

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Medien, Hormone und technische Geräte

2.1.1 Chemikalien

BSA	Sigma, Taufkirchen
B2-Medium	Laboratoire CCD, Paris (F)
CaCl ₂	Merck, Lyon (F)
CHX	Sigma, Lyon (F)
6-DMAP	Sigma, Lyon (F)
DMEM	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)
DMSO	Merck, Lyon (F)
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)
Glutamin	Merck, Lyon (F)
Glucose	Sigma, Lyon (F)
KCl ₂	Merck, Lyon (F)
Mannitol	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck, Lyon (F)
Mineralöl	Sigma, Lyon (F)
M199	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F),
NaCl ₂	Merck, Lyon (F)
NaN ₃	Sigma, Taufkirchen (D), (1% Stammlösung. auf 0,02% verdünnt mit PBS)
NaOH	Sigma, Lyon (F)
NaHCO ₃	Merck, Lyon (F)
PFA	Sigma, Taufkirchen
4% Paraformaldehyd	125 ml
Paraformaldehyd	5g in
DEPC-H ₂ O	113 ml lösen
10 x PBS	13 ml
auf Raumtemperatur abkühlen	
pH auf 7,25 einstellen, bei -20°C lagern	
PBS	Dulbecco, Sigma, Taufkirchen
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma, Lyon (F)
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen

2.1.2. Medien

Ca/Mg-freies Medium PBS ohne Mg und Ca mit NaCl 0,2g/l, hergestellt von C. Patrick

M199-Medium Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)

Ansatz:

NaHCO₃ 2.2 g/l (Finalkonz. 26 mM)

Penicilline G 60 mg/l

Dihydro-Streptomycine 50 mg/l

pH 7.3-7.4

→ in diesem Medium werden die Embryonen kultiviert, nachdem es mindestens 30 min. im Brutschrank mit CO₂ equilibriert wurde

Ansatz M199 + Hepes:

NaHCO₃ 0.336 g/l (Finalkonz. 4mM)

Hepes 4.766 g/l (Finalkonz. 20 mM)

pH auf 7.3-7.35 mit NaOH 1N

Penicilline G 60 mg/l

Dihydro-Streptomycine 50 mg/l

PBSB

1% (resp 0,1%) BSA in PBS (aqua dest.)

PTXB

1% BSA in PBS (aqua dest.)

500µl Triton-100 auf 200ml PBSB

Tyrode's Säure

Ansatz g/100ml

Glucose 0,1

CaCl x 2 H₂O 0,024

KCl 0,02

MgCl x 6 H₂O 0,01

NaCl 0,8

PVP 0,4

Mit HCl auf pH 2,5 einstellen

Vectaschild

Linaris, Wertheim-Bettingen (D), Paris (F)

2.1.3. Enzyme, Hormone, Medikamente

α -Amanitin	Sigma, Lyon (F)
Actinomycin-D	Sigma, Lyon (F)
FSH (Stimufol)	Merial, Lyon (F)
HCG (Choluron)	Intervet, Boxmeer (NL)
Hyaluronidase	Sigma, Lyon (F)
Kollagenase	Sigma, Lyon (F)
Narcofen (Pentobarbital)	Merial, Rohrdorf
Penicillin	Sigma, Lyon (F)
Pronase	Sigma, Lyon (F)
Receptal	Hoechst, Unterschleißheim
Streptomycin	Sigma, Lyon (F)

2.1.4 Antikörper

CoxIV	Mobitec, Göttingen
Cy3	Dianova, Hamburg
Dapi	Serva, Heidelberg
Hoechst	Sigma, Lyon (F)
IgG1	Dunn, Asbach
IgG2a	Dunn, Asbach
MTC02	Biocarta, San Diego (USA)
PG2	bereitgestellt von C. Viebahn

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroglaskapillaren	Harvard Apparatus, Les Ulis (F)
Mikroscheren	Vannas spring scissors - Fine Science Tools, Heidelberg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
Tygoonschlauch	Carl Roth, Karlsruhe
4-/24-/96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Wolframdrähte	Plano, Wetzlar

2.1.6. Geräte und Software

Axio Plan-Mikrosko	Vision CZJ 2.05, Carl Zeiss, Oberkochen
Axio Vision CZJ 2.05	Carl Zeiss, Oberkochen
Axiovert M35	Carl Zeiss, Oberkochen
BTX Stimulators	Biotechnologies & Experimental Research, San Diego CA (USA)
CCD camera	Photometrics and RS-image software, Roper Scientific Inc., Trenton (USA), Tuscon (USA)
inverted microscope	Olympus, Hamburg
Lupe	Nokia, Ulm
Laser scanning microscope 310	Carl Zeiss, Oberkochen
Pneumatic micromanipulator	Alcatel, Annecy (F)

2.2 Gewebegewinnung und –bearbeitung

2.2.1 Gewinnung und Fixierung der Embryonen für die Immunhistochemie

Frühembryonale Blastocysten des Alters 24h, 28h, 32h, 36h, 40h und 44h wurden von Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer nach Befruchtung durch Böcke derselben Rasse gewonnen. Um die Konzeptionsrate zu verbessern, wurden zwei Wochen vor der Befruchtung einmalig 0,2 ml Receptal intramuskulär oder subkutan injiziert. Nach intravenöser Applikation von 0,2 ml Narcoren (Pentobarbital) wurden zu den oben angegebenen Zeiten nach der Kopulation die Uteri oder die Eileiter per Kaiserschnitt in toto reseziert und später nach Präparation unter dem Lichtmikroskop mit auf 37°C vorgewärmtem PBS durchgespült. Die dadurch erhaltene Embryonen wurden in 4% PFA (siehe Herstellung von PFA) für 1h bei Raumtemperatur fixiert.

2.2.2 Präparation der Embryonen

Für die frühembryonalen Stadien war die Entfernung der Zona Pellucida mit Wolframdrähten nicht möglich, da die Embryonen an diesen haften blieben und sich eine kontrollierbare Entfernung technisch schwierig gestaltete. Mit Hilfe von Mikroscheren ließ sich die Zona Pellucida (ZP) allerdings gut entfernen, wobei besondere Sorgfalt auf die Entfernung des sich um die ZP befindenden mukoiden Mantels gelegt werden musste sowie auf die Unversehrtheit der Blastomeren beim Einschnitt in die ZP und dem vorsichtigen Hinausdrücken des Blastomerenverbandes. Die so bearbeiteten Embryonen wurden für max. 1 Woche in PBSB 1% bei 4°C gelagert. Für längere Lagerungszeiten erfolgte die Überführung in PBS 0,01% NaN₃-Lösung, um einen mikrobiellen Befall der Präparate zu vermeiden. Versuche, die Zona pellucida enzymatisch durch Pronase oder chemisch

durch Tyrode acid zu entfernen, scheiterten sowohl an der Effizienz der Ablösung der Zona als auch an dem beeinträchtigten Färbungsmuster (s. Ergebnisse).

2.2.3 In vitro Kultivierung frühembryonaler Stadien

Für die in vitro Kultivierung der frühembryonalen 4-Zell-, 16-Zell- und Morulastadien wurden Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer folgender Hormonbehandlung unterzogen:

1. 2 Injektionen FSH (siehe Medien Hormone) à 0,32 mg 3 Tage vor der Befruchtung (morgens 72h und abends 60h vor der Befruchtung)
2. 2 Injektionen FSH à 0,64 mg 2 Tage vor der Befruchtung (morgens 48h und abends 36h vor der Befruchtung)
3. 1 Injektion FSH à 0,32 mg am Tag vor der Befruchtung (morgens 24h vor der Befruchtung)
4. Am Abend 9-10h nach der Befruchtung erfolgte die einmalige Gabe von 30 IU hCG (siehe Medien und Hormone)

24h nach der Befruchtung erfolgte die Entnahme der Eileiter wie unter 2.1.1 beschrieben, die mit warmem PBS/PVP 0,005% (Polyvinylpyrrolidon Mol Wt 40.000) durchgespült wurden. Die Embryonen wurden in sterilen Uhrglasgefäßen gesammelt. Der größte Teil der Embryonen befand sich zu diesem Zeitpunkt im 2-Zellstadium. Nicht befruchtete Oozyten, die durch den fehlenden männlichen Vorkern identifiziert wurden, wurden aussortiert. Es erfolgte danach die Überführung in sterile 4-Well Platten mit auf 37°C vorgewärmtem M199 Medium und Auswahl der 2-Zellstadien für die immunhistochemische Färbung. Anschließend wurden die restlichen Embryonen in M199/Hepes Medium transferiert und bei 38°C und 5%CO₂ weiter kultiviert. Die Embryonen wurden zweimal täglich (Vormittag und Nachmittag) begutachtet und sobald die entsprechenden Stadien erreicht waren in PBSB 1% (siehe oben) überführt, in 4% PFA fixiert und wie unter 2.1.2 beschrieben depellucidiert. Die Stadienbestimmung erfolgte durch Zählen der Blastomeren unter der Lupe.

2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von Kernspenderzellen für den Kerntransfer¹

(1) Für den Kerntransfer mit Blastomeren wurden Embryonen im Morulastadium benutzt. Diese Embryonen wurden bei -20°C gelagert, als Kryoprotektor diente DMSO (Stammlösg. für alle Schritte: 3M in Glucose und Natriumpyruvat enthaltendem PBS).

Für die Einfrierung wurden drei Waschschrte in DMSO durchgeführt:

1. 0,5 M DMSO für 5 min.
2. 1 M DMSO für 5 min.
3. 1,5 M DMSO für 15 min.

Danach erfolgte die Einfrierung nach dem „Minicool“ Programm:

1. $+20^{\circ}\text{C}$ auf -6°C (5°C pro min.)
2. -6°C auf -35°C ($0,3^{\circ}\text{C}$ pro min.)
3. -35°C auf -150°C (99°C pro min.)

Das Auftauen erfolgte nach Inkubation für 3 sec. Bei Raumtemperatur und anschließendem Wasserbad für 8 sec. durch folgende Waschschrte:

1. 1,5 M DMSO für 2 min.
2. 1 M DMSO für 5 min.
3. 0,5 M DMSO für 10 min.
4. PBS mit 20% fetalem Kälberserum für 10 min.

Der mukoide Mantel und die Zona Pellucida wurden durch 3minütige Inkubation in Pronase (0,5% in PBS) entfernt. Danach wurden die Embryonen in einem Ca- und Mg-freien Medium (modifiziertes PBS, in dem Ca und Mg durch NaCl [0,2g/l] ersetzt wurden, um die Osmolarität von 290 Milliosmol zu wahren) für 30 min. bei 38°C inkubiert und die Blastomeren wurden mittels einer kalibrierten Glaspipette aus dem Verband gelöst. Bis zu ihrem Gebrauch wurden sie bei 4°C gelagert.

(2) Zur Gewinnung der Cumuluszellen wurden die Oozyten einige Momente in 0,5% Hyaluronidase (Lösung in mit 20mM HEPES ergänztem M199 HEPES-Medium) inkubiert, bis die Follikelzellen abfielen. Danach wurden die Zellen unverzüglich aufgenommen und mehrere Male in M199 HEPES Medium gewaschen. Bis zum Kerntransfer wurden die Zellen bei 38°C in PBS mit 1% PVP überführt (durchgeführt von Nathalie Daniel, s.o.).

¹ (durchgeführt von Nathalie Daniel, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich)

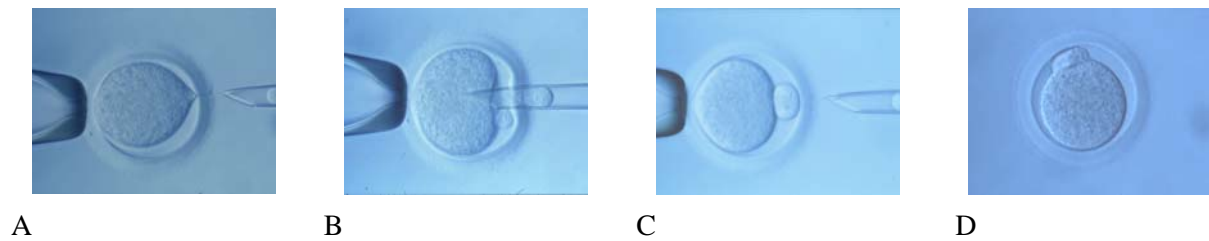
(3) Die fetalen Fibroblasten wurden in Nantes (Laboratoire VIVALIS, Nantes, (F)) präpariert. Aus dem Fetus wurden die Organe entnommen und in kleine Stücke geschnitten. Dann erfolgte eine Inkubation für der Stücke in 10 µl Kollagenase (Verdünnung 1/3 mit PBS) für 10-20 min. bei 37°C und die nicht verdauten Anteile wurden abfiltriert und verworfen. Anschließend wurde der Verdau zentrifugiert und der Bodensatz gewaschen und in Kultur überführt. Diese setzte sich zusammen aus DMEM mit Glutamin (2mM Finalkonzentration) (89µl auf 100µl), 10% fetalen Kälberserum (10µl auf 100µl), Penicillin/Streptomycin (0,1g/l Finalkonzentration) (1µl auf 100µl). Um zu verifizieren, dass es sich um Fibroblasten handelt, wurde eine immunhistochemische Standardfärbung mit Vimentin und Zytokeratin durchgeführt. Fibroblasten wurden an einer positiven Vimentin-Färbung erkannt.

2.2.5 Kerntransfer und Aktivierung der Eizelle²

Die Oozyten (MeioseII) wurden Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer 16h nach Injektion von hCG und Kopulation mit einem vasektomierten Männchen entnommen. Anschließend wurden sie in 0,5% Hyaluronidase 15min. inkubiert und die adhärierenden Cumuluszellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren entfernt. Alle Schritte wurden in M199 Medium mit 20 mM HEPES und Zusatz von 10% vol/vol fetalem Kälberserum durchgeführt. Für die Rekonstruktion von Embryonen durch Kerntransfer wurden die entsprechenden Zellen durch Mikromanipulation in den perivitellinen Raum der enukleierten Oozyten injiziert. Die so erzeugten Embryonen sowie die MII Oozyten (zur Erzeugung von parthenogenetischen Embryonen als Positivkontrolle) wurden 18-20h nach der hCG Gabe zweimal im Abstand von 1h mit Hilfe eines BTX Stimulators (Biotechnologies & Experimental Research Inc., San Diego CA) (3 Stöße von 3.2 kV/cm für 20µs jeweils in 0.3 M Mannitolwasser mit 0.1 mM CaCl₂ und 0.1 mM MgCl₂) elektrisch stimuliert, um die Fusion der Cumuluszelle mit der Eizelle zu induzieren. Die rekonstituierten Embryonen und Eizellen wurden dann für 1h in M199 bei 38°C inkubiert, danach wurde ein zweiter Stromstoss appliziert, um den Abschluss der Meiose II einzuleiten und die Aktivierung fortzuführen. Die Embryonen und Oozyten wurden für 1h bei 38°C in M199 Medium mit 5µg/ml CHX (Sigma) und 2mM 6-DMAP inkubiert und danach in 50µl mit 2,5% fetalem Kälberserum versetztem B2 Medium (Laboratoire CCD, Paris, Frankreich) unter Mineralöl (Sigma) bei 38°C und 5% CO₂ in Kultur gebracht. In den gewünschten Zellstadien wurden die Embryonen aus dem Medium genommen und in PBSB 1% 5min gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung in 4% PFA und die Depellucidierung mit der Mikroschere. Da sich bei den rekonstituierten Embryonen kein mukoider Mantel um die Pellucida befand, war die Depellucidation leichter möglich als bei den normalen Embryonen.

² (ausgeführt von Mireille Challah-Jacques und Patrick Chesné, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich).

Abb. 1: Die wichtigsten Schritte während der Klonierung, freundlichst bereitgestellt von P. Chesné, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich



A = Aspiration des Zellkerns der Oocyte, B = Injektion des Spenderkerns in die enukleierte Oocyte, C = Oocyte mit Spenderkern, D = Oocyte nach elektrischer Stimulation mit fusioniertem Spenderkern

2.3 Färbung, Behandlungen der Embryonen und Auswertung

2.3.1 Protokoll für die Immunhistochemie

1. 4 x 5 min PTXB (siehe Chemikalien)
2. 4h PG2 (siehe Antikörper)
3. 3x 5min. PTXB
4. 45 min. Cy3 (siehe Antikörper)
5. 3x 5 min. PTXB
6. 30 min. PG2 → Blockade des Cy3-Epitops
7. 30 min. MTC02 (siehe Antikörper)
8. 3x 5min PTXB
9. 30 min. IgG 1 (siehe Antikörper)
10. 3x 5 min. PTXB
11. 5 min. DAPI oder Hoechst (siehe Antikörper)
12. 2x 5 min. PBSB

Die Immunhistochemie wurde an whole mount Präparaten im 2-, 4-, 8- bis 16-Zell- und 16- -Morulastadium ausgeführt. Für die frühembryonalen Stadien wurden die Färbungen in 96-Well-Platten (Nunc) durchgeführt. Das Umsetzen der einzelnen Embryonen erfolgte durch Pipettieren mit dem Mund mit Hilfe von Mikroglaskapillaren (Harvard Apparatus) gleicher Öffnungsbreite, einem Tygoonschlauch (Roth) und gefilterten Pipettenspitzen (Biozym). Die Keimscheiben wurden in 24-Well-Platten (Nunc) gefärbt und mit Glaspasteurpipetten umgesetzt.

2.3.2 Inhibition der zygotischen Transkription durch α -Amanitin und Actinomycin-D

Die Inkubation mit α -Amanitin erfolgte nach einem Protokoll von Evelyne Campion (pers. Mitteilung). Die Embryonen wurden 19h p.c. (zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Embryonen noch im 1-Zell-Stadium) wie unter 2.1.4 beschrieben gewonnen und in 500 μ l M199 Hepes + 10 μ l α -Amanitin (5mg/ml) bei 38°C / 5% CO₂ in Kultur überführt. Die Entwicklung der Embryonen wurde unter einer vorgewärmten Lupe nach 43h p.c. und 48h p.c. beobachtet. Nach 48h wurden die Embryonen aus der Kultur genommen und in PBSB 1% gewaschen. Danach wurden sie für 1h in 4% PFA fixiert und, wie in 2.1.1 beschrieben, weiterbehandelt.

Die Inkubation mit Actinomycin-D erfolgte nach einem Protokoll von Evelyn Campion (pers. Mitteilung). Die Embryonen wurden 19h p.c., wie unter 2.1.4 beschrieben, gewonnen und in M199/Hepes Medium bei 38°C/5% CO₂ bis zum 2-Zellstadium kultiviert, danach erfolgte die Überführung in 0,4 μ l Actinomycin-D auf 500 μ l Hepes M199. Die Entwicklung der Embryonen wurde unter einer vorgewärmten Lupe im Alter von 43h, 47h und 50h beobachtet. Die Embryonen wurden dann im Alter von 50h p.c. aus der Kultur genommen, in PBSB 1% gewaschen und für 1h in 4% PFA fixiert und, wie unter 2.1.1 beschrieben, weiterbehandelt.

Die α -Amanitin und Actinomycin-D Inkubation erfolgte ein weiteres Mal gemeinsam analog dem Protokoll für die α -Amanitin Inkubation. Direkt nach der Gewinnung 19h p.c. wurden die Embryonen entweder in 4 μ l Actinomycin-D auf 500 μ l M199/Hepes Medium oder in 500 μ l M199/Hepes Medium mit 10 μ l α -Amanitin überführt. Es erfolgte also vor der Actinomycin-D-Inkubation anders als in der vorangegangenen Inkubation keine Kultivierung mehr bis zum 2-Zellstadium. Im Alter von 48h p.c. erfolgte dann die Fixierung in 4% PFA für 1h und die Depellucidation.

2.3.3 Inkubation mit Tyrode´s Säure und Pronase zur enzymatischen Entfernung der Zona Pellucida

(1) Die Inkubation mit Tyrode´s Säure wurde im 4-Zell- und 16-Zellstadium an normalen Embryonen nach in vitro Entwicklung 24h p.c. durchgeführt. Die Herstellung erfolgte wie in *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual* (Hogan, B. et al., 1994) beschrieben. Die Embryonen wurden unfixiert in Tyrode acid überführt und 1 min. unter Beobachtung unter der Lupe durch Rühren des Ansatzes mit der Glaspipette durchmischt. Sogleich erfolgte die Versetzung der Embryonen in PBSB 1%. Die PBSB 1% Inkubation erfolgte 6x für 1min. unter stetem Bewegen der Embryonen durch Rühren mit der Glaspipette. Wenn die Zona Pellucida sich nicht gelöst hatte, wurde mittels einer eng

kalibrierten Pipette versucht, sie durch häufige Aspiration der Embryonen zu lösen. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual

(2) Die Inkubation mit Pronase wurde im 4-Zell- und 16-Zellstadium an normalen Embryonen nach in vitro Entwicklung 24h p.c. durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde 100mg Pronase in 20ml M199 Hepes Medium gelöst und für 30min auf den Schüttelinkubator gestellt. Danach erfolgte Zentrifugation bei 1000 rpm/min für 10 min.. Der Überstand wurde durch einen 0,22µl Filter abfiltriert und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert (durchgeführt von Patrick Chesné).

Die Inkubation erfolgte gemäß einem Protokoll von Patrick Chesné, INRA, Jouy-en-Josas:

1. Vorbereitung einer 4-Well-Schale 1h vor der Inkubation mit 1x Pronase und 3x M199 Hepes/10% BSA-Medium und Lagerung bei 38°C
2. Inkubation der 4-Zell-Embryonen für 3min., der 16-Zell-Embryonen für 5min.
3. Überführung in M199 Hepes/10% BSA-Medium
4. Sofort nach Schritt 3 weiter Überführung in M199 Hepes/10% BSA-Medium
5. Inkubation bei 38°C für 3-5min.
6. Pipettierung der Embryonen durch eine eng kalibrierte Pipette, um die Zona Pellucida komplett zu lösen

Alle Schritte müssen bei 38°C ausgeführt werden, mit einem Minimum an Kontakt der Embryonen mit Raumtemperatur.

2.3.4 Mikroskopie der Färbungen

Die frühembryonalen Stadien wurden in PBS auf spezielle Objektträger übertragen. Daraufhin wurde das PBS mit Hilfe der Mikroglasspipette wieder entzogen und zeitgleich 1,8-2µl Vectaschild mit der Eppendorfpipette auf den Objektträger (Carl Roth) aufgetragen, so dass die Embryonen darin eintauchten. Es erfolgte sogleich die Einbettung unter einem Deckglas.

Die am Anatomischen Institut der Martin-Luther-Universität, Halle Wittenberg, durchgeführten Färbungen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axio Plan (ZEISS, Germany) unter den Objektiven 16x Öl und 40x Öl begutachtet und mit dem Programm Axio Vision CZJ 2.05 abphotographiert. In Frankreich im INRA gefärbte Embryonen (alle in vitro Embryonen, sowie die Fibroblasten- und Cumulus-Klone) wurden unter dem Mikroskop Zeiss Axiovert M35 (Carl ZEISS, Germany) begutachtet und mit dem der CCD Kamera Photometrics CoolSNAP "cf " (Roper Scientific Inc., USA) unter automatischer Belichtungszeit mit einem 40er Objektiv ohne Öl photographiert.