

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Untersuchungsmaterial und Versuchsaufteilung**

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gliederten sich in vier Abschnitte. Für jeden Versuchsabschnitt wurden die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) in vier Klassen eingeteilt. Jeweils 7 Maturationszeiten (0, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden) wurden in den ersten drei Abschnitten berücksichtigt. Im letzten Teil erfolgte die Untersuchung der Entwicklungsfähigkeit in vitro von COK der verschiedenen Klassen bis zur Blastozyste.

Der erste Abschnitt umfasste die Beurteilung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten sowie die Beurteilung der Aktivität und Aggregation von Mitochondrien im Ooplasma. An einer Oozyte konnten jeweils alle drei Parameter erhoben werden. Für die Durchführung des ersten Abschnittes wurden insgesamt 1473 Cumulus-Oozyten-Komplexe verwendet.

Im zweiten Abschnitt erfolgte die Beurteilung des Apoptoseverlaufes während der IVM in Cumuluszellen. Für diese Untersuchung wurden 855 Cumulus-Oozyten-Komplexe isoliert. Die Auswertung im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte an 70779 Cumuluszellen.

Der dritte Versuchsabschnitt war auf die Bestimmung von Caspase-3 im Ooplasma und in den Cumuluszellen gerichtet (n=140 COK).

Für die Untersuchungen zur Entwicklungskompetenz im vierten Abschnitt wurden 1106 Oozyten verschiedener COK-Klassen in vitro gereift, befruchtet und kultiviert.

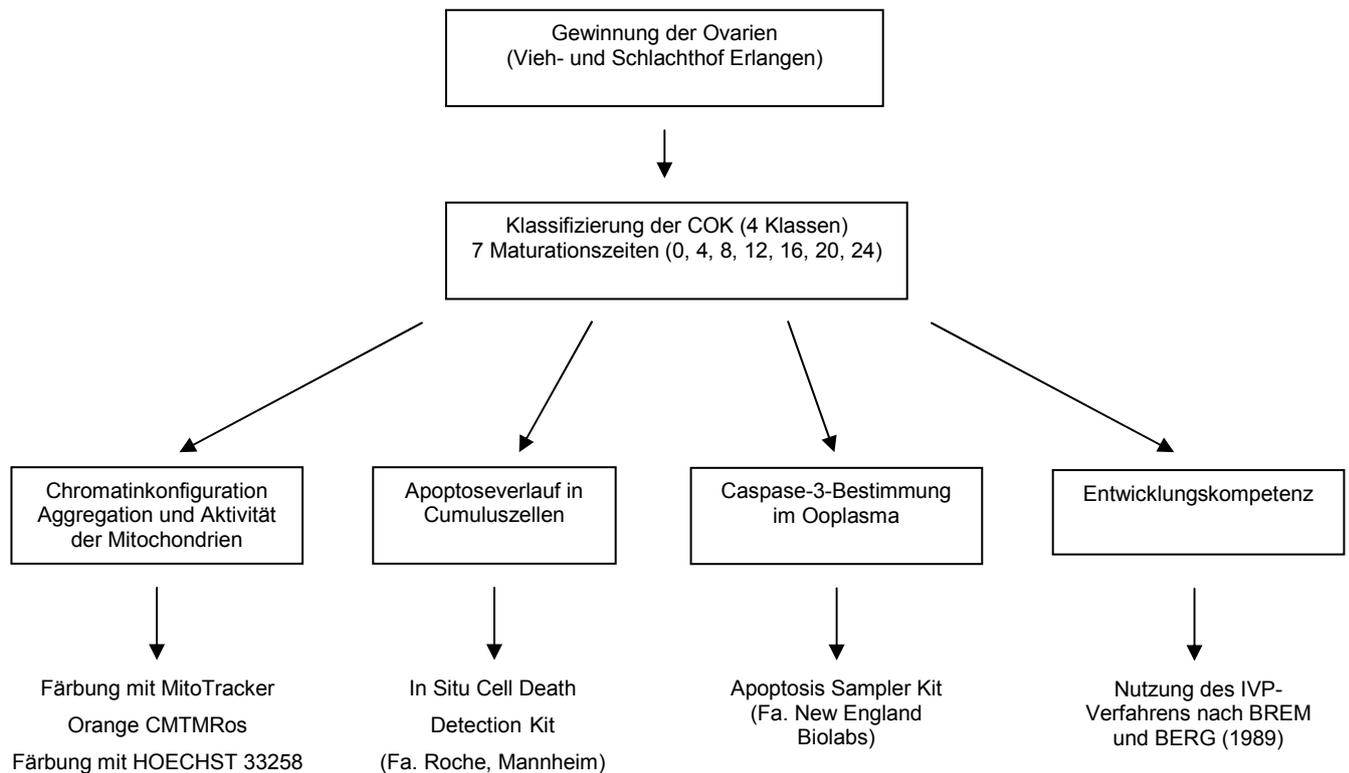
Für alle 4 Versuchsabschnitte wurden zur experimentellen Bearbeitung insgesamt 3574 Cumulus-Oozyten-Komplexe genutzt.

Es wurden ausschließlich Ovarien und Cumulus-Oozyten-Komplexe geschlachteter Rinder für die Durchführung der Versuche verwendet. Die Probennahme und die Probenvorbereitung wurden auf dem Schlachthof Erlangen und im Embryotransfer-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch e.V. durchgeführt. Die Auswertungen wurden zum Teil im Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf durchgeführt.

Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien ist im Anhang unter Kapitel 9.1. aufgeführt.

Die Abbildung 1 verdeutlicht die Durchführung der einzelnen Versuchsabschnitte.

**Abb. 1** Versuchsabschnitte



### 3.2. Spendertiere

Bei den Spendertieren handelte es sich zum größten Teil um Kühe und Jungrinder der Rasse Deutsches Fleckvieh. Ein geringer Anteil der Spendertiere entfiel auf die Rassen Deutsche Schwarzbunte und Gelbvieh. Es erfolgte keine Selektion der Spendertiere in Bezug auf Alter, Gewicht, Gesundheitszustand und Zyklusstand.

### 3.3. Entnahme der Ovarien

Die Entnahme der Ovarien erfolgte für alle Versuchsabschnitte nach der gleichen Methode. Sie wird daher an dieser Stelle für alle weiteren Abschnitte beschrieben.

Die für die Untersuchungen verwendeten Oozyten wurden aus den Ovarien geschlachteter Kühe gewonnen. Die Entnahme der Ovarien wurde auf dem Schlachthof Erlangen vorgenommen und erfolgte unmittelbar nach Eröffnung der Bauchhöhle ca. 15 Minuten nach dem Tod des Tieres. Die Entnahme wurde unter möglichst hygienischen Bedingungen mit Hilfe einer chirurgischen Schere vorgenommen.

Es wurden nur Ovarien ohne pathologische Veränderungen entnommen.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Ovarien in ein mitgeführtes Thermogefäß mit physiologischer Kochsalzlösung (30-37°C) überführt. Innerhalb von max. drei Stunden nach der Entnahme erfolgte die weitere Bearbeitung der Ovarien im Labor.

### **3.4. Gewinnung und Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK)**

Die Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) erfolgte im Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch e.V. mit Hilfe der Slicing-Methode.

Die Ovarien wurden mit einer Arterienklemme in einer Petrischale aus Borosilikatglas mit einem Durchmesser von 14,5 cm (Fa. Roth, Karlsruhe) fixiert. Der Boden der Petrischale wurde zu Beginn des Slicing-Vorganges mit 37°C warmer modifizierter phosphatgepufferter Salzlösung nach Dulbecco (mPBS; Fa. Biochrom, Berlin) bedeckt. Danach wurden die Ovarien beidseitig gleichmäßig mit Hilfe eines Mehrfachmessers in Längsrichtung durchschnitten. Das Mehrfachmesser bestand aus 5-6 parallel angeordneten Rasierklingen (Fa. Goldhand, Düsseldorf). Nach dem Durchschneiden der Ovaroberfläche wurde diese gründlich mit mPBS gespült.

Die gewonnene Flüssigkeit wurde nun zur Entfernung der groben Gewebestandteile durch ein handelsübliches Teesieb in ein Becherglas mit einem Volumen von 600 ml (Fa. Roth, Karlsruhe) überführt. Die Wände und der Boden des Becherglases wurden zuvor mit warmer mPBS-Lösung benetzt.

Anschließend erfolgte eine Filtration, der im Becherglas befindlichen Flüssigkeit mit Hilfe eines Prüfsiebes (Durchmesser 100mm, Maschenweite 75µm; Fa. Jürgens, Hannover). Die aufgefangenen Gewebepartikel wurden nun gründlich mit warmer mPBS-Lösung gespült. Das Filtrat wurde nach gründlichen Spülungen des Rückstandes und der Siebmaschen in eine gerasterte Petrischale (90mm; Fa. Greiner, Frickenhausen) dekantiert. Der Boden der Petrischale wurde zuvor mit warmer mPBS-Lösung benetzt. Abschließend wurde das Filtrat mit warmer mPBS-Lösung aufgeschwemmt und die Petrischale auf einer 37°C warmen Wärmeplatte aufbewahrt.

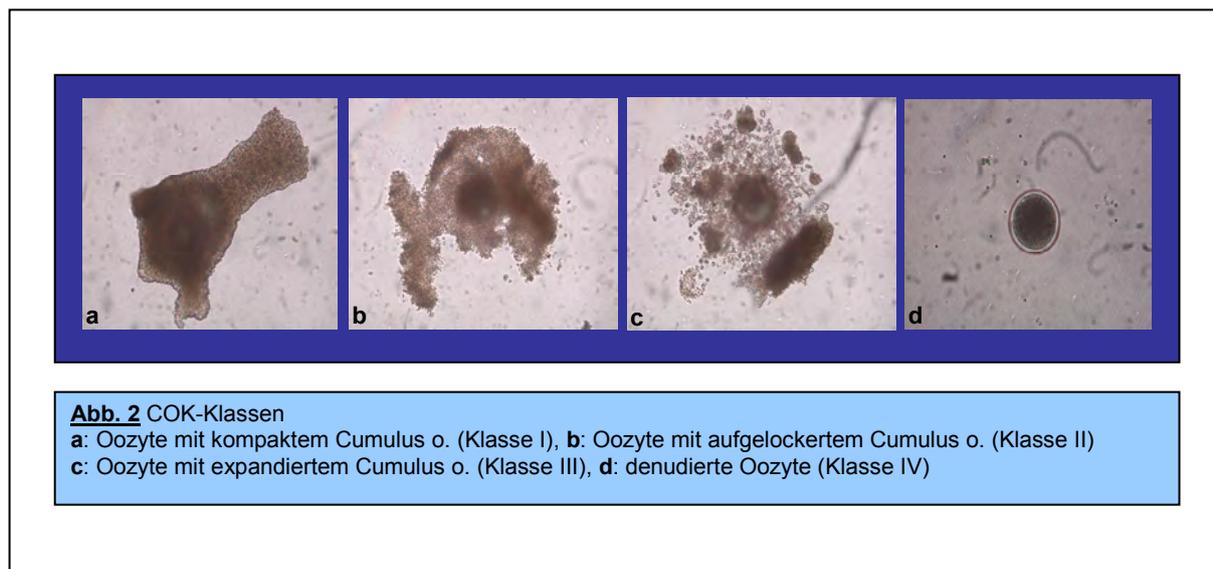
Das Aufsuchen der COK erfolgte unter einem Stereomikroskop (SMZ 800; Fa. Nikon, Düsseldorf) bei 15facher Vergrößerung. Aus der Rasterschale wurden die COK in eine 4-Well-Schale (Fa. Nunc, Dänemark) überführt. Jede Vertiefung der 4-Well-Schale enthielt 500 µl TCM199 (Tissue culture medium 199, s. Kapitel 9.1) + 10% ECS (oestrous cow serum) und 15 µl FSH Lösung ovinen Ursprungs (Ovagen®, Fa. Bondico, Alkmaar, Holland). Bei der

Überführung der COK wurden diese direkt klassifiziert und entsprechend ihrer Einteilung in die Vertiefung 1-4 der 4-Well-Schale übertragen.

Die Einteilung der COK erfolgte in vier Klassen. Sie richtete sich nach der morphologischen Beschaffenheit von Ooplasma und umgebenen Cumuluszellen. Die Beurteilung erfolgte unter dem Stereomikroskop bei 15facher Vergrößerung.

**Tab. 10** Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe

<b>Klasse 1</b>	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und kompaktem Cumulus oophorus
<b>Klasse 2</b>	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und aufgelockertem Cumulus oophorus
<b>Klasse 3</b>	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und expandiertem Cumulus oophorus mit Clusterbildung
<b>Klasse 4</b>	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und mit geringem oder fehlendem Cumulus oophorus



### 3.5. In-vitro-Reifung (IVM) der Cumulus-Oozyten-Komplexe

Nach Beendigung des Aufsuchens der COK und deren Klassifizierung erfolgte das Umsetzen der COK in eine Waschschale. Als Waschschale diente eine 4-Well-Schale. In jede der vier Vertiefungen der Schale wurden 500 µl TCM 199, sowie 15 µl FSH-Lösung ovinen Ursprungs (Ovagen<sup>®</sup>; Fa. Bondico, Alkmaar, Holland) pipettiert. Nach diesem Waschschrift erfolgte das Umsetzen der COK in die Reifungsschale. Hier handelte es sich ebenfalls um eine 4-Well-Schale. In jede der 4 Vertiefungen der Schale wurden 500 µl

TCM 199, sowie 15 µl FSH-Lösung pipettiert und mit 200 µl Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet.

Die Sammelschale, die Waschschale und je eine Reifungsschale pro Maturationszeit wurden ca. 4 Stunden vor der Verwendung vorbereitet und im Brutschrank bei einer Temperatur von 39°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei einem Gasgehalt von 5% CO<sub>2</sub> in Luft äquilibriert.

Die Reifungsdauer betrug 0, 4, 8, 12, 16, 20 bzw. 24 Stunden.

Es wurden am Entnahmetag jeweils COK für 2 Maturationszeiten gewonnen. Das Umsetzen der COK erfolgte mit Hilfe der Pipettierhilfe MicroClassic (Fa. Brand, Wertheim) unter Verwendung von 20 µl Glaskapillaren (Fa. Heiland, Hamburg).

### **3.6. Beurteilung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten und Bestimmung der Aktivität und Verteilung von Mitochondrien im Ooplasma**

Bei dieser Untersuchung konnten 3 Parameter an dem COK-Material erhoben werden.

Im Embryotransfer-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch e.V. wurden die Probenahme sowie die Färbungen durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Proben erfolgte im Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf. Die statistische Auswertung wurde ebenfalls im FBN Dummerstorf durchgeführt.

#### **3.6.1. Anfärbung der Mitochondrien zur Bestimmung der Verteilung und Aktivität im Ooplasma**

Für die Anfärbung der Mitochondrien im Ooplasma wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTMRos (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet.

##### *Eigenschaften des Farbstoffes MitoTracker Orange CMTMRos*

Bei MitoTracker Orange CMTMRos handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv aktive Mitochondrien anfärbt. Der Farbstoff enthält eine thiolreaktive Chloromethyl-Gruppe. Diese Gruppe ermöglicht es, dass die Färbung auch nach einer Fixation mit Aldehyden bestehen bleibt.

Während der Inkubation der entsprechenden Zellen mit einer mikromolaren Menge Farbstoff, erfolgt ein passiver Transport der Farbstoffmoleküle durch die Plasmamembran und eine Akkumulation in den aktiven Mitochondrien.

MitoTracker Orange CMTMRos ist ein Derivat des Tetramethylrosamin. Die Verbindung reagiert mit Thiolverbindungen von Proteinen und Peptiden der Atmungskette in den Mitochondrien (Produktinformation, Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

### *Herstellung der Färbelösung*

Zur Herstellung der Stammlösung wurde eine Ampulle MitoTracker Orange CMTMRos à 50 µg bei Zimmertemperatur aufgetaut und in 117 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Sigma, Steinheim) gelöst. Von der hergestellten Stammlösung wurden 10 µl in Tubes mit einem Fassungsvermögen von 0,2 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt. Die Tubes wurden in einem Kunststoffbehälter (Fa. Eppendorf, Hamburg) aufbewahrt, der mit Alufolie als Lichtschutz umwickelt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Stammlösung wurde vor Beginn der gesamten Versuchsreihe hergestellt und abgefüllt.

Die Färbelösung wurde ca. 30 Minuten vor der Verwendung aus der Stammlösung hergestellt. Eine Ampulle der Stammlösung à 10 µl wurde mit Alufolie umwickelt und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden 2 µl Stammlösung in 4 ml modifizierter PBS-Lösung (mPBS) in einem Zentrifugenröhrchen gelöst. Das Zentrifugenröhrchen wurde ebenfalls mit Alufolie als Lichtschutz umwickelt. Durch leichtes Schwenken des Röhrchens wurde die Stammlösung in der mPBS-Lösung verteilt. Anschließend wurden in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale 500 µl der fertigen Färbelösung (200nM) pipettiert. Die 4-Well-Schale wurde mit Alufolie umwickelt, mit einer Styroporschale abgedeckt und auf einer 37°C warmen Wärmeplatte bis zur Verwendung gelagert.

### *Entfernung des Cumulus oophorus*

Die Entfernung des Cumulus oophorus erfolgte mit 0,3% Na-Citrat (Fa, Sigma, Steinheim). Das Na- Citrat wurde ca. ½ Stunde vor Beginn des Färbevorganges aus dem Kühlschrank genommen und bei Raumtemperatur erwärmt.

Vier Probefläschchen mit Schraubverschluss (Borosilikatglas, 8 ml Fassungsvermögen, Fa. VWR, Nürnberg) wurden mit jeweils 2 ml Na-Citrat gefüllt.

1½ Stunden vor Ablauf der entsprechenden Maturationszeit wurden zunächst die COK der Klasse I aus der Kulturschale in ein Probenfläschchen überführt. Das mit Na-Citrat befüllte Probenfläschchen wurde nun ca. 1 Minute geschüttelt. Danach wurde der Inhalt des Fläschchens in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Das Fläschchen wurde nun mit 1 ml Na-Citrat ausgespült und der

Inhalt ebenfalls in die Petrischale geschüttet. Anschließend wurde die Petrischale unter dem Stereomikroskop (SMZ 800; Fa. Nikon, Düsseldorf) bei 15facher Vergrößerung durchsucht. Alle Oozyten die vollständig von Cumuluszellen befreit waren, wurden in die Vertiefung Nr. 1 einer 4-Well-Schale überführt. Jede Vertiefung dieser Waschschele enthielt 500 µl mPBS. Im Anschluss an diesen Waschschrift erfolgte ein erneutes Umsetzen in eine Waschschele mit 500 µl mPBS pro Vertiefung. Dieser Vorgang wurde mit den COK der weiteren Klassen wiederholt.

#### *Durchführung der Färbung mit MitoTracker Orange CMTMRos*

Nach den zwei Waschschriften erfolgte das Umsetzen der Eizellen in die Färbelösung MitoTracker Orange CMTMRos.

Während des Pipettiervorganges wurde die Schale mit der Färbelösung weiterhin von einer Alufolie als Lichtschutz bedeckt. Die Oozyten verblieben für 30 Minuten bei 37°C unter Lichtschutz in der Färbelösung. Während der Färbezeit wurde die Fixation vorbereitet. In jede Vertiefung einer 4-Well-Schale (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden 500 µl 3%iges Paraformaldehyd (Fa. Sigma, Steinheim) pipettiert.

Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Oozyten unter Beibehaltung der Klassen zweimal in PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO, nicht modifiziert) gewaschen. Die Waschschriften erfolgten ebenfalls in 4-Well-Schalen.

Nach den Waschschriften wurden die Eizellen für 15 Minuten in 3%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Fixation erfolgte nach Ablauf der entsprechenden Maturationszeit.

Im Anschluss an die Fixation folgten wiederum drei Waschschriften in PBS-Lösung. Die ersten zwei Waschschriften wurden in 4-Well-Schalen durchgeführt. Der letzte Waschschrift erfolgte in einer vierteiligen Gewebekulturschale (Cellstar®; 35mm Durchmesser; Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen). Die Einteilungen der Gewebekulturschale enthielten 150 µl PBS-Lösung.

Aus der Gewebekulturschale wurden die Eizellen unter Beibehaltung der Klassen auf Objektträger aufgebracht. Pro Objektträger (SuperFrost weiß, 76x26mm; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden 2 x 5 Oozyten in jeweils ca. 10 µl PBS- aufgebracht.

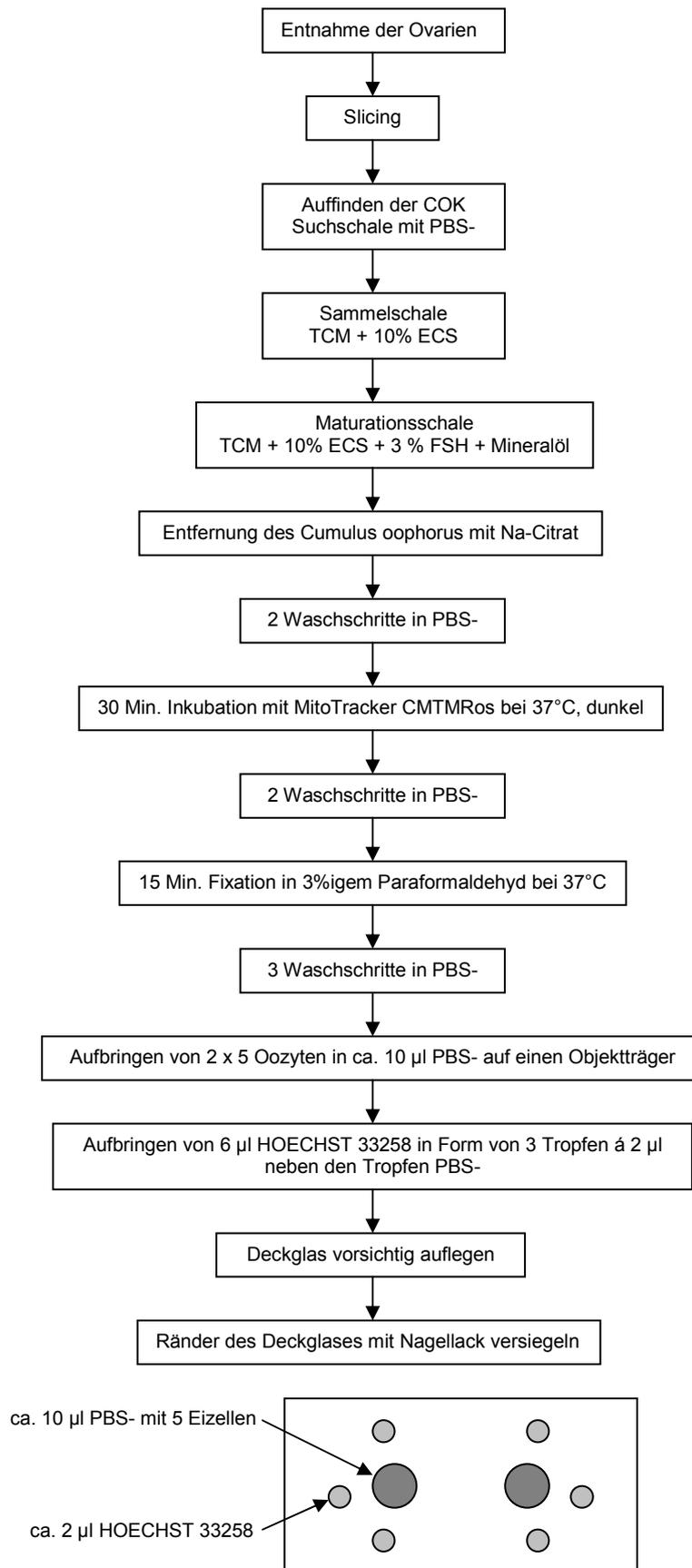
Im Anschluss erfolgte nun die Zugabe des Farbstoffes HOECHST 33258 (Fa. Sigma, Steinheim).

Die fertige Färbelösung wurde vor Beginn der gesamten Versuchsreihe hergestellt, in einem mit Alufolie umwickeltem Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bei 7°C gelagert.

Ca. 10 Minuten vor der Verwendung wurde die Färbelösung aus dem Kühlschrank entnommen, geschwenkt und bis zur Verwendung bei Zimmertemperatur gelagert.

Der Versuchsansatz ist zur Verdeutlichung in einem Schema dargestellt (Abb. 3).

**Abb. 3** Versuchsschema Chromatinkonfiguration/Aggregation und Aktivität der Mitochondrien



### **3.6.2. Anfärbung des Chromatin**

Die Chromatinfärbung erfolgte als Parallelfärbung zur Mitochondrienfärbung nach der Fixation der Oozyten.

Die Herstellung des Farbstoffes wird unter Kapitel 9.1. beschrieben.

#### *Eigenschaften des Farbstoffes HOECHST 33258*

Hoechst 33258 gehört zur Gruppe der Bisbenzimid-Farbstoffe. Es handelt sich um einen membrandurchgängigen Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in der A-T-Region der DNA interkaliert. Diese Bindung führt zu einem Wechsel des Emissionsmaximums von 500 nach 460 nm. Der Farbstoff emittiert im blauen Bereich bei 450 nm und weist eine geringe Cytotoxizität auf.

#### *Durchführung der Färbung mit HOECHST 33258*

Im Anschluss an die Fixation der Oozyten mit 3%igem Paraformaldehyd wurden 2 x 5 Oozyten einer Klasse in ca. 10 µl PBS-Lösung auf einen Objektträger (76 x 26 mm, SuperFrost®, Fa. Roth, Karlsruhe) aufgebracht.

Vor der Eindeckelung mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm, Fa. Heiland, Hamburg) erfolgte die Zugabe des Farbstoffes Hoechst 33258. Insgesamt wurden pro 5 Eizellen 6 µl Farbstoff in Form von 3 kleinen Tropfen, die um die Eizellen positioniert wurden, verwendet.

Nach Eindeckelung der Proben wurden die Deckgläschen durch einen handelsüblichen Nagellack an allen Seiten versiegelt und abgedunkelt bei 7°C gelagert.

#### *Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Chromatinkonfiguration*

Die Auswertung der Chromatinkonfiguration erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei 450 nm.

Die Beurteilung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten erfolgte nach dem Auftreten des Diplotäns, der Diakinese, Metaphase I, Anaphase I, Telophase I, Metaphase II, aktiviertes Chromatin und Degenerationsphasen in allen Meiosestadien.

*Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mitochondrialen Verteilung und Messung der Aktivität*

Die Messung der mitochondrialen Aktivität erfolgte bei 570 nm (Emissionswellenlänge) mit einem Photomultiplier P100 der Fa. Nikon, Düsseldorf bei 550  $\mu$ V und 4-4,3 A.

Es wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz bestimmt und anschließend die Aktivität der Mitochondrien. Die Hintergrundfluoreszenz wurde dann von dem Messergebnis der Mitochondrienaktivität subtrahiert, um die endgültige Intensität zu ermitteln.

Die Auswertung der mitochondrialen Verteilung erfolgte ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei 570 nm.

Die Verteilung der Mitochondrien wurde zunächst nach der Homogenität bzw. Heterogenität eingeteilt. Im Anschluß erfolgte eine spezifische Beschreibung der Verteilung in feinkörnig, grobkörnig und kristallin.

### **3.7. Beurteilung des Apoptoseverlaufes in Cumuluszellen während der In-vitro-Reifung**

Für die Untersuchung des Apoptoseverlaufes wurden die Oozyten und Cumuluszellen der COK-Klassen I-III verwendet.

#### **3.7.1. Entfernung der Cumuluszellen nach der Reifung und Herstellung der Präparate zur Apoptosebestimmung**

Nach Ablauf der entsprechenden Maturationszeiten wurden die COK unter Beibehaltung der Klassen in eine 4-Well-Schale mit 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA (10%) in Hanks-Lösung pro Vertiefung umgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der Cumulus oophorus durch wiederholtes Pipettieren entfernt.

Nach der Entfernung des Cumulus oophorus wurden die denudierten Eizellen entfernt und verworfen. Die Flüssigkeit mit den Cumuluszellen in den Vertiefungen der 4-Well-Schale wurde mit einer 500  $\mu$ l-Eppendorf-Pipette aufgesogen und unter Beibehaltung der Klassen in Tubes (1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt. Jede Vertiefung der Schale wurde nun anschließend zweimal mit 500  $\mu$ l PBS-Lösung ohne Ca/Mg gespült und die Flüssigkeit wurde ebenfalls wieder in Tubes überführt.

Die Tubes wurden 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Min. (600g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 1000 µl der Flüssigkeit abgezogen und erneut 1000 µl PBS-Lösung ohne Ca/Mg zugegeben. Die Tubes wurden nun erneut 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurde die Flüssigkeit bis zur vorher gesetzten 60 µl-Markierung abgezogen.

Nach dem Resuspendieren der Cumuluszellen wurden 2 x 20 µl auf einen Poly-L-lysin beschichteten Objektträger (s. 9.1.) aufgetragen. Die aufgetragenen Tropfen wurden mit einer Pipettenspitze auf eine Größe von ca. 1 x 1 cm ausgezogen.

Die Objektträger wurden bis zur Trocknung abgedeckt bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung horizontal bei 7°C.

### **3.7.2. Nachweis von Apoptose in Cumuluszellen durch Markierung von DNA-Strangbrüchen mit TdT (TUNEL)**

#### *Eigenschaften der TUNEL-Färbung*

Während der Apoptose entstehen DNA-Strangbrüche. Diese können für die Identifizierung apoptotischer Zellen verwendet werden.

Für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurde der In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Dieser Kit identifiziert DNA-Strangbrüche durch enzymatische Markierung. Dabei werden freie 3'-OH-Enden der DNA mit fluorescein-gekoppelten Nukleotiden markiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysiert. Diese Reaktion wird beschrieben als TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) oder als ISEL (in situ end labeling).

Der Vorteil dieser Methode besteht in der Identifizierung jeder einzelnen apoptotischen Zelle in einer frühen Phase ihrer Apoptose.

#### *Eigenschaften des Farbstoffes Propidiumiodid*

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an Nucleinsäuren bindet und sowohl DNA als auch RNA anfärbt. Nach der Bindung steigt die Fluoreszenz auf das 20-30fache. Propidiumiodid kann die Zellmembran nicht passieren. Das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid liegt bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm.

### *Fixierung und Permeabilisierung*

Die Herstellung der verwendeten Reagentien wird in Kapitel 9 beschrieben.

Die auf dem Objektträger angetrockneten Cumuluszellen wurden zunächst 30 Minuten mit Paraformaldehyd (4%) bei Raumtemperatur fixiert.

Nach der Fixation wurden die Präparate 2 x für 5 Minuten mit PBS-Lösung gespült.

Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mit TRITON X-100 (Fa. Sigma, Steinheim) für 2 Minuten auf Eis. Danach wurden die Präparate erneut 2 x für 5 Minuten mit PBS-Lösung gespült und am Rand gründlich getrocknet.

### *TUNEL-Reaktion*

Für die Anwendung der TUNEL-Reaktion wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren.

Die fixierten und permeabilisierten Cumuluszellen wurden mit 50 µl TUNEL reaction mixture pro markierten Zellen für 60 Minuten bei 37°C abgedunkelt in einer feuchten Kammer inkubiert.

### *Gegenfärbung mit Propidiumiodid und Eindeckelung der Präparate*

Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

Die Präparate wurden nach der Inkubation 1 x für 5 Minuten mit PBS-Lösung gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Propidiumiodid für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS-Lösung für 5 Minuten. Danach wurden die Präparate in destilliertes Wasser eingetaucht und anschließend am Rand gründlich getrocknet.

Vor dem Auflegen wurde auf die Deckgläschen 4 µl Moviol aufgetragen.

Die Präparate wurden ca. 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss horizontal bei 7°C in einer Objektträgermappe gelagert.

### **3.7.3. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung**

Die Auswertung des Apoptoseverlaufes in den Cumuluszellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei 480 nm. Pro Untersuchungsfeld wurden 1000 Cumuluszellen ausgezählt. Rot bzw. orange gefärbte Zellen wurden als nicht apoptotisch gezählt und deutlich grün gefärbte Zellen als apoptotisch definiert.

### 3.8. Caspase-Bestimmung im Ooplasma und in den Cumuluszellen

#### *Herstellung und Lagerung der Präparate für die Caspasebestimmung in den Cumuluszellen*

Nach Ablauf der entsprechenden Reifungszeit wurden die COK unter Beibehaltung der Klassen in eine 4-Well-Schale mit 500 µl Trypsin/EDTA (10%) in Hanks-Lösung pro Vertiefung umgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der Cumulus oophorus durch wiederholtes Pipettieren entfernt.

Nach der Entfernung des Cumulus oophorus wurden die denudierten Eizellen entfernt und unter Beibehaltung der Klassen in eine 4-Well-Schale mit 500 µl TCM 199 + 10% ECS überführt und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Die Flüssigkeit mit den Cumuluszellen in den Vertiefungen der 4-Well-Schale wurde unter Beibehaltung der Klassen in Reaktionsgefäße (1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt. Jede Vertiefung der Schale wurde nun anschließend zweimal mit 500 µl PBS-Lösung ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gespült und die Flüssigkeit wurde ebenfalls wieder in Reaktionsgefäße überführt.

Die Reaktionsgefäße wurden 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Min. (600g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellsediment mit 1 ml PBS-Lösung ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 2 x gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand bis zur vorher gesetzten 40 µl-Markierung abgezogen und verworfen.

Nach dem Resuspendieren der Cumuluszellen wurden die Reaktionsgefäße bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

#### *Herstellung und Lagerung der Präparate für die Caspase-Bestimmung im Ooplasma*

Die denudierten Oozyten (s. 3.6.3.) wurden aus dem Brutschrank entnommen und anschließend in einer 4-Well-Schale mit 500 µl TCM 199 + 10% ECS gewaschen.

Die Entfernung des eventuell verbliebenen Cumulus oophorus der Klassen I-III erfolgte mit 0,3% Na-Citrat (Fa. Sigma, Steinheim). Das Na-Citrat wurde ca. ½ Stunde vor Beginn des Färbeproganges aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur erwärmt.

Vier Probefläschchen mit Schraubverschluss (Borosilikatglas, 8 ml Fassungsvermögen, Fa. VWR, Nürnberg) wurden mit jeweils 2 ml Na-Citrat gefüllt.

90 Minuten vor Ablauf der entsprechenden Reifungszeit wurden zunächst die COK der Klasse I aus der Kulturschale in ein Probenfläschchen überführt. Das mit Na-Citrat befüllte

Probenfläschchen wurde nun ca. 1 Minute geschüttelt. Danach wurde der Inhalt des Fläschchens in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Das Fläschchen wurde nun mit 1 ml Na-Citrat ausgespült und der Inhalt ebenfalls in die Petrischale verbracht. Anschließend wurde die Petrischale unter dem Stereomikroskop (SMZ 800; Fa. Nikon, Düsseldorf) bei 15facher Vergrößerung durchsucht. Alle Oozyten die vollständig von Cumuluszellen befreit waren, wurden in die Vertiefung Nr. 1 einer 4-Well-Schale überführt. Jede Vertiefung dieser Waschschele wurde mit 500 µl PBS-Lösung befüllt. Dieser Vorgang wurde mit den COK der Klassen II-III wiederholt.

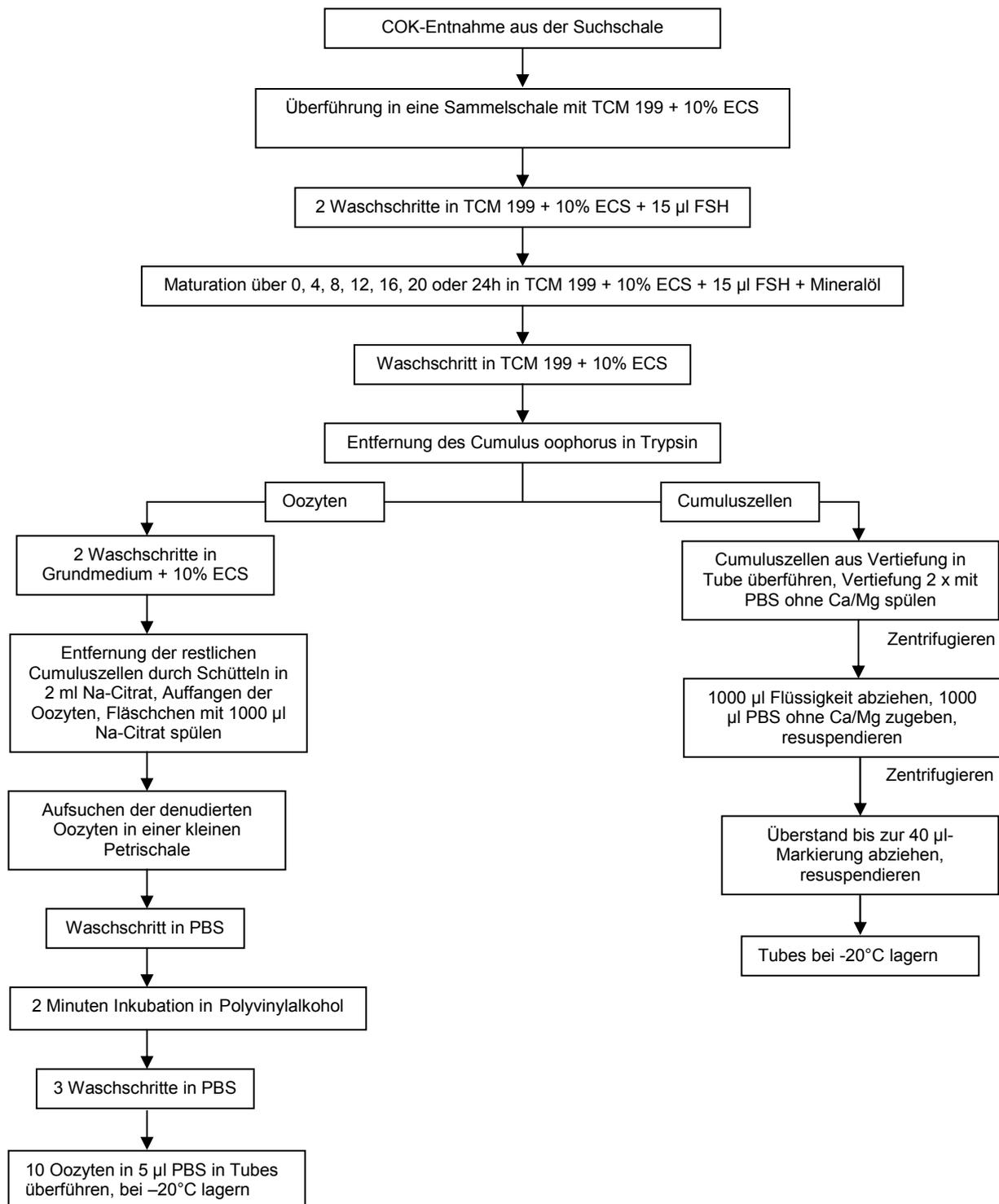
Anschließend wurde eine Petrischale (Durchmesser 14,5 cm, Fa. Roth, Karlsruhe) mit Hilfe eines Farbstiftes in vier Felder unterteilt. In Feld Nr. 1 wurden 4 Tropfen Polyvinylalkohol (Fa. Sigma, Steinheim) á 200 µl aufgetragen. Auf die Felder 2-4 wurden jeweils 4 Tropfen PBS-Lösung á 200 µl pipettiert.

Die Oozyten wurden nun unter Beibehaltung der Klassen zunächst für 2 Minuten in Polyvinylalkohol inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschrte in PBS-Lösung in Feld 2, Feld 3 und Feld 4. Aus den Waschtropfen in Feld 4 wurden die Oozyten in jeweils 5 µl PBS-Lösung in Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Abbildung 4 verdeutlicht die gesamte Probenbearbeitung dieses Versuchsabschnittes.

### *Herstellung und Lagerung der Präparate für die Caspase-3-Bestimmung in Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK)*

Für die Bestimmung der Caspase-3 in kompletten COK wurden die COK unter Beibehaltung der Klassen nach der entsprechenden Reifungszeit 2 x in PBS-Lösung ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Anschließend wurden jeweils 10 bzw. 20 COK jeder Klasse in ca. 5 µl PBS-Lösung ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  in Reaktionsgefäße überführt und bis zur biochemischen Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Abb. 4** Schema der Probenbearbeitung für die Caspase-3-Bestimmung

### *Biochemische Techniken zur Analyse von Caspase-3 im Ooplasma*

Die biochemischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe Biochemie des Forschungsbereiches Fortpflanzungsbiologie des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf durchgeführt.

Zur Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurden die Proben elektrophoretisch nach der Methode nach LAEMMLI (1970) behandelt. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele befindet sich im Anhang 9.2. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western Blotting.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben wurden zunächst aufgetaut und bei 10000 U/Minute zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und das Zellsediment mit 10  $\mu\text{l}$  Probenpuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte das Auftragen des Probenmaterials auf 12%ige SDS-Gele. Die Elektrophorese wurde bei konstant 25 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (TOWBIN et al. 1979). Der Transfer erfolgte mittels eines „semidry“ Elektrobloppers, bei 1 mA pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche für 1 h.

Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in 5% fettfreier Trockenmilch in TTBS (1 h, bei Raumtemperatur) abgesättigt. Danach und nach jeder weiteren Inkubation wurde die Membran in TTBS 3 x für zehn Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte bei einer Verdünnung von 1:1000 in TTBS über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Der zweite Antikörper (anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert) erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

Für die Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Membran wurde die Chemilumineszenzreaktion (ECL-Plus, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Proteinbanden wurden auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### **3.9. Einschätzung der Entwicklungsfähigkeit der einzelnen COK-Klassen**

#### **3.9.1. In-vitro-Fertilisation (IVF)**

##### *Vorbereitung der Spermien durch das Swim-up-Verfahren*

Für die Fertilisation wurde tiefgefrierkonserviertes Sperma der für die IVF getesteten Fleckviehbullen „Humid“ (Hb-Nr.176100) und „Weinold“ (Hb-Nr. 169367) von jeweils einem einzigen Ejakulat (Ejakulatnummer 2405 bzw. 705) verwendet.

Die Aufbereitung der Spermien erfolgte nach dem Swim-up-Verfahren nach PARRISH et al. (1986).

Eine Spermienportion (0,25 ml Paillette, Fa. Minitüb, Landshut) wurde für 100 Eizellen verwendet. Ca. 2 Stunden nach Ablauf der 24stündigen Reifungszeit der COK wurde die Spermienportion für 10 Sekunden in 38°C warmen Wasser aufgetaut. Anschließend wurden je 125µl der Spermienportion am Boden zweier Kryoröhrchen (1,5 ml, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark), die 1 ml Sperm-TALP (s. Kapitel 9.1.) enthielten, abgesetzt. Die Kryoröhrchen sowie ein leeres Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) verblieben nun für 1 Stunde bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Winkel von 45° im Brutschrank. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden 800 µl des Mediums mit den motilen Spermien abgenommen und in das vorgewärmte Zentrifugenröhrchen überführt. Die Spermisuspension wurde nun 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis zum Spermienpellet abgezogen und durch die gleiche Menge Sperm-TALP ersetzt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen. Danach wurde der Überstand bis zum Spermienpellet abgezogen und das Pellet mit 40 µl Fert-TALP (s. Kapitel 9.1) resuspendiert. Die Spermiedichte wurde mit einer Zählkammer nach THOMA bestimmt und zur Berechnung des für die Befruchtung benötigten Volumens der Spermisuspension herangezogen. Pro Befruchtungstropfen wurden ca. 100.000 Spermien eingesetzt.

##### *In-vitro-Fertilisation (IVF) der Oozyten*

Für die IVF wurde das Medium Fert-TALP verwendet. In einer Petrischale (30 mm Durchmesser, Fa. Greiner, bio-one, Frickenhausen) wurden 4 Tropfen á 60 µl dieses Mediums aufgebracht und komplett mit Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet. Die Befruchtungstropfen wurden für mind. 2 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit äquilibriert.

Nach Ablauf der Reifungszeit von 24 Stunden wurden die COK unter Beibehaltung der Klassen in 200 µl Fert-TALP gewaschen und anschließend in die Befruchtungstropfen umgesetzt.

Anschließend wurde das berechnete Volumen Spermisuspension zugegeben und Oozyten und Spermien für 18 bis 22 h im Brutschrank inkubiert.

### *In-vitro-Kultivierung (IVK)*

Nach 18 bis 22 Stunden wurden die Oozyten unter Beibehaltung der ursprünglichen Klassen in 200 µl Grundmedium + 10% ECS umgesetzt. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die aufgelockerten Cumuluszellen und die abgestorbenen Spermien entfernt. Danach wurden die Oozyten unter Beibehaltung der Klassen in 200 µl TCM 199 + 10% ECS gewaschen und anschließend in eine 4-Well-Schale mit 500 µl TCM 199 + 10% ECS + Mineralöl überführt.

Am 4. und 6. Tag der Kultivierung wurden in jede Vertiefung der Kultivierungsschale 100 µl Grundmedium + 10% ECS pipettiert.

### *Beurteilung der Teilungs- und Entwicklungsstadien*

Am 3. Tag nach der Kultivierung wurde die Anzahl der befruchteten Oozyten ermittelt und die Teilungsrate berechnet. Dazu wurden alle Oozyten/Embryonen unter dem Stereomikroskop bei 30facher Vergrößerung beurteilt und der Prozentsatz an Embryonen mit mindestens 2 gleichmäßigen Blastomeren bestimmt.

Die Blastozystenrate wurde an den Tagen 7, 8 und 9 ermittelt. Die Beurteilung erfolgte in Anlehnung an KAUFFOLD und THAMM (1985).

## **3.10. Statistische Auswertungen**

Die statistischen Berechnungen wurden mit SAS Version 9.13 (SAS 2004) durchgeführt.

Die statistischen Masszahlen sowie die prozentualen Häufigkeiten wurden mit den Prozeduren MEANS und FREQ aus SAS/Base (SAS 2004) berechnet.

Für die Merkmale „prozentuale Häufigkeiten der Chromatinkonfiguration“ und „mitochondriale Aggregation“ wurden verschiedene Modelle mit der Prozedur GENMOD aus SAS/STAT 9.1 (SAS 2004b) ausgewertet. Kontraste interessierender Häufigkeiten wurden getestet.

Für das Merkmal „Aktivität“ wurden für die verschiedenen Modelle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Zusätzlich wurden alle LS-Mittelwerte der entsprechenden Stufen der interessierenden Effekte in den verschiedenen Modellen paarweise verglichen. Die Vergleiche und ANOVAs wurden mit der Prozedur GLM aus SAS/STAT durchgeführt.