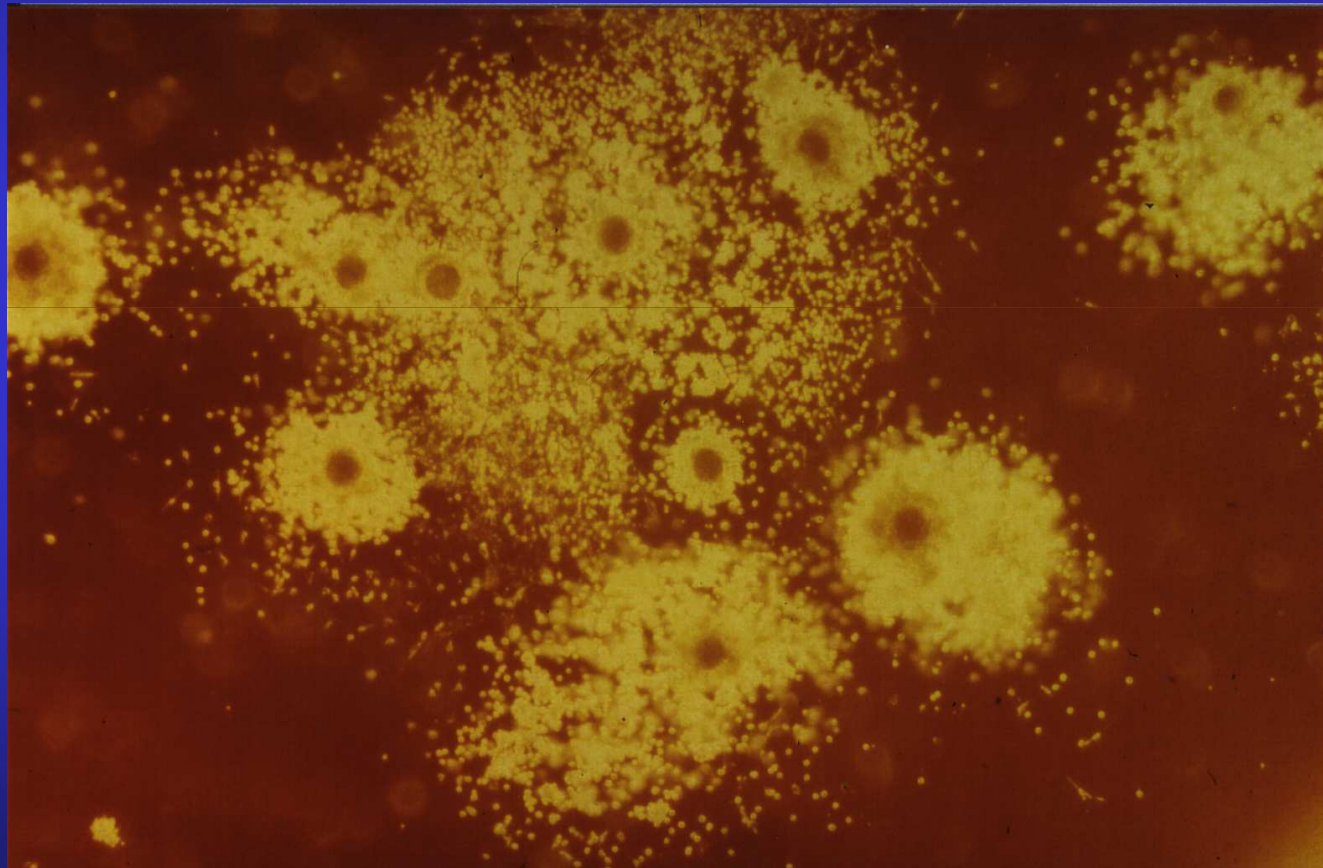


Abb. 2: Mit Giemsa angefärbte Oozyte in der Metaphase II; Links degenerierter Chromosomensatz, der als Polkörperchen ausgeschleust wird, rechts intakter Chromosomensatz der Oozyte (Vergrößerung 1000x ; Balken = 50µm).

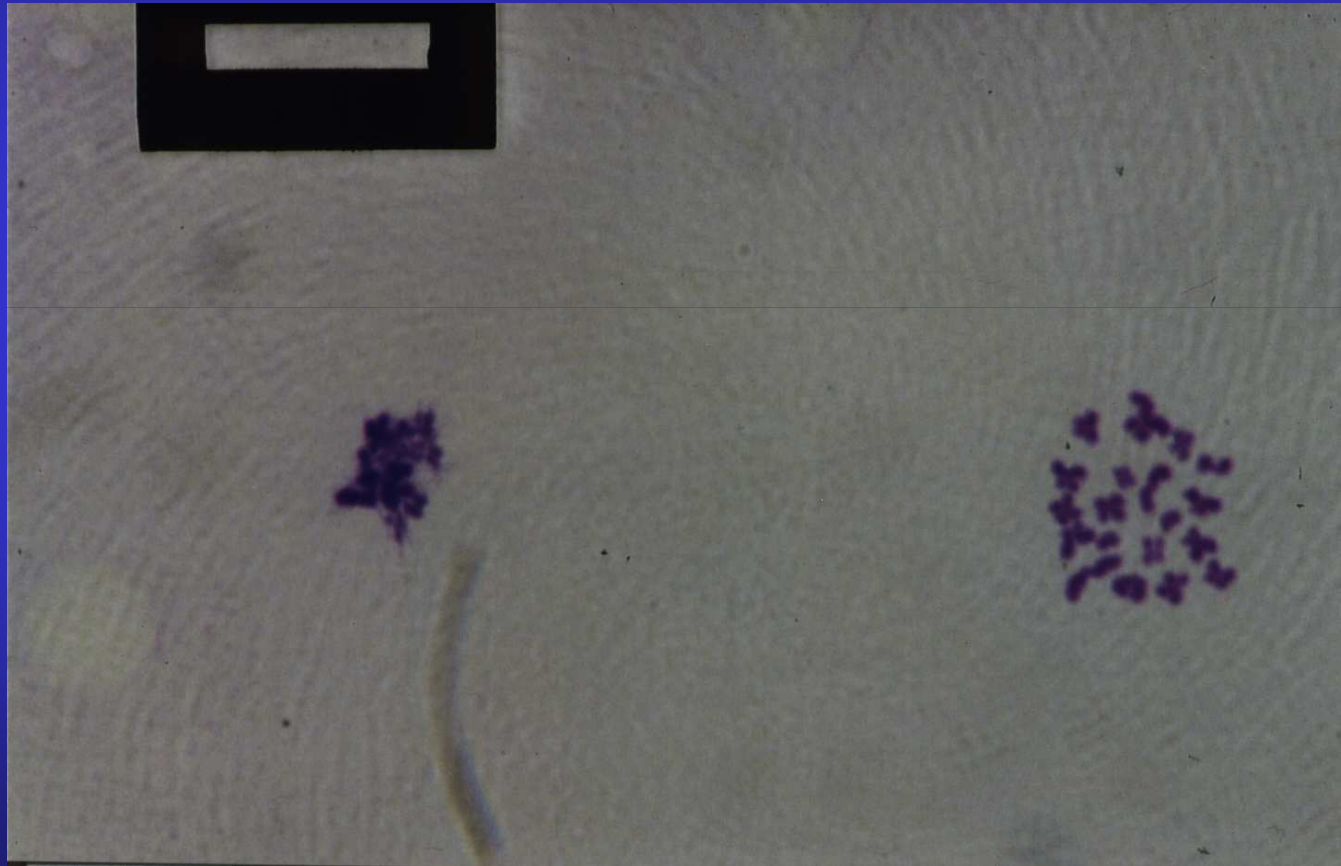


Abb. 3: Germinal vesicle, GV, Keimbläschenstadium. Deutlich sind der Nucleus und Nucleolus der Oozyte zu erkennen (Vergrößerung 400x; Balken = 50µm).

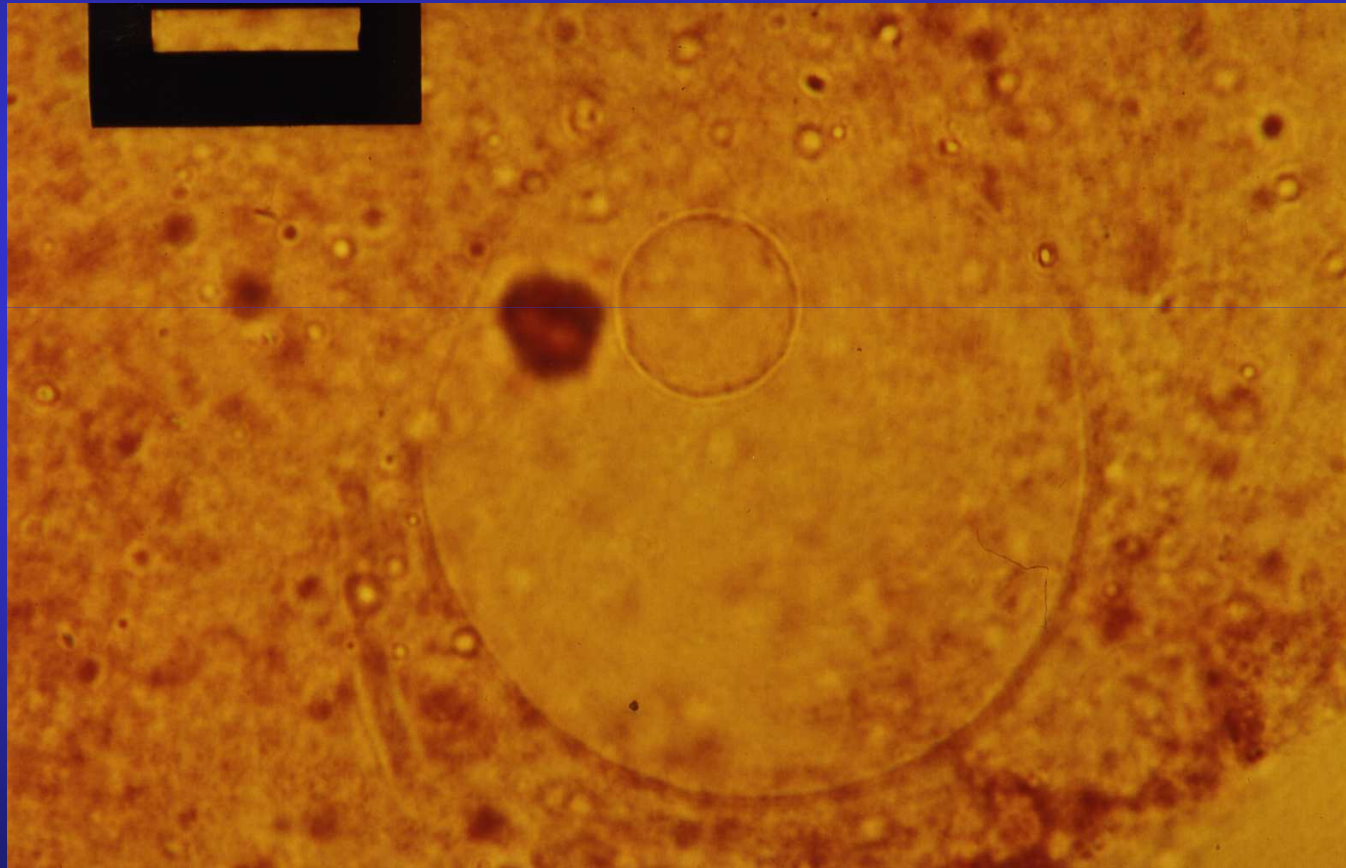
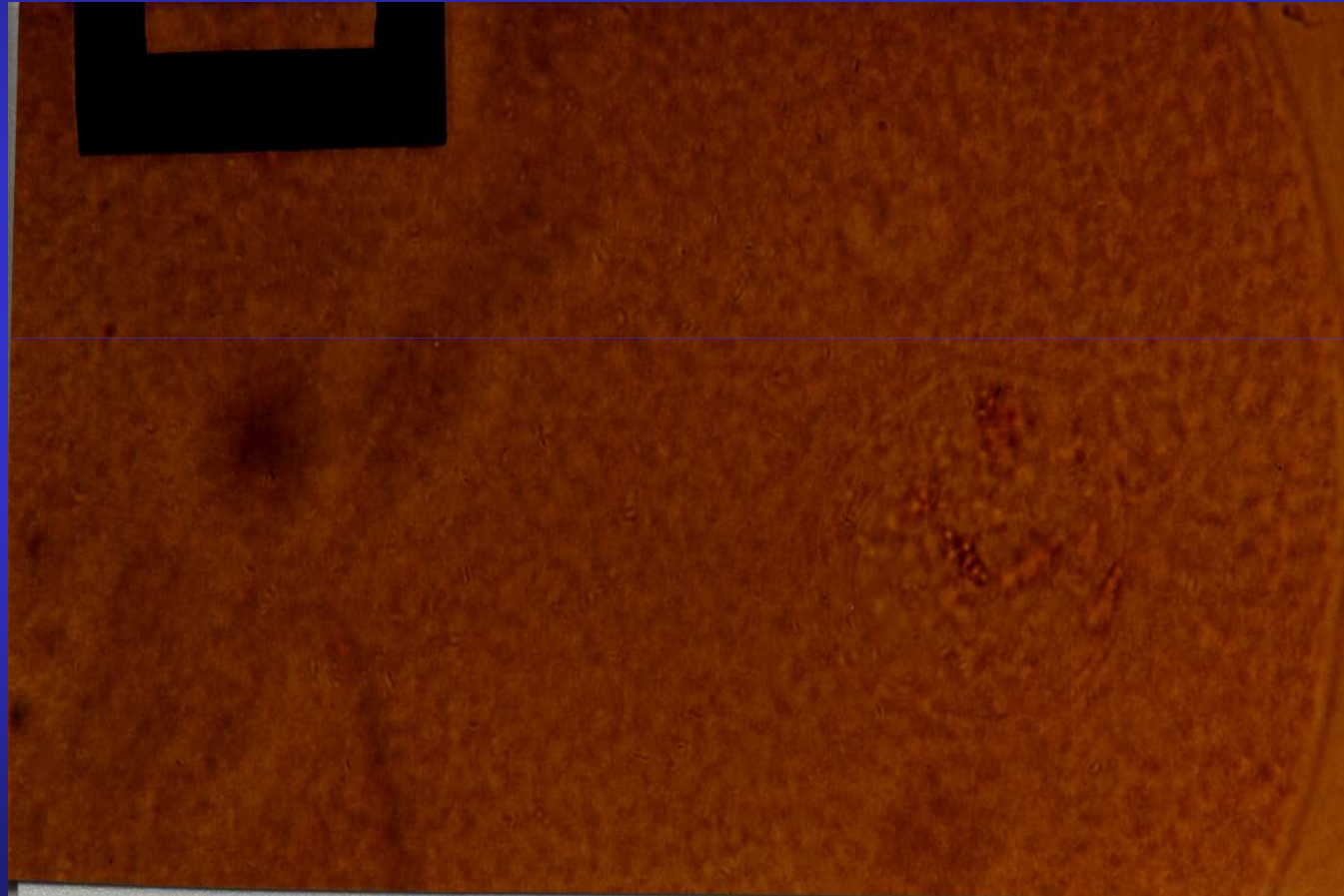


Abb. 4: Germinal vesicle breakdown, GVBD . Die Auflösung der Kernmembran hat begonnen. Die Meiose wurde wieder aufgenommen (Vergrößerung 400x; Balken = 50 μ m).



Abbe 5: Prometaphase I. Die Chromosomen verdicken sich und kondensieren

(Vergrößerung 400x; Balken = 50 μ m).

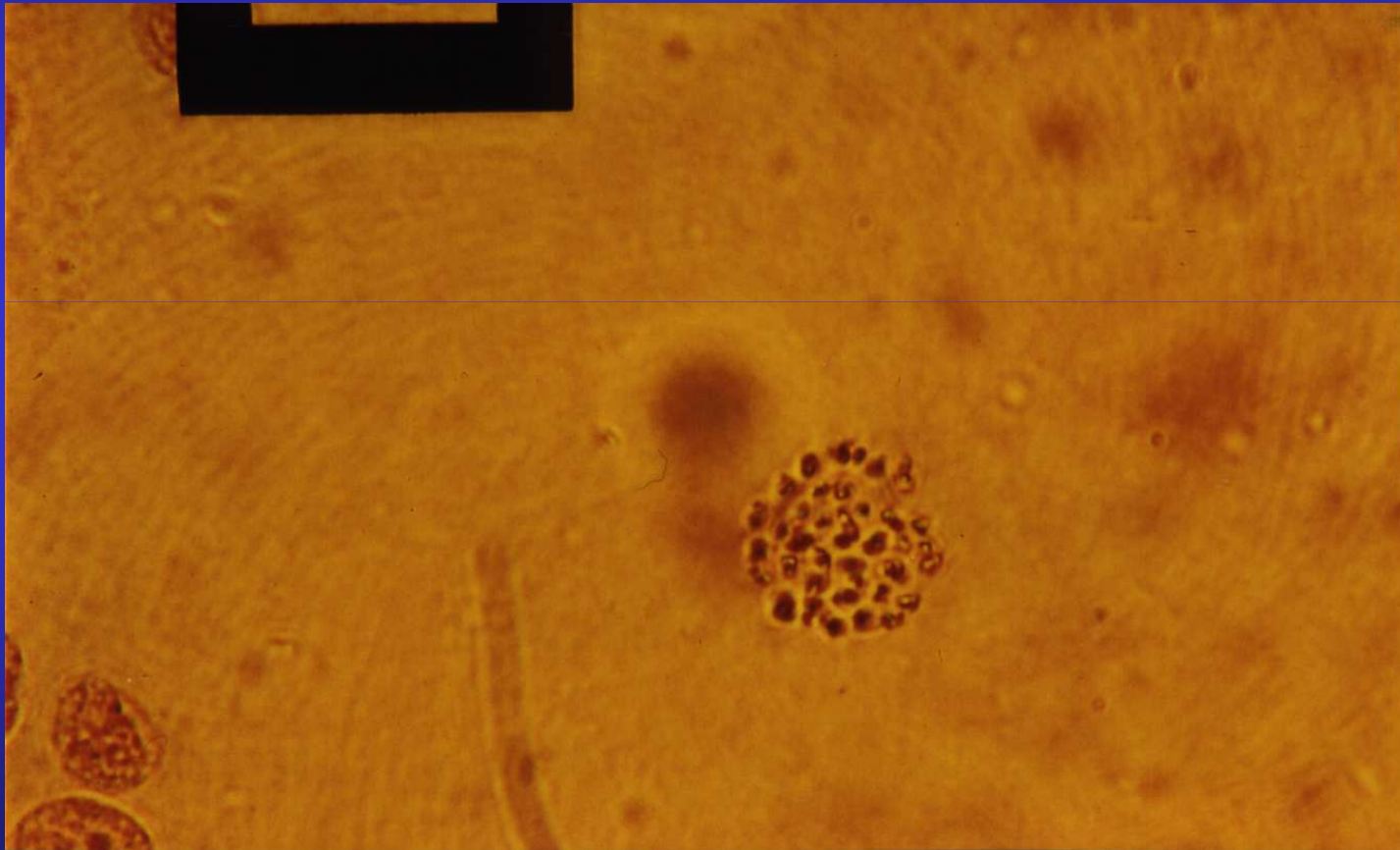


Abb. 6: Metaphase I: Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene der Oozyte an (Vergrößerung 400x; Balken = 50µm).

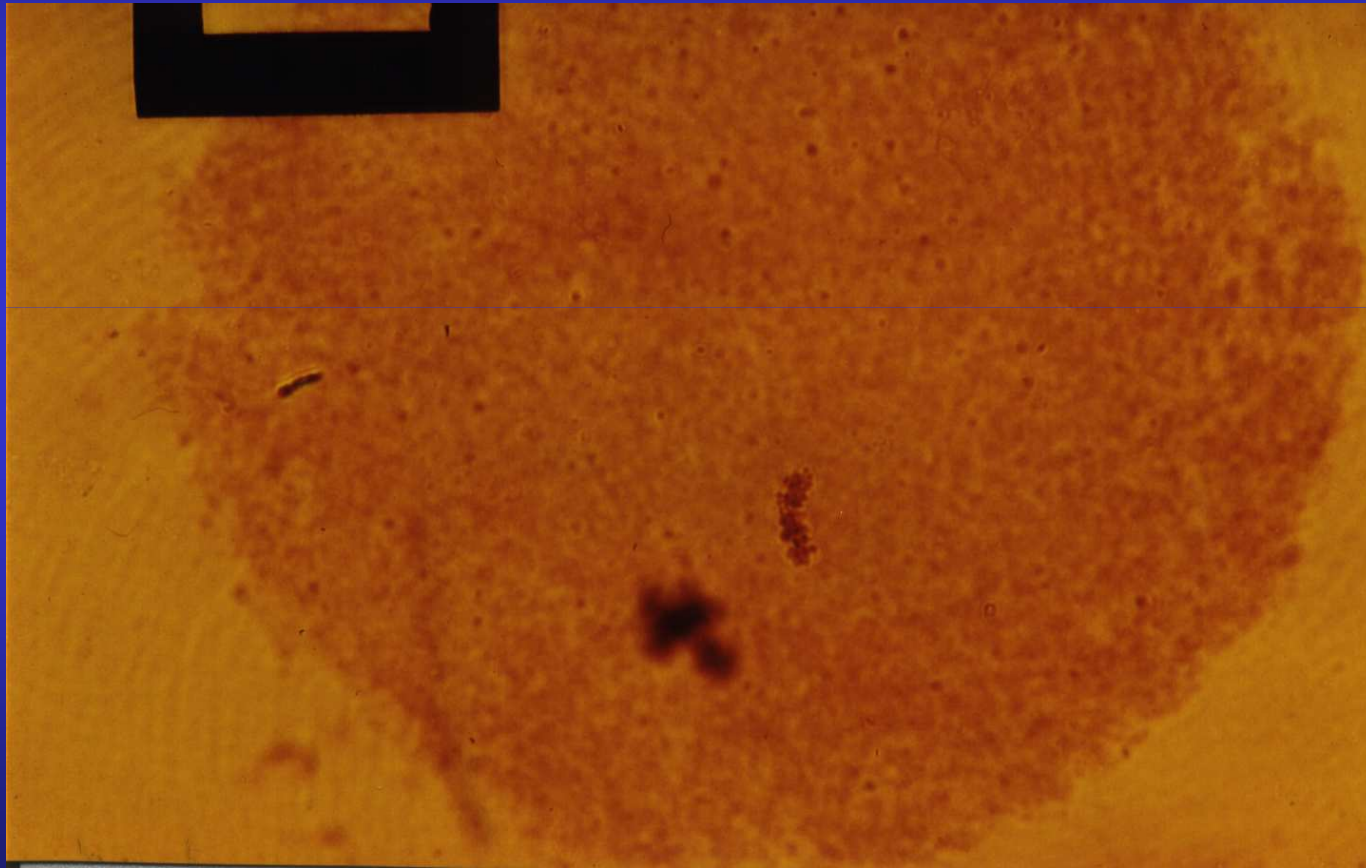


Abb. 7: Anaphase I. Der Spindelapparat ist ausgebildet und zieht die homologen Chromosomen zu den Polen (Vergrößerung 400x; Balken = 50 μ m).

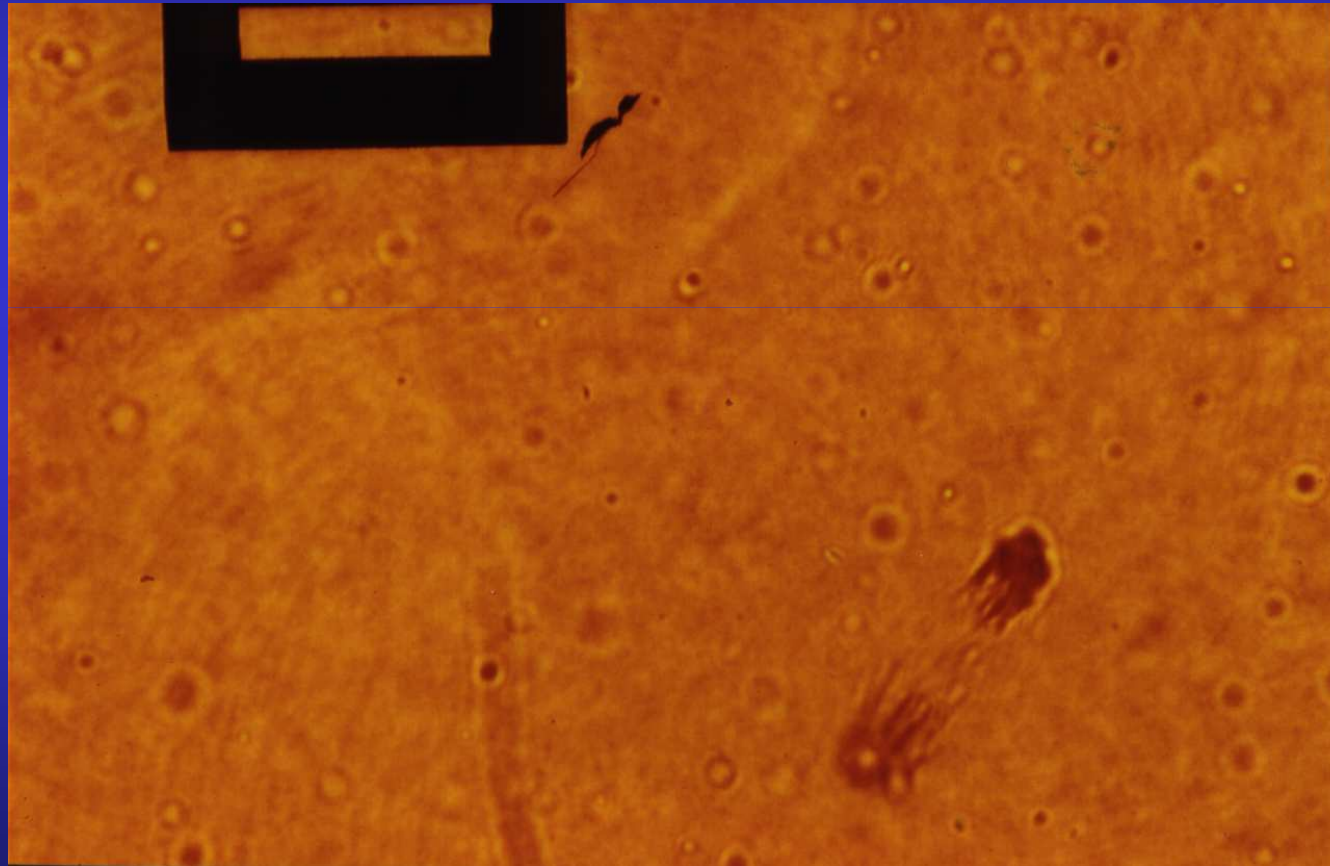


Abb. 8: Metaphase II. Der Chromosomensatz hat sich in ein Polkörperchen und einen homologen Chromosomensatz aufgeteilt. Die Oozyte ist gereift
(Vergrößerung 400x; Balken = 50 μ m)

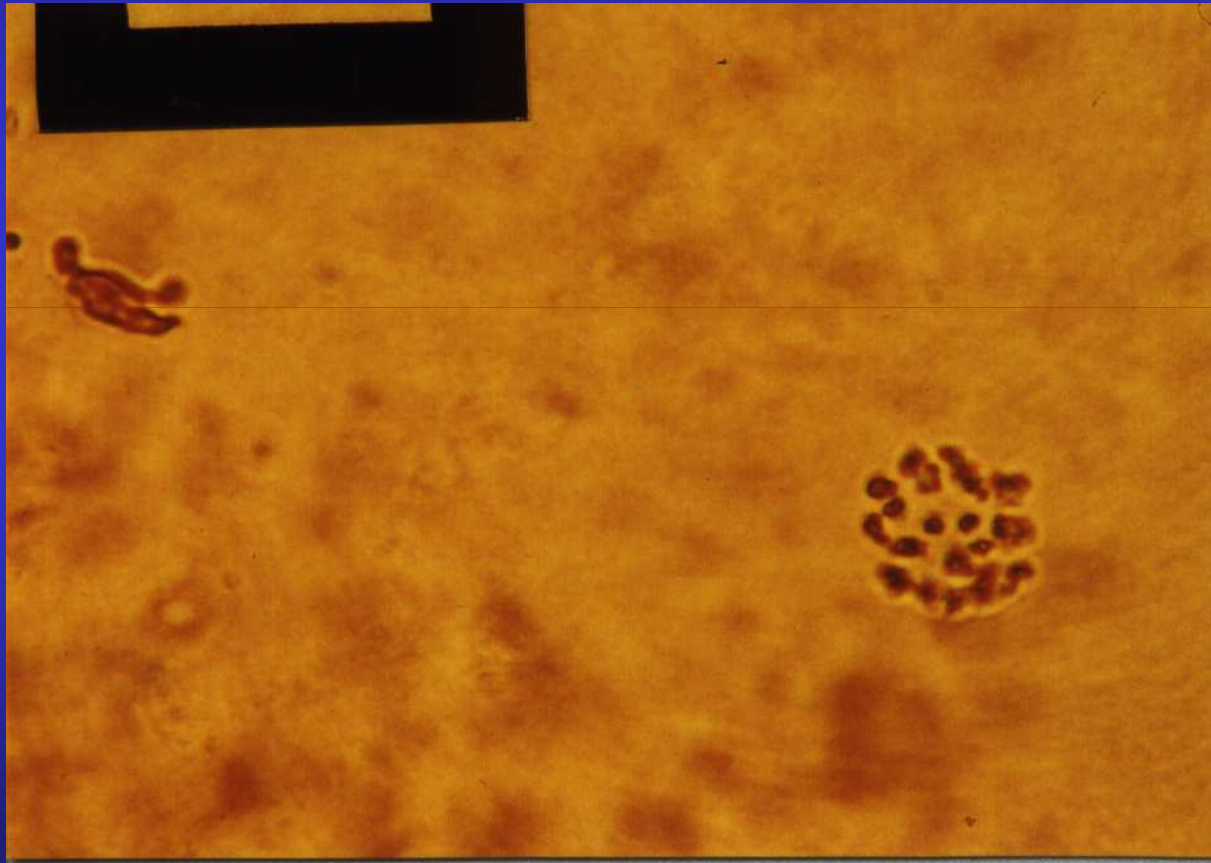


Abb. 9: Mit FDA angefärbte Oozyte. Die hellgrüne Fluoreszenzreaktion weist auf ein enzymatisch aktives Zytoplasma einer vitalen Oozyte hin.
(Vergrößerung 400x).

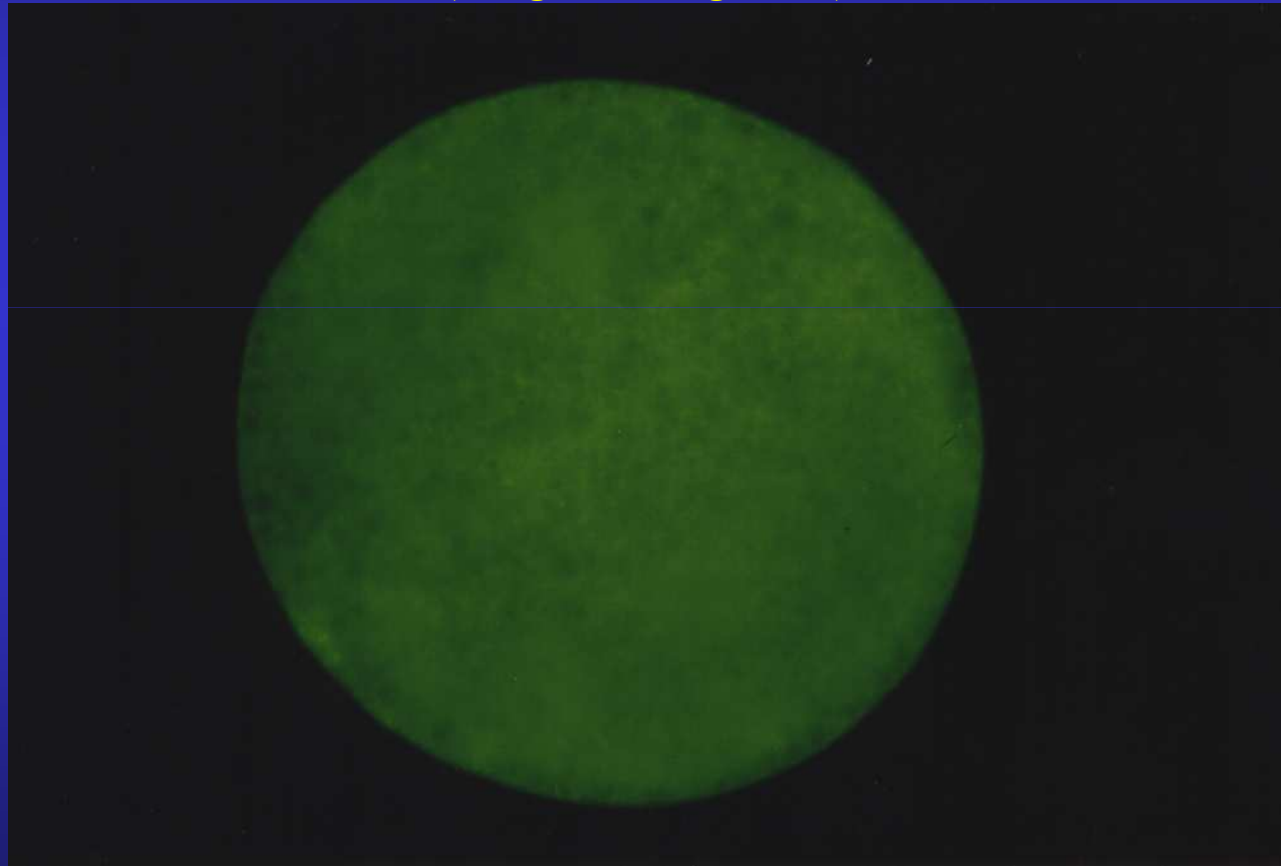


Abb. 10: Mit Hoechst A 3342 angefärbte Zygote. Das Zytoplasma mit Zellkernen ist bei der Präparation ausgelaufen. Deutlich zu erkennen sind anheftende Spermatozoen an der Zona pellucida (Vergrößerung 400x, Balken = 50µm).

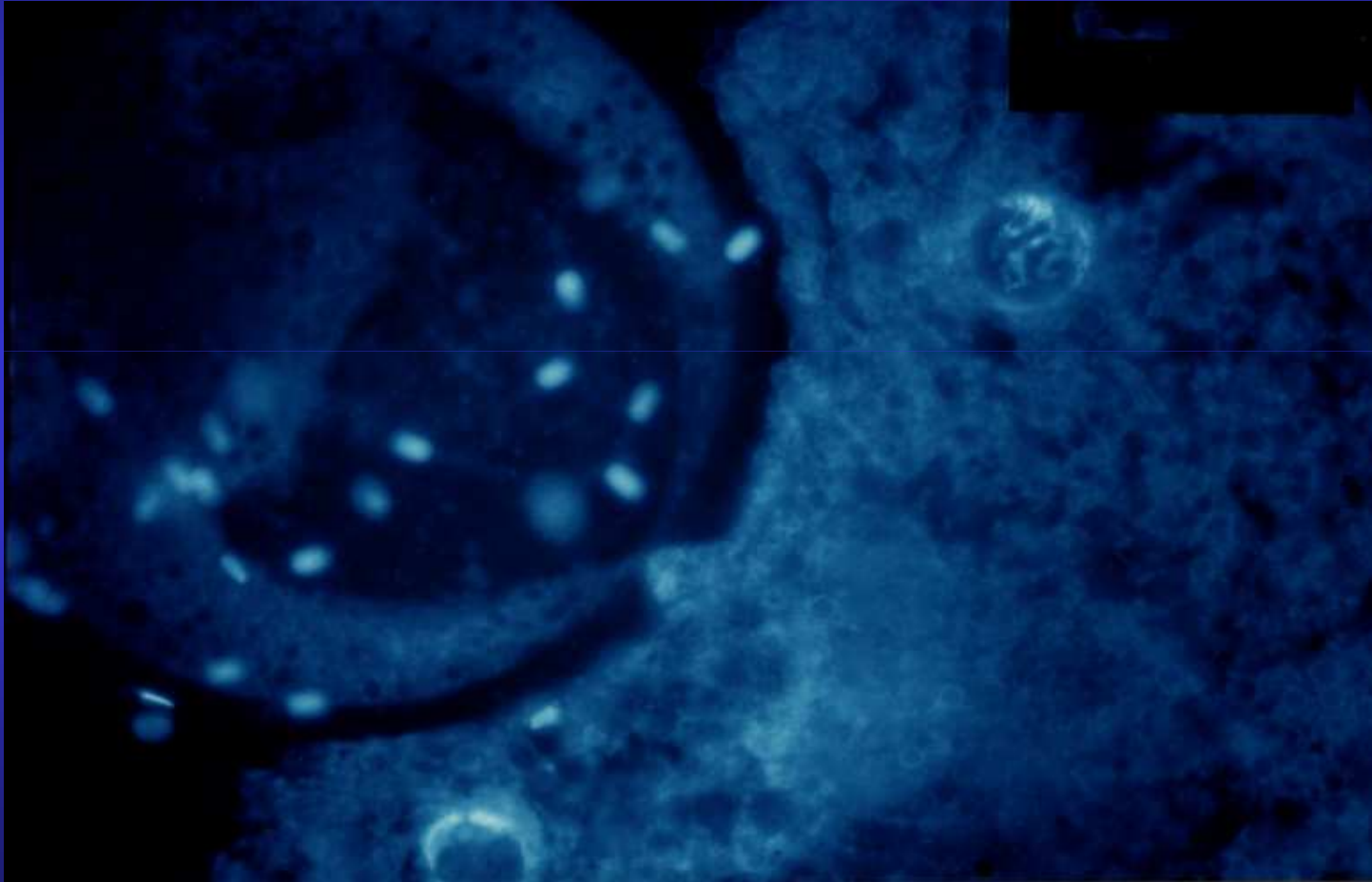


Abb. 11: Kombinierte FDA (grün) und Hoechst A 33342 (blau)-Färbung eines Embryos mit drei Zellkernen (Vergrößerung 400x).

