

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Aigner

Angefertigt am
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
(PD Dr. Markus Brielmeier)

Überprüfung der Eignung von Ectoin als Zusatz zum Kryoprotektivum bei der Archivierung von murinen Embryonen und Spermien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Annalena Maria Riedasch
aus Heidelberg

München, 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Schneider

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Für meinen Stiefvater

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Literatur	3
II.1.	Reproduktion bei der Labormaus	3
II.1.1.	Maus ist nicht gleich Maus.....	3
II.1.2.	Sexualzyklus der Maus.....	4
II.1.3.	Superovulation von Spenderweibchen	5
II.1.4.	Embryonenproduktion und Gewinnung von Mausembryonen	7
II.1.4.1.	<i>In-vivo</i> -Produktion von Embryonen.....	7
II.1.4.2.	Embryonengewinnung durch <i>In-vitro</i> -Fertilisation (IVF).....	8
II.1.5.	Transfer von Embryonen in Empfängermäuse	8
II.2.	Methoden der Kryokonservierung.....	10
II.2.1.	Kryokonservierung von Mausembryonen	10
II.2.2.	Kryokonservierung von Mausspermien.....	15
II.3.	Das kompatible Solut Ectoin.....	18
II.3.1.	Herkunft und Herstellung von Ectoin	18
II.3.2.	Wirkungsweise und Verwendungszweck von Ectoin	19
II.3.3.	Verwendung von Ectoin bei der Kryokonservierung	20
II.4.	Ziel dieser Arbeit.....	21
III.	Tiere, Material und Methoden	22
III.1.	Tiere	22
III.1.1.	Haltung der Mäuse	22
III.1.2.	Verwendete Mausstämme	23
III.2.	Material.....	23
III.2.1.	Hormone.....	23
III.2.2.	Chemikalien.....	23
III.2.3.	Verbrauchsmaterialien.....	24
III.2.4.	Anästhetika und Analgetika	25
III.2.5.	OP-Materialien.....	26
III.2.6.	Geräte.....	26
III.2.7.	Ansatz der Medien.....	27
III.2.7.1.	Hormone.....	27
III.2.7.2.	M2 Medium.....	28
III.2.7.3.	Einfriermedium für das Embryofreezing.....	28
III.2.7.4.	Einfriermediums für das Spermfreezing.....	28

III.2.7.5.	Kalium Simplex Optimized Medium	29
III.3.	Versuchsplanung	29
III.4.	Operative Eingriffe	30
III.4.1.	Anästhesie und Analgesie	30
III.4.2.	Vasektomie der Böcke	31
III.4.3.	Embryotransfer	31
III.5.	Einsatz von Ectoin beim Embryofreezing	33
III.5.1.	Superovulation der Spenderweibchen	33
III.5.2.	<i>In-vivo</i> -Embryonengewinnung	33
III.5.2.1.	Präparation der Eileiter für die <i>In-vivo</i> -Embryonengewinnung	33
III.5.2.2.	Spülen der Eileiter und Waschen der Embryonen	34
III.5.3.	Dosierungsreihe für Ectoin beim Embryofreezing	35
III.5.3.1.	slow freezing von Embryonen	35
III.5.3.2.	Ansetzen der Dosierungsreihe mit Ectoin	36
III.5.3.3.	Auftauen und Revitalisierung der kryokonservierten Embryonen	37
III.5.3.4.	Beobachtung der <i>In-vitro</i> -Weiterentwicklung der Embryonen	38
III.5.4.	Beurteilung der Embryonen	38
III.6.	Einsatz von Ectoin beim Spermfreezing	39
III.6.1.	Spermiengewinnung	39
III.6.1.1.	Präparation der Nebenhoden	39
III.6.1.2.	Feinpräparation und Gewinnung der Spermien	39
III.6.2.	Dosierungsreihe für Ectoin beim Spermfreezing	40
III.6.2.1.	Ansetzen der Dosierungsreihe mit Ectoin und Spermfreezing	40
III.6.2.2.	Auftauen der kryokonservierten Spermaproben	42
III.6.2.3.	Qualitätsmessung der Spermien	42
III.6.3.	<i>In-vitro</i> -Fertilisation (IVF)	43
III.6.3.1.	Spermfreezing für die IVF	43
III.6.3.2.	Superovulation der Spenderweibchen	43
III.6.3.3.	Präparation der Eileiter und Eröffnen der Ampullae	44
III.6.3.4.	Durchführung der IVF	44
III.7.	Auswertung und Statistik	45
IV.	Ergebnisse	46
IV.1.	Embryonengewinnung	46
IV.1.1.	<i>plug</i> Raten	46
IV.1.2.	Anzahl der Embryonen pro Maus	47
IV.1.3.	Anzahl der Oozyten pro Maus	48

IV.2.	Anwendung von Ectoin beim Embryofreezing	49
IV.2.1.	Seedingzeiten	49
IV.2.2.	CD-1	51
IV.2.3.	C3H	53
IV.2.4.	B6	56
IV.3.	Embryotransfer	58
IV.4.	Beurteilung und Einteilung der aufgetauten Embryonen	60
IV.5.	Anwendung von Ectoin beim Spermfreezing	61
IV.5.1.	CD-1	61
IV.5.2.	C3H	63
IV.5.3.	B6	64
IV.6.	<i>In-vitro</i> -Fertilisation (IVF)	65
IV.6.1.	CD-1	65
IV.6.2.	C3H	66
IV.6.3.	B6	67
V.	Diskussion	69
V.1.	Embryonengewinnung und Superovulation	69
V.1.1.	<i>plug</i> Raten bei verschiedenen Mausstämmen	69
V.1.2.	Anzahl an Embryonen bzw. Oozyten pro Maus	70
V.2.	Embryofreezing	72
V.2.1.	Embryofreezing bei verschiedenen Mausstämmen	72
V.2.2.	Einfluss von Ectoin beim Embryofreezing und bei der Revitalisierung ..	75
V.3.	Spermfreezing	79
V.3.1.	Spermfreezing bei verschiedenen Mausstämmen	79
V.3.2.	Einfluss von Ectoin beim Spermfreezing und IVF	83
V.4.	Schlussfolgerungen	86
VI.	Zusammenfassung	88
VII.	Summary	91
VIII.	Literaturverzeichnis	93
IX.	Anhang	105
IX.1.	Abbildungsverzeichnis	105
IX.2.	Tabellenverzeichnis	107
IX.3.	Formelverzeichnis	107
IX.4.	Abkürzungsverzeichnis	108

I. Einleitung

Im Rahmen biomedizinischer Forschung ist die Archivierung des genetischen Materials von Mausstämmen in einer modernen Versuchstierhaltung unerlässlich. Durch Kryokonservierung von murinen Embryonen und Spermien können im Vergleich zur Haltung und Zucht von Mäusen Tierzahlen reduziert und zugleich der Genpool vor Verlusten durch genetische Drift oder bestandsgefährdende Infektionen bewahrt werden (Glenister und Thornton, 2000; Landel, 2005).

Die Kryokonservierung von Embryonen und Spermien erfolgt unter kontrollierten Einfrierbedingungen in einem konzentrierten Kryoprotektivum mit anschließender Lagerung in flüssigem Stickstoff, wobei Zellschädigung durch Eiskristallbildung weitgehend vermieden werden soll. Allerdings variieren die Kryokonservierungserfolge bei unterschiedlichen Mauslinien stark, und häufig kommt es zu irreversiblen Zellschäden während des Einfrier- und Auftauprozesses. In diesen Fällen sind Embryonen nach dem Auftauen nicht mehr revitalisierbar, und kryokonservierte Spermien verlieren ihre Fertilität.

Seit der ersten erfolgreichen Kryokonservierung von Embryonen (Whittingham, 1971) wurden die Methoden, basierend auf verschiedenen Protokollen, fortwährend weiter entwickelt. Dagegen werden bei der Kryokonservierung von Spermien bis heute weitgehend einheitliche Protokolle verwendet, bei denen immer weiter die Zugabe neuer Substanzen getestet wird, um die Methoden zuverlässiger und effizienter zu machen.

Im Jahr 1985 wurde von Galinski et al. in Bakterien des Genus *Ectothiorhodospira* eine protektive Substanz gefunden, die von diesen extremophiler Organismen gebildet und ausgeschieden wird, um ihnen das Überleben in ihren Habitaten zu sichern (Galinski et al., 1985). Diese als „Ectoin“ bezeichnete Substanz gehört zu den sogenannten „kompatiblen Soluten“, einer Gruppe von niedermolekularen Substanzen, die auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch sind und Zellen, Membranen, Enzyme oder DNA vor hohem osmotischem Druck, Hitze, Kälte und Austrocknung schützen können. Ectoin wird inzwischen industriell gewonnen und unter anderem in der Hautpflege zum Schutz gegen UV-bedingte Zellschädigungen eingesetzt. In einer Untersuchung an Vorkernembryonalstadien der Auszuchtmauslinie Crl:CD1(ICR) konnte durch Einsatz von Ectoin der Kryokonservierungserfolg annähernd verdoppelt werden (Lohmer et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Anwendungsmöglichkeiten von Ectoin im Bereich der Kryokonservierung von Mausembryonen und -spermien bei drei verschiedenen Wildtyp-Mausstämmen (CrI:CD-1(ICR)/DCM (Department of Comparative Medicine; CD-1), C3HeB/FeJ/DCM (C3H) und C57BL/6J/DCM (B6)) untersucht werden. Ziel ist es Embryonen und Spermien zuverlässiger und mit größeren Revitalisierungsraten einzufrieren, archivieren und auftauen zu können. Eine derartige Optimierung der Kryokonservierungstechniken würde letztendlich zu einer Tierzahlreduktion im Sinne der „3R“ (Grundprinzip bei Tierversuchen: *refine, reduce, replace*) führen (Russell und Burch, 1959), da weniger Spendermäuse für die Embryonen- und Spermagewinnung eingesetzt werden müssten.

II. Literatur

II.1. Reproduktion bei der Labormaus

II.1.1. Maus ist nicht gleich Maus

Die Maus als Versuchstier entwickelte sich Anfang des 20. Jahrhunderts aus Hobbyzuchten, wie derjenigen von Abbie Lathrop aus eingefangenen Wildmäusen, selbst gezüchteten Mäusen und Japanischen Tanzmäusen. Zusammen mit dem Pathologen Leo Loeb erforschte Lathrop die Effekte des genetischen Hintergrundes und der Inzucht auf das Auftreten von spontanen Tumorentstehungen. Aus dieser Zusammenarbeit ging die erste rein wissenschaftliche Zucht von Mäusen hervor. Lathrop und Loeb waren 1915 die ersten, die Unterschiede zwischen einzelnen Mausstämmen, zu denen auch DBA, C57 und C58 gehörten, feststellten (Lathrop und Loeb, 1915; Steensma et al., 2010). Der bis heute wichtigste Inzuchtstamm C57BL/6 entwickelte sich aus zwei Muttertieren dieser ersten C57- und C58-Zuchten von Lathrop (Nagy et al., 2003). Heute werden je nach Datenbank 14115 Stämme bei Mouse Genome Informatics (MGI) und bis zu 22675 Stämme bei der International Mouse Strain Resource (IMSR) geführt (Stand Februar 2012), wobei zu der letzteren auch gefrierkonservierte Ovarien, Embryonen und Spermien gezählt werden. Ständig kommen neue Stämme hinzu oder werden gelöscht.

In der Forschung spielen heute vor allem Inzuchtstämme eine wichtige Rolle, da alle Tiere desselben Inzuchtstammes ein weitgehend identisches Erbmaterial besitzen. Dagegen können verschiedene Inzuchtstämme zueinander eine große Variabilität in ihrer phänotypischen Ausprägung aufweisen (Linder, 2006). So gibt es zum Beispiel Unterschiede im Verhalten (Moy et al., 2008), in Körperbau und Gewicht (Reed et al., 2007) sowie in der Reproduktion (Auerbach et al., 2003; Byers et al., 2006). Inzwischen gibt es zu den wichtigsten Stämmen ausführliche Charakterisierungen, die die Auswahl von geeigneten Versuchstieren vereinfachen (IMSR, MGI).

II.1.2. Sexualzyklus der Maus

Mäuse werden im Alter von ca. sechs Wochen geschlechtsreif, was bei der weiblichen Maus an der Vaginalöffnung und dem Auftreten der ersten Brunst erkennbar ist (Monzavifar et al., 1970; Nagy et al., 2003). Als zuchttauglich gelten sie ab einem Alter von 6 bis 8 Wochen. Die Gewinnung von murinen Embryonen wird dadurch erleichtert, dass Mäuse einen ganzjährig, polyöstrischen Sexualzyklus aufweisen und jederzeit zur Embryonenproduktion angeregt werden können. Der Zyklus der weiblichen Maus dauert in der Regel ungefähr vier bis sechs Tage (Fox et al., 2007), allerdings zeigte Parkes, dass unter 100 betrachteten Zyklen auch Zykluslängen von 2 bis hin zu 28 Tagen vorkommen können (Parkes, 1928). Diese Variabilität kann auf genetischen und physiologischen Faktoren, Stress, Fütterung und sozialen Bedingungen beruhen (Fox et al., 2007). Etwa zwei bis drei Stunden nach Einsetzen des Östrus kommt es zur spontanen Ovulation.

Der Zyklus der Maus wird durch Pheromone und Haltungsbedingungen beeinflusst. So kann der Urin von Männchen bei weiblichen, bereits geschlechtsreifen Tieren den Östrus induzieren. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker als Whitten-Effekt bezeichnet (Whitten, 1959; Hau und Hau, 2007). Beim so genannten Lee-Boot-Effekt (Van Der Lee und Boot, 1955; Ma et al., 1998) wird der Zyklus von in Gruppen lebenden weiblichen Tieren durch Chemosignale im Urin unterdrückt oder verzögert, ohne aber die Regelmäßigkeit des Zyklus zu beeinträchtigen. Der Vandenbergh-Effekt beschreibt eine vorgezogene, beziehungsweise beschleunigte Geschlechtsreife bei präpuberalen weiblichen Mäusen durch bestimmte Chemosignale (Vandenbergh, 1989). Schließlich kommt es beim Bruce-Effekt zum Abbruch der Trächtigkeit, wenn eine weibliche Maus in einem bestimmten Zeitraum nach der Verpaarung dem Geruch eines fremden Männchens ausgesetzt wird (Bruce, 1959; Becker und Hurst, 2009).

Der tägliche Tag-Nacht-Rhythmus beeinflusst den Zeitpunkt des Anstiegs des Luteinisierenden Hormons (LH) und somit den Zeitpunkt der Ovulation. Dadurch kann der Zeitpunkt der Ovulation durch Veränderung des Hell-Dunkel-Zyklus manipuliert werden (Snell et al., 1940). In der Regel findet die Ovulation mitten in der Dunkelphase kurz nach Mitternacht statt. Bei umgekehrten Lichtverhältnissen findet die Ovulation folglich um die Mittagszeit statt (Braden, 1957).

II.1.3. Superovulation von Spenderweibchen

Die Superovulation hat zum einen den Zweck, den sexuellen Zyklus der weiblichen Tiere zu synchronisieren und zum anderen, je nach Mausstamm, die Anzahl ovulierter Oozyten zu erhöhen. Vor allem bei Auszucht- und Hybridmäusen nimmt die Anzahl der Embryonen nach der Superovulation zu (Hedrich, 2008). Das 1971 von Whittingham erstellte Schema zur Superovulation wird noch heute angewendet (Whittingham, 1971). Hierbei werden den Tieren am Tag 1 5 I.E. des *Pregnant Mare's Serum Gonadotropins* (PMSG), und 48-50 Stunden später 5 I.E. des *human Chorionic Gonadotropins* (hCG) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. PMSG soll den Oozyten-Reifungseffekt des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und hCG den Ovulations-induzierenden Effekt des Luteinisierenden Hormons (LH) nachahmen. Deswegen müssen die Gonadotropingabe und der eigene Zyklus der Maus aufeinander abgestimmt werden. Das höchste Ergebnis wird bei der PMSG-Gabe während des Östrus erzielt (Tarin et al., 2002). 10-13 Stunden nach der hCG-Gabe findet in der Regel die Ovulation statt (Nagy et al., 2003). Der Effekt der Superovulation hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab (Mausstamm, Alter, Gewicht, Zyklusphase, Injektionszeitpunkt, Dosis und Lichtzyklus), die in jeder Tierhaltung spezifisch berücksichtigt und entsprechend aufeinander abgestimmt werden müssen (Nagy et al., 2003).

Um eine optimale Befruchtungsfähigkeit der Eizellen zu gewährleisten und die Aushärtung der *Zona pellucida* zu verhindern, muss zudem die Eizellgewinnung an den Zeitpunkt der Hormongabe und den Tag-Nacht-Zyklus angepasst werden.

Für die *In-vitro*-Fertilisation (IVF) werden präpuberale Weibchen (im Alter von 21-28 Tagen) als Spender benötigt. Um Embryonen *in vivo* zu gewinnen, werden geschlechtsreife Weibchen (älter als 56 Tage) eingesetzt (Ozgunen et al., 2001). Die Verwendung deutlich älterer Tiere hat eine negative Auswirkung auf die Oozytenanzahl, die Auftaurate und die Furchungsrate bei der Weiterentwicklung (Yan et al., 2010).

Fertilisation und Weiterentwicklung

Jede ovulierte Eizelle ist von der *Zona pellucida* und zahlreichen Kumuluszellen umgeben. Durch die Bewegung von Zilien und peristaltischen Kontraktionen und mit Hilfe der Granulosazellen gelangen die Eizellen in das Infundibulum und kurz darauf in die Ampulla des Eileiters, wo die Befruchtung der Eizelle erfolgt (Fox et al., 2007). Wenn die Spermien die Ampulla meist nur wenige Minuten nach der Ejakulation erreichen, sind sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht bereit für die Fertilisation. Sie müssen sich erst einem Reifungsprozess unterziehen, der als Kapazitation bezeichnet wird (Nagy et al., 2003). Die Hyperaktivität und die Akrosomenreaktion sind die beiden Hauptmerkmale des bis heute noch teilweise unverstandenen Kapazitationsprozesses (Kota et al., 2010). Nur ein kleiner Teil der Spermien wird hyperaktiviert. Dadurch nehmen die Geschwindigkeit und die Schlagkraft des Spermischwanzes deutlich zu, und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sie den Uterus möglichst schnell durchwandern und die Kumuluszellen durchdringen (Nieschlag et al., 2009). Die Migration erfolgt vermutlich durch Thermotaxis, wozu nur kapazitierte Spermien fähig sind (Bahat und Eisenbach, 2006). Bahat et al. wiesen nach, dass zum Zeitpunkt der Ovulation zwischen Ampulla und Isthmus beim Kaninchen ein Temperaturunterschied von ca. 0,7°C und beim Schwein von ca. 2°C herrscht. Die Spermien schwimmen folglich der höheren Temperatur entgegen (Bahat et al., 2005). Während der Kapazitation werden Oberflächenproteine entfernt und Membranlipide verändert. Durch enzymatische Spaltungen verändert sich die Rigidität der Membranen und durch den Cholesterolefflux der Status der *Lipid-Rafts* (Mikrodomänen), an denen die Signaltransduktion zur Wahrnehmung und Bindung an die *Zona pellucida* stattfindet (Nieschlag et al., 2009).

Nach erfolgreicher Kapazitation findet die Penetration des *Cumulus oophorus* mit Hilfe der Hyaluronidase statt. Diese zersetzt die viskös-elastische Matrix aus Hyaluronsäure zwischen den Granulosazellen. Über die Mikrodomänen kommt es zur Punktfusion zwischen Plasmamembran und der darunter liegenden äußeren akrosomalen Membran des Spermatozoons. Es folgt eine Interaktion mit der *Zona pellucida*, durch welche es anschließend zur Akrosomenreaktion kommt. Diese schafft die Voraussetzung für die Fusion mit der Eizelle (Busch und Holzmann, 2001).

Nach Bildung der Zygote kommt es auf dem Weg zum Uterus etwa alle elf Stunden zur Zellteilung. Der Transport der Zygote erfolgt durch Muskelkontraktionen im

Eileiter. Als Morulastadium (16-32 Zellen) gelangen die Embryonen 2,5-3 Tage nach der Ovulation in den Uterus, wo sie als Blastozyste an Tag 4 aus der *Zona pellucida* schlüpfen und es zur Implantation kommt. Dieser Prozess wird die gesamte Zeit durch Progesteron und Östrogen gesteuert (Nieschlag et al., 2009). Innerhalb von 19-21 Tagen nach der Befruchtung entwickeln sich die Embryonen zu lebensfähigen Mäusen.

II.1.4. Embryonenproduktion und Gewinnung von Mausembryonen

II.1.4.1. In-vivo-Produktion von Embryonen

Bei der *In-vivo*-Embryonengewinnung durch Anpaarung von Mäusen werden zuchtreife Weibchen, wie in Abschnitt II.1.3 beschrieben, superovuliert. Anschließend werden die Weibchen direkt nach der hCG-Gabe mit jeweils einem geschlechtsreifen Bock verpaart. Nach der Verpaarung der Tiere können anhand eines vaginalen Pfropfes die gedeckten Tiere erkannt werden. Dieser so genannte *plug* besteht aus dem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Böcke und verbleibt nach dem Deckakt bis zu 24 Stunden sichtbar in der Scheide der Weibchen. Dadurch wird zum einen eine physikalische Barriere geschaffen, durch welche kein weiteres Männchen die Möglichkeit zur Begattung hat. Zum anderen wird die Gelbkörperbildung im weiblichen Ovar stimuliert sowie das Ejakulat am Auslaufen gehindert. Allerdings lässt sich allein durch das Vorhandensein eines *plugs* keine sichere Aussage über eine eventuelle Trächtigkeit machen (Fox et al., 2007). Es gibt Mausstämme, die eine relativ hohe *plug* Rate haben, ohne, dass es bei allen *plug* positiven Tieren zur Trächtigkeit kommt, wie z.B. C57BL/6J.

Die Tatsache, dass je nach Mausstamm eine unterschiedliche Anzahl von Embryonen pro superovuliertem Weibchen gewonnen werden kann, muss bei der Berechnung von Tierzahlen berücksichtigt werden. So muss bei C57BL/6J eine entsprechend größere Anzahl an Tieren einkalkuliert werden, um die gleiche Menge an Embryonen wie bei CD-1 oder C3HeB/FeJ zu erhalten. Um Embryonen zu gewinnen, werden nach dem Töten der *plug* positiven Tiere deren Eileiter präpariert und anschließend gespült.

II.1.4.2. Embryonengewinnung durch In-vitro-Fertilisation (IVF)

Im Gegensatz zur *In-vivo*-Produktion, bei der sich die Paarung der Tiere über viele Stunden erstrecken kann (Nagy et al., 2003), wird bei der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) eine Synchronisation von Spermien-Kapazitation und Eizell-Reife (Maturation) erreicht, wodurch prinzipiell eine größere Anzahl an Embryonen gewonnen werden kann. Weitere Vor- und Nachteile der IVF im Gegensatz zur *In-vivo*-Produktion werden in Abschnitt II.2.2 dargestellt. Mit dem Aufkommen der routinemäßigen Kryokonservierung von Spermien wurde die IVF eine wichtige Methode zur Rederivierung kryokonservierter Mausstämme.

Für eine erfolgreiche Fertilisation müssen sich sowohl Eizellen als auch Spermien im befruchtungsfähigen Zustand befinden, wenn sie in der Petrischale zusammen gebracht werden. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt bei der Eizelle die Maturation und bei den Spermien die Kapazitation abgeschlossen sein müssen. Deshalb ist auch hier die Optimierung der Zeiten von Superovulation und Eizell- bzw. Spermagewinnung Voraussetzung, um ein frühzeitiges Aushärten der *Zona pellucida* zu verhindern. Sind Kapazitation und Maturation nicht optimal aufeinander abgestimmt, z.B. aufgrund von Verzögerungen im Ablauf einer IVF, hat die Aushärtung der *Zona pellucida* möglicherweise zu früh stattgefunden, so dass es zu einer geringen Ausbeute an Embryonen kommt. Zwar kann dieses Problem mittels einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) umgangen werden, aber meistens haben bereits eine Corticalreaktion und eine Depolarisierung stattgefunden, weshalb die Effizienz der ICSI in diesen Fällen in der Regel auch gering ist (Larman et al., 2006).

II.1.5. Transfer von Embryonen in Empfängermäuse

Bei der Maus erfolgt der Embryotransfer in der Regel über einen chirurgischen Eingriff in pseudogravide Empfängertiere (Rezipienten). Hierfür eignen sich nicht alle Stämme gleich gut. Es werden bevorzugt Auszuchtweibchen, wie CD-1 und NMRI, oder F1 Hybriden (B6 x DBA/2) als Rezipienten verwendet (Nagy et al., 2003), da Weibchen dieser Stämme viele Embryonen austragen können und als fürsorgliche „Mütter“ gelten. Die Weibchen müssen gesund und geschlechtsreif sein und sollten etwa zwischen 25 bis 35 Gramm Körpergewicht aufweisen, um Nachkommen gut und sicher austragen und aufziehen zu können.

Die Gewinnung pseudogravider Rezipienten erfolgt durch die Verpaarung geschlechtsreifer Weibchen mit vasktomierten Böcken.

In der Regel werden die Tiere für einen Tag oder bis zu drei Tagen verpaart, wobei die Ausbeute *plug* positiver Tiere an Tag 3 dank des Whitten-Effekts größer ist. Ovulation und Begattung finden bei östrischen Weibchen während der Dunkelphase statt, so dass der auf den *plug* folgende Tag als Tag 0,5 der Pseudogravidität gezählt wird. Als Rezipienten werden nur *plug* positive Tiere verwendet (Schenkel, 2006).

Vasktomierte Böcke erhält man durch operatives Entfernen der Nebenhodenschwänze oder durch das Durchtrennen des Samenleiters. Die Testosteronproduktion und somit die Libido wird nicht beeinträchtigt, da der Hoden erhalten bleibt (Schenkel, 2006). 2010 konnten erstmals erfolgreich sterile Männchen gezüchtet werden (Haueter et al., 2010). Dies wäre eine Möglichkeit die invasive chirurgische Operation zu vermeiden.

Für den Embryotransfer eignen sich direkt gewonnene und aufgetaute Embryonen, sowohl aus *In-vivo*-Produktion als auch aus der IVF. Die besten Ergebnisse werden mit direkt *in vivo* gewonnenen Embryonen erzielt. Aufgetaute Embryonen oder Embryonen aus der IVF sind im Allgemeinen empfindlicher und können leichter beim Transport, vor dem Transfer oder nach dem Transfer in der Maus degenerieren.

Bei einem Ovidukttransfer werden 0,5 bis 2,5 Tage alte Embryonen mittels einer Transferkapillare in den Eileiter am Tag 0,5 der Pseudogravidität transferiert. Embryonen in einem höheren Entwicklungsstadium (Blastozysten oder Morulae) werden direkt in den Uterus am Tag 2,5 der Pseudogravidität eingebracht. In der Regel werden dem Empfängertier beim Eileitertransfer nicht mehr als 20 Embryonen eingesetzt. Bei weniger als zehn transferierten Embryonen besteht die Gefahr, dass der Wurf zu klein ist und von dem Rezipienten aufgefressen wird (Schenkel, 2006). Der Transfer kann sowohl einseitig (alle Embryonen in einen Eileiter) als auch beidseitig (jeweils die Hälfte der Embryonen in jeden Eileiter) durchgeführt werden. Der Zugang erfolgt entweder über kleine Schnitte links und/oder rechts in der Flanke oder über einen größeren Schnitt in der Medianen (Nagy et al., 2003). Zu bevorzugen ist der einseitige Eingriff aufgrund der geringeren Belastung für die Tiere (nur einseitige Wundöffnung, kürzere Narkosedauer). Der Vorteil des beidseitigen Transfers ist, dass es im Falle eines einseitigen Defekts nicht zu einem vollständigen Verlust aller Embryonen kommen würde (Schenkel, 2006).

Alternativ zum chirurgischen Eingriff besteht die Möglichkeit Embryonen transzervikal zu transferieren. Diese Methode ist allerdings erst ab dem Morula-Stadium einsetzbar. Dabei werden die Embryonen mittels eines Spekulum und einem kleinen Katheter über die Zervix direkt in eines der beiden Uterushörner injiziert. Laut Green et al. kann mit dieser Methode bei Blastozysten ein Rederivierungserfolg (Anzahl geborener Junge/Anzahl transferierter Embryonen) von 33 % erreicht werden (Green et al., 2009).

In der Regel ist nach ungefähr zwölf Tagen erkennbar, ob die Maus aufgenommen hat. Die Trächtigkeitsdauer beträgt 19-21 Tage, wobei kleine Würfe länger getragen werden als große (Fox et al., 2007). Dauert eine Trächtigkeit deutlich länger als die üblichen 21 Tage, kann ein Kaiserschnitt durchgeführt werden, um den Erfolg des Embryotransfers zu sichern.

II.2. Methoden der Kryokonservierung

II.2.1. Kryokonservierung von Mausembryonen

Whittingham gelang es 1971/72 als erstes erfolgreich Mausembryonen zu kryokonservieren (Whittingham, 1971; Whittingham et al., 1972). Dabei verwendete er das *slow freezing* Protokoll mit Dimethylsulfoxid (DMSO), nach dessen Prinzip bis heute immer noch Embryonen eingefroren werden. Inzwischen gibt es aber unzählige Protokolle und viele verschiedene Kryokonservierungsmittel, mit denen alle Präimplantationsstadien eingefroren werden können (Nagy et al., 2003). Diese rasante Entwicklung rührt daher, dass es mit der steigenden Anzahl transgener Mauslinien immer wichtiger wurde, Embryonen nicht benötigter Mauslinien zu archivieren und gegebenenfalls wieder zu revitalisieren. Zum einen können wichtige Mauslinien so vor Verlust durch Gendrift oder Krankheiten bewahrt werden. Zum anderen müssen die Zuchten nicht permanent aufrechterhalten werden, wodurch Tiere und damit Erhaltungskosten eingespart werden können. In der Folge entstanden Embryonen-Banken wie z.B. die MRC Mammalian Genetics Unit, The Jackson Laboratory und das National Institute of Health (Glenister und Thornton, 2000).

Kryokonservierung bedeutet das Aufbewahren von Zellen in flüssigem Stickstoff, wobei nach dem Auftauen deren Vitalität erhalten bleiben soll. Laut Kasai et al. gibt

es bei Embryonen sechs Typen von Kryoschäden: die Toxizität der Kryoprotektiva, der hypotonische Stress, der physikalische Druck des extrazellulären Eises, der hypertotonische Stress, die intrazelluläre Eisbildung und die Bruchschäden (Kasai et al., 2002). Edashige et al. nennen dagegen nur drei wesentliche Gefahren: die intrazelluläre Eisbildung, die Toxizität der Kryoprotektiva und das osmotisch bedingte Anschwellen der Zelle nach dem Auftauen (Edashige et al., 2006). Ohne Kryokonservierungsmittel kommt es beim Einfrierprozess zur sogenannten Kristallbildung des intrazellulären Wassers (*intracellular ice formation*, IIF) (Mazur et al., 2005). Um dies zu verhindern dient das Gefrierschutzmittel dazu, einen Großteil des Wassers der Zelle zu entziehen, bevor die Temperatur, bei der die Kristallbildung ausgelöst wird, erreicht wird. Dies geschieht dadurch, dass Kryoprotektiva den Gefrierpunkt bei gleichzeitiger Reduzierung der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration erniedrigen. Der Prozess, in dem das freie intrazelluläre Wasser dem osmotischen Druck aus der Zelle folgen kann, wird zusätzlich durch ein möglichst langsames Abkühlen unterstützt. Die Zelle schrumpft. Der erhöhte osmotische Druck im extrazellulären Raum entsteht durch die extrazelluläre Eiskristallbildung. Entscheidend ist dabei auch die Abkühlgeschwindigkeit, da sie die Kristallgröße bestimmt (Seki und Mazur, 2010). Schon vor über 40 Jahren stellte Mazur die Theorie auf, dass das Überleben einer Zelle maximal ist, wenn die intrazelluläre Eiskristallbildung minimal ist (Mazur, 1963). In der Masterarbeit von Bradley zeigen Mikrographien von gefrorenen Glycerolproben, wie unterschiedlich die Kristallbildung bei verschiedenen Abkühlgeschwindigkeiten ist (Abbildung 1). Je langsamer die Abkühlgeschwindigkeiten gewählt werden, desto weniger, aber umso größere Kristalle bilden sich (Bradley, 1999).

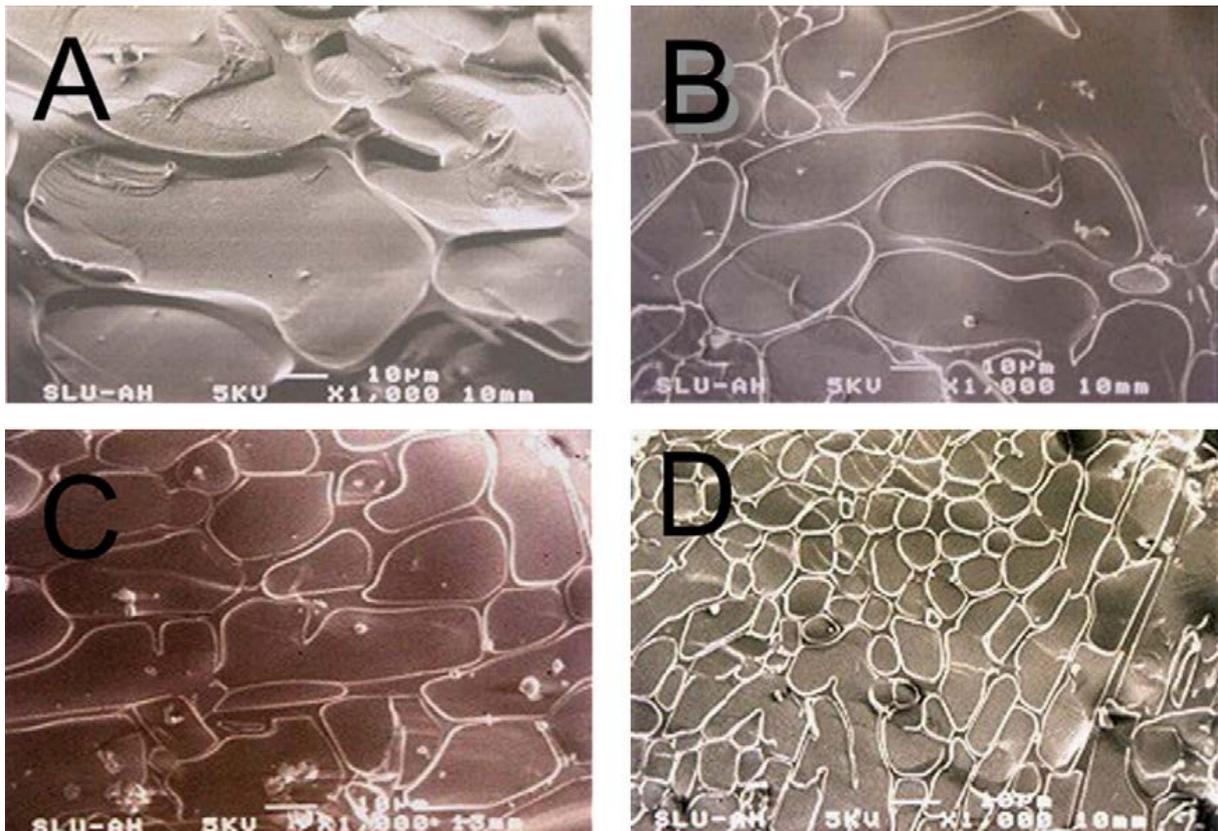


Abbildung 1: Mikrophotografien von gefrorenen Proben mit 6 %iger Glycerollösung. Die Proben wurden in Straws bei vier verschiedenen Abkühlgeschwindigkeiten eingefroren: 0,1°C/min (A), 1°C/min (B), 10°C/min (C), 100°C/min (D) und anschließend in flüssigem Stickstoff versenkt (Bradley, 1999).

Generell werden penetrierende und nicht penetrierende Gefrierschutzmittel unterschieden (Meryman, 1971). Wie der Name schon sagt, sind die Mittel der ersten Gruppe (z.B. Dimethylsulfoxid, Propylenglykol, Ethylenglykol und Glycerol) aufgrund ihrer sehr geringen Molekülgröße in der Lage, durch die Zellmembran in eine Zelle einzudringen, und befinden sich somit im intra- und extrazellulären Raum. Die nicht penetrierenden Gefrierschutzmittel (z.B. Saccharose, Trehalose, Laktose, Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyvinylalkohol (PVA)) bleiben dagegen im extrazellulären Raum und entfalten dort ihre Wirkung. Da alle Kryoprotektiva mehr oder weniger toxisch sind, müssen die Einfriermethode, die Abkühlgeschwindigkeit, das Gefrierschutzmittel und das Embryonenstadium optimal aufeinander abgestimmt werden. Aus diesem Grund gibt es sehr viele Einfrierprotokolle. Wenn die Abkühlgeschwindigkeit zu langsam ist, besteht die Gefahr, dass die Zelle zu lange dem toxischen Mittel ausgesetzt und geschädigt wird. Bei einer zu schnellen Geschwindigkeit kann nicht genügend Gefrierschutzmittel die Membran passieren, wodurch es zur intrazellulären Eiskristallbildung kommt (Edashige et al., 2003). Im Laufe der Entwicklung der Embryonen ändert sich auch der Aufbau der Membran

und somit die Durchlässigkeit für Wasser und Kryoprotektiva (Leibo, 2008). 1976 stellten Mazur et al. fest, dass Acht-Zell-Embryonen für Glycerol zehnfach durchlässiger sind als Ein-Zell-Embryonen (Mazur et al., 1976). Pedro et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Wirkung von fünf verschiedenen Kryoprotektiva (Azetamid, DMSO, Ethylenglykol, Glycerol und Propylenglykol) auf die zeitliche Volumenveränderung bei Oozyten, Ein-Zell-, Zwei-Zell-, Acht-Zell- und Morula-Stadien und konnten nachweisen, dass bei fast allen Mitteln die Permeabilität der Zellen ab dem Acht-Zell- bzw. Morula-Stadium deutlich zunimmt. Nur für Propylenglykol sind alle Stadien gleich permeabel (Pedro et al., 2005). Edashige et al. vermuteten, dass die für die Diffusion von Wasser und Kryoprotektiva nötigen Aquaporin-Kanäle und *Gap Junctions* bei Metaphase II Oozyten und Ein-Zell-, Zwei-Zell- und Vier-Zell-Embryonen noch nicht vorhanden sind. Aquaporin-Kanäle kommen erst in Acht-Zell-Embryonen und *gap junctions* erst im Acht-Zell- und Morula-Stadium vor (Edashige et al., 2006; Seki und Mazur, 2010).

Der Auftauvorgang spielt bei der Kryokonservierung fast eine genau so wichtige Rolle wie der Einfriervorgang. Deshalb muss die Auftaugeschwindigkeit dem Einfriervorgang und dem Zell-Stadium angepasst werden (Shaw und Jones, 2003).

Bei der Kryokonservierung von Mausembryonen („Embryofreezing“) werden als Methoden *slow freezing* bzw. *equilibrium freezing* und *rapid freezing* bzw. *non equilibrium freezing* unterschieden (Leibo, 2008). Inzwischen gibt es viele verschiedene Protokolle und Bezeichnungen für die Methoden (*two step method*, *three step method*, *rapid freezing*, *ultrarapid freezing*, *super rapid*, *vitrification*), die auch in der Literatur häufig für Verwirrungen sorgen (Shaw und Jones, 2003). Alle Protokolle lassen sich aber entweder dem Prinzip des *slow freezings* oder dem des *rapid freezings* zuteilen. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Verfahren liegt in den Abkühl- bzw. Auftaugeschwindigkeiten. Beim *slow freezing* werden die Embryonen, nachdem sie in das Kryoprotektivum gegeben wurden, für einige Minuten bei 0°C äquilibriert, in denen dem Embryo durch das Einfriermedium bereits Wasser entzogen wird. Anschließend erfolgt die gezielte Kristallisation („Seeding“) bei -5 bis -10°C, je nach Protokoll. Beim Seeding werden bei einer Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes der Lösung gezielt extrazelluläre Eiskristalle erzeugt, um zu vermeiden, dass es zu einer spontanen Entstehung von Eiskristallen verschiedener Größe kommt (Songsasen und Leibo, 1997a). Dadurch können die Embryonen dehydrieren und gleichzeitig wird der Effekt der „unterkühlten Schmelze“

(engl. *supercooling*) reduziert (Pomeroy, 1991). Unterkühlte Schmelze bedeutet, dass eine Lösung nicht gefriert, obwohl bereits eine Temperatur erreicht wurde, bei der die Lösung kristallisieren könnte (Shaw und Jones, 2003). Wenn dies geschieht, wird für den Übergang von flüssig zu fest eine große Menge an Energie in Form von Wärme frei gesetzt, die dann die Umgebung des Mediums wieder erwärmt. Dadurch wird die Form und Größe der Eiskristalle verändert. Dies hat eine Schädigung der Membran oder der *Zona pellucida* zur Folge (Pomeroy, 1991). Nach dem Seeding werden die Embryonen kontinuierlich abgekühlt. Dies geschah bei der Einschnitt-Methode nach Whittingham mittels eines mit flüssigem Stickstoff gekühlten Dewarbehälters, der manuell mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 0,5°C/min auf -80°C abgekühlt wurde (Whittingham et al., 1972). Danach erfolgte die Überführung in den flüssigen Stickstoff. Heute wird in der Regel die Zweischritte-Methode mit einem Kryostat angewendet. Je nach Gerät wird das Seeding manuell oder automatisch durchgeführt. Die Abkühlgeschwindigkeiten sind vorprogrammiert. Nach dem Abkühlen (ca. 0,4°C/min auf -30 bis -40°C) erfolgt das Eintauchen in den flüssigen Stickstoff (Shaw und Jones, 2003). Die Vorteile gegenüber der manuellen Kühlung liegen zum einen in dem konstanten, kontrollierten Ablauf des Programms und zum anderen in einem deutlich geringeren Stickstoffverbrauch durch Verwendung von Alkohol als Kühlmittel. Von Nachteil sind die Anschaffungskosten für den Kryostat und ein höherer Zeitaufwand bei der *slow freezing* Methode.

Das *rapid freezing* stellt dagegen eine schnellere und finanziell erheblich günstigere Methode dar, für die kein Kryostat nötig ist. Dabei werden die Embryonen in einer sehr hohen Konzentration an Gefrierschutzmittel eingefroren, damit die Dehydrierung möglichst vor dem Eintauchen in den flüssigen Stickstoff erfolgt und sie trotz Kristallisation nicht beschädigt werden. Die Vitrifikation gilt als Sonderform des *rapid freezings*, bei der es nicht zur Eiskristallbildung kommt, sondern, wie der Name schon sagt (lat. „Verglasung“), zur Entstehung eines amorphen Zustandes. Dies ist nur möglich, wenn die Konzentration des Kryokonservierungsmittels über 40 Volumenprozent liegt. Von Nachteil ist bei dieser Methode, dass vitrifizierte Embryonen wesentlich empfindlicher und weniger stabil sind. Kleinste Abweichungen im Protokoll oder Temperaturunterschiede während der Lagerung haben erhebliche Auswirkung auf die Auftaurate (Nagy et al., 2003). 1985 führten Rall und Fahy erstmals eine Kryokonservierung von Mausembryonen durch Vitrifikation erfolgreich durch (Rall und Fahy, 1985).

II.2.2. Kryokonservierung von Mausspermien

Im Gegensatz zu der Kryokonservierung von Embryonen liegen die Vorteile des sogenannten „Spermfreezing“ im deutlich schnelleren und einfacheren Ablauf der Spermengewinnung und der Einfrierprotokolle. Auch die Kosten sind deutlich geringer, da keine Anschaffung teurer Geräte nötig ist. Von einem Mausbock können je nach Protokoll mindestens zehn Spermaproben eingefroren werden, was je nach Qualität des Spermias für bis zu zehn IVF-Durchgänge ausreicht (Nakagata, 2000; Nagy et al., 2003). Für eine *In-vivo*-Gewinnung von Embryonen muss in der Regel die Zuchtkapazität erhöht und die Männchen zum Verpaaren der Eizellspender einzeln gesetzt werden, wodurch mehr Platz und auch mehr Tiere benötigt werden (Marschall und Hrabé de Angelis, 1999). Während beim Embryofreezing die Spenderweibchen nicht älter als zehn Wochen sein sollten, ist das Alter der Böcke für das Spermfreezing nach oben nicht derart begrenzt. Von Nachteil ist, dass durch Spermien nur ein haploider Chromosomensatz archiviert werden kann, weshalb die weiblichen Spendertiere für eine Revitalisierung immer denselben genetischen Hintergrund wie das Männchen haben sollten (Marschall et al., 1999). Die Nachkommen aus diesen IVFs sind dann im besten Fall heterozygot, was z.B. die Archivierung komplizierter Mehrfach-Knockout/Transgen-Linien erschwert.

Bereits in den 50er Jahren wurden Spermien von Hühnern, Rindern und Menschen erfolgreich mit Glycerol eingefroren (An et al., 2000). Die Kryokonservierung von Mausspermien wurde erst in den 90er Jahren etabliert, deutlich später als die Kryokonservierung von Mausembryonen. Eines der ersten Protokolle war von Tada et al., die als Kryoprotektivum 18 % Raffinose und 1,75 % Glycerol verwendeten (Tada et al., 1990). Takeshima et al. stellten fest, dass das Verhältnis aus 18 % Raffinose und 3 % Magermilchpulver (*skim milk*) die besten Ergebnisse erzielte (Takeshima et al., 1991). In den folgenden Jahren optimierte Nakagata das Protokoll, das heute immer noch zu einem der Standardprotokolle zählt (Nakagata, 1992; Nakagata et al., 1992; Nakagata, 1996). Das Protokoll von Songsasen mit Raffinose, Glycerol und Eigelb führte ebenfalls zu guten Ergebnissen (Songsasen et al., 1997), findet aber heutzutage keine Anwendung mehr. Wie in Abschnitt II.2.1 bereits beschrieben, gibt es nach Kasai grundsätzlich sechs unterschiedliche Formen von Kryoschäden (Kasai et al., 2002). Bei den Spermien ist eine Schädigung durch Toxizität des Einfriermediums nicht möglich, da für deren Kryokonservierung keine penetrierenden Medien nötig sind. Aus demselben Grund kommt auch hypotoner

Stress nicht vor. Druck durch extrazelluläres Eis ist ebenfalls keine Gefahr für Spermien, da sie deutlich kleiner als Embryonen sind. Die Hauptgefahren für Kryoschäden bei Spermien bestehen beim Abkühlen, durch hypertonen Stress und vor allem durch intrazelluläre Eiskristallbildung (Jin et al., 2008).

Im Jahr 2000 kryokonservierte Sztein et al. Mausperma von verschiedenen Inzuchtstämmen und einem F1-Hybrid-Stamm als Kontrollgruppe und untersuchte die Unterschiede bei der IVF in Bezug auf die Fertilität des aufgetauten Spermias und die Empfindlichkeit der Spermien beim Einfrieren. Nach dem Auftauen waren Motilität und Progressivität bei den Inzuchtstämmen deutlich niedriger als bei dem Hybrid-Stamm. Auch zwischen den Inzuchtstämmen untereinander gab es erhebliche Unterschiede bei der Fertilisationsrate. Damals wurde bereits festgestellt, dass aufgetaute Spermien von C57BL/6J eine relativ hohe Motilität und Progressivität erreichen, aber eine sehr geringe Fertilität (0-40 %) aufweisen (Sztein et al., 2000). Bei Mausstämmen wie C57BL/6J und 129S1, die zu den wichtigsten Stämmen für die Erzeugung transgener Mäuse gehören, kann versucht werden, die Fertilisationsrate mit Hilfe von *Partial Zona Dissection* (PZD) bzw. *Zona Incision by Piezo-Micromanipulator* (ZIP), *Laser Zona Dissection* (LZD) oder *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) zu verbessern. Bei den ersten drei genannten Methoden wird, entweder mit einer Kanüle, einem Piezo-Mikromanipulator oder einem Laser ein kleiner Schnitt in die *Zona pellucida* gesetzt, um einem motilen Spermium die Befruchtung zu erleichtern (Depypere et al., 1988; Germond et al., 1996; Kawase et al., 2002). Bei der ICSI wird ein immotiles Spermium direkt in das Zytoplasma der Eizelle gebracht (Yanagimachi, 1995).

Nachdem die Fertilisationsraten bei C57BL/6J nach wie vor gering blieben, wurden neue Auftaumethoden und Präinkubationsmedien entwickelt. In dem Protokoll von Ostermeier et al. wird zu dem üblichen Einfriermedium (*cryoprotective agent*, CPA) bestehend aus Raffinose und Magermilch zusätzlich Monothioglycerol (MTG) hinzugefügt. MTG soll Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) reduzieren, die zwar für die Fertilisation notwendig sind, aber bei einer Überproduktion während dem Einfrieren zu Schädigungen von Spermien führen können (Ostermeier et al., 2008). Takeo et al. stellten fest, dass Spermien nach dem Auftauen zwar häufig motil, aber nicht mehr in der Lage sind, die *Zona pellucida* zu penetrieren. Sie vermuteten, dass durch den Einfriervorgang die Fähigkeit, die Kapazitation vollständig abzuschließen, verloren geht. Ein wichtiger Prozess bei der Kapazitation

ist die Cholesterol-Reduktion in der Plasmamembran, die durch Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD) nach dem Auftauen stimuliert werden kann und somit zu einer besseren Fertilisationsrate führt (Takeo et al., 2008; Takeo und Nakagata, 2010). Die Verwendung von Kalzium-freien Medien für die Inkubation nach dem Auftauen ist eine weitere Möglichkeit, die Fertilität bei eingefrorenem C57BL/6J Sperma zu erhöhen. Für die Kapazitation, die Akrosomenreaktion und die Hyper-aktivität wird eine adäquate Kalziumkonzentration intra- und extrazellulär benötigt. Durch den Einfriervorgang kann es zu Abweichungen kommen und dadurch zu niedrigeren Fertilisationsraten (Suzuki-Migishima et al., 2009). Auch die Trennung motiler und nicht motiler Spermien nach dem Auftauen, wie es beim Menschen und anderen Spezies stattfindet, wird für IVF-Techniken bei der Maus diskutiert (Taguma et al., 2009). Bei Pferd und Rind wurde bereits festgestellt, dass tote oder durch Kryokonservierung beschädigte Spermien schädigende Stoffe produzieren, welche die Fertilität bei der IVF herabsetzen können. Bath konnte zeigen, dass die Zugabe von Glutathion bei gleichzeitiger Reduzierung der hemmenden ROS die Fertilisationsrate erhöht. Durch die Inkubation der Spermien und Eizellen in Zellkultureinsätzen sollen die schädigenden Faktoren in das tiefer liegende Medium sinken und dort gebunden werden. Ein aufwendiges Aussortieren oder Trennen der vitalen von den toten oder beschädigten Spermien wäre somit nicht mehr nötig (Bath, 2010).

II.3. Das kompatible Solut Ectoin

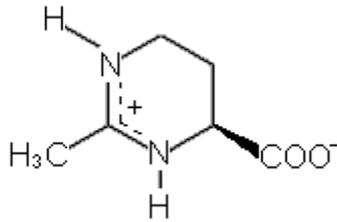


Abbildung 2: Strukturformel von Ectoin

II.3.1. Herkunft und Herstellung von Ectoin

Ectoin [(S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylsäure] (Abbildung 2) wurde 1985 erstmals in dem halophilen phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* der Gattung *Ectothiorhodospira* entdeckt, das aus dem Natronsee im *Wadi an-Natrun* in Ägypten isoliert wurde (Galinski et al., 1985). Dieses Bakterium gehört zu den Extremophilen, die hauptsächlich aus der Domäne der Archaea stammen, aber auch bei den Bacteria und Eukarya vorkommen. Diese extremophilen Bakterien sind auf Grund ihrer hohen Anpassungsfähigkeit in der Lage, Lebensräume zu besiedeln, an denen es für andere Spezies unmöglich ist zu bestehen. Um z.B. in Salzseen, Salzwüsten, Geysiren und dem ewigen Eis des Nord- und Südpols zu überleben, benötigen diese Mikroorganismen Schutzstoffe, die häufig zur Gruppe der kompatiblen Solute gezählt werden. Diese sind osmotisch aktive, organische Substanzen und gehören verschiedenen Stoffklassen an (da Costa et al., 1998): Zucker (Trehalose, Saccharose), Polyole (Glycerol, Arabitol, Inositol), Aminosäuren und deren Derivate (Ectoin und Hydroxyectoin, Prolin, Glycinbetain, acetylierte Diaminosäuren und Glutaminderivate). Da die Lebensräume der Extremophilen sehr unterschiedlich sind (halo-, thermo-, acido-, alkali-, psychrophil), unterscheidet sich auch die Struktur und die Wirkungsweise der kompatiblen Solute. Gemeinsam haben sie eine hohe Löslichkeit in Wasser, sind bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral und besitzen eine geringe molare Masse. Auch in hohen Konzentrationen haben kompatible Solute keinen negativen Einfluss und sind somit mit dem Metabolismus kompatibel. Die extremophilen Organismen sind in der Lage die kompatiblen Solute entweder neu zu synthetisieren oder aus der Umgebung aufzunehmen, was energetisch betrachtet, günstiger ist.

Die Herstellung vieler kompatibler Solute, wie auch des Ectoins, erfolgt durch das so genannte „Bakterienmelken“ (*bacterial milking*) (Sauer und Galinski, 1998). Dabei wird eine Fähigkeit halophiler Bakterien, wie *Halomonas Elongata*, genutzt, in Medien mit hoher Salinität große Mengen an Ectoin zu produzieren und diese dann bei sinkendem Salzgehalt ins Medium auszuschleusen. Anschließend wird es chromatographisch aufgereinigt und kristallisiert. Hierbei werden die Bakterien nicht beschädigt und können somit für den nächsten Durchgang wieder verwendet werden, so dass mit dieser Technik Ectoin im industriellen Maßstab produziert werden kann.

II.3.2. Wirkungsweise und Verwendungszweck von Ectoin

Die Wirkungsweise der kompatiblen Solute ist noch nicht vollständig geklärt. Da sie die Organismen vor jeweils verschiedenen Einflüssen schützen müssen, ist auch ihre Wirkung sehr unterschiedlich. Allgemein werden aber nicht nur ganze Zellen, sondern auch einzelne Biomoleküle vor physikalischem Stress geschützt. Einige halophile bzw. halotolerante Bakterien reagieren auf hyperosmotischen Stress durch Akkumulation eines Solutes, weshalb solche Solute auch als Osmoprotektivum bezeichnet werden. Zu diesen gehört auch Ectoin. Es gibt mehrere Theorien zu deren Wirkungsweise, wobei im Folgenden die *Preferential Interaction Theory* und die *Water Replacement Theory* erläutert werden.

Die *Preferential Interaction Theory* von Arakawa und Timasheff wird im Deutschen als „Ausschlusshypothese“ bezeichnet. Danach werden kompatible Solute, wie Ectoin, aus der Hydratoberfläche von Proteinen ausgeschlossen und können somit die Hydrathülle von außen stabilisieren. Durch den Ausschluss entsteht in der Zelle ein thermodynamisches Ungleichgewicht, weshalb sich das Volumen verringert. Die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der nativen Proteinfaltung hat somit einen stabilisierenden Effekt (Arakawa und Timasheff, 1983).

Im Gegensatz dazu steht die *Water Replacement Theory*. Laut Clegg et al. gelangen die kompatiblen Solute in oder an die Zelle, um die entzogenen Wassermoleküle in den Hydrathüllen zu ersetzen (Clegg et al., 1982).

Ectoin wird von der Biotechnologiefirma „bitop AG“ (Witten, Deutschland) nach industriellen Maßstäben produziert. Inzwischen gibt es zahlreiche Produkte und Verwendungszwecke. Vor allem im Bereich Dermatologie werden die schützenden Eigenschaften von Ectoin genutzt. Ectoin vermindert nachweislich die Schädigung der Haut durch UV-Strahlen und andere Umwelteinflüsse, in dem es die Schädigung

der Langerhans-Zellen verhindert und die Anzahl apoptotischer Keratinozyten reduziert (Buenger und Driller, 2004). Die Hautzellen werden geschützt und rehydriert. Viele Firmen der Kosmetikbranche verwenden Ectoin in ihren Produkten, wie Sonnenschutzcremes, Anti-Aging-Pflege, Cremes gegen Neurodermitis (Merck KGaA, DADO-cosmed GmbH, Marbert, Sebapharma GmbH & Co. KG). Bei der Behandlung von Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) und Allergien könnten demnächst Inhalationspräparate, Nasensprays und Augentropfen mit Ectoin verwendet werden, die sich derzeit noch in der Entwicklung befinden (Ectoin Produkte: ect2inhale Inhalation Solution, ect4allergy Nasenspray, ect4allergy Augentropfen, bitop AG, <http://www.bitop.de/cms/website.php?id=/de/index/produkte.htm>; 23.03.2012). In der Diagnostik wird Ectoin zur Stabilisierung von Enzymen und Antikörpern, in der Pharmazie zur Impfstoffstabilisierung und Wirkstoffapplikation, in der Zell- und Mikrobiologie zur Konservierung von Starterkulturen, Zellen und Geweben und zur PCR-Optimierung verwendet (Lippert und Galinski, 1992; Schnoor et al., 2004) (z.B. Fa. Biomol GmbH: www.biomol.de; 23.03.2012). Bei der Kühlung von Rattendünndarm bei 4°C konnte Ectoin die *Tunica mucosa* und *Tunica muscularis* vor Reperfusionsschäden und Ischämie effektiv schützen (Wei et al., 2009), so dass die Verwendung von Ectoin auch auf dem Gebiet der Organtransplantation denkbar wäre.

II.3.3. Verwendung von Ectoin bei der Kryokonservierung

Kompatible Solute, wie Saccharose, Trehalose und Glycerol, werden, wie in Abschnitt II.2.1 beschrieben, schon lange bei der Kryokonservierung verwendet. Trehalose wurde bei Tardigrada (Bärtierchen), die im Eis leben, entdeckt, und der kanadische graue Laubfrosch *Hyla versicolor* verwendet Glycerol, um überwinteren zu können (Storey und Storey, 1986; Honadel und Killian, 1988).

Bei der Kryokonservierung von humanen mesenchymalen Stammzellen bewirkte Ectoin eine deutlich höhere Überlebensrate und wäre somit eine Alternative für das zellschädigende DMSO (Grein et al., 2010). Untersuchungen an Embryonen des Auszuchtmausstammes Crl:CD1(ICR) wiesen nach der Kryokonservierung unter Zusatz von Ectoin (1 mg/ml) eine signifikante Erhöhung des Anteils an vitalen Vorkernembryonalstadien auf. Eine Verbesserung der Überlebens- und Entwicklungsrate der aufgetauten Embryonen und eine Steigerung des Embryo-

transfererfolges bezogen auf die Anzahl lebender Nachkommen, konnten ebenfalls festgestellt werden (Lohmer et al., 2008).

II.4. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollten weitere Anwendungsmöglichkeiten von Ectoin bei der Kryokonservierung von murinen Embryonen und Spermien erprobt werden, mit dem Ziel, die protektive Wirkung des Ectoins zu überprüfen und möglicherweise eine Verbesserung des Kryokonservierungserfolgs zu erreichen.

Da bisher der Einsatz von Ectoin bei der Kryokonservierung von Mausembryonen des Zwei-Zell-Stadiums noch nicht untersucht worden war, sollte eine Dosierungsreihe durchgeführt werden, um die optimale Dosierung von Ectoin zu finden. Diese Dosierungsreihe sollte an drei verschiedenen Wildtyp-Mausstämmen (Crl:CD1(ICR); C57BL/6J; C3HeB/FeJ) untersucht werden, da verschiedene Mausstämme unterschiedliche Kryokonservierungseigenschaften zeigen. Es sollten die Auftaurate (AR) und die *In-vitro*-Entwicklungsrate (ER) in Abhängigkeit verschiedener Ectoin-Dosierungen bestimmt werden. Wenn sich eine Dosierung als optimal erweisen sollte, würde mit dieser die Wirkung von Ectoin auf die Vitalität der eingefrorenen Embryonen *in vivo* untersucht werden. Dazu sollten jeweils ohne oder mit Zusatz von Ectoin eingefrorene Embryonen aufgetaut, in Rezipienten transferiert und die Revitalisierungsraten (RR) bestimmt werden.

Analog zur Kryokonservierung von Embryonen sollte die Wirkung von Ectoin auf den Kryokonservierungserfolg von Spermien untersucht werden. Hierzu sollte eine Dosierungsreihe für dieselben Mausstämme erstellt werden, um die jeweils optimale Dosis für die Kryokonservierung zu finden. Die Qualität des Spermias sollte jeweils vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen anhand seines Motilitäts- und Progressivitätsindex beurteilt werden.

Mit der für jeden Mausstamm jeweils optimalen Dosierung von Ectoin sollte seine Wirkung auf die Vitalität von kryokonservierten Spermien und deren Effektivität bei Durchführung einer *In-vitro*-Fertilisation (IVF) untersucht werden. Dabei sollten die Fertilisationsrate (FR) und die Entwicklungsrate (ER) jeweils für ohne oder mit Zusatz von Ectoin eingefrorenem Sperma bestimmt werden.

III. Tiere, Material und Methoden

III.1. Tiere

Alle Experimente wurden in der Abteilung für Vergleichenden Medizin des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Die Versuchstiere stammten aus der eigenen Versuchstierzucht und -haltung. Der Tierversuch wurde unter dem Titel „Anwendungsmöglichkeiten von Ectoin bei der Kryokonservierung von murinen Embryonen und Spermien“ von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-116-10).

III.1.1. Haltung der Mäuse

Filter Top Käfig Typ II Makrolon®	Verschiedene Hersteller
IVC-System	VentiRack Bioscreen TM, Biozone, Margate, UK
Labortiereinstreu	Lignocel ¾, Rettenmeier
Spezialfutter	Altromin 1314, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage

Die Mäuse wurden in vollklimatisierten Räumen unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF-)Bedingungen bei einer Temperatur von 22±2°C, einer Luftfeuchte von 55±5 % und einem 12/12 Stunden Lichtzyklus gezüchtet und gehalten. Maximal vier Mäuse (>25 g KGW) waren in Filter Top Käfigen Typ II Makrolon® untergebracht. Die Rezipienten wurden nach dem Embryotransfer bis zur Geburt der Nachkommen in einem System mit einzelbelüfteten Käfigen (*Individually Ventilated Cages*, IVC) gehalten.

Die Tiere erhielten steril filtriertes (Filtergröße 0,2 µm) Wasser und eine Standarddiät für Nager *ad libidum*.

Das Betreten des Barrierebereichs erfolgte über eine Drei-Kammer-Duschschleuse. Bei Arbeiten im Barrierebereich trugen die Mitarbeiter autoklavierte Kleidung, Einmalhandschuhe, Kopfhauben und Mundschutz. Alle Materialien wurden vor Einbringen in den Tierbereich autoklaviert oder chemisch desinfiziert. Das Hygiene-monitoring der

Kolonien erfolgte entsprechend den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) über *Dirty-bedding*-Sentinels in einem sechswöchigen Untersuchungsintervall.

III.1.2. Verwendete Mausstämme

Zur Embryonengewinnung wurden weibliche Mäuse der Stämme CrI:CD-1(ICR)/DCM (Department of Comparative Medicine; CD-1), C3HeB/FeJ/DCM (C3H) und C57BL/6J/DCM (B6) aus Eigenzuchten verwendet. Für die *In-vivo*-Produktion von Embryonen wurden Weibchen im Alter von über acht Wochen und für die IVF vier Wochen alte Weibchen superovuliert. Als Rezipienten für den Embryotransfer dienten CD-1 Weibchen, die im Alter von ca. acht Wochen mit vasktomierten CD-1 Böcken verpaart wurden und danach auf Pseudogravidität getestet wurden (*plug check*). Für die Kryokonservierung der Spermien wurden über zwölf Wochen alte CD-1, C3H und B6 Männchen verwendet.

III.2. Material

III.2.1. Hormone

Pregnant mare's serum gonadotropin, (PMSG)	Intergonan® 240 I.E./ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Human chorionic gonadotropin, (hCG)	Ovogest® 300 I.E./ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim

III.2.2. Chemikalien

Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Neufahrn
Desinfektionsmittel	Pursept-A, Merz Hygiene GmbH, Frankfurt
Ethanol 80 %	Abteilung für Vergleichende Medizin, Helmholtz Zentrum München

Human Tubal Fluid (HTF)	Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München
Kalium Simplex Optimized Medium, Embryo Max® KSOM, Powdered Media Kit	Millipore GmbH, Schwalbach
Natriumchlorid 0,9 % (NaCl)	Plastipur®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Neufahrn
M2 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magermilch	Difco Skim milk, Becton, Dickinson & Co, USA
Mineralöl, Embryo tested	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumcitrat-Dihydrat	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propylenglycol 1,5 M (1,2 Propanediol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Raffinose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sucrose > 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

III.2.3. Verbrauchsmaterialien

Cryocups (Goblet)	Medical Technology Vertriebs-GmbH, Bruckberg
Eppendorftube 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon 15 ml	Becton, Dickinson & Co, USA
Filter, steril, 0,22 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filter, steril, 0,45 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vier-Well-Multischalen, Nunclon Surface ™Δ, steril	Nunc Brand Products, Dänemark
Gewebekulturschale 35 * 10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturschale 100 * 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturschale 35 * 10 mm, Nunclon Surface ™Δ, steril, (Fertilisationsschale)	Nunc Brand Products, Dänemark

Gewebekulturschale 60 * 15 mm, Nunclon Surface TM Δ, steril	Nunc Brand Products, Dänemark
Glaskapillaren zum Ziehen	Borosilicate glass capillaries, BioMedical Instruments, Zöllnitz
Hamilton Sonderkanüle N733, Länge 15 mm	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Kanülen Sterican®	Braun Melsungen AG, Melsungen
Minitübs, 65 mm Röhrchen	Minitüb, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co KG, Tiefenbach bei Landshut
Nunc Cryo Tube Vials, 1,8 ml	Nunc Brand Products, Dänemark
Pipettenspitzen ART® Aerosol Resistant Tips: 2-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	Molecular BioProducts, Inc., USA
Spritze 1 ml, Omnifix®-F	Braun, Melsung AG, Melsungen
Spritze 2 ml, Injekt®,	Braun, Melsung AG, Melsungen
Straws, MiniPaillette, 0,25 ml, transparent,	Minitüb, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co KG, Tiefenbach bei Landshut
Verschlusskugel Metall	Minitüb, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co KG, Tiefenbach bei Landshut
2X-CEL® dual sided sperm analysis chamber 80 µm + 2X-CEL® cover glass (Spermanalyser)	Parallabs LTD, UK
Zellkulturschale, viergeteilt	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

III.2.4. Anästhetika und Analgetika

Atipamezol 5 mg/ml, Antisedan®	Orion Corporation Espoo, Finnland
Fentanyl 0,05 mg/ml	Fentanyl®-Janssen 0,1 mg, Janssen- Cilag GmbH, Neuss
Flumazenil 0,1 mg/ml	Anexate®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Medetomidin 0,5 ml/kg, Dormitor®	Orion Corporation Espoo, Finnland
Metamizol p.o.	Novaminsulfon-ratiopharm Tropfen, ratiopharm GmbH, Ulm
Metamizol s.c.	Vetalgin®, Intervet, Wien, Österreich

Midazolam 5 mg/ml	Midazolam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm
Naloxon 0,4 mg/ml	DeltaSelect, AlleMan Pharma GmbH, Rimbach

III.2.5. OP-Materialien

Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Federschere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Klemmen	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Nadelhalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Nahtmaterial Ethicon Vicryl®	Ethicon, Norderstedt
Pinzette, anatomisch	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette, chirurgisch	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette, gebogen	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Präparationsnadel	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Saugtupfer, steril	Kettenbach GmbH & Co KG, Eschenburg
Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Thermokauter	Faromed GmbH, Berlin
Uhrmacherpinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Wundklammern, Autoclip® wound clips 9 mm	Becton, Dickinson & Co, USA
Wundklammerzange, Autoclip® wound clips applier for 9 mm clips	Becton, Dickinson & Co, USA

III.2.6. Geräte

Brutschrank MiniGalaxy A	Nunc Brand Products, Dänemark
Feinwaage Scaltec SPB31	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Köcher mit Styroporboden (Sperm freezing)	angefertigt von der Werkstatt des Helmholtz Zentrums München

Kryostat KT 75L	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe
Axioplan 2 imaging und Axiophot 2 & Axiovision Release 3.1.	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mundpipette	BioMedical Instruments, Zöllnitz Instruments, Zöllnitz
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Handschweißgerät Super Poly	Audion Elektro GmbH, Kleve
Stereomikroskop Leica MZ 7 _s	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Spermanalyser	Hamilton Thorne Research, Hamilton Thorne Biosciences, USA
Wärmeplatte Präzitherm	Störk-Tronic Störk GmbH & Co.KG , Stuttgart
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Zentrifuge 3K30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Zwischentank IC 10 R Refrigerator	International Cryogenics, Inc., USA
Magnetischer Heizrührer IKAMAG RCT + Magnetrührstäbchen	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg

III.2.7. Ansatz der Medien

III.2.7.1. Hormone

human Chorionic Gonadotropin (hCG)

Der Inhalt von drei Durchstechflaschen Ovogest 300 I.E./ml (1 Flasche enthält 6,6 mg Pulver, 1500 I./E. humanes Choriongonadotropin) wurde in 15 ml 0,9 % NaCl gelöst. Die gewonnene Hormonlösung wurde anschließend mit 0,9%igen NaCl auf 90 ml aufgefüllt. Die Gebrauchslösung wurde in Aliquots zu 4 ml in Falcons bei -20°C eingefroren. Etwa eine halbe Stunde vor Gebrauch wurden die Hormonlösungen aufgetaut, damit sie bei ihrer Anwendung Raumtemperatur hatten.

Pregnant Mare´s Serum Gonadotropin (PMSG)

Der Inhalt von fünf Durchstechflaschen Intergonan 240 I.E./ml (1 Flasche enthält 6,5 mg Pulver, 1000 I./E. Gonadotropin) wurde in 25 ml 0,9 % NaCl gelöst. Die gewonnene Hormonlösung wurde anschließend mit 0,9 %igem NaCl auf 100 ml aufgefüllt. Die Gebrauchslösung wurde in Aliquots zu 4 ml in Falcons bei -20°C eingefroren.

III.2.7.2. M2 Medium

Vor dem Gebrauch wurde einer Flasche M2 Medium (100 ml) 100 µl einer Penicillin/Streptomycin Lösung zugefügt. Die Stocklösung wurde bei -20°C in 150 µl Aliquots gelagert. Die Lösung bestand aus 0,120 g Penicillin und 0,100 g Streptomycin und wurde in 2 ml Ampuwa gelöst. Das M2 Medium (P/S) wurde vor der Verwendung mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

III.2.7.3. Einfríermedium für das Embryofreezing

Für die Herstellung des Einfriermediums wurden 2,76 ml 1,5 M Propylenglycol mit 25 ml M2 (P/S) gemischt und steril filtriert. Das Medium wurde in Nunc-Cryoröhrchen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde zum Test ein Minitüb-Röhrchen mit Einfriermedium gefüllt und ohne Embryonen im Kryostat eingefroren. Dabei wurde die Seeding-Zeit (= Zeit vom Ansetzen des in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kupferstempels bis zur vollständigen Kristallisation des Mediums) gemessen. Nur wenn diese maximal 2 min dauerte, wurde diese Charge des Einfriermediums verwendet.

III.2.7.4. Einfríermediums für das Spermfreezing

Die Herstellung des Einfriermediums (*cryoprotective agents*, CPA) erfolgte nach der Methode von Nakagata (Nakagata et al., 1997; Sztein et al., 1997).

Für 40 ml CPA wurden zuerst 7,2 g Magermilchpulver und dann 1,2 g Raffinose in 30 ml vorgewärmtem Ampuwa-Wasser aufgelöst und auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt. Bis zum vollständigen Lösen aller Bestandteile mittels magnetischen Heizrührer und Magnetrührstäbchen wurde das Gefäß ins Wasserbad gestellt. Nachdem die Lösung 60 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde, wurde der

Überstand abpipettiert, gefiltert (0,45 µm Filter) und in Nunc-Cryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden bei -20°C maximal drei Monate gelagert. Zur Qualitätskontrolle des hergestellten CPA wurde Sperma eines C3H-Bocks in jeweils zwei Straws mit neu angesetztem CPA und zwei Straws mit bereits getestetem CPA eingefroren und die Qualität der aufgetauten Spermien verglichen. Das CPA wurde nur verwendet, wenn die Spermienmotilität nach dem Einfrieren und Auftauen maximal 5 % unter der des bereits getesteten CPA lag und nicht weniger als 50 % der Motilität des Frischspermas betrug.

III.2.7.5. Kalium Simplex Optimized Medium

Es wurden 10 ml der mitgelieferten Lösung aus dem KSOM Powdered Media Kit mit einer Pipette entnommen und zu der Ampulle mit der Trockensubstanz gegeben. Anschließend wurde die gelöste Gebrauchslösung mittels eines 0,22 µl Filters steril filtriert.

III.3. *Versuchsplanung*

Überprüfung der Anwendbarkeit von Ectoin beim Embryofreezing

Um die Dosis zu finden, bei der optimale Auftauraten für Zwei-Zell-Embryonen der drei Mausstämme Crl:CD-1(ICR)/DCM (CD-1), C3HeB/FeJ/DCM (C3H) und C57BL/6J/DCM (B6) erzielt werden, werden fünf Dosisgruppen (1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium, 10 mg/1 ml, 25 mg/1 ml, 50 mg/1 ml und die Negativkontrolle (ohne Ectoin)) getestet. Dazu sollen fünf Einfriertermine durchgeführt werden. Es werden die Auftaurate (AR, Anteil der morphologisch intakten Embryonen/Gesamtzahl der aufgetauten wiedergefundenen Embryonen) und die Entwicklungsrate (ER, Anzahl der Blastozysten/Gesamtzahl der morphologisch intakten Embryonen) in Abhängigkeit verschiedener Ectoin-Dosierungen bestimmt.

Kontrolle der Vitalität der eingefrorenen Embryonen mit der jeweils besten Dosierung aus der Dosierungsreihe mittels Embryotransfer (ET)

Mit der in der Dosierungsreihe festgestellten, optimalen Dosierung soll die Wirkung von Ectoin auf die Vitalität der eingefrorenen Embryonen der drei Mausstämme untersucht werden. Dazu werden jeweils ohne oder mit Zusatz von Ectoin

eingefrorene Embryonen aufgetaut und in Rezipienten transferiert. Es werden die Auftaurate (AR) sowie die Revitalisierungsrate (RR, Anzahl lebender Nachkommen/Anzahl transferierter Embryonen) bestimmt. Sollte sich keine der getesteten Dosierungen als wirkungsvoll erweisen, entfällt dieser Versuchsteil. Es werden drei Durchgänge (Termine) angesetzt. Wenn möglich, sollen bei jedem Durchgang zwei ETs ohne und zwei ETs mit Ectoin eingefrorenen Embryonen durchgeführt werden.

Überprüfung der Anwendbarkeit von Ectoin beim Spermfreezing

Zur Durchführung einer Dosierungsreihe werden die gleichen fünf Dosisgruppen wie in der Dosierungsreihe für Embryofreezing (1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (CPA), 10 mg/1 ml, 25 mg/1 ml, 50 mg/1 ml und die Negativkontrolle) an jeweils fünf Einfrierterminen getestet. Pro Termin werden zwei Männchen als Spermaspender eingesetzt, deren Sperma vermischt wird. Die Spermaqualität wird anhand der Motilität und der Progressivität der Spermien gemessen.

Kontrolle der Vitalität der eingefrorenen Spermien mittels IVF

Mit der jeweils besten Ectoin-Dosierung aus der Dosierungsreihe werden Spermaproben eingefroren und nach dem Auftauen mittels *In-vitro*-Fertilisation (IVF) auf ihre Fertilität getestet. Pro IVF Termin wird ein Spendermännchen benötigt, dessen Sperma zu 50 % ohne (Kontrolle) und zu 50 % mit Ectoin eingefroren wird. Pro Gruppe (ohne/mit Ectoin) werden Eizellen von jeweils zehn Spenderweibchen befruchtet. Es werden fünf IVF Termine durchgeführt. Dabei werden die Fertilisationsrate (FR, Anzahl der Zwei-Zell-Embryonen/Gesamtzahl der Oozyten) und die Entwicklungsrate (ER) ermittelt.

III.4. Operative Eingriffe

III.4.1. Anästhesie und Analgesie

Bei allen operativen Eingriffen (Vasektomie, Embryotransfer) an der Maus wurde eine voll antagonisierbare Narkose angewendet. Sowohl das Narkosemittel als auch die Antagonisierung bestanden aus drei Medikamenten. Die Narkose setzte sich aus Medetomidin (0,5 ml/kg), Midazolam (1 ml/kg) und Fentanyl (1 ml/kg) in 0,9 % NaCl zusammen und wurde intraperitoneal injiziert. Die Antagonisierung bestehend aus

Atipamezol (0,5 ml/kg), Flumazenil (5 ml/kg) und Naloxon (3 ml/kg) in 0,9 % NaCl, wurde subkutan appliziert.

Nach der Narkoseeinleitung bekam das Tier Augensalbe zum Schutz vor Austrocknung oder Verletzung der Augen. Zur postoperativen Analgesie wurde 50 mg/kg Metamizol in 500 µl 0,9 % NaCl während der Aufwachphase subkutan injiziert. Für die weitere analgetische Versorgung wurden 300 mg Metamizol in die Tränkwasserflaschen (250 ml) zur oralen Aufnahme gegeben (6 mg Metamizol/5 ml Wasser/Tag).

III.4.2. Vasektomie der Böcke

Es wurden zuchtreife (mind. 8 Wochen alte) CD-1 Böcke vasektomiert, um sterile, aber potente Männchen zur Gewinnung der pseudograviden Mäuse (Rezipienten) für den Embryotransfer zu erhalten. Der Zugang erfolgte über das Skrotum, da diese Methode weniger invasiv, als die über die Bauchhöhle ist. Die Tiere wurden gewogen, in Narkose gelegt und in Rückenlage gebracht. Das OP-Feld wurde mit 80 %igem Ethanol desinfiziert. Nach Ertasten der Hoden im Skrotum wurde mit einer Schere ein etwa 5 mm großer Schnitt in der Medianen des Skrotums gesetzt. Der erste Hoden wurde durch die Öffnung nach außen verlagert und der Nebenhodenschwanz mit einer Pinzette abgeklemmt. Distal der Pinzette wurde der Nebenhodenschwanz abgesetzt und der Schnitt verödet. Nach sorgfältiger Überprüfung auf fehlende Nachblutungen wurde der zweite Nebenhodenschwanz auf die gleiche Weise entfernt. Zum Schluss wurde das Skrotum mit einem Einzelheft zugenäht und die Narkose antagonisiert. Die postoperative Versorgung erfolgte wie unter Abschnitt III.4.1 beschrieben. Eine Woche nach der OP wurden die Männchen sechs Wochen lang zum Test mit Weibchen verpaart, um den Erfolg der Vasektomien zu bestätigen. Erst bei nachgewiesener Sterilität wurden die Böcke zur Produktion von pseudograviden Rezipienten verwendet.

III.4.3. Embryotransfer

Alle Rezipienten wurden vor der Einleitung der Narkose gewogen. Dabei sollten die Tiere nicht weniger als 27 g und nicht mehr als 32 g wiegen, da erfahrungsgemäß bei Rezipienten der Linie CD-1 mit einem Körpergewicht von unter 27 g oder über 32 g die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen Embryotransfer sinkt.

Nach der Narkoseinjektion wurde die Maus in Bauchlage unter einer Kaltlichtquelle platziert. Der Embryotransfer wurde einseitig durchgeführt. Das OP-Feld wurde desinfiziert und das Fell entlang einer Linie zwischen der höchsten Stelle des Rückens und dem Knie gescheitelt. In der Mitte dieser Linie wurde, ein etwa 2 mm großer Hautschnitt gesetzt. Die Öffnung wurde stumpf geweitet und die folgenden Schichten auf die gleiche Weise geöffnet. Das Ovar befand sich in der Regel direkt unterhalb der Öffnung und konnte mit einer gebogenen Pinzette an seinem Fettgewebe aus der Bauchhöhle vorgelagert und mit einer Klemme fixiert werden. Die zu transferierenden Embryonen wurden unter dem Durchlicht-Mikroskop in M2-Medium gewaschen und dann eng aneinander aufgereiht mit der Mundpipette in die Transferkapillare aufgenommen. Dabei wurde jeweils vor und nach der Mediumfraktion, in der sich die Embryonen befanden, eine kleine Luftblase gesetzt. In der Regel wurden ca. 20 Embryonen pro Maus transferiert. Die Maus wurde so unter dem Auflicht-Mikroskop platziert, dass der Eileiter bzw. das Infundibulum unter der Bursa ovarica sichtbar waren. Mit einer Federschere wurde die Bursa genau an dieser Stelle aufgeschnitten.

Eventuell auftretende Blutungen wurden mit Saugtüpfeln gestillt, um ein Verstopfen der Kapillare durch eindringendes und gerinnendes Blut zu verhindern und um das Sichtfeld frei zu halten. Die Spitze der Transferkapillare wurde in das freigelegte Infundibulum eingeführt und die Embryonen unter Sichtkontrolle durch vorsichtiges Pusten in den Eileiter gegeben. Ein sicheres Zeichen für einen erfolgreichen Ablauf war das Erscheinen der Luftblase hinter den Embryonen im Eileiter.

Nach erfolgtem Embryotransfer wurde das Ovar vorsichtig wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Die Muskelschicht wurde mit einem Einzelheft und die Hautschicht mit einer Wundklammer verschlossen. Nach Antagonisierung der Narkose wurde die Maus postoperativ wie in Abschnitt III.4.1 versorgt und der Käfig bis zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gestellt. Bis zu der Geburt der Nachkommen wurden die Rezipienten einzeln in IVC-Käfigen, die mit Nistmaterial (Zellstoff) und Maushaus versehen waren, gehalten. Unmittelbar nach der Geburt wurde die Anzahl der Nachkommen und das Geschlechterverhältnis bestimmt. Nachdem die Nachkommen das Absetzalter erreicht hatten, wurden sie nochmals gezählt und anschließend zur weiteren Verwendung in der Mauszucht freigegeben.

III.5. Einsatz von Ectoin beim Embryofreezing

III.5.1. Superovulation der Spenderweibchen

Für die *In-vivo*-Produktion der Embryonen wurden Weibchen im zuchtfähigen Alter nach dem Schema von Whittingham superovuliert (Whittingham, 1971). Dazu wurde an Tag 1 um 13 Uhr PMSG und 48 Stunden später an Tag 3 hCG intraperitoneal (i.p.) injiziert. Direkt nach der hCG-Injektion wurden die Tiere 1:1 mit zuchtreifen Böcken des gleichen Stammes verpaart. An Tag 4 erfolgte etwa um 9 Uhr die *plug* Kontrolle. Die *plug* positiven Tiere wurden an Tag 5 um ca. 9 Uhr mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend präpariert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zeitschema für die Superovulation für die *In-vivo*-Produktion von Embryonen.

<i>Tag 1</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 4</i>	<i>Tag 5</i>
13 Uhr: PMSG	Keine Behandlung	13 Uhr: hCG, Verpaarung	<i>plug</i> Kontrolle + Trennung	Gewinnung von Zwei-Zell- Embryonen

PMSG: *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (Intergonan®); 5 I.E./Maus i.p.
hCG: *human Chorionic Gonadotropin* (Ovogest®); 5 I.E./Maus i.p.

III.5.2. *In-vivo*-Embryonengewinnung

III.5.2.1. Präparation der Eileiter für die *In-vivo*-Embryonengewinnung

Die gemäß Tabelle 1 superovulierten, *plug* positiven Mäuse wurden nach der Tötung durch zervikale Dislokation unter einer Lichtquelle auf den Rücken gelegt. Der Bauchbereich wurde mit 80 % Ethanol desinfiziert und die Bauchhöhle mit einer Schere eröffnet. Die Eileiter wurden frei präpariert, entnommen (Abbildung 3) und in einer Gewebekulturschale mit M2 Medium (P/S) gesammelt.



Abbildung 3: Präparation der Eileiter.

III.5.2.2. Spülen der Eileiter und Waschen der Embryonen

Zur Gewinnung der Embryonen wurden die Eileiter in viergeteilten Zellkulturschalen platziert. Unter einem Stereomikroskop wurde die Spitze einer Hamiltonkanüle, die auf einer 2 ml Spritze aufgebracht war, in das Infundibulum des Eileiters eingeführt. Die Spritze war mit M2 Medium P/S gefüllt und bei gleichzeitigem Fixieren des Eileiters mit einer Pinzette wurde dieser mit dem Medium durchspült (Abbildung 4).

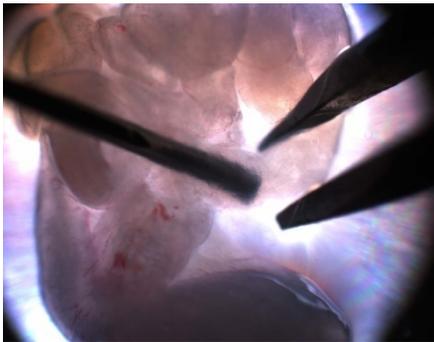


Abbildung 4: Spülen eines Eileiters. Die Hamiltonkanüle befindet sich im Infundibulum.

Die Embryonen, die auf diese Weise aus dem Eileiter gespült wurden, wurden unter dem Stereomikroskop mittels Mundpipette und Glaskapillare eingesammelt, gezählt und nacheinander durch vier Tropfen M2 Medium (P/S) transferiert, um sie zu waschen. Dabei wurden die Embryonen morphologisch begutachtet. Als morphologisch intakt wurden diejenigen Zwei-Zell-Embryonen bezeichnet, die eine intakte *Zona pellucida* und zwei symmetrische, unter dem Mikroskop leuchtend erscheinende Blastomere aufwiesen (s. Abschnitt III.5.4).

III.5.3. Dosierungsreihe für Ectoin beim Embryofreezing

III.5.3.1. slow freezing von Embryonen

Die für das Embryofreezing verwendeten Minitüb-Röhrchen wurden vor Gebrauch auf einer Seite mit einer farbigen Verschlusskugel verschlossen und gamma-sterilisiert. Vor jedem Einfrierdurchgang wurde die benötigte Anzahl an Minitübs mit 250 µl Einfriermedium mittels einer 1 ml Spritze und einer langen Kanüle (0,90 * 70 mm, 20 G * 2¾") befüllt. Um ein Platzen der Minitübs während des Gefrierprozesses zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass beim Befüllen mit Einfriermedium keine Luftblasen entstanden. Im Anschluss an das Einfriermedium wurde gezielt eine ca. 0,5 cm große Luftblase gesetzt und danach das noch offene Ende mit einem kleinen Tropfen Einfriermedium abgeschlossen. Erst nach der Beschickung mit Embryonen wurde auch das zweite Ende des Minitübs mit einer zweiten Metallkugel verschlossen (Abbildung 5).

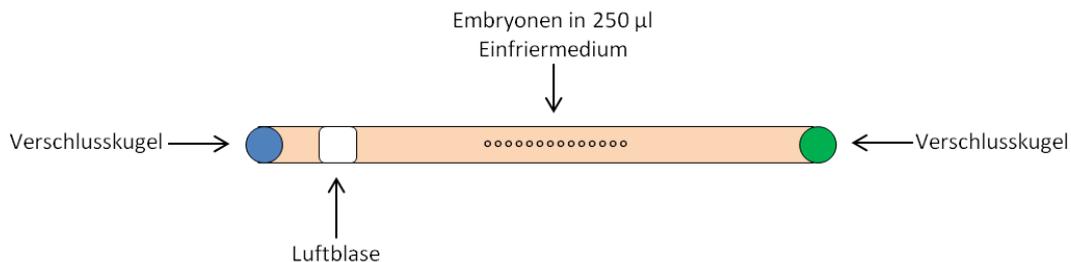


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines befüllten Minitübs.

Die Farbcodierung der Kugeln ermöglichte die Unterscheidung der Minitübs. Jedes Tüb wurde mit Datum, Dosierung, Embryonenzahl und Mausstamm beschriftet.

Die Minitübs wurden je nach Embryonengesamtzahl mit 20 bis 30 Embryonen befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass die Embryonen beim Aufnehmen mit der Kapillare dicht aneinander gereiht wurden, damit nicht mehr M2 Medium (P/S) als notwendig in das Minitüb gelangte und die Konzentration des Einfriermediums veränderte. Die Embryonen wurden etwa in der Mitte des Einfriermediums platziert und die Tübs mit einer zweiten Kugel verschlossen. Nach Befüllung aller Minitübs wurden diese in den Kryostat überführt, der vor Beginn des Einfriervorgangs von Raumtemperatur (RT) auf 0°C vorgekühlt worden war.

Der Programmablauf des Kryostaten ist in Tabelle 2 dargestellt. Als Kühlmedium wurde vergällter Ethanol (99,9 %) verwendet. Erst wenn alle Minitübs im Kryostat platziert waren, wurde das Programm gestartet. Mit -0,6°C/min wurde die Temperatur

zunächst auf -6°C gesenkt. Bei dieser Temperatur erfolgte das Seeding. Ein in flüssigem Stickstoff vorgekühlter Kupferstempel wurde manuell auf Höhe der Luftblasen an die Minitübs angesetzt und so die Kristallisation des Einfriermediums ausgelöst. Im weiteren Verlauf des Programms wurden die Minitübs mit einer Abkühlgeschwindigkeit von $-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -32°C herunter gekühlt. Nach Ablauf des Programms wurden die Minitübs aus dem Kryostat direkt in flüssigen Stickstoff überführt und in farbigen Kassetten verstaut. Die Lagerung erfolgte im Zwischentank für maximal sieben Tage.

Tabelle 2: Programmablauf des Kryostaten.

	Zeit	End-Temperatur	Abkühlgeschwindigkeit
Programmstart, Kühlung	14 min	RT \rightarrow 0°C	$\sim -1,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Pause (Beschicken der Tübs)		0°C	$0^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Kühlung	5 min	0°C	$0^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Seeding	6 min	-6°C	$-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Kühlung	65 min	-32°C	$-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$

III.5.3.2. Ansetzen der Dosierungsreihe mit Ectoin

Das Ectoin wurde von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Professor Tolba (Institut für Versuchstierkunde in der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen, Universitätsklinikum Aachen) bezogen. Diese erwarb Ectoin® in größeren Mengen bei der Bitop AG in Witten. Es wurde in 15 ml Falcons in einem gepolsterten Umschlag verschickt und nach seiner Ankunft in München im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt.

Die Dosierungsreihe wurde mit *in vivo* gewonnenen Zwei-Zell-Embryonen von jeder der drei verwendeten Mausstämmen (CD-1, C3H und B6) durchgeführt. Als Ectoin-Dosierungen wurden 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (Dosierung 1, D1; vgl. Lohmer et al., 2008), 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (Dosierung 2, D2), 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (Dosierung 3, D3) und 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (Dosierung 4, D4) verwendet. Als Kontrolle (D0) wurden Embryonen ohne Zusatz von Ectoin zum Einfriermedium kryokonserviert. Für jeden Einfriertermin wurde das Ectoin frisch auf der Feinwaage in einem Eppendorfgefäß abgewogen und dem Einfriermedium nach dessen Auftauen hinzugefügt. Die Berechnung der Ansätze für die verschiedenen Dosierungen ergab sich wie folgt:

- 100 mg Ectoin + 2 ml Einfriermedium (Dosierung 4, D4)
- 600 µl der Dosierung 4 + 600 µl Einfriermedium (Dosierung 3, D3)
- 300 µl der Dosierung 4 + 1,2 ml Einfriermedium (Dosierung 2, D2)
- 150 µl der Dosierung 2 + 1,35 ml Einfriermedium (Dosierung 1, D1)

Die *in vivo* gewonnenen Embryonen wurden nach dem Waschen in vier Tropfen M2 Medium (P/S) in fünf annähernd gleich große Gruppen aufgeteilt. Je nach der Gesamtzahl der Embryonen konnten zwei bis drei Minitübs pro Dosierung eingefroren werden. Für jede Dosierung wurde die Seedingzeit vom Ansetzen des Kupferstempels bis zur vollständigen Kristallisation gemessen.

III.5.3.3. Auftauen und Revitalisierung der kryokonservierten Embryonen

Das Auftaumedium wurde vor jedem Gebrauch frisch angesetzt. 5,13 mg Sucrose wurden in einer Petrischale abgewogen und 15 ml M2 Medium (P/S) dazugegeben. Nach vollständiger Lösung der Sucrose wurde die Lösung steril filtriert (0,22 µm).

Die Kassetten mit den Minitübs wurden aus dem Zwischentank in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Wanne gegeben. Die Tübs mussten 40 sek abdampfen bevor sie für 5 min in ein 37°C Wasserbad gelegt wurden. Mit einer Schere wurden die Minitübs aufgeschnitten und der Inhalt mit einer Spritze mit Record-Anschluss in eine Gewebekulturschale mit 219 µl Auftaumedium gegeben. Nach 5 min wurden 438 µl Auftaumedium und nach weiteren 5 min 876 µl dazugegeben. Im Anschluss wurden die Embryonen mit Mundpipette und Glaskapillare herausgesucht, gezählt und in einem viergeteilten Zellkulturschälchen durch vier Tropfen M2 Medium (P/S) transferiert, um sie zu waschen. Die als morphologisch intakt beurteilten Zwei-Zell-Embryonen (vgl. Abschnitt III.5.4), die im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) zur weiteren Entwicklung inkubiert wurden, wurden aus dem M2 Medium (P/S) in einem weiteren viergeteilten Zellkulturschälchen durch vier Tropfen KSOM transferiert. Danach wurden sie in 100 µl KSOM unter Mineralöl überführt, welches zuvor im Brutschrank äquilibriert wurde. Die Überschichtung des Mediums mit Öl dient zur Verhinderung des Austrocknens der Embryonen im Brutschrank.

Diejenigen Embryonen, die nachfolgend in Rezipienten transferiert wurden, wurden nach dem Waschen für den weiteren Transport in 100 µl M2 Medium (P/S) unter Mineralöl überführt.

III.5.3.4. Beobachtung der In-vitro-Weiterentwicklung der Embryonen

Die im Brutschrank zur Weiterentwicklung inkubierten Embryonen wurden jeden Tag um die gleiche Zeit morphologisch begutachtet. Dabei wurden sowohl die Embryonen gezählt, die sich weiterentwickelt hatten als auch die, welche inzwischen morphologisch beschädigt waren.

III.5.4. Beurteilung der Embryonen

Alle aufgetauten Embryonen wurden gezählt und beurteilt. Die morphologisch intakten Embryonen wurden zur Weiterentwicklung im Brutschrank inkubiert (s. Abschnitt III.5.3.3 und III.5.3.4). Die Embryonen wurden in 5 verschiedene Kategorien von Beschädigungen eingeteilt um die Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen Typen zu protokollieren (Abbildung 6). Es wurden unterschieden: „morphologisch intakt“ (Kategorie A), „nur ein Blastomer morphologisch intakt“ (Kategorie B), „Zwei-Zell-Struktur noch erkennbar“ (Kategorie C), „Zwei-Zell-Struktur nicht mehr erkennbar“ (Kategorie D), „Zellmembran zerstört und ohne Inhalt“ (Kategorie E).

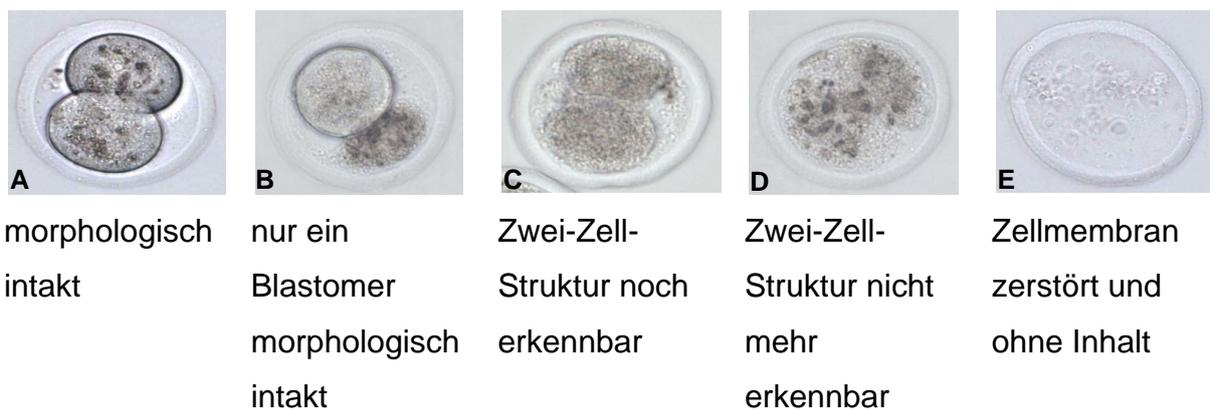


Abbildung 6: fünf Kategorien von Beschädigungen von Zwei-Zell-Embryonen nach dem Auftauen.

III.6. Einsatz von Ectoin beim Spermfreezing

III.6.1. Spermengewinnung

III.6.1.1. Präparation der Nebenhoden

Zur Gewinnung der Spermaproben für die Kryokonservierung wurden jeweils zwei zuchtreife Männchen (mindestens 12 Wochen alt) eines Stammes (CD-1, C3H oder B6) mittels zervikaler Dislokation getötet und unter einer Lichtquelle auf den Rücken gelegt. Der Bauchbereich wurde mit 80 % Ethanol desinfiziert und die Bauchhöhle mit einer Schere eröffnet. Die Nebenhodenschwänze wurden frei präpariert und zusammen mit einem Stück des Samenleiters entnommen (Abbildung 7). Bis zur Feinpräparation wurden sie in einer Vier-Well-Schale in 0,9 % NaCl-Lösung auf Eis gelagert.



Abbildung 7: Präparation des Nebenhodenschwanzes.

III.6.1.2. Feinpräparation und Gewinnung der Spermien

Unter dem Stereomikroskop wurden eventuell noch vorhandenes Fett, Blutgefäße sowie Reste des Nebenhodenkörpers entfernt und in 100 μ l CPA siehe Abschnitt III.2.7.4) überführt (Abbildung 8). Im CPA wurden die Nebenhodenschwänze mit der Federschere mehrmals aufgeschnitten, so dass die Spermien 5 min ausschwimmen konnten und nach Schwenken der Vier-Well-Schale eine homogene Spermien-suspension entstand. Diese Spermien-suspension wurde wie in Abschnitt III.6.2.1 beschrieben eingefroren.



Abbildung 8: Feinpräparation der Nebenhodenschwänze.

III.6.2. Dosierungsreihe für Ectoin beim Spermfreezing

III.6.2.1. Ansetzen der Dosierungsreihe mit Ectoin und Spermfreezing

Die Dosierungsreihe für das Spermfreezing wurde für Männchen der Stämme CD-1, C3H und B6 durchgeführt. Für jeden Einfrierdurchgang wurde das Sperma von zwei männlichen Mäusen gemischt. Die Spermaproben wurden in sogenannten „Straws“ eingefroren. Es wurden für jede Dosierung drei Straws eingefroren und aufgetaut. Pro Straw wurden nach dem Auftauen drei Messungen durchgeführt.

Für jeden Termin wurde das auf der Feinwaage jeweils frisch abgewogene Ectoin dem CPA nach dessen Auftauen hinzugefügt.

Analog zum Embryofreezing wurden folgende Dosierungen angesetzt:

- 50 mg Ectoin + 1 ml CPA (Dosierung 4, D4)
- 250 µl der Dosierung 4 + 250 µl CPA (Dosierung 3, D3)
- 200 µl der Dosierung 4 + 800 µl CPA (Dosierung 2, D2)
- 100 µl der Dosierung 2 + 900 µl CPA (Dosierung 1, D1)

Vor dem Einfrieren mussten die Messschalen (Gewebekulturschalen) vorbereitet werden. Für jede Messung mit dem Spermanalyser wurde eine Messschale benötigt. Für die fünf Dosierungen wurden 15 Straws (5 * 3 Straws) eingefroren und aufgetaut. Aus jedem Straw wurden drei Proben genommen. Zudem wurde immer eine Messung von frischem unverdünntem und 1:5 verdünntem Sperma durchgeführt. Die insgesamt 47 Messschalen wurden mit 100 µl HTF befüllt und mit Mineralöl überschichtet. Bis zur Verwendung wurden die Schälchen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) gelagert.

Alle beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung auf Eis. Von jeder Dosierung und der Kontrolle wurden 80 μ l Einfriermedium vorgelegt und jeweils 20 μ l der Spermiasuspension hinzugefügt (1:5 Verdünnung). Nach 2 min wurden von jeder Dosierung und der Kontrolle jeweils drei Tropfen (17 μ l) vorgelegt und mit einer 1 ml Spritze in die Straws aufgezogen (Abbildung 9). Die Straws wurden mit Datum, Dosierung und Mausstamm beschriftet und zugeschweißt. Die Beschickung der Straws ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

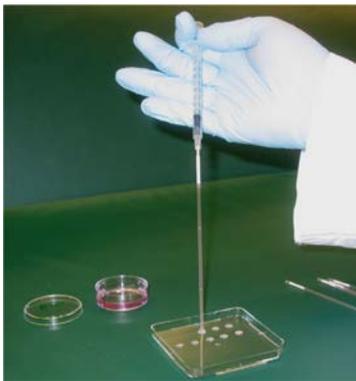


Abbildung 9: Aufziehen der vorgelegten Spermproben in einen Straw mit einer 1 ml Spritze.

Die zugeschweißten Straws wurden in *Cryocups* in extra für diesen Zweck angefertigte Köcher gestellt. Die Straws wurden für 10 min vorgekühlt, indem sie auf der Stickstoffoberfläche in der Gasphase schwammen, bevor sie vollständig im flüssigen Stickstoff versenkt wurden.

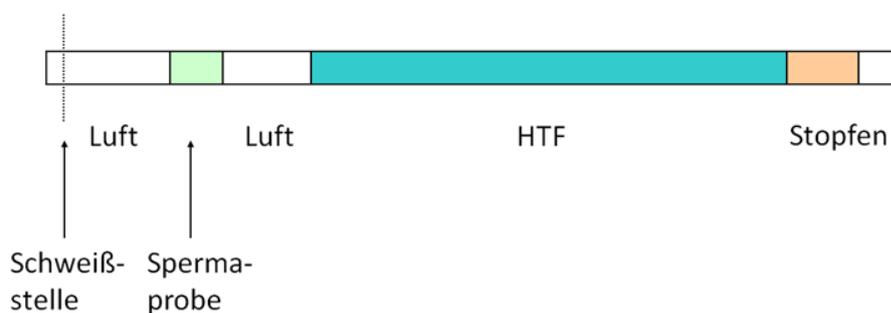


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines befüllten Straws.

III.6.2.2. Auftauen der kryokonservierten Spermaproben

Die eingefrorenen Spermaproben wurden am selben Tag wieder aufgetaut. Hierfür wurden die Straws für 10 min in ein Wasserbad (37°C) gelegt. Sie wurden aufgeschnitten und nur die Spermaprobe nicht aber das HTF in eine Schale (35 * 10 mm) gegeben. Aus jedem Tropfen eines Straws wurden jeweils 2,5 µl in eine vorbereitete Messschale (100 µl HTF unter Mineralöl) pipettiert. Die Schalen wurden für 10 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert, da die Spermien nach dem Auftauen einige Zeit benötigen um sich zu revitalisieren.

III.6.2.3. Qualitätsmessung der Spermien

Mit dem *spermanalyser* „IVOS“ (=Integrated Visual Optical System) wurden drei Parameter (Motilität, Progressivität und Konzentration) zur Beurteilung der Spermienqualität gemessen. Von jeder Spermaprobe wurden 15 µl in eine Zählkammer gegeben und mit einem Deckglas bedeckt (Abbildung 11). Zählkammern und Deckgläser wurden nach jeder Messung verworfen. Es wurden jeweils fünf Bilder auf einem angeschlossenen Bildschirm für die Messung ausgewählt, aus denen das Programm einen Mittelwert für jeden Parameter berechnete. Gleichzeitig wurde visuell überprüft, ob die Zahlen mit den Bildern übereinstimmten. Insgesamt wurden 45 Messungen von den fünf Dosierungen nach dem Auftauen durchgeführt (drei Straws/ Dosierung; drei Messungen/ Straw).



Abbildung 11: Befüllung der Zählkammern mit den Spermaproben.

III.6.3. *In-vitro-Fertilisation (IVF)*

III.6.3.1. Spermfreezing für die IVF

Die Spermaproben wurden mit der jeweils für jeden Mausstamm ermittelten besten Ectoin-Dosierung aus den Ergebnissen der Dosierungsreihe eingefroren. Die Kontrolle wurde mit CPA ohne Zusatz von Ectoin durchgeführt.

Für jeden Durchgang war Sperma von nur einem Männchen ausreichend. Wie in Abschnitt III.6.1 beschrieben, wurde das Tier getötet, die Nebenhodenschwänze präpariert und in einer Vier-Well-Schale in 50 µl CPA überführt. Davon wurden jeweils 20 µl zu 80 µl CPA + Ectoin bzw. 80 µl CPA gegeben.

Da im Gegensatz zu Abschnitt III.6.2.1 nur ein Männchen verwendet wurde, wurde die Menge des CPA entsprechend geändert. Pro Männchen wurden zwei Straws eingefroren. Der restliche Verlauf der Kryokonservierung bis zum Auftauen der Spermien entsprach dem in Punkt III.6.2.1 dargestellten Vorgehen.

III.6.3.2. Superovulation der Spenderweibchen

Der Ansatz für die Hormonlösung ist im Abschnitt III.2.7.1 beschrieben. Für die Gewinnung der Oozyten für die IVF wurden pro IVF-Termin jeweils zehn präpuberale Weibchen (Alter: 21-26 Tage) superovuliert. Dazu wurde an Tag 1 um 16 Uhr PMSG intraperitoneal (i.p.) injiziert und 50 Stunden später, an Tag 3 um 18 Uhr, hCG ebenfalls i.p. appliziert. Alle superovulierten Tiere wurden ohne vorherige Verpaarung mit Männchen an Tag 4 um 8 Uhr durch zervikale Dislokation getötet und die Eileiter für die Gewinnung der Oozyten präpariert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zeitschema für die Superovulation zur Gewinnung von Oozyten für IVF.

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
16 Uhr: PMSG	Keine Behandlung	18 Uhr: hCG	8 Uhr: Gewinnung von Oozyten	8 Uhr: Gewinnung von Zwei-Zell- Embryonen

PMSG: *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (Intergonan®); 5 I.E./Maus i.p.
hCG: *human Chorionic Gonadotropin* (Ovogest®); 5 I.E./Maus i.p.

III.6.3.3. Präparation der Eileiter und Eröffnen der Ampullae

Die entnommenen Eileiter wurden in einem Schälchen (35 * 10 mm) mit Mineralöl gesammelt. In einem weiteren Schälchen (60 * 15 mm) mit einem unter Mineralöl beschichteten 200 µl HTF-Tropfen, wurden die Ampullae der Eileiter im Mineralöl mit einer Präpariernadel aufgestochen und die Kumulus-Oozyten-Komplexe in den HTF-Tropfen überführt (Abbildung 12).

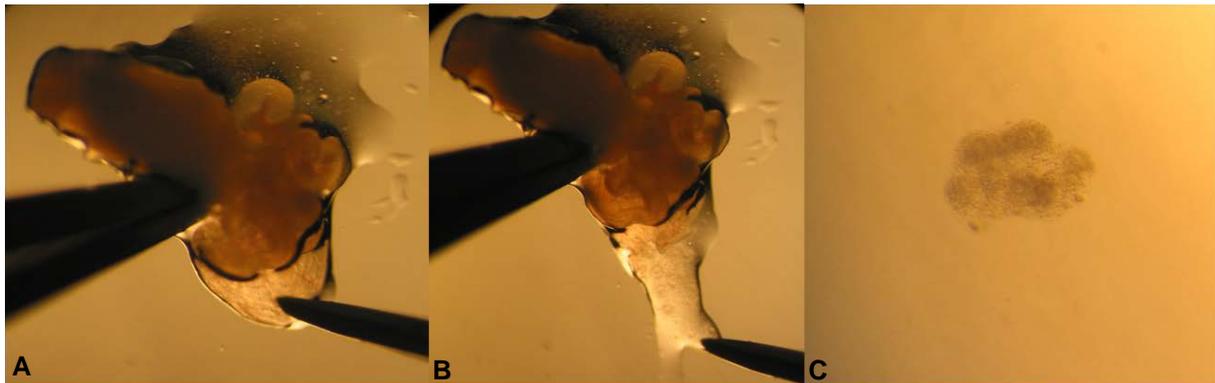


Abbildung 12: Eröffnen der Ampulla (A+B). Gewonnener Kumulus-Oozyten-Komplex im HTF Tropfen (C).

III.6.3.4. Durchführung der IVF

Jeweils am Vortag des IVF-Termins wurden die Fertilisationsschalen vorbereitet. Es wurden in der Regel zwei IVF-Schalen für die Fertilisation der Eizellen mit Spermien, die unter Zusatz von Ectoin eingefroren wurden, und zwei Schalen für die Kontroll-IVF benötigt. In jeder Fertilisationsschale wurden 100 µl HTF mit Mineralöl überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO₂).

Die Spermaproben wurden um ca. 7.30 Uhr, wie in Abschnitt III.6.2.2 beschrieben, aufgetaut. Die Proben von zwei Straws aus einem Ansatz wurden in einer Schale vermischt und daraus 2,5 µl in jede Fertilisationsschale zu den 100 µl HTF gegeben. Nach 10 min im Brutschrank wurden die Proben für die Spermien-Qualitätsmessung (15 µl) direkt aus den Fertilisationsschalen entnommen.

Die Oozyten wurden anschließend wie oben (vgl. Abschnitt III.6.3.2) beschrieben gewonnen. Mit einer Pipette wurden die Kumulus-Oozyten-Komplexe unter dem Mikroskop aus dem HTF-Tropfen entnommen und gleichmäßig auf die Fertilisationsschalen verteilt. Anschließend wurden die Schalen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) für ca. 4 ½ Stunden inkubiert.

Danach wurden alle Zellen zum Waschen durch fünf Tropfen KSOM transferiert. Anschließend wurden sie in 100 µl KSOM unter Mineralöl (beides äquibriert) überführt, um über Nacht im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) zu inkubieren. Am nächsten Morgen wurde die Anzahl der Einzeller, der Zwei-Zell-Embryonen und der degenerierten Zellen erhoben. Die morphologisch intakten Zwei-Zell-Embryonen wurden bis zum Blastozystenstadium in KSOM unter Mineralöl inkubiert (37°C, 5 % CO₂) und die Weiterentwicklungsrate zur Blastozyste bestimmt.

III.7. Auswertung und Statistik

Für jeden untersuchten Parameter wurde das arithmetische Mittel (Mittelwert, MW) und die Standardabweichung (SD) der Daten aus fünf bzw. drei Terminen (nur Embryotransfer) berechnet. Zur Überprüfung auf Gruppenunterschiede wurden t-Tests für gepaarte Stichproben zwischen den jeweiligen Daten an den einzelnen Terminen durchgeführt. Kriterium für die Annahme statistisch signifikanter Unterschiede war eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$. Die statistische Auswertung wurde von Herrn Dr. H. Scherb (Institut für Biomathematik und Biometrie, Helmholtz Zentrum München) überprüft. Die Berechnung der MW und SD erfolgte in Excel® (Microsoft® Office Excel 2007, Fa. Microsoft). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms SAS® Enterprise Guide 4.1 (Version 4.1.0.1019, Fa. SAS Institute Inc.) vorgenommen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot® für Windows Version 11.0 (Version 11.0.0.75, Fa. Systat Software Inc.) verwendet.

IV. Ergebnisse

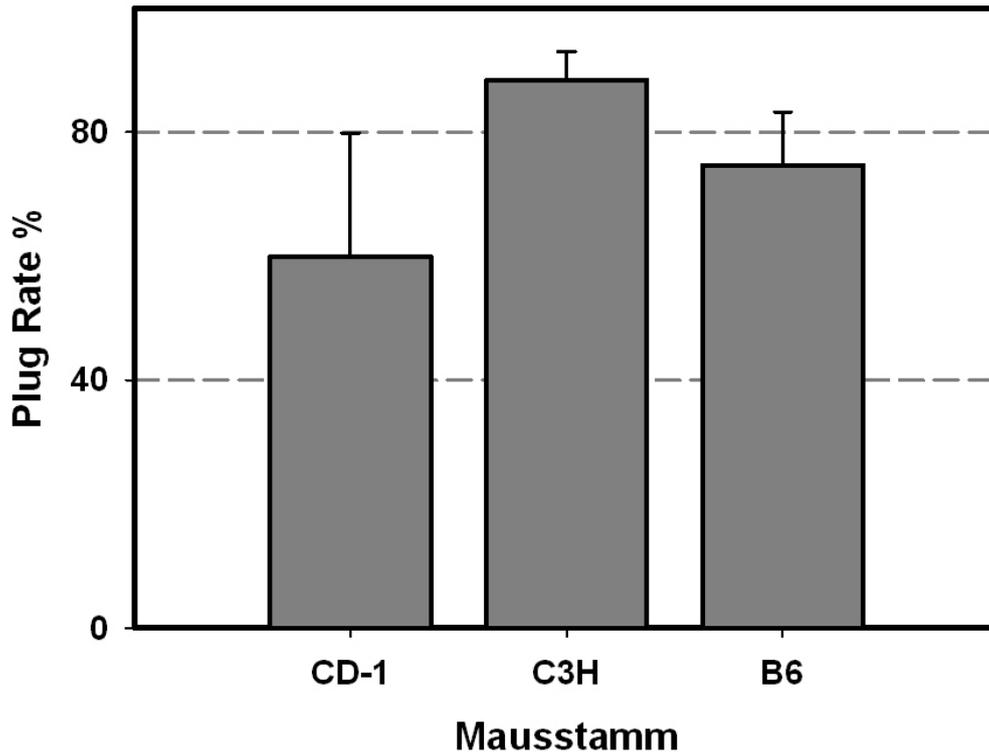
IV.1. Embryonengewinnung

IV.1.1. *plug* Raten

Die *plug* Raten jedes Mausstammes wurden im Rahmen der Durchführung der Dosierungsreihe für das Embryofreezing bestimmt. An jeweils fünf Terminen für jeden Stamm wurden insgesamt 60 CD-1(ICR) (CD-1), 143 C3HeB/FeJ (C3H) und 147 C57BL/6J (B6) Weibchen superovuliert. Davon waren 36 CD-1, 126 C3H und 110 B6 Mäuse *plug* positiv. Die *plug* Rate wurde anhand der Formel 1 berechnet. Im Durchschnitt (MW \pm SD) ergab sich aus fünf Terminen für CD-1 eine *plug* Rate von 60,0 (\pm 19,9) %, für C3H 88,4 (\pm 4,7) % und für B6 74,7 (\pm 8,6) %. Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Abbildung 13 dargestellt.

Formel 1: Berechnung der *plug* Rate (%).

$$\text{plug Rate (\%)} = \frac{\text{Anzahl plug positiver Tiere}}{\text{Anzahl superovulierter Tiere}} * 100 \%$$

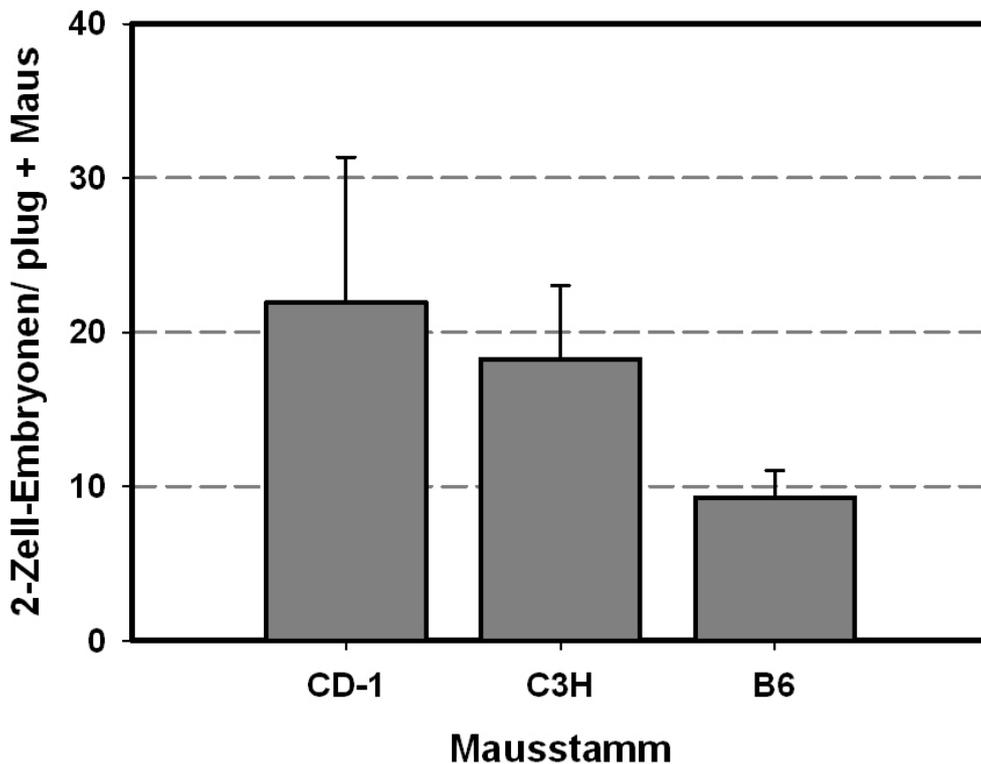


Stamm	CD-1	C3H	B6
Termin 1	50,0	86,7	73,3
Termin 2	41,7	83,9	76,7
Termin 3	91,7	86,7	79,3
Termin 4	50,0	88,5	60,7
Termin 5	66,7	96,2	83,3
MW	60,0	88,4	74,7
SD	19,9	4,7	8,6

Abbildung 13: Durchschnittliche *plug* Raten für die drei Mausstämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils fünf Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.1.2. Anzahl der Embryonen pro Maus

Aus den 36 *plug* positiven CD-1 Mäusen konnten insgesamt 794 Zwei-Zell-Embryonen, aus den 126 C3H *plug* positiven Mäusen 2309 Zwei-Zell-Embryonen und aus den 110 B6 *plug* positiven Mäusen 1007 Zwei-Zell-Embryonen gewonnen werden. Abbildung 14 zeigt für jede Mauslinie die durchschnittliche Anzahl der Zwei-Zell-Embryonen pro Tier. Aus fünf Terminen wurde für jeden Stamm der Mittelwert (MW \pm SD) berechnet. Daraus ergaben sich für CD-1 22,0 (\pm 9,4) Zwei-Zell-Embryonen, für C3H 18,2 (\pm 4,8) und für die B6 9,3 (\pm 1,8) Embryonen pro *plug* positives Weibchen.

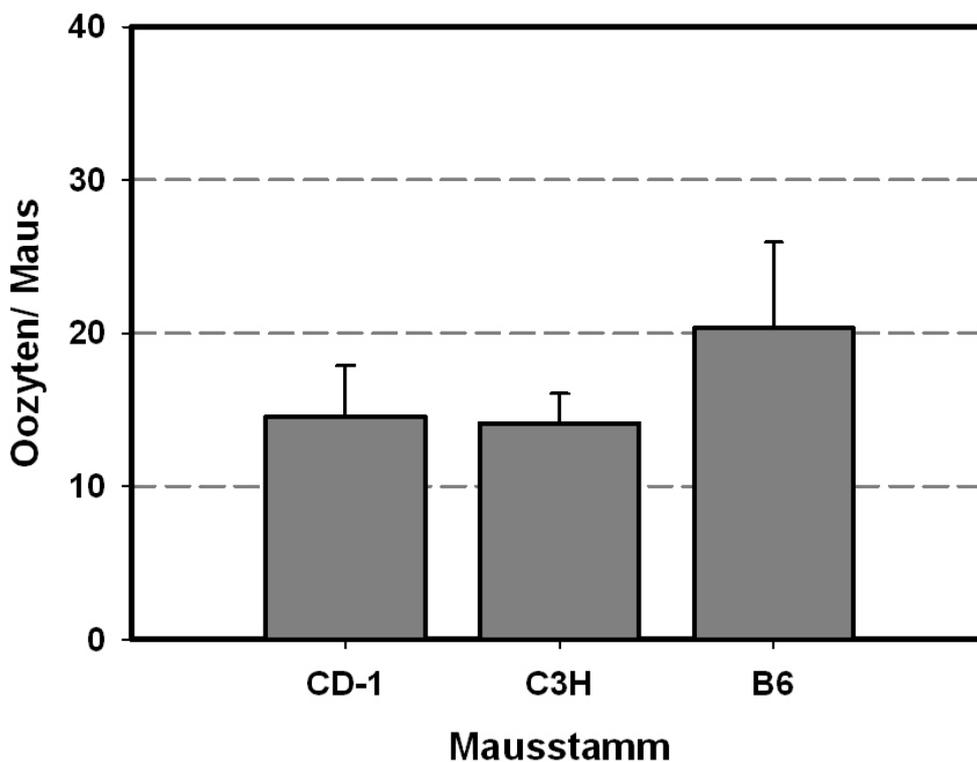


Stamm	CD-1	C3H	B6
Termin 1	37,5	14,3	6,6
Termin 2	15,0	17,3	9,8
Termin 3	21,3	25,7	9,1
Termin 4	14,2	14,1	11,6
Termin 5	21,9	19,8	9,2
MW	22,0	18,2	9,3
SD	9,4	4,8	1,8

Abbildung 14: Durchschnittliche Anzahl an Zwei-Zell-Embryonen pro *plug* positives Weibchen der Stämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils fünf Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.1.3. Anzahl der Oozyten pro Maus

An fünf IVF-Terminen wurden bei insgesamt 50 CD-1 Mäusen 727 Oozyten gezählt. Bei 50 C3H Weibchen wurden 702 Oozyten und bei 52 B6 Mäusen 1068 Oozyten notiert. In der Tabelle der Abbildung 15 sind für jeden Termin die Einzelwerte der Anzahl an Oozyten pro Maus dargestellt. Für jeden Mausstamm wurde der Mittelwert aus den fünf Terminen (MW±SD) bestimmt. Bei den CD-1 Mäusen hatte jedes Tier durchschnittlich 14,5 Oozyten; bei den Inzuchtstämmen C3H und B6 waren es 14,1 bzw. 20,3 Oozyten im Durchschnitt.



Stamm	CD-1	C3H	B6
Termin 1	12,6	16,1	25,9
Termin 2	11,7	14,2	25,9
Termin 3	15,7	11,2	12,8
Termin 4	19,9	13,4	17,9
Termin 5	12,8	15,6	19,1
MW	14,5	14,1	20,3
SD	3,4	2,0	5,6

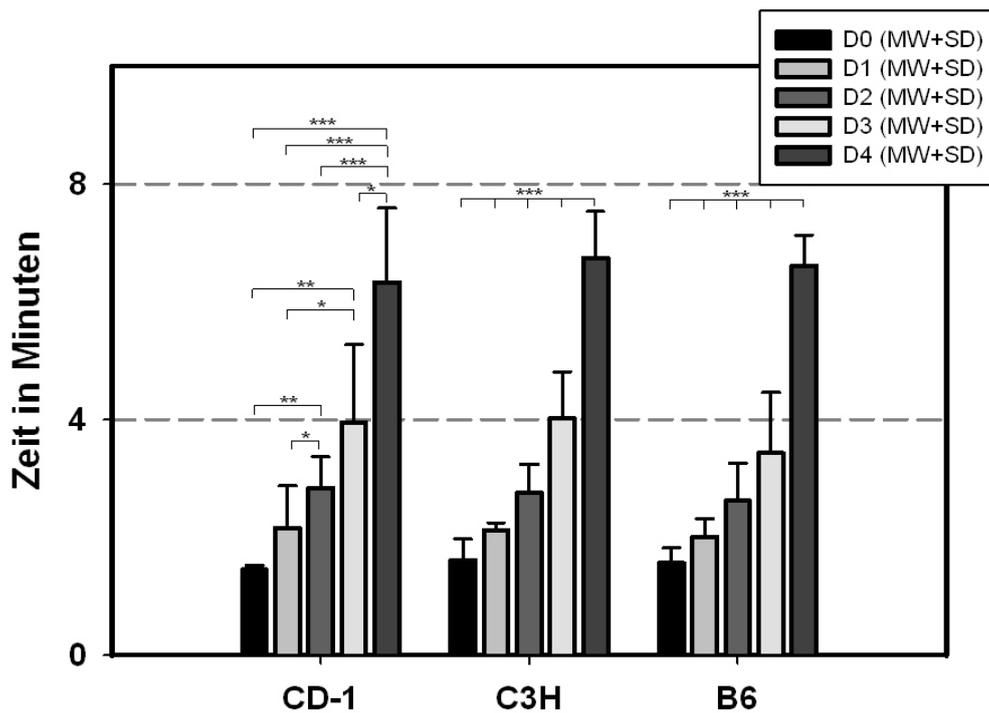
Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl an Oozyten pro superovuliertem Weibchen der Stämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils fünf Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.2. Anwendung von Ectoin beim Embryofreezing

IV.2.1. Seedingzeiten

Die Seedingzeit wurde ab dem Zeitpunkt des Ansetzens des Kupferstempels an die Luftblase im Minitüb-Röhrchen bis zur vollständigen Kristallisation in Minuten (min) gemessen. Die Ergebnisse (MW±SD) aus fünf Terminen sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei allen drei Mausstämmen nahm die Zeitdauer mit steigender Ectoin-Dosierung zu. Die Zeit der Dosierung 0 lag bei CD-1 bei 1,5 min und bei C3H und B6 bei 1,6 min. Tübs, die mit Dosierung 1 eingefroren wurden, benötigten 2,2 min (CD-1), 2,1 min (C3H) und 2,0 min (B6) für die vollständige Kristallisation. Eine

Seedingzeit von 2,8 min (CD-1, C3H) bzw. 2,6 min (B6) konnte bei der Dosierung 2 gemessen werden. Bei der Dosierung 3 wurden für CD-1 4,0 min, für C3H 4,1 min und für B6 3,4 min gezählt. Die Dosierung 4 lag bei 6,3 min (CD-1), 6,7 min (C3H) und 6,6 min (B6). Außer die Dosierung 0 gegenüber der Dosierung 1 und die Dosierung 3 gegenüber der Dosierung 4 beim CD-1 Mausstamm, waren bei allen drei Stämmen alle Dosierungen miteinander signifikant ($p \leq 0,05$). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (mit Ausnahme von D0 vs. D1 und D3 vs. D4, jeweils nur bei CD-1) waren statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).



Dosierung	CD-1					C3H					B6				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	1,4	1,6	2,5	3,1	6,2	1,5	2,0	2,3	3,3	7,0	1,5	2,2	3,5	5,2	7,3
Termin 2	1,5	2,5	3,3	6,2	6,5	2,0	2,1	3,3	4,3	6,0	2,0	2,3	3,1	3,3	7,0
Termin 3	1,5	2,5	3,3	4,1	8,1	1,3	2,0	2,2	5,2	6,4	1,3	1,5	2,1	3,1	6,2
Termin 4	1,5	3,1	3,0	3,4	6,5	2,0	2,2	3,0	4,0	6,3	1,5	2,0	2,2	2,6	6,5
Termin 5	1,4	1,3	2,1	3,0	4,5	1,3	2,3	3,0	3,3	8,0	1,5	2,1	2,2	3,0	6,1
MW	1,5	2,2	2,8	4,0	6,3	1,6	2,1	2,8	4,1	6,7	1,6	2,0	2,6	3,4	6,6
SD	0,1	0,7	0,5	1,3	1,3	0,4	0,1	0,5	0,8	0,8	0,3	0,3	0,6	1,0	0,5

Abbildung 16: Durchschnittliche Seedingzeiten (min) bei der Kryokonservierung von Zwei-Zell-Embryonen der drei Stämme CD-1, C3H und B6 für die verschiedenen Ectoin-Dosierungen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,001$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]**

IV.2.2. CD-1

An fünf verschiedenen Terminen wurden insgesamt 60 Tiere superovuliert. Aus den 36 *plug* positiven Tieren konnten 794 Zwei-Zell-Embryonen gewonnen werden. Für jede Dosierung (D0 bis D4) wurden jeweils insgesamt 158 Zwei-Zell-Embryonen eingefroren (kryoarchiviert, k.a.). Nach dem Auftauen wurde zu jedem Termin die Anzahl der wiedergefundenen (w.g.) sowie die davon morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen bestimmt. Aus der Anzahl der morphologisch intakten Embryonen bezogen auf die Gesamtzahl der wiedergefundenen Embryonen wurde die Auftaurate (AR) gemäß Formel 2 berechnet. Nach weiterer Inkubation der morphologisch intakten Embryonen wurde die Anzahl der sich daraus entwickelnden intakten Blastozysten (BZ) bestimmt und die Entwicklungsrate (ER) anhand Formel 3 ermittelt. Eine Übersicht über die Gesamtzahl der kryoarchivierten, wiedergefundenen und morphologisch intakten Zwei-Zell-Embryonen sowie der intakten Blastozysten gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Embryonen an fünf verschiedenen Terminen.

<i>Dosierung</i>	<i>k.a.</i>	<i>w.g.</i>	<i>m.i.</i>	<i>BZ</i>
D0	158	148	98	56
D1	158	156	117	41
D2	158	144	95	42
D3	158	143	121	25
D4	158	136	72	0

[D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium]

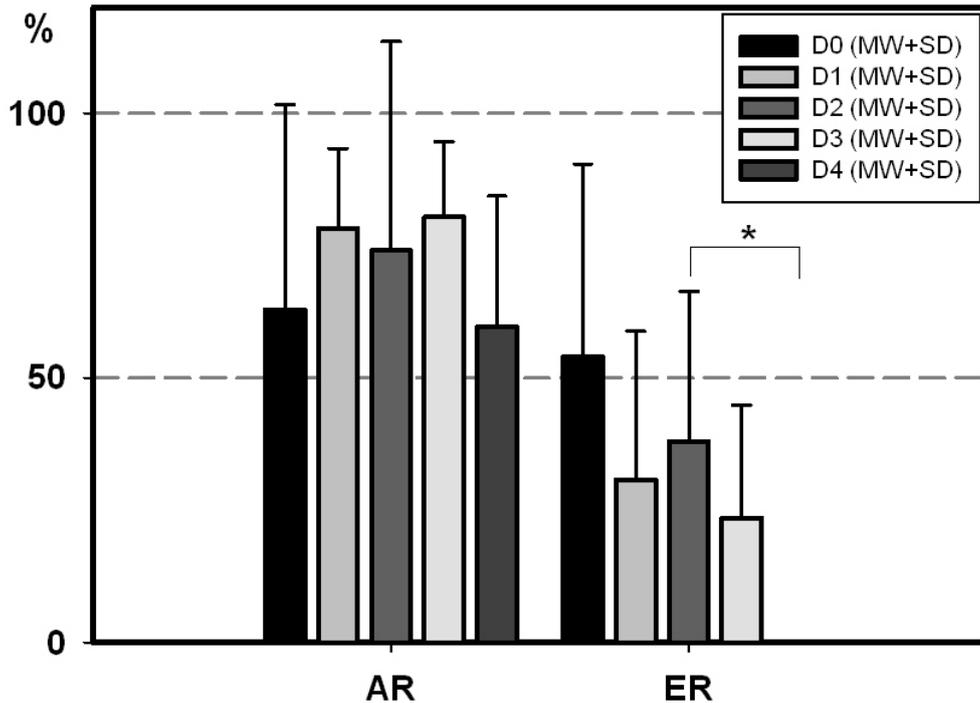
Formel 2: Berechnung der Auftaureate (%).

$$\text{Auftaureate (\%)} = \frac{\text{Anzahl morphologisch intakter Embryonen [m.i.]}}{\text{Anzahl wiedergefundener Embryonen [w.g.]}} * 100 \%$$

Formel 3: Berechnung der Entwicklungsrate (%).

$$\text{Entwicklungsrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Blastozysten [BZ]}}{\text{Anzahl morphologisch intakter Embryonen [m.i.]}} * 100 \%$$

Die durchschnittlichen (MW±SD) AR sowie ER für die verschiedenen Dosierungen von Ectoin (D0-D4) aus 5 Terminen sind in Abbildung 17 dargestellt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Ectoin (D0) wurde die höchste AR mit D4 (80,4±14,2 %) erreicht. Bei der ER ergab sich mit D0 der höchste Wert (54,0±36,4 %). Die ER der D2 ist gegenüber der D4 signifikant höher (T=-3,01; p=0,04). Da jedoch keine Dosierung eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle D0 zeigte, wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Revitalisierung durch Embryotransfers durchgeführt.



Dosierung	AR (%)					ER (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	82,9	88,6	94,4	85,3	41,0	79,4	56,4	41,2	55,2	0,0
Termin 2	92,3	93,3	80,0	73,3	66,7	66,7	0,0	66,7	0,0	0,0
Termin 3	51,2	55,6	4,7	86,4	45,2	0,0	12,0	0,0	7,9	0,0
Termin 4	0,0	82,4	100,0	60,0	100,0	-	21,4	20,0	27,3	0,0
Termin 5	88,2	71,4	91,4	97,1	45,7	70,0	64,0	62,5	27,3	0,0
MW	62,9	78,3	74,1	80,4	59,7	54,0	30,8	38,1	23,5	0,0
SD	38,7	15,1	39,5	14,2	24,6	36,4	28,1	28,3	21,4	0,0

Abbildung 17: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Zwei-Zell-Embryonen an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.2.3. C3H

Insgesamt wurden an fünf verschiedenen Terminen 143 weibliche C3H Mäuse superovuliert. Aus den 126 *plug* positiven Weibchen konnten 2309 Zwei-Zell-Embryonen gewonnen werden. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Anzahl der für die verschiedenen Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 kryoarchivierten, wiedergefundenen und morphologisch intakten Zwei-Zell-Embryonen, sowie der intakten Blastozysten aus anschließender *In-vitro*-Entwicklung. Für jede Dosierung wurden die entsprechenden Auftau- und Entwicklungsraten ermittelt. Sie sind in Abbildung 18 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Embryonen an fünf verschiedenen Terminen.

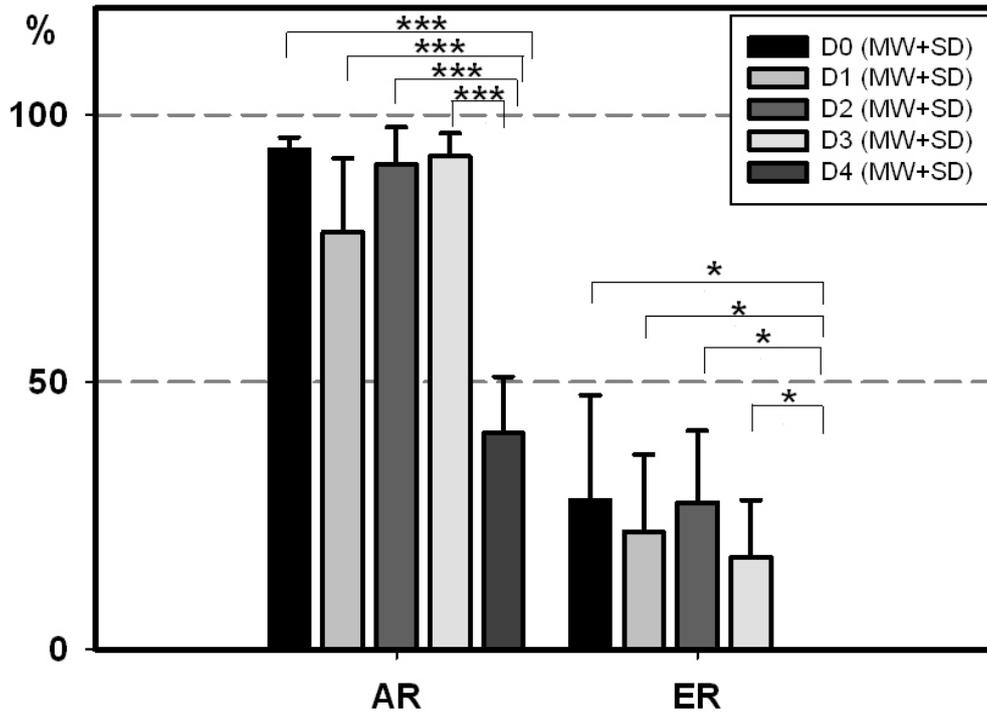
<i>Dosierung</i>	<i>k.a.</i>	<i>w.g.</i>	<i>m.i.</i>	<i>BZ</i>
D0	456	415	388	112
D1	460	446	348	66
D2	460	441	395	98
D3	425	391	361	69
D4	469	372	146	0

[D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium]

Sowohl in der AR als auch in der ER erzielte die Kontrollgruppe ohne Ectoin die höchsten Werte (AR: $93,6 \pm 2,2$ %; ER: $27,9 \pm 19,6$ %). Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. D4 ergab im Vergleich zu den anderen Gruppen mit einer AR von $40,4 \pm 10,6$ % bzw. einer ER von 0,0 % die signifikant ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,05$) niedrigsten Ergebnisse.

Da keine der Ectoin-Dosierungen eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle D0 zeigte, wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Revitalisierung durch Embryotransfers durchgeführt.

Ergebnisse



Dosierung	AR (%)					ER (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	94,4	60,6	98,7	98,6	39,1	9,0	2,3	18,9	15,5	0,0
Termin 2	90,6	69,5	93,1	92,9	28,1	44,2	19,3	46,9	19,2	0,0
Termin 3	92,5	77,4	80,5	88,7	34,2	30,3	18,5	17,2	22,1	0,0
Termin 4	93,8	95,4	93,9	87,8	55,7	6,7	27,4	18,0	0,0	0,0
Termin 5	96,6	87,4	87,9	93,3	45,1	49,4	42,2	36,3	28,9	0,0
MW	93,6	78,1	90,8	92,2	40,4	27,9	21,9	27,5	17,2	0,0
SD	2,2	13,8	6,9	4,3	10,6	19,6	14,5	13,5	10,8	0,0

Abbildung 18: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Zwei-Zell-Embryonen an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; *: $p \leq 0,001$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]**

IV.2.4. B6

Von den an fünf Terminen insgesamt 147 superovulierten B6 Mäusen waren 110 Tiere *plug* positiv. Nach dem Spülen der Eileiter wurden 1007 Zwei-Zell-Embryonen gezählt. In Tabelle 6 sind die Verteilung der gewonnenen Embryonen auf die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 sowie die Ergebnisse der Auszählungen nach dem Auftauen und der *In-vitro*-Weiterentwicklung zusammengefasst. Die durchschnittlichen (MW±SD) AR und ER sind in Abbildung 19 dargestellt. Die höchste AR wurde mit D3 erreicht (82,1±7,6 %) und der Unterschied im Vergleich zur AR bei D0 (59,2±19,6 %) war statistisch signifikant (T=2,72; p=0,05). Auch gegenüber der D4 war die AR bei D3 signifikant höher (T=-3,17; p=0,03). Bei der ER wurde das höchste Ergebnis mit D1 erreicht (36,5±40,3 %), doch der Unterschied gegenüber den übrigen Ectoin-Dosierungen und D0 war statistisch nicht signifikant. Mit D4 ergaben sich sowohl in der AR als auch in der ER die niedrigsten Werte (AR: 57,2±23,2 %; ER: 12,4±27,8 %).

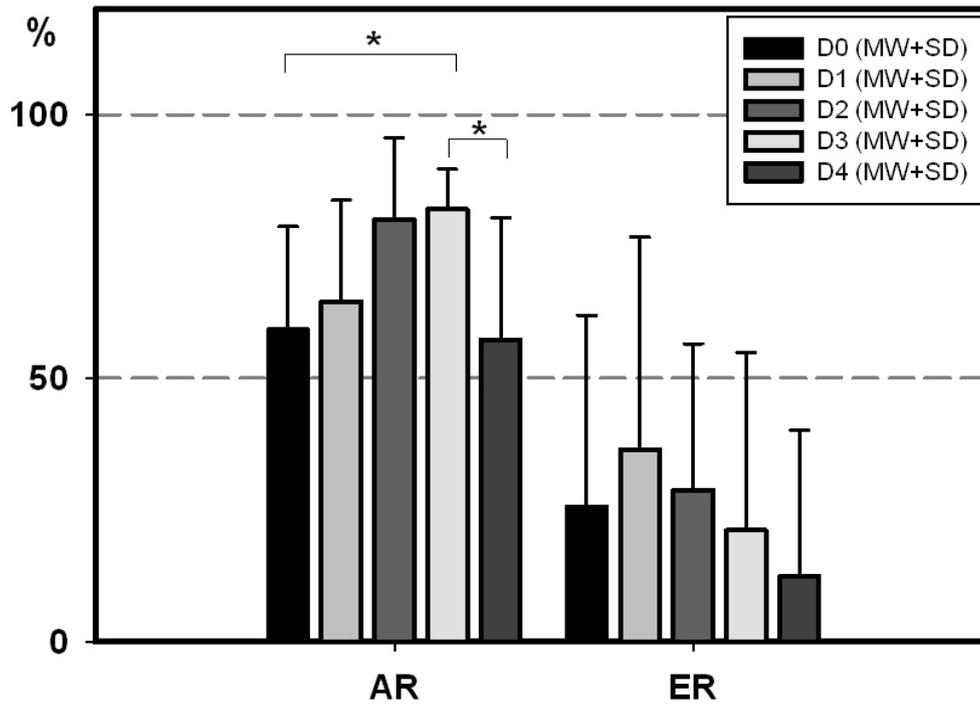
Gemäß der Versuchsplanung wurden im Folgenden erneut Zwei-Zell-Embryonen gewonnen und mit D0 und D3 eingefroren, um danach mit den aufgetauten, morphologisch intakten Embryonen Transfers in Rezipienten durchzuführen.

Tabelle 6: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Embryonen an fünf verschiedenen Terminen.

<i>Dosierung</i>	<i>ka.</i>	<i>w.g.</i>	<i>m.i.</i>	<i>BZ</i>
D0	201	191	118	30
D1	201	184	121	31
D2	201	186	148	38
D3	201	192	158	37
D4	201	194	116	18

[D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium]

Ergebnisse



Dosierung	AR (%)					ER (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	34,6	46,2	96,4	74,1	19,2	0,0	-	55,6	0,0	0,0
Termin 2	57,5	75,6	76,3	80,5	68,9	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0
Termin 3	85,7	92,3	92,3	87,5	67,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Termin 4	48,7	58,8	57,1	92,1	78,4	77,8	70,0	55,0	77,1	62,1
Termin 5	69,6	50,0	78,3	76,1	52,2	50,0	72,7	33,3	28,6	0,0
MW	59,2	64,6	80,1	82,1	57,2	25,6	36,5	28,8	21,1	12,4
SD	19,6	19,2	15,5	7,6	23,2	36,4	40,3	27,8	33,7	27,8

Abbildung 19: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.3. Embryotransfer

Da bei der Kryokonservierung von B6-Embryonen die Ectoin-Dosierung D3 eine signifikant höhere durchschnittliche Auftauration als die Kontrolle D0 erzielte, wurden drei weitere Einfrier- und Auftautermine mit den Dosierungen D0 und D3 durchgeführt. Die nach dem Auftauen morphologisch intakten Embryonen wurden jeweils anschließend in pseudogravide Rezipienten transferiert. Zusätzlich zu der Auftauration (Berechnung s. Formel 2) wurde die Revitalisierungsrate (RR) nach Formel 4 ermittelt.

Formel 4: Berechnung der Revitalisierungsrate (%).

$$\text{Revitalisierungsrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl lebender Nachkommen}}{\text{Anzahl transferierter Embryonen}} \times 100 \%$$

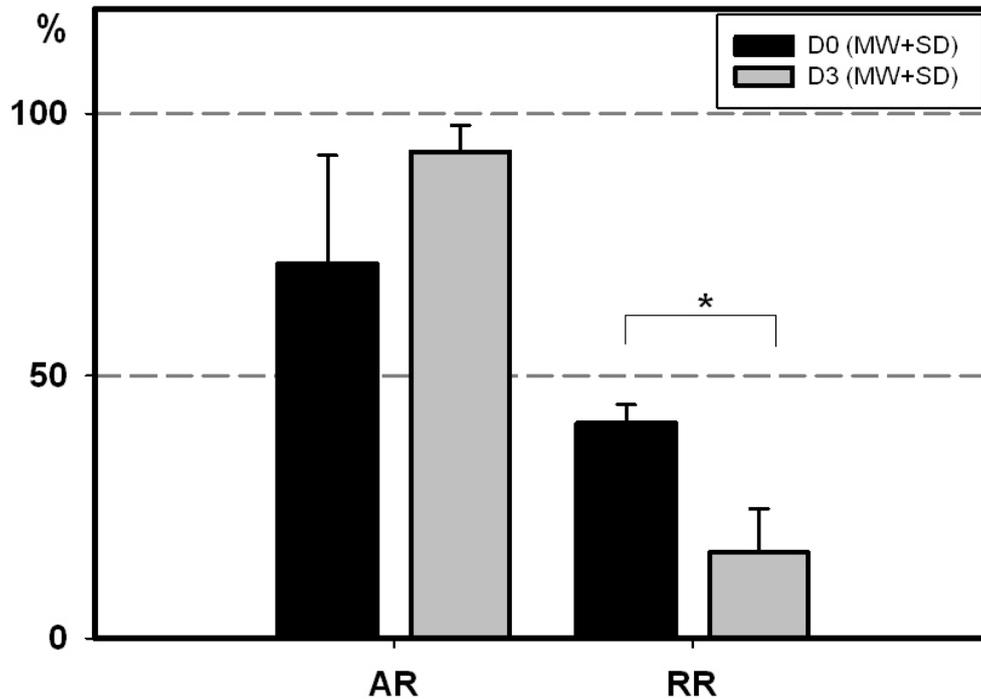
In Tabelle 7 sind für beide Dosierungen die Anzahl der eingefrorenen (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) und transferierten (trans.) Zwei-Zell-Embryonen sowie die Anzahl der geborenen Nachkommen und deren Geschlecht im Absetzalter aufgelistet.

Die durchschnittlichen (MW±SD) Auftau- und Revitalisierungsraten sind in Abbildung 20 dargestellt. D3 ergab mit 92,7 (±5,0) % gegenüber der D0 mit 71,6 (±20,7) % die höhere AR, doch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Dagegen war die RR bei D3 gegenüber der Kontrolle D0 signifikant niedriger (16,3±8,4 % vs. 41,0±3,5 %; T=-5,80; p=0,03).

Tabelle 7: Anzahl der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen sowie Gesamtzahlen der transferierten (trans.) Embryonen, Anzahl der geborenen Nachkommen und deren Geschlecht im Absetzalter für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei der Kryokonservierung und Revitalisierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an drei verschiedenen Terminen.

	Dosierung	ka.	w.g.	m.i.	trans.	geb.	♂	♀
Termin 1	D0	78	78	37	34	15	8	7
	D3	83	61	53	40	10	9	1
Termin 2	D0	100	100	83	78	29	15	14
	D3	100	98	94	90	14	9	5
Termin 3	D0	61	61	51	48	20	13	7
	D3	90	85	81	60	5	4	1

[D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D3: 25 mg Ectoin/ml Einfriermedium]



Dosierung	AR (%)		RR (%)	
	D0	D3	D0	D3
Termin 1	47,4	86,9	44,1	25,0
Termin 2	83,0	95,9	37,2	15,6
Termin 3	83,6	95,3	41,7	8,3
MW	71,6	92,7	41,0	16,3
SD	20,7	5,0	3,5	8,4

Abbildung 20: Auftauraten (AR) und Revitalisierungsraten (RR) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei der Kryokonservierung und Revitalisierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an drei verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.4. Beurteilung und Einteilung der aufgetauten Embryonen

Nach dem Auftauen der Dosierungsreihen wurden alle Embryonen visuell beurteilt und die degenerierten Embryonen in die verschiedenen Kategorien von Beschädigungen (vgl. Abschnitt III.5.4) eingeteilt. In Tabelle 8 ist die Anzahl der verschiedenen Gruppen für alle fünf Termine gelistet. Bei allen drei Mausstämmen kamen die morphologisch intakten Zwei-Zell-Embryonen nach dem Auftauen am häufigsten vor (Kategorie A). Bei den Stämmen CD-1 und B6 bildeten die Embryonen die noch eine Zwei-Zell-Struktur zeigten (Kategorie C) die größte Gruppe. Ausnahme war hierbei nur die Dosierung D3, bei der Kategorie B am häufigsten auftrat. C3H Embryonen zeigten nach dem Auftauen vorwiegend nur ein morphologisch intaktes Blastomer (Kategorie B), allerdings bei Verwendung der Dosierungen D2 und D4 am meisten degenerierte Embryonen, bei denen die Zwei-Zell-Struktur noch erkennbar war (Kategorie C).

Tabelle 8: Vorkommen fünf verschiedener Kategorien von Beschädigungen (A: morphologisch intakt, B: ein Blastomer morphologisch intakt, C: Zwei-Zell-Struktur vorhanden, D: Zwei-Zell-Struktur nicht vorhanden, E: Zellmembran zerstört und ohne Inhalt) bei den drei Mauslinien nach dem Einfrieren mit den Ectoin-Dosierungen D0 bis D4.

Maus Stamm	Dosis					
		A	B	C	D	E
CD-1	D0	98	13	35	2	0
	D1	117	13	19	7	0
	D2	95	14	23	12	0
	D3	121	12	7	3	0
	D4	72	21	23	20	0
C3H	D0	388	11	9	6	1
	D1	348	46	38	14	0
	D2	395	13	26	0	7
	D3	361	16	8	6	0
	D4	146	78	98	50	0
B6	D0	118	19	39	15	0
	D1	121	20	21	21	1
	D2	148	16	16	6	0
	D3	158	17	14	3	0
	D4	116	14	52	12	0

[D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium]

IV.5. Anwendung von Ectoin beim Spermfreezing

IV.5.1. CD-1

Als Parameter zur Beurteilung der Spermaqualität wurden jeweils die Progressivität und die Motilität der Spermien gemessen. Um für alle Proben eine einheitliche Bewertung der Effekte des Einfrier-/Auftauvorgangs zu ermöglichen, wurde jeweils das Verhältnis der Werte nach dem Auftauen bezogen auf die vor dem Einfrieren gemessenen Werte ermittelt (Angabe in %; vgl. Formel 5).

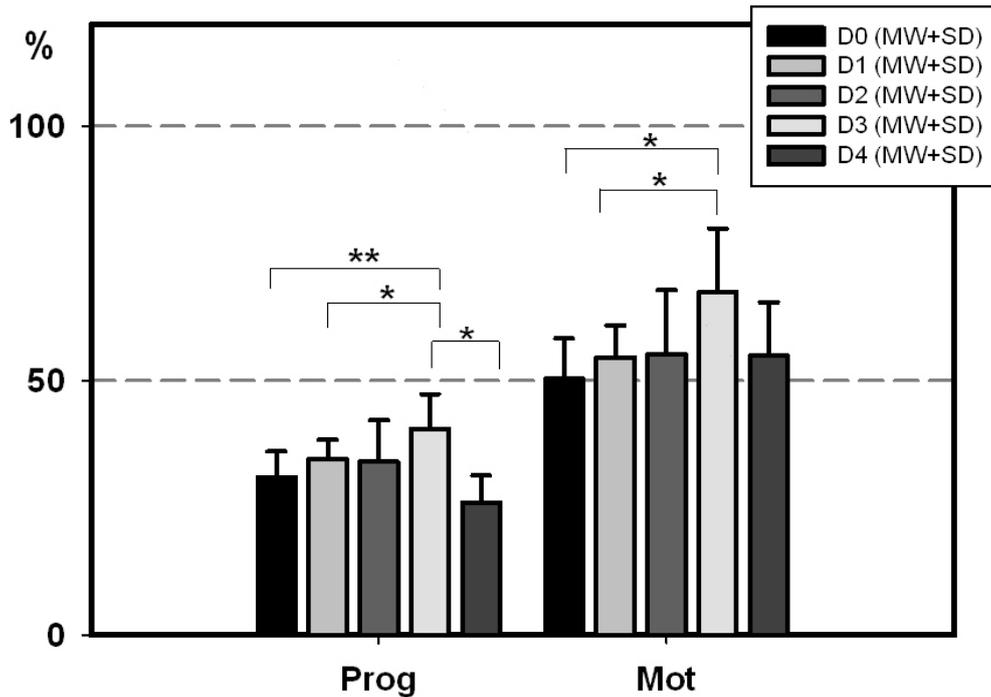
Formel 5: Berechnung des Progressivitäts- (%) bzw. Motilitätsindex (%) nach dem Auftauen bezogen auf die jeweils vor dem Einfrieren gemessenen Werte.

$$\text{Progressivitätsindex (\%)} = \frac{\text{Progressivität nach dem Auftauen}}{\text{Progressivität vor dem Einfrieren}} \times 100 \%$$

$$\text{Motilitätsindex (\%)} = \frac{\text{Motilität nach dem Auftauen}}{\text{Motilität vor dem Einfrieren}} \times 100 \%$$

In Abbildung 21 sind die bei den fünf Terminen gemessenen Daten für den Progressivitäts und Motilitätsindex und die daraus berechneten Mittelwerte (MW±SD) angegeben. Mit der Dosierung D3 wurde bei der Kryokonservierung der CD-1 Spermien jeweils der höchste Progressivitäts- (40,6±6,8 %) und Motilitätsindex (67,3±12,6 %) erreicht. Die Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe D0 waren jeweils signifikant (Prog: T=2,90; p≤0,01; Mot: T=1,40; p=0,04). Dosierung D4 führte bei dem Progressivitätsindex und die Dosierung D0 bei dem Motilitätsindex zum jeweils niedrigsten Ergebnis, doch diese Unterschiede waren in beiden Fällen nicht signifikant.

Ergebnisse

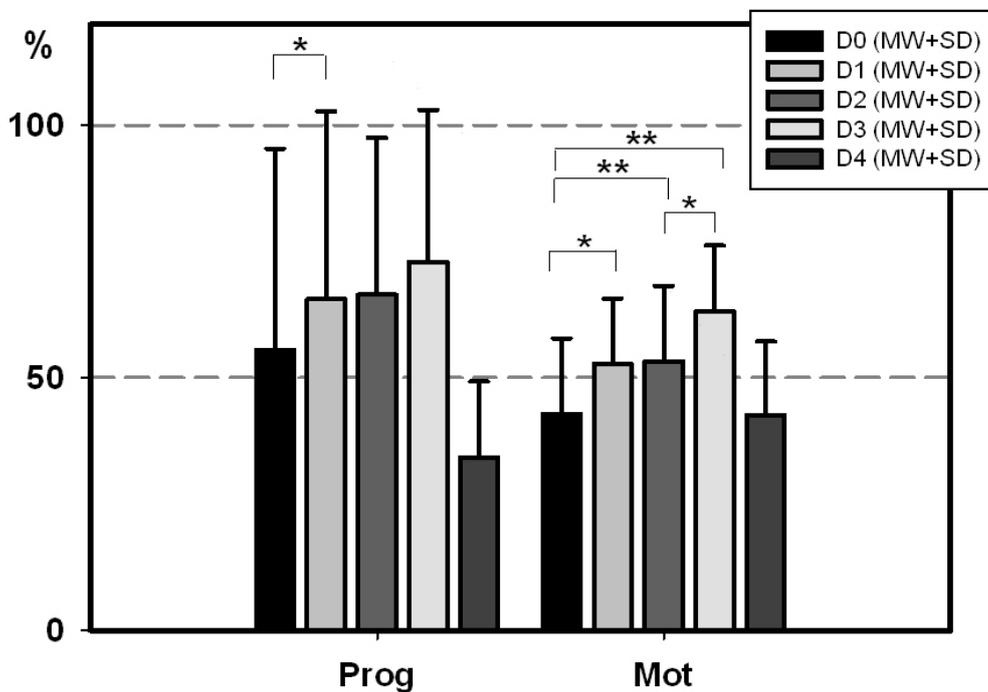


Dosierung	Prog (%)					Mot (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	34,7	34,2	47,5	41,1	26,4	62,0	54,1	74,4	61,8	62,0
Termin 2	27,7	29,9	27,4	34,1	24,2	47,5	51,3	52,5	71,1	62,2
Termin 3	24,1	32,3	28,7	33,6	35,0	41,4	53,1	40,0	50,9	60,9
Termin 4	35,9	39,0	35,6	49,0	21,4	46,5	49,3	50,6	67,8	37,7
Termin 5	32,9	37,7	31,1	45,1	23,3	54,1	65,2	58,2	85,1	51,4
MW	31,0	34,6	34,1	40,6	26,0	50,3	54,6	55,1	67,3	54,9
SD	5,0	3,8	8,1	6,8	5,3	8,0	6,2	12,6	12,6	10,6

Abbildung 21: Progressivitätsindex (Prog; MW±SD) und Motilitätsindex (Mot; MW±SD) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Spermien an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: p≤0,05; **: p≤0,01). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.5.2. C3H

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für die Dosierungsreihe mit Spermien von C3H-Mäusen. Der höchste Progressivitäts- (72,9±30,2 %) und Motilitätsindex (63,1±13,1 %) wurde bei Zugabe von Ectoin in der Dosierung D3 erreicht. Im Falle des Motilitätsindex war der Unterschied gegenüber der Kontrolle D0 hoch signifikant (T=2,23; p≤0,01). Dosierung D4 führte in beiden Parametern zu den niedrigsten Ergebnissen (Prog: 34,2±15,0 %; Mot: 42,6±14,5 %). Die Daten des Progressivitätsindex von D0 bis D2 an Termin 5 stellen Messartefakte dar.

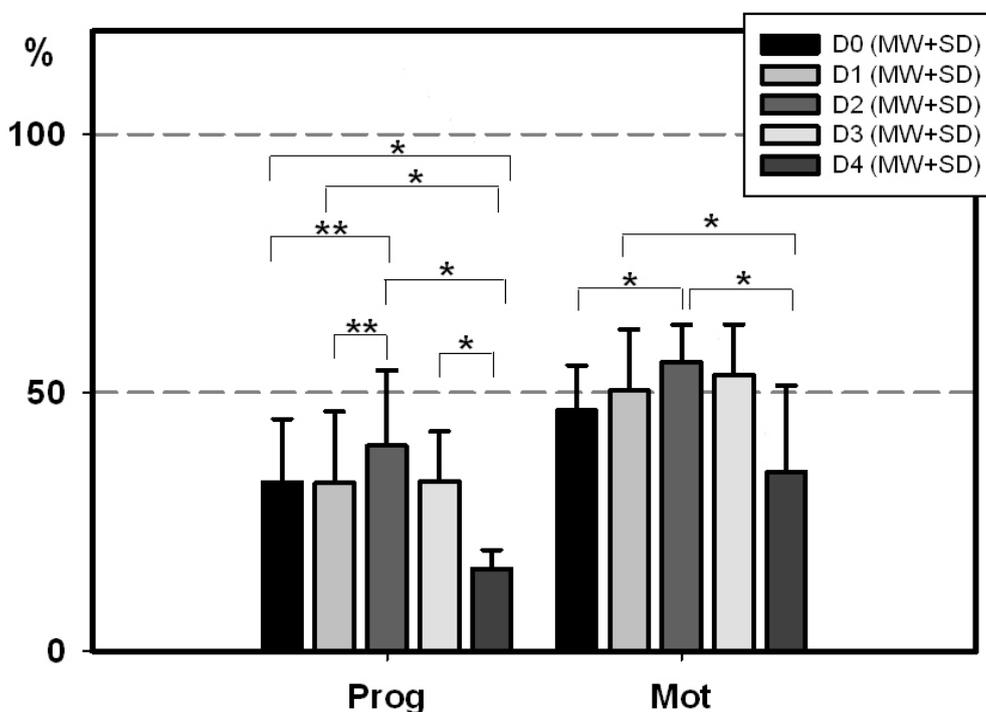


Dosierung	Prog (%)					Mot (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	15,2	30,7	22,5	27,3	22,0	25,4	46,5	32,0	43,1	44,0
Termin 2	63,7	80,0	77,8	97,0	20,0	49,1	57,5	60,2	69,6	22,0
Termin 3	42,9	53,4	68,3	84,1	52,4	37,6	43,0	50,1	71,9	48,3
Termin 4	36,3	40,4	56,1	57,9	48,0	37,0	43,1	51,3	56,6	60,9
Termin 5	119,7	123,2	107,6	98,0	28,8	65,0	73,4	72,7	74,2	34,0
MW	55,5	65,5	66,4	72,9	34,2	42,8	52,7	53,3	63,1	42,6
SD	39,8	37,2	31,1	30,2	15,0	13,0	13,0	14,9	13,1	14,5

Abbildung 22: Progressivitätsindex (Prog; MW±SD) und Motilitätsindex (Mot; MW±SD) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Spermien an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: p≤0,05; **: p≤0,01). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.5.3. B6

Die Ergebnisse der Ectoin-Dosierungsreihe für die Kryokonservierung von B6-Spermien sind in Abbildung 23 dargestellt. Mit der Dosierung D2 wurde jeweils der höchste Progressivitäts- ($39,7 \pm 14,6\%$) und Motilitätsindex ($55,9 \pm 7,2\%$) erreicht. Diese Erhöhungen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe D0 jeweils signifikant (Prog: $T=2,30$; $p \leq 0,01$; Mot: $T=1,54$; $p=0,03$). Dosierung D4 führte in beiden Parametern zum jeweils niedrigsten Ergebnis. Die Reduktion des Progressivitätsindex war gegenüber allen anderen Dosierungen signifikant, während die Unterschiede im Motilitätsindex nur gegenüber D1 und D2 signifikant waren (jeweils $p \leq 0,05$).



Dosierung	Prog (%)					Mot (%)				
	D0	D1	D2	D3	D4	D0	D1	D2	D3	D4
Termin 1	20,1	20,3	23,2	21,0	19,8	52,7	62,9	56,9	56,2	63,3
Termin 2	43,9	47,0	55,6	46,0	13,6	54,2	61,9	65,1	57,6	27,8
Termin 3	23,4	22,6	29,4	29,4	12,3	35,5	37,2	54,7	66,0	28,6
Termin 4	28,7	24,4	36,3	28,7	13,6	38,8	39,6	15,0	41,7	20,0
Termin 5	47,2	48,2	54,2	38,9	19,9	51,7	51,0	57,9	45,4	33,3
MW	32,7	32,5	39,7	32,8	15,8	46,6	50,3	55,9	53,4	34,6
SD	12,2	13,8	14,6	9,7	3,7	8,7	11,9	7,2	9,8	16,8

Abbildung 23: Progressivitätsindex (Prog; MW±SD) und Motilitätsindex (Mot; MW±SD) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Spermien an fünf verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

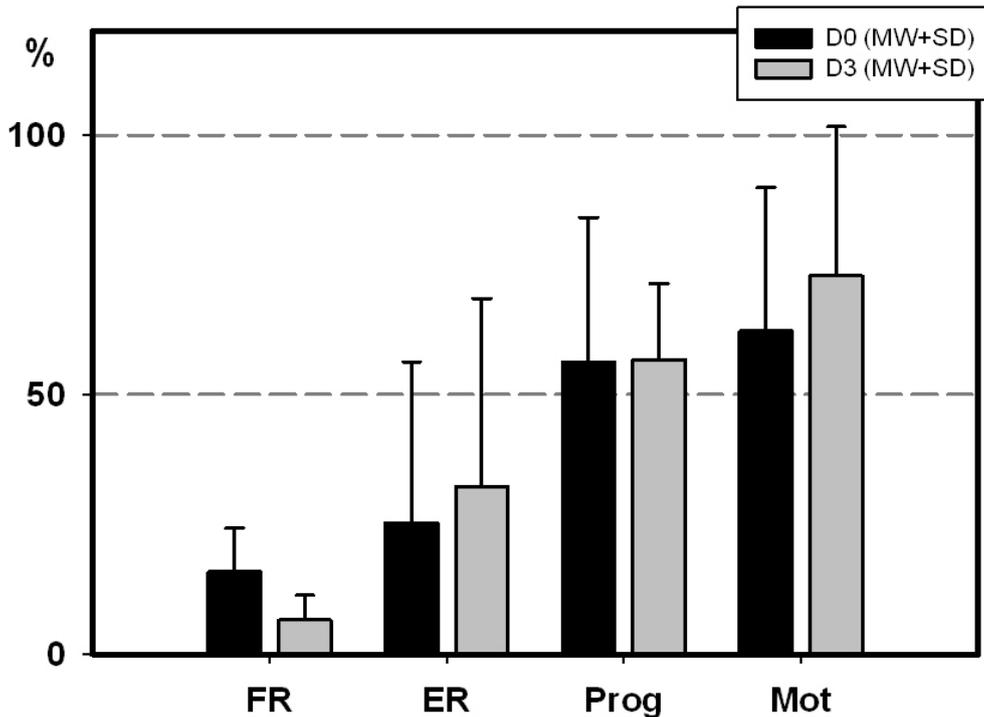
IV.6. In-vitro-Fertilisation (IVF)

IV.6.1. CD-1

Da bei der Dosierungsreihe für Spermfreezing die Dosierung D3 die signifikant besten Werte für den Progressivitäts- und Motilitätsindex erzielte, wurden mit dieser Dosierung und der Kontrolle D0 als Vergleich an fünf Terminen erneut Spermienproben eingefroren, um damit anschließend fünf IVF-Durchgänge durchzuführen. Es wurden die Fertilisationsrate (FR) (Formel 6) und die Entwicklungsrate (ER) (Formel 3) erhoben. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse dieser Parameter sowie des entsprechenden Progressivitäts- und Motilitätsindex für beide Gruppen dargestellt. In der FR ergab die Kontrolle D0 mit 15,8 % ($\pm 8,4$ %) höhere Werte als die Ectoin-Dosierung D3 ($6,6 \pm 4,8$ %). Bei den übrigen Parametern wurde mit der Dosierung D3 jeweils höhere Werte erreicht. In der ER ergaben sich für D0 25,3 % ($\pm 31,0$ %) vs. 32,3 % ($\pm 36,2$ %) für D3. Der Progressivitätsindex war in beiden Dosierungen annähernd gleich (D0: $56,2 \pm 27,9$ %; D3: $56,7 \pm 14,6$ %), während der Motilitätsindex D3 ($72,9 \pm 28,8$ %) höhere Werte erbrachte als D0 ($62,3 \pm 27,6$ %). Die beobachteten Unterschiede zwischen D0 und D3 waren aber in keinem Parameter statistisch signifikant. Bei den Daten des Progressivitäts- und der Motilitätsindex an Termin 2 handelt es sich um Messartefakte.

Formel 6: Berechnung der Fertilisationsrate (%).

$$\text{Fertilisationsrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl der Zwei - Zell - Embryonen}}{\text{Gesamtzahl der Oozyten}} \times 100 \%$$



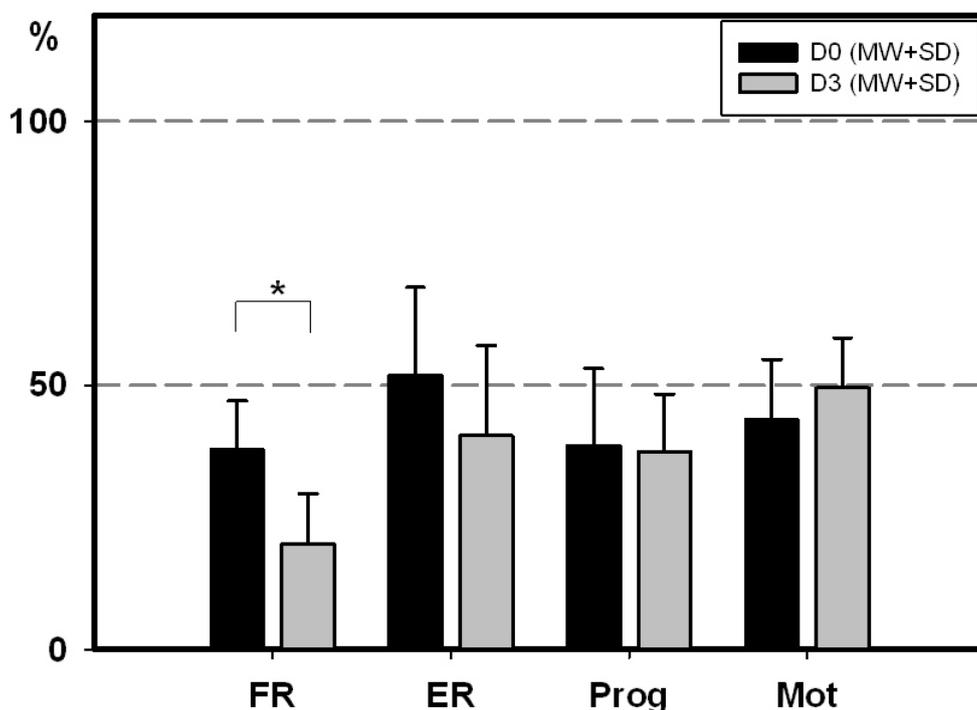
	FR (%)		ER (%)		Prog (%)		Mot (%)	
	D0	D3	D0	D3	D0	D3	D0	D3
Termin 1	14,3	14,3	10,0	0,0	40,0	50,0	55,8	62,8
Termin 2	22,7	2,0	0,0	0,0	103,9	80,0	109,3	123,8
Termin 3	9,7	4,2	66,7	75,0	35,1	60,6	35,9	65,0
Termin 4	26,1	7,7	50,0	20,0	44,4	51,4	54,4	54,4
Termin 5	6,4	4,6	0,0	66,7	57,7	41,7	55,9	58,5
MW	15,8	6,6	25,3	32,3	56,2	56,7	62,3	72,9
SD	8,4	4,8	31,0	36,2	27,9	14,6	27,6	28,8

Abbildung 24: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei fünf IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei CD-1 Mäusen. [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D3: 25 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.6.2. C3H

Für den Stamm C3H ergab sich aus der Dosierungsreihe für Spermfreezing die Dosierung D3 als optimale Ectoin-Dosierung. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse (FR, ER, Prog, Mot) aus fünf IVF-Terminen mit sowohl mit (D3) als auch ohne Ectoin (D0) kryokonserviertem, revitalisiertem Sperma dargestellt. Sowohl in der FR als auch in der ER brachte die Kontrolle D0 jeweils höhere Raten als D3 (FR: 37,8±9,3 % vs. 19,9±9,5 %; ER: 51,9±16,7 % vs. 40,5±17,1 %). Beim Progressivitätsindex gab es nur einen geringen Unterschied (D0: 38,5±14,7 %; D3: 37,5±10,9 %), wohingegen beim Motilitätsindex mit D3 (49,5±9,5 %) höhere Werte erzielt wurden als mit D0

(43,5±11,4 %). Die beobachteten Unterschiede zwischen D0 und D3 waren nur bei der FR statistisch signifikant (T=-2,15; p≤0,01).



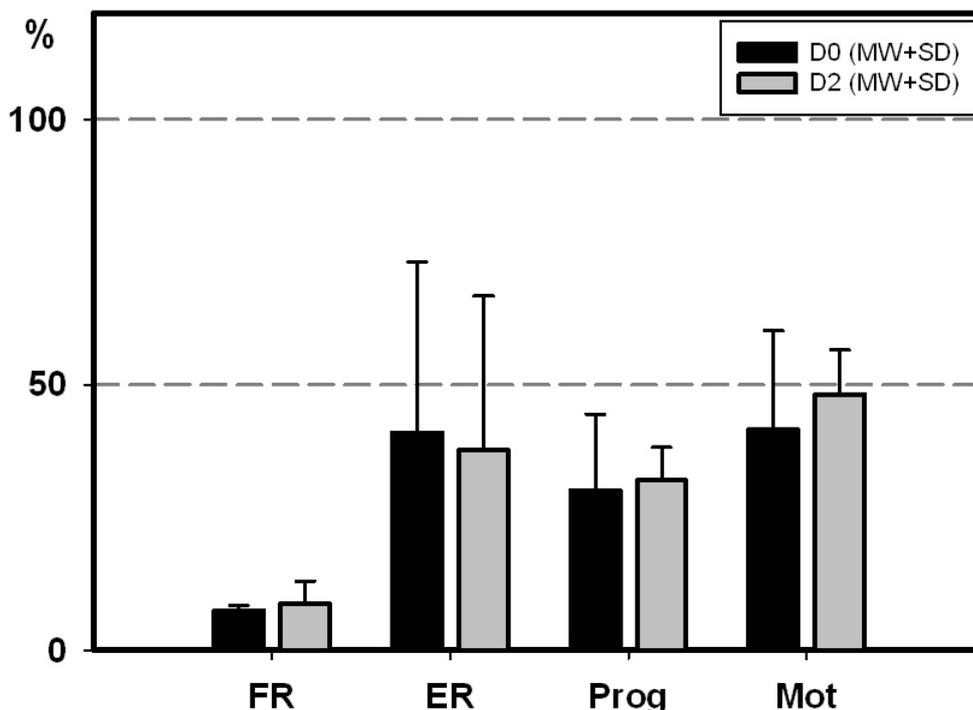
	FR (%)		ER (%)		Prog (%)		Mot (%)	
	D0	D3	D0	D3	D0	D3	D0	D3
Termin 1	41,5	15,0	41,2	16,7	17,4	27,5	29,7	41,2
Termin 2	39,5	11,5	43,8	28,6	58,3	51,9	61,4	56,0
Termin 3	28,6	16,7	37,5	57,1	37,2	31,7	41,4	42,6
Termin 4	29,0	20,7	59,1	50,0	42,5	46,3	44,1	62,9
Termin 5	50,6	35,8	77,8	50,0	37,3	30,0	40,8	44,7
MW	37,8	19,9	51,9	40,5	38,5	37,5	43,5	49,5
SD	9,3	9,5	16,7	17,1	14,7	10,9	11,4	9,5

Abbildung 25: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei fünf IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei C3H Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: p≤0,05). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D2: 10 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

IV.6.3. B6

Da sich bei dem Mausstamm B6 die Dosierung D2 als optimale Ectoin-Dosierung erwiesen hatte, wurden mit dieser Dosierung und der Kontrolle D0 weitere fünf Einfriertermine mit anschließender IVF durchgeführt. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für FR, ER, Prog und Mot aus diesen 5 Durchgängen dargestellt. Die FR war in beiden Dosierungen annähernd gleich (D0: 7,5±1,0 %; D2: 8,7±4,3 %). Bei der

ER ergab die Kontrolle D0 mit 41,0 ($\pm 32,1$) % höhere Werte als die Ectoin-Dosierung D2 (37,7 $\pm 29,0$ %). Beim Progressivitäts- und Motilitätsindex wurde mit der Dosierung D2 jeweils höhere Werte als mit D0 erreicht (Prog: 32,0 $\pm 6,2$ % vs. 30,1 $\pm 14,4$ %; Mot: 48,2 $\pm 8,4$ % vs. 41,6 $\pm 18,7$ %). Die beobachteten Unterschiede zwischen D0 und D2 waren aber in keinem Parameter statistisch signifikant.



	<i>FR (%)</i>		<i>ER (%)</i>		<i>Prog (%)</i>		<i>Mot (%)</i>	
	D0	D2	D0	D2	D0	D2	D0	D2
Termin 1	7,3	12,9	0,0	23,8	48,0	27,3	67,4	52,6
Termin 2	8,8	7,7	55,6	56,3	12,9	29,6	15,6	36,2
Termin 3	7,3	3,4	60,0	0,0	34,8	39,3	46,5	57,7
Termin 4	7,9	13,3	14,3	33,3	36,7	25,8	41,8	43,4
Termin 5	6,2	6,3	75,0	75,0	18,2	37,9	36,4	50,9
MW	7,5	8,7	41,0	37,7	30,1	32,0	41,6	48,2
SD	1,0	4,3	32,1	29,0	14,4	6,2	18,7	8,4

Abbildung 26: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D2 bei fünf IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei B6 Mäusen. [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D2: 10 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]

V. Diskussion

V.1. Embryonengewinnung und Superovulation

V.1.1. *plug* Raten bei verschiedenen Mausstämmen

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der *In-vivo*-Embryonengewinnung für jeden der drei untersuchten Stämme die *plug* Rate als eine grundlegende Kennzahl für die Reproduktionsleistung von Mäusen bestimmt. Die *plug* Raten bei C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6) lagen dabei mit 88,4 % bzw. 74,7 % deutlich höher als bei CD-1(ICR) (CD-1) mit 60,0 %. Es fiel zudem auf, dass die Standardabweichung bei CD-1 (19,9 %) deutlich höher als bei C3H (4,7 %) und B6 (8,6 %) war.

In der Literatur sind zu diesem Parameter allgemein nur sehr wenige Angaben zu finden. Generell ist je nach Mausstamm von *plug* Raten zwischen 75 und 80 % auszugehen (Fox et al., 2007). In einer bereits früher in der Abteilung für Vergleichenden Medizin durchgeführten Studie von Mayer et al. wurden für CD-1 ebenfalls *plug* Raten von etwa 60 %, für B6 und C3H von knapp über 80 % erzielt (Mayer et al., 2007). Somit entsprachen die Reproduktionsdaten der vorliegenden Untersuchung weitgehend den Erwartungen aus der Literatur sowie eigenen Erfahrungswerten.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen dem Auszuchtstamm (CD-1) und den Inzuchtstämmen (C3H, B6) könnte in den unterschiedlichen Verpaarungs- und Superovulationsschemata liegen. Während C3H und B6, wie von Fox (2007) empfohlen, jeweils nur für einen Termin pro Woche verpaart wurden, mussten die CD-1 Embryonen aus Zeitgründen an zwei Terminen (Dienstag und Donnerstag) gewonnen werden. Demnach hatten die C3H und B6 Männchen genügend Zeit, sich zwischen den einzelnen Verpaarungen zu erholen, was sich auf die Libido und die Spermienqualität ausgewirkt haben könnte. Dagegen wurden die CD-1 Böcke jeweils am Sonntag (für *plug* am Dienstag; Termin 1, 3 und 5) und am Dienstag (für *plug* am Donnerstag; Termin 2 und 4) verpaart und hatten damit verschieden lange Pausen zwischen zwei Verpaarungen. Die zweimalige Verwendung innerhalb einer Woche könnte zum einen Ursache für eine verminderte Libido und damit geringere *plug* Rate

und zum anderen eine Erklärung für die größere Standardabweichung in der *plug* Rate (niedrigere Werte an Terminen 2 und 4, vgl. Abbildung 13) sein.

Bei C3H und B6 fiel weiter auf, dass mit Ausnahme von Termin 4 bei B6 die *plug* Raten von Termin zu Termin zunahmen. Dies lag vermutlich daran, dass die Männchen keine erfahrenen Zuchtböcke, sondern mit ca. zehn Wochen gerade erst zuchtreif waren und an Termin 1 erstmals mit Weibchen verpaart wurden.

V.1.2. Anzahl an Embryonen bzw. Oozyten pro Maus

Wie aus Abbildung 14 zu entnehmen ist, konnten in der vorliegenden Arbeit beim Mausstamm CD-1 im Durchschnitt mehr Zwei-Zell-Embryonen (ZZ) pro *plug* positiver Maus (22,0 ZZ/Maus) als bei den Inzuchtstämmen C3H (18,2 ZZ/Maus) und B6 (9,3 ZZ/Maus) gewonnen werden. Bei der Oozyten-Gewinnung für die IVF (Abbildung 15) wurden bei B6 im Mittelwert die größte Anzahl an Oozyten (OZ) pro Spenderweibchen isoliert (20,3 OZ/Maus). Bei den Stämmen CD-1 (14,5 OZ/Maus) und C3H (14,1 OZ/Maus) waren es dagegen deutlich weniger. Auch bei Mayer et al. (2007) wurden in B6 Mäusen im Vergleich zu C3H und CD-1 nur sehr wenige ZZ/Maus gefunden. Dagegen konnten für den Mausstamm B6 im Durchschnitt 13,8 bis 20,4 OZ/Maus, für C3H 10,2 bis 16,1 OZ/Maus und für CD-1 14,5 bis 18,2 OZ/Maus gewonnen werden (Mayer et al., 2007).

Die Ausbeute an Embryonen pro Spendermaus wird maßgeblich beeinflusst vom Superovulationsprotokoll. In den meisten Einrichtungen werden hierfür jeweils individuell angepasste Protokolle verwendet, die sich im Laufe der Zeit bewährt haben. In einer aktuellen Arbeit untersuchten Luo et al. (2011) verschiedene Superovulationsschemata bezüglich Alter und Gewicht der Weibchen sowie Dosierung der Hormone. Für CD-1 wurde dabei die beste Ausbeute an Oozyten, Vorkernstadien, Zygoten oder Zwei-Zell-Embryonen bei Verwendung von über sechs Wochen alten Spenderweibchen erreicht (Luo et al., 2011). Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit bei CD-1 verhältnismäßig wenige Oozyten pro Spendermaus gefunden wurden, da hier für die IVF vier Wochen alte Weibchen superovuliert wurden. Für zukünftige IVFs mit CD-1 sollte deshalb in Erwägung gezogen werden, ältere Weibchen als Eizellspender zu verwenden. In derselben Arbeit fanden Luo et al. die besten Ausbeuten an Embryonen für B6 und andere Inzuchtstämmen bei Verwendung von deutlich jüngeren Weibchen (z.T. gerade drei

Wochen alt). Allerdings wurden die Weibchen nach hCG-Injektion mit Böcken im Alter von drei bis acht Monaten verpaart, um die Zellen *in vivo* zu gewinnen (Luo et al., 2011). Die Verpaarung von präpuberalen Mäusen mit sehr viel älteren Böcken muss im Hinblick auf den Tierschutzaspekt sehr kritisch betrachtet werden, obwohl dieses Verfahren heute noch durchaus üblich ist, wie auch die Arbeit von Luo et al. zeigt. Bereits Hoogenkamp und Lewing (1982) befürworteten in ihrer Arbeit eine Verpaarung im Alter von 3 bis 4 ½ Wochen (Hoogenkamp und Lewing, 1982). Und selbst ein marktführendes Unternehmen wie das „Jackson Laboratory“ empfiehlt die Verwendung von 21-35 Tage alten Weibchen für die Produktion von fertilisierten Eizellen (Superovulation Technique, Jackson Laboratory, JAX[®] NOTES Issue 434, July 1988, <http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/434c.html>; 23.03.2012). In diesem jungen Alter, mehr oder weniger unmittelbar nach dem Absetzen, sind die Weibchen häufig noch sehr klein (B6: 12-14 g) und damit den wesentlich größeren und schwereren Zuchtmännchen (B6: ca. 30 g) physisch deutlich unterlegen. Diese Praxis der Verpaarung ist deshalb aus Gründen des Tierschutzes abzulehnen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur für die Gewinnung von Oozyten für die IVF präpuberale Weibchen superovuliert, während für die *In-vivo*-Produktion von Embryonen durch Verpaarung der Mäuse mit zuchtreifen Böcken ebenfalls zuchtreife Weibchen verwendet wurden.

Da Auszuchtstämme in der Regel ein deutlich höheres Zuchtleistungsvermögen als Inzuchtstämme haben (Hedrich, 2008), überrascht es nicht, dass in der vorliegenden Arbeit bei CD-1 nach *In-vivo*-Embryonengewinnung die meisten Zwei-Zell-Embryonen pro *plug* positiver Maus gefunden wurden. Zudem war zu beobachten, dass bei B6 nicht aus allen *plug* positiven Weibchen auch Zwei-Zell-Embryonen gewonnen werden konnten. Dadurch kam es bei B6 trotz hoher *plug* Raten im Durchschnitt zu niedrigen ZZ-Ausbeuten pro *plug* positiver Maus. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass vereinzelt auch fehlende *plugs* als falsch positiv bewertet wurden, doch im Allgemeinen ist dieses Phänomen für B6 bekannt. Leider sind in der aktuellen Literatur bezüglich der *In-vivo*-Produktion von Zwei-Zell-Embryonen nur wenig aussagekräftige Angaben bezüglich der hier untersuchten Stämme zu finden, da in der Regel entweder weiterentwickelte Stadien (Mehr-Zell-Embryonen, Morulae, Blastozysten) oder aber andere Linien (häufig auch transgene) Gegenstand der jeweiligen Untersuchung sind.

Wie bereits in V.1.1 ausgeführt wurde, wurde für CD-1 die *In-vivo*-Embryonengewinnung an jeweils zwei Terminen pro Woche durchgeführt. Analog zu den *plug* Raten ist auch die Anzahl an Zwei-Zell-Embryonen pro *plug* positiver Maus an den Terminen 2 und 4 deutlich niedriger als an den anderen Terminen und dadurch auch die Standardabweichung höher als bei C3H und B6. Dies verdeutlicht ebenfalls die Notwendigkeit, den Böcken zwischen den Verpaarungen eine genügend lange Phase der Erholung zu geben, um eine Regeneration zu ermöglichen und damit die Spermaqualität auf einem konstanten Niveau zu halten (Fox et al., 2007).

Bezüglich der Zahlen bei der Gewinnung von Oozyten für IVF entsprachen die Ergebnisse weitgehend den Angaben aus der Literatur. Es ist bekannt, dass die Superovulation von präpuberalen B6 Weibchen zu einer sehr hohen Ausbeute an Oozyten (33,7 OZ/Maus) führt und auch für C3H werden ähnlich hohe Zahlen (29,6 OZ/Maus) berichtet. Allerdings gibt es auch davon abweichende Studien, die für C3H zu weniger guten Ergebnissen kommen (14,9 OZ/Maus) (Suzuki et al., 1996; Byers et al., 2006). Für CD-1 gibt es dagegen in der Literatur weniger Angaben zur Oozyten-Ausbeute nach der Superovulation, da die Linie CD-1 verhältnismäßig selten für IVF verwendet wird. Suzuki et al. fanden jedoch durchschnittlich 17,4 OZ/Maus und damit ebenfalls deutlich weniger als bei B6 (Suzuki et al., 1996).

V.2. Embryofreezing

V.2.1. Embryofreezing bei verschiedenen Mausstämmen

Die Wirkung von Ectoin bei der Kryokonservierung von Zwei-Zell-Embryonen variiert je nach Mausstamm und muss daher vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Mausstämme bei der Kryokonservierung betrachtet werden. Im Allgemeinen wird der genetische Hintergrund einer Mauslinie als wichtigster Faktor für das erfolgreiche Überleben von kryokonservierten Embryonen nach dem Auftauen angesehen (Schmidt et al., 1985; Pomp und Eisen, 1990; Dinnyes et al., 1995; Wayss et al., 2005; Byers et al., 2006; Mayer et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte dies anhand der Kontrollgruppe ohne Ectoin (D0) untersucht und dargestellt werden.

Auftaurate

Die höchste Auftaurate wurde bei den C3H Embryonen (93,6 %) erreicht, gefolgt von den CD-1 Embryonen mit 62,9 % und den B6 Embryonen mit 59,2 %. Es fiel auf, dass hierbei die Standardabweichung bei C3H (2,2 %) im Gegensatz zu B6 (19,6 %) und CD-1 (38,7 %) sehr niedrig war. Auch bei den Auftaustadien (vgl. Abschnitt IV.4, Tabelle 8) unterschied sich C3H von CD-1 bzw. B6, indem die Kategorie B (= ein Blastomer morphologisch intakt) abgesehen von den intakten Embryonen am häufigsten vorkam, wohingegen bei CD-1 und B6 das bereits stärker beschädigte Kategorie C (= Zwei-Zell-Struktur noch erkennbar) am zweithäufigsten auftrat.

Aus diesen drei Feststellungen (hohe Auftaurate, niedrige Standardabweichung, geringere morphologische Beschädigung) kann man schließen, dass Zwei-Zell-Embryonen von C3H Mäusen verhältnismäßig stabil gegenüber Belastungen sind, die beim Einfrier- und Auftauprozess auf die Zellen wirken. In der Literatur finden sich allerdings für diese drei Wildtyp-Mausstämme nur wenige aussagekräftige Arbeiten bezüglich Auftauraten bei Zwei-Zell-Embryonen nach Kryokonservierung. Schmidt et al. fanden keine Unterschiede in den Auftauraten von Embryonen (vier- bis acht-Zell-Embryonen) verschiedener Inzuchtstämme (Schmidt et al., 1985). Dinnyes et al. fanden dagegen acht- bis 16-Zell-Embryonen von C3H signifikant schlechter in der Revitalisierung nach Kryokonservierung, erklärten dies jedoch durch Schwierigkeiten bei der Qualitätsbeurteilung der Embryonen bereits vor dem Einfrieren (Dinnyes et al., 1995). Mayer et al. erzielten für CD-1 eine durchschnittliche Auftaurate von 70 %, für C3H 63 % und für B6 35 % (Mayer et al., 2007). Die im Vergleich hierzu niedrigere Auftaurate für CD-1 (62,9 %) in der vorliegenden Untersuchung ist vor allem dadurch erklärbar, dass Termin 4 mit 0,0 % den Durchschnitt deutlich senkt. Dieser Termin muss aber als „Ausreißer“ gewertet werden, da an diesem Tag nur 17 Embryonen in einem einzelnen Minitüb eingefroren werden konnten und diese alle nach dem Auftauen vollständig beschädigt waren. Aus bisher unersichtlichen Gründen kommt es immer wieder vor, dass alle Embryonen in einem Tüb gänzlich degeneriert sind. Deshalb sollten die Embryonen beim Einfrieren, wenn möglich, auf mindestens zwei Tübs aufgeteilt werden. Zudem sollte darauf geachtet werden, dass jeweils etwa 20-30 Embryonen pro Minitüb eingefroren werden, damit das Verhältnis von Embryonenanzahl zu Einfriermedium nicht verändert wird, was sich negativ auf die kryoprotektive Wirkung des Einfriermediums auswirken kann.

Entwicklungsrate

In den Entwicklungsraten zeigten die drei Mausstämme dagegen eine andere Reihenfolge. Den höchsten Wert erzielte hier der Auszuchtstamm CD-1 mit 54,0 %. Deutlich niedriger fielen die Zahlen bei C3H (27,9 %) und B6 (25,6 %) aus. Die Standardabweichung der Entwicklungsrate verhielt sich wie bei der Auftaurate. Sie war bei C3H (19,6 %) deutlich niedriger als bei CD-1 (36,4 %) und B6 (36,4 %). Dabei fiel auf, dass einzelne Durchgänge entweder hohe oder extrem niedrige Entwicklungsraten zeigten. Bei CD-1 waren bei einem Durchgang keine Blastozysten vorhanden (Entwicklungsrate 0,0 %) und bei Termin 4 standen schon nach dem Auftauen keine morphologisch intakten Embryonen zur weiteren Inkubation zur Verfügung. Die anderen drei Termine brachten jedoch hohe Entwicklungsraten von 66,7 bis 79,4 %. Bei B6 gab es sogar an drei von fünf Durchgängen keine Entwicklung bis zur Blastozyste (Entwicklungsrate 0,0 %), an den beiden letzten Terminen hingegen entwickelten sich 50,0 bzw. 77,8 % der Zwei-Zell-Embryonen zur Blastozyste. Einzig bei C3H konnten bei allen fünf Durchgängen Blastozysten gezählt werden, wobei an drei Durchgängen Entwicklungsraten von 30,3 % bis 49,4 %, aber an zwei Durchgängen nur 6,7 % und 9,0 % zu beobachten waren. Diese Zahlen zeigen, dass für eine sichere Archivierung eines Mausstammes immer mehrere Einfriertermine durchgeführt werden müssen, um Totalausfälle zu vermeiden. Vergleichsdaten zu den Entwicklungsraten von Zwei-Zell-Embryonen der drei untersuchten Wildtyp-Mausstämme konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Sowohl Schmidt et al. als auch Dinnyes et al. inkubierten bereits mehrzellige Embryonenstadien zur Weiterentwicklung bis zur Blastozyste (Schmidt et al., 1985; Dinnyes et al., 1995). Die meisten Studien auf diesem Gebiet verzichteten auf eine *In-vitro*-Inkubation und überprüfen die Vitalität von aufgetauten Embryonen per Embryotransfer. Im Hinblick auf die Reduktion der Versuchstierzahlen wurde dieses Vorgehen für die vorliegende Arbeit weitgehend vermieden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zu den Auftau- und Entwicklungsraten die allgemeine Ansicht bestätigen, dass sich Zwei-Zell-Embryonen der Mauslinie B6 im Verhältnis gegenüber CD-1 und C3H weniger gut kryokonservieren und revitalisieren lassen (Wayss et al., 2005; Mayer et al., 2007).

Revitalisierungsrate

Die Überprüfung der Vitalität von Embryonen mittels Embryotransfer wurde aus Gründen der Tierzahlreduktion nur mit B6 Embryonen durchgeführt, bei denen aufgrund der Daten aus der Dosierungsreihe mit einer Wirkung von Ectoin gerechnet werden konnte. Die hierbei gefundene Revitalisierungsrate von 41,0 % bei der Kontrolle D0 entspricht den Werten, die in der Literatur zu finden sind. Byers et al. erzielten mit eingefrorenen C57BL/6J Zwei-Zell-Embryonen eine Revitalisierungsrate von 41,9 % (Byers et al., 2006). Allerdings ist zu bemerken, dass in der Arbeit von Byers et al. die Rezipienten bereits vor der Geburt am Tag 17/18 getötet und die nach einem Kaiserschnitt lebend geborenen Jungtiere gezählt wurden.

V.2.2. Einfluss von Ectoin beim Embryofreezing und bei der Revitalisierung

Nachdem im vorigen Abschnitt der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Kryokonservierung von Embryonen betrachtet wurde, soll nun die Wirkung des kompatiblen Soluts Ectoin diskutiert werden. Die Dosierungen für die Dosierungsreihe wurden in Anlehnung an die Arbeit von Lohmer et al. (2008) gewählt, in der CD-1 Vorkernstadien mit einer Dosierung von 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium (D1) und einer Kontrolle ohne Ectoin eingefroren wurden. Aufgrund der Tatsache, dass Embryonalstadien von der fertilisierten Oozyte bis zur Blastozyste für verschiedene Kryoprotektiva unterschiedliche Permeabilitätseigenschaften zeigen (Pedro et al., 2005), wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich noch die Dosierungen D2 bis D4 gewählt (10 mg, 25 mg, 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium). Die Klärung der Dosisabhängigkeit der Ectoinwirkung war der erste wichtige Schritt zur Untersuchung einer möglichen kryoprotektiven Wirkung. Der Ansatz einer niedrigeren Dosierung als D1 (0,5 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium) bzw. einer höheren als D4 (100 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium) wurde einmalig getestet. Beide Ansätze erwiesen sich jedoch aus verschiedenen Gründen als nicht erfolgversprechend. Da die Anzahl an verwendeten Mäusen so gering wie möglich gehalten werden sollte und gleichzeitig ausreichend viele Embryonen pro Gruppe gewonnen werden mussten, konnten nicht mehr als fünf Dosierungen getestet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die hierbei untersuchten Parameter Auftaurate, Entwicklungsrate, Revitalisierungsrate und Seedingzeit diskutiert.

Auftaurate

Die höchsten Auftauraten bei CD-1 und B6 wurden mit D3 erreicht (CD-1: 80,4 %; B6: 82,1 %). Aber nur bei B6 war diese Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe D0 signifikant ($p \leq 0,05$). Bei C3H führte die Kontrolle ohne Ectoin zum besten Ergebnis (93,6 %). Die Auftauraten aus der Dosierungsreihe zeigen, dass für Mausstämme wie CD-1 und C3H, die im Allgemeinen als gut kryokonservierbar und revitalisierbar gelten, der Zusatz von Ectoin zum Einfriermedium keine Verbesserung bringt. Allerdings scheint eine mittlere Dosierung (10 mg Ectoin/ 1 ml Einfriermedium) bei dem als in der Kryokonservierung problematisch angesehenen B6 Stamm positive Effekte zu haben. Die Mechanismen, die dazu führen, dass B6 Embryonen empfindlich auf Kryokonservierungsprozesse reagieren, sind bislang im Detail nicht bekannt. Zwar gibt es verschiedene Klärungsansätze hierzu, wie z.B. die Untersuchung der genetischen Hintergründe der sogenannten Blastomeren-Fragmentation (Hawes et al., 2001) oder die der intrazellulären Eisfragmentation bei verschiedenen Oozyten-Größen (Mazur et al., 2007), doch alle diese Erklärungsmodelle sind nicht ausreichend um das Problem zu begründen. Die Tatsache, dass das kompatible Solut Ectoin bei der Kryokonservierung der B6 Embryonen positive Effekte zu haben scheint, könnte darauf hinweisen, dass der Erhalt der Membranstabilität einen ausschlaggebenden Punkt darstellt. Ähnliches wird auch nach Untersuchungen an Stammzellen (Grein et al., 2010) berichtet, wonach Ectoin als zuverlässiger DMSO-Ersatz in der Kryokonservierung angesehen wird. Doch auch in dieser Arbeit können über die zugrunde liegenden Wirkmechanismen nur Vermutungen geäußert werden.

Bei allen drei Stämmen wurde mit D4 die schlechteste Auftaurate erzielt (CD-1: 59,7 %; C3H: 40,4 %; B6: 57,2 %). Die Beurteilung der Embryonen unmittelbar nach dem Auftauen zeigte, dass die Beschädigungskategorie C bei D4 bei jedem Mausstamm an zweiter Stelle nach den morphologisch intakten Embryonen stand. Auch dies ist ein starker Hinweis auf eine massive Schädigung der Embryonen aus D4. Der negative Effekt der höheren Ectoin-Dosierungen wird auch bei Betrachtung der Entwicklungsraten deutlich. Bei den beiden hohen Konzentrationen D3 und D4 war die Entwicklungsrate bis zur Blastozyste erheblich schlechter. Weder bei CD-1 noch bei C3H entwickelten sich Embryonen, die mit D4 eingefroren wurden, auch nur ein einziges Mal zur Blastozyste. Bei B6 konnten zwar an einem Termin Blastozysten bei D4 gezählt werden (Termin 4), doch bei diesem Termin waren insgesamt die

Entwicklungsraten bei allen fünf Dosierungen sehr hoch. Diese Werte konnten leider nicht reproduziert werden, so dass es sich um eine unerklärliche Ausnahme handelte. Weiterhin fiel bei D4 auf, dass, bis auf wenige Ausnahmen, die Embryonen bereits im Zwei-Zell-Stadium degenerierten. Da Ectoin generell als nicht-toxisch gilt, könnte die Ursache für eine Kryoschädigung der Embryonen in einer zu starken Osmoprotektion liegen, wodurch die Zellmembran nicht mehr ausreichend permeabel für den Austausch von Kryoprotektivum und Wasser wäre. Möglicherweise wurden die Embryonen aber auch beim Einfriervorgang durch Eiskristalle beschädigt, da bei hohen Ectoin-Konzentrationen eine verlängerte Seedingzeit gemessen wurde.

Entwicklungsrate

Die Annahme, dass bei CD-1 und C3H die Zugabe von Ectoin keinen positiven Effekt auf die Revitalisierung von Embryonen nach Kryokonservierung hat, bestätigte sich auch in den Entwicklungsraten. Sowohl bei CD-1 als auch bei C3H zeigten die Gruppen ohne Ectoin die besten Weiterentwicklungen (CD-1: 54,0 %; C3H: 27,9 %). Bei B6 konnten zwar mit D1 (36,5 %) und D2 (28,8 %) bessere Entwicklungsraten als mit D0 (25,6 %) erzielt werden, doch insgesamt zeigten sich große Schwankungen in den Ergebnissen (Standardabweichung bis zu 40,3 %). Häufig wurde bei allen Linien keinerlei Entwicklung zur Blastozyste gesehen. Schließlich fiel auf, dass bei C3H die wenigsten Termine mit 0,0 % Entwicklungsrate vorkamen (sechs Termine), bei CD-1 waren neun Termine ohne Blastozysten und bei B6 gab es bei 13 Terminen keine Blastozysten. Obwohl die Werte der einzelnen Termine bei C3H insgesamt niedriger lagen (< 50 %) als bei CD-1 und B6 (< 80 %), zeigte sich bei C3H Embryonen die größte Konstanz bei der Weiterentwicklung.

Revitalisierungsrate

Laut Dinnyés et al. stimmen *In-vitro*- und *In-vivo*-Entwicklungsrate nicht immer miteinander überein (Dinnyes et al., 1995). Deshalb wurden zur weiteren Überprüfung der Vitalität der B6 Embryonen nach dem Auftauen Embryotransfers durchgeführt. Es wurde hierfür die Ectoin-Dosierung D3 gewählt, welche die besten Auftauraten erbracht hatte, obwohl D3 schon in den *In-vitro*-Entwicklungsraten schlechter als D0 war. Zusätzlich wurden für die Embryotransfers auch Embryonen mit D1 eingefroren und aufgetaut, da mit D1 die besten Entwicklungsraten erzielt werden konnten. Leider waren aber die Daten aus diesen Durchgängen wegen

„Ausreißer“-Werten statistisch nicht auswertbar, weshalb sie hier nicht dargestellt werden.

Der Vergleich der Auftau- und Entwicklungs- bzw. Revitalisierungsraten von D0 und D3 aus Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigte einen auffälligen Unterschied in der Höhe der Zahlen. Insgesamt lagen die Raten bei den Embryotransfer-Durchgängen deutlich höher. Möglicherweise lag dies daran, dass die Versuche in unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt wurden. Die Embryofreezing-Dosierungsreihe fand in den Monaten April/Mai statt, während die Embryonen für die Embryotransfers Ende Juli/Anfang August gewonnen und eingefroren wurden. In den Sommermonaten standen für die jeweiligen Dosierungen generell mehr Embryonen zur Verfügung (April/Mai: 8,5 ZZ/ *plug* positive Maus; Juli/August: 11,0 ZZ/ *plug* positive Maus). Abgesehen von den in Abschnitt II.1.3 bereits dargestellten Faktoren wird vermutet, dass auch die Jahreszeit für den Erfolg der Superovulation eine wichtige Rolle spielen kann (Hedrich, 2008).

Nach den drei Embryotransfer-Durchgängen zeigte sich, dass trotz einer besseren Auftaurate die Revitalisierungsrate bei Embryonen, die unter der Zugabe von Ectoin zum Einfriermedium eingefroren wurden, signifikant ($p \leq 0,05$) schlechter war (Abbildung 20). Es ist hierbei allerdings nicht klar, ob die Embryonen bereits durch den Einfrier- und Auftauprozess geschädigt wurden und später degenerierten, oder aber durch Ectoin die Weiterentwicklung vom Zwei-Zell-Stadium gehemmt wurde. Da bisher keinerlei Kenntnisse über die genauen Wirkungsmechanismen von Ectoin vorliegen, kann nur vermutet werden, dass Ectoin entweder in die Zelle eindringt oder außerhalb an der Zellmembran Wirkungskaskaden im Zellinneren auslöst, so dass die weitere Entwicklung des Embryos nicht stattfinden kann. Ein ähnliches Phänomen kann beim sogenannten „Zwei-Zell-Block“ beobachtet werden, bei welchem *in vitro* inkubierte Zwei-Zell-Embryonen in der Entwicklung stehen bleiben und degenerieren. Eine Erklärung dafür liegt in der verspäteten Aktivierung der Transkription des embryonalen Genoms der Maus nach der ersten Zellteilung. Bis zur Hälfte der Entwicklung des Zwei-Zell-Stadiums ist die Entwicklung des Embryos abhängig von bereits während der Oogenese produzierten mRNAs und Proteinen. Erst dann wird eine aktive embryonale Neusynthese von mRNA erforderlich. Wenn diese Neusynthese ausbleibt, arretieren die Embryonen im Zwei-Zell-Stadium (Krüssel, 2001; Zanoni et al., 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass auch verschiedene Stoffe in zu hohen Konzentrationen (wie z.B. auch NaCl) diesen Zwei-

Zell-Block auslösen können. Möglicherweise liegen den beobachteten Effekten von Ectoin vergleichbare Mechanismen zugrunde, die aber an dieser Stelle nicht ausführlich geklärt werden können.

Seedingzeit

Bei allen drei Stämmen ergaben sich mit der höchsten Ectoin-Dosierung D4 die schlechtesten Auftau- und Entwicklungsraten. Dies spiegelte sich auch in den Seedingzeiten wider. Vermutlich wird die Osmolarität des Mediums durch die hohe Ectoin-Konzentration derart erhöht, dass das Seeding erheblich länger dauert. Die Seedingzeiten lagen bei D4 im Durchschnitt mit 6,3 min (CD-1), 6,6 min (B6) bzw. 6,7 min (C3H) deutlich höher als die üblichen 2 min. Zum Zeitpunkt des Seedings sinkt die Temperatur im Kryostat bereits mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 0,6°C/min. Bei einer Seedingzeit von 6,7 min ergibt sich ein Temperaturunterschied von 4°C zwischen Beginn und Ende des Seedings. Durch die unterschiedlichen Temperaturen entstehen unterschiedlich große Eiskristalle, welche zur Schädigung der Embryonen führen können (Songsasen und Leibo, 1997a). Der eigentliche Zweck des Seedings, gezielt gleich große Kristalle in einem sehr kleinen Temperaturrahmen entstehen zu lassen, geht somit bei einer verlängerten Seedingzeit verloren. Wie oben bereits beschrieben, wurde eine höhere Dosierung als D4 einmalig getestet. Eine Dosierung von 100 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium lies kein Seeding mehr zu. Das Medium in den Tübs kristallisierte trotz mehrmaligem Ansetzen des Kupferstempels nicht.

V.3. Spermfreezing

V.3.1. Spermfreezing bei verschiedenen Mausstämmen

Wie bei den Embryonen gibt es auch bei der Kryokonservierung von Spermien Unterschiede in den Eigenschaften der verschiedenen Mausstämme (Marschall und Hrabé de Angelis, 1999). Diese Stamm-spezifischen Besonderheiten konnten in der vorliegenden Arbeit an den Kontrollgruppen (D0) zum einen aus den Dosierungsreihen und zum anderen aus den IVF-Durchgängen untersucht werden. Da die Konzentrationen der Spermaproben bei allen Durchgängen weitgehend einheitlich und vergleichbar waren, werden für die Beurteilung der Qualität und

Vitalität der aufgetauten Spermien im Folgenden nur die Parameter Motilitätsindex und Progressivitätsindex sowie die Fertilisationsrate und die Entwicklungsrate betrachtet und diskutiert.

Motilitäts- und Progressivitätsindex

Der Motilitätsindex der Spermien war nach dem Auftauen der Dosierungsreihen bei CD-1 am besten (50,3 %), gefolgt von B6 (46,6 %) und C3H (42,8 %). Dagegen zeigte sich bei C3H (55,5 %) der höchste Progressivitätsindex, während CD-1 (31,0 %) und B6 (32,7 %) nach dem Auftauen fast gleich viele progressive Spermien hatten. Bei den Qualitätsmessungen der Spermaproben für die IVF zeigte ebenfalls CD-1 den besten Motilitätsindex (62,3 %) vor C3H (43,5 %) und B6 (41,6 %). Überraschenderweise war auch der Progressivitätsindex bei diesen Durchgängen bei CD-1 am besten (56,2 %), während sie bei C3H nur wenig besser war als bei B6 (38,5 % vs. 30,1 %). Diese Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass für den Ansatz der Dosierungsreihe jeweils zwei Männchen verwendet wurden, deren Sperma gemischt wurde, um eine ausreichend große Menge für die fünf Dosierungsgruppen zu erhalten. Dadurch wurden starke individuelle Schwankungen in der Spermaqualität ausgeglichen. Dagegen wurde für jeden IVF-Termin jeweils nur ein Männchen verwendet, so dass sich Unterschiede bei den Einzelterminen stärker auf die Mittelwerte auswirkten. Dies spiegelt sich auch in den Standardabweichungen wider, die vor allem bei CD-1 und B6 in der Dosierungsreihe teilweise wesentlich niedriger waren als bei den Messungen der Proben für die IVF.

Bei der Kryokonservierung der C3H Spermien fiel in der Kontrollgruppe D0 auf, dass nach dem Auftauen das Verhältnis progressiver motiler Spermien in Bezug auf die Frischmessung höher lag als das entsprechende Verhältnis aller motilen Spermien. Das heißt, dass bei C3H zwar durch das Einfrieren mehr als die Hälfte der motilen Spermien geschädigt wird (Reduktion des Motilitätsindex auf 42,8 %), aber von dieser Schädigung scheinen die progressiven motilen Spermien weniger stark betroffen zu sein (Reduktion des Progressivitätsindex nur auf 55,5 %) als die nicht-progressiven. Dies mag eine Erklärung dafür sein, dass mit C3H häufig so gute Fertilisationsraten auch nach der Kryokonservierung erzielt werden können (Marschall et al., 1999).

Vergleichswerte aus der Literatur zur Spermienqualität der verschiedenen Mausstämme waren nicht zu finden. Im Allgemeinen werden nur die Fertilisations-

raten aus der IVF und die Revitalisierungsraten der anschließenden Embryotransfers zur Beurteilung des Kryokonservierungserfolgs angegeben.

Fertilisationsrate

In der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass die Fertilisationsraten aus der IVF nicht den Verhältnissen der Spermaqualitätsmessungen nach dem Auftauen entsprachen. Obwohl die CD-1 Spermien die beste Qualität nach dem Auftauen aufwiesen, war die Fertilisationsrate mit 15,8 % deutlich niedriger als die Rate von C3H (37,8 %), während bei B6 sogar nur eine Rate von 7,5 % erzielt wurde. Ähnliche Verhältnisse werden auch in der Literatur diskutiert und es gibt eine Vielzahl an Publikationen, die das Verhalten verschiedener Mauslinien bei der IVF mit kryokonserviertem Sperma beschreiben (Parkening und Chang, 1976; Nakagata und Takeshima, 1993; Songsasen und Leibo, 1997b; Marschall et al., 1999; Thornton et al., 1999; Nakagata, 2000; Sztein et al., 2000; Walters et al., 2005; Kaneko et al., 2006; Kawai et al., 2006; Ostermeier et al., 2008; Liu et al., 2011).

Vor allem die Problematik bei B6 wird mit Hochdruck beforscht, da es sich um einen der wichtigsten Inzuchtstämme für die Herstellung transgener Linien und von *Knock-out* Linien handelt (Nakagata et al., 1997; Bath, 2003; Takeo et al., 2008; Liu et al., 2009; Movassaghi et al., 2009; Suzuki-Migishima et al., 2009; Taguma et al., 2009; Bath, 2010; Takeo und Nakagata, 2010; Bath, 2011). Einen Überblick zu diesem Thema geben auch Sztein et al. (2000), die mit kryokonserviertem Sperma aus fünf verschiedenen, gängigen Inzuchtstämmen IVFs durchführten. Trotz vitalem Sperma schwankten die Fertilisationsraten bei B6 auch hier zwischen 0 und 40 %. Selbst eine Erhöhung der Spermamenge bewirkte keine Veränderung zum Positiven (Sztein et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit lag die Fertilisationsrate bei C3H am höchsten, obwohl die Motilität der C3H Spermien bei der Dosierungsreihe die schlechteste aller drei Stämme war und auch beim Spermfreezing für die IVF niedrigere Werte als CD-1 zeigte. C3H ist jedoch bekannt für seine guten IVF Ergebnisse. Auch Marschall et al. sprechen von einer sicheren und einfachen Methode, um Mutanten auf C3H Hintergrund zu erzeugen (Marschall et al., 1999). In der Literatur werden für C3H Fertilisationsraten von 43 % (Kaneko et al., 2006) bis zu 54 % (Kawai et al., 2006) berichtet. Für CD-1 gibt es kaum vergleichbare Literatur, da mit diesem Stamm üblicherweise keine IVF durchgeführt wird. Mit Fertilisationsraten von 18 bis 24 %

(An et al., 2000) bzw. 25 % (Mayer et al., 2007) liegen die Vergleichsdaten leicht über den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

Insgesamt stellt sich letztendlich die Frage, inwiefern durch die Messung der beiden Parameter Motilität und Progressivität überhaupt eine Aussage über die Fertilität der Spermien getroffen werden kann. Auch Takeo et al. beobachteten bei kryokonservierten B6 Spermien, dass selbst nach dem Auftauen vitale progressive Spermien nicht in der Lage waren Eizellen zu befruchten. Es wurde vermutet, dass ihnen die Fähigkeit zur vollständigen Kapazitation verloren gegangen war (Takeo et al., 2008). Dagegen beschrieben Kawai et al. in ihrer Arbeit zwar bei verschiedenen Inzuchtstämmen einen kausalen Zusammenhang zwischen den morphologischen Merkmalen von Spermien und ihrer Fertilisationsrate (Kawai et al., 2006), allerdings wäre diese aufwändige morphologische Beurteilung keine Option für die routinemäßige Arbeit mit Mausspermien. In diesem Zusammenhang werden immer wieder verschiedene Möglichkeiten der Selektion fertilisierender von nicht fertilisierenden Spermien diskutiert (Furimsky et al., 2005; Taguma et al., 2009; Bath, 2010), doch in der allgemeinen Routine hat sich bislang noch keines der Verfahren durchsetzen können.

Entwicklungsrate

Die meisten Angaben der Literatur zur Überprüfung der Revitalisierungsfähigkeit von Sperma beziehen sich auf die Erfolgsraten nach dem Transfer von Embryonen, die aus der IVF mit dem gefrorenen Sperma gewonnen wurden. In der vorliegenden Studie wurde nach den Ergebnissen der Untersuchung des Embryofreezings allerdings darauf verzichtet, weitere Embryotransfers durchzuführen, da nicht davon ausgegangen wurde, dass hier Effekte des Ectoins hätten festgestellt werden können. Die Vitalität der Embryonen wurde deshalb lediglich durch Inkubation im Brutschrank überprüft. Ein vergleichbarer Ansatz findet sich bei Si et al. (2009). Auch hier wurde die Fertilität von kryokonserviertem Maussperma durch IVF mit anschließender Inkubation bis zur Blastozyste geprüft. Allerdings wurde hier nur mit Mäusen der Stämme ICR (CD-1) und C57BL/6 gearbeitet. Eine IVF wurde auch nur für CD-1, nicht aber für C57BL/6 durchgeführt, mit der Begründung, dass die zu erwartenden Fertilisationsraten bei C57BL/6 zu niedrig seien. Für CD-1 wurden jedoch nach der IVF Entwicklungsraten zwischen 50 bis 71,4 % beobachtet (Si et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach IVF mit kryokonserviertem Sperma der Kontrollgruppen D0 die beste Entwicklungsrate bei den Embryonen des Stammes C3H (51,9 %) erzielt, gefolgt von B6 (41,0 %) und CD-1 (25,3 %). Dies war nach den Ergebnissen der Weiterentwicklung aus den Dosierungsreihen nicht zu erwarten, bei denen noch CD-1 die höchsten (54,0 %) und C3H (27,9 %) und B6 (25,6 %) deutlich niedrigere Entwicklungsraten zeigten. Eine Erklärung für diese unerwarteten Verhältnisse könnte darin liegen, dass aufgrund der niedrigen Fertilisationsraten nach der IVF generell nur sehr wenige Zwei-Zell-Embryonen zur weiteren Inkubation zur Verfügung standen. Dadurch bedingt wirkten sich einzelne Ausfälle stärker auf den Mittelwert und die Standardabweichung aus.

V.3.2. Einfluss von Ectoin beim Spermfreezing und IVF

Motilitäts- und Progressivitätsindex

Bei jedem Mausstamm zeigten sich bei der Kryokonservierung von Sperma mit jeweils einer Ectoin-Dosierung Verbesserungen bezüglich des Motilitäts- und Progressivitätsindex gegenüber der Kontrollgruppe D0. Bei CD-1 und C3H war dies die Dosierung D3 und bei B6 die Gruppe D2. Es fiel weiter auf, dass bei allen drei Stämmen die Werte mit steigender Dosierung bis D3 bzw. D2 besser wurden, aber bei D4 das jeweils schlechteste Ergebnis (mit Ausnahme des Motilitätsindex bei CD-1) erzielt wurde. Demnach hatte Ectoin offensichtlich eine Wirkung auf den Motilitäts- und Progressivitätsindex der Spermien nach der Kryokonservierung. Als mögliche Erklärung käme auch hier, wie schon bei den Embryonen (s. Abschnitt V.2.2), die Veränderung der Osmolarität des CPA durch die steigende Konzentration des Ectoins im Medium in Betracht. Es ist bekannt, dass murine Spermien sehr empfindlich gegenüber osmotischen Veränderungen sind (Willoughby et al., 1996; Songsasen und Leibo, 1997b; An et al., 2000; Walters et al., 2005; Jin et al., 2008; Si et al., 2009). Si et al. (2009) testeten verschiedene Bewegungsparameter von direkt gewonnenen sowie nach Kryokonservierung wieder aufgetauten Spermien der Stämme CD-1 und B6 in Medien unterschiedlicher Osmolarität. Sie stellten fest, dass beide Stämme sehr unterschiedlich reagierten, denn bei direkt gewonnenen CD-1 Spermien war die Motilität bei einer höheren Osmolarität signifikant besser, während sie bei B6 mit zunehmender Osmolarität signifikant schlechter wurde. Bei aufgetauten Spermien konnten keine Stamm-spezifischen Unterschiede in den

Bewegungsparametern festgestellt werden. Jedoch waren die Fertilisations- und die Entwicklungsrate bei CD-1 Embryonen signifikant höher, wenn das für die IVF verwendete Sperma zuvor in Medium mit höherer Osmolarität kryokonserviert worden war. Wie bereits in Abschnitt V.3.1 erwähnt, wurden für den Mausstamm B6 keine IVF Termine durchgeführt, da hier zu niedrige Fertilisationsraten befürchtet wurden (Si et al., 2009).

In der vorliegenden Untersuchung wurden für alle drei Stämme im Anschluss an die Dosierungsreihe IVFs durchgeführt, um die anhand der Parameter Motilität und Progressivität beobachtete Wirkung von Ectoin weiter zu prüfen. Auch bei diesen Kryokonservierungsdurchgängen zeigten die Gruppen mit Ectoin bei CD-1 und B6 nach dem Auftauen gegenüber den Kontrollen D0 höhere Werte im Motilitäts- und Progressivitätsindex. Diese Unterschiede waren allerdings nicht mehr signifikant, womöglich weil für die IVF-Durchgänge nur jeweils ein Männchen verwendet wurde, wodurch es größere Schwankungen in den Ergebnissen gab als bei der Dosierungsreihe, für die das Sperma von zwei Männchen gemischt wurde.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen war bei C3H zwar der Motilitätsindex mit D3 noch besser als die der Kontrolle, allerdings war der Progressivitätsindex bei beiden Dosierungen D0 und D3 in etwa gleich. Hier konnten zum einen die signifikanten Unterschiede aus der Dosierungsreihe nicht reproduziert werden, zum anderen war auch der Effekt des im Verhältnis zum Motilitätsindex höheren Progressivitätsindex nach dem Auftauen nicht mehr zu sehen.

Fertilisationsrate

Obwohl die Qualität der Spermien gemessen an Motilität und Progressivität mit der jeweiligen Ectoin-Dosierung besser war als in der Kontrollgruppe ohne Ectoin, lag die Fertilisationsrate bei CD-1 und C3H mit Ectoin deutlich niedriger (CD-1: 6,6 %; C3H: 19,9 %) als bei der jeweiligen Kontrolle D0 (CD-1: 15,8 %; C3H: 37,8 %). Bei C3H war dieser Unterschied signifikant. Lediglich bei B6 waren die Raten in etwa gleich groß (D0: 7,5 %; D2: 8,7 %). Auch hier zeigte sich, dass die Parameter Motilität und Progressivität keine unmittelbare Schlussfolgerung auf die Fertilisationsrate zulassen. Man könnte nun vermuten, dass Ectoin zwar bei der Kryokonservierung eine protektive Wirkung in Bezug auf die Beweglichkeit (Motilität und Progressivität) hat, nach dem Auftauen jedoch den Fertilisationsprozess hemmt. Es wäre möglich, dass Ectoin in die Akrosomenreaktion eingreift, indem es an der Oberfläche der

Spermien bindet und dadurch die Signaltransduktion zur Wahrnehmung und Bindung an die *Zona pellucida* nicht stattfinden kann. Interessanterweise jedoch blieben gerade bei dem als problematisch geltender Mausstamm B6 die Fertilisationsraten auch bei Zugabe von Ectoin im CPA gleich. Es gibt Erklärungsansätze, dass bei der Kryokonservierung von B6 Spermien nach dem Auftauen bedingt durch die Kryoschädigung die Kapazitationskaskade ausbleibt. Das könnte bedeuten, dass die hemmende Wirkung von Ectoin auf die Akrosomenreaktion bei dieser Linie ohne Folge bleiben würde, da schon von vorneherein nach dem Auftauen keine intakten, kapazitierten Spermien vorhanden sind, die an die *Zona pellucida* binden könnten.

Entwicklungsrate

Ähnlich wie bei der Embryofreezing-Dosierungsreihe waren auch bei der Weiterentwicklung der Zwei-Zell-Embryonen aus der IVF große Standardabweichungen zu beobachten. Bei CD-1 und B6 lagen die in den Versuchsgruppen mit und ohne Ectoin festgestellten Unterschiede absolut im Schwankungsbereich der Ergebnisse, so dass hier nicht von einer Verbesserung oder Verschlechterung durch die Verwendung von Ectoin gesprochen werden kann.

Wie bereits bei der Embryofreezing-Dosierungsreihe zeigte sich bei C3H die größte Konstanz in der Weiterentwicklung. Offensichtlich sind C3H-Embryonen stabiler bei der Inkubation im Brutschrank als Embryonen von CD-1 und B6. Für die C3H-Embryonen zeigt sich auch hier ein eher negativer Effekt durch das Ectoin auf die Entwicklungsrate.

V.4. Schlussfolgerungen

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, an drei verschiedenen Wildtyp-Mausstämmen (CrI:CD-1(ICR)/DCM, C3HeB/FeJ/DCM und C57BL/6J/DCM) die Wirkung von Ectoin bei der Kryokonservierung von Mausembryonen und -spermien zu überprüfen.

Dabei konnte zum einen gezeigt werden, dass große Unterschiede zwischen den drei Stämmen im Verhalten bei der Anwendung von assistierten Reproduktionstechniken (ART) bestehen. Es wurde zudem offensichtlich, wie wichtig es ist, fundierte Kenntnisse über die jeweiligen Eigenschaften der einzelnen Mausstämmen zu besitzen, damit die Kalkulation der benötigten Tierzahlen für eine sichere Archivierung oder Rederivierung von Linien korrekt durchgeführt werden kann. Im Sinne der „3R“ dient eine Reduktion der Tierzahlen auf ein unbedingt notwendiges Minimum in erster Linie dem Tierschutz, stellt aber zudem auch eine finanzielle Kostenersparnis und optimale Verwendung der Ressourcen dar. Wegen der Vielfalt an Mauslinien in der biomedizinischen Forschung finden sich zu speziellen Linien häufig nur wenig konkrete Angaben bezüglich relevanter Reproduktionsdaten in der aktuellen Literatur. Für die Vergleichbarkeit und Überprüfung der Daten aus der vorliegenden Arbeit wäre dies jedoch von großer Bedeutung gewesen.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Ectoin bei der Kryokonservierung von Embryonen erstaunlicherweise nur bei B6 eine positive Wirkung auf die Auftaurate hatte. Bei den anschließenden ETs bewirkte Ectoin jedoch eine signifikante Verschlechterung der Revitalisierungsrate, so dass eine Anwendung von Ectoin beim Embryofreezing nicht empfohlen werden kann. Auf den Kryokonservierungserfolg der ohnehin zuverlässig zu rederivierenden Linien CD-1 und C3H zeigte Ectoin keinen positiven Einfluss.

Bei der Kryokonservierung der Spermien waren die beiden Parameter Motilitäts- und Progressivitätsindex nach dem Auftauen bei allen drei Linien in den Proben, die mit Ectoin eingefroren wurden, besser als in den Kontrollgruppen ohne Ectoin. Allerdings wirkte sich die Ectoin-Zugabe bei den beiden Linien CD-1 und C3H negativ auf die Fertilisationsrate in der anschließend durchgeführten IVF aus. Nur beim Mausstamm

B6 bewirkte die Zugabe von Ectoin zum CPA interessanterweise keine Verschlechterung. Da jedoch auch keine deutliche Verbesserung der Fertilisationsrate erreicht werden konnte, bietet sich Ectoin auch hier nicht als zuverlässiges Kryoprotektivum an.

Es wurde des Weiteren festgestellt, dass eine Ectoin-Dosierung ab 50 mg/ml Einfriermedium sowohl bei der Kryokonservierung von Embryonen als auch von Spermien eine schädigende Wirkung hat.

Bei der Kryokonservierung von Mauspermien muss grundsätzlich die Frage gestellt werden, wie sinnvoll es ist *in vitro* Parameter wie die Motilität und die Progressivität mit teuren Geräten oder zeitaufwendigen Zählungen zu messen, um Rückschlüsse auf die Fertilisationsfähigkeit ziehen zu können. Denn es wurde gerade bei B6 deutlich, dass auch noch nach dem Auftauen vitalen, beweglichen Spermien die Fähigkeit zur Befruchtung fehlen kann.

Im Rahmen der Dosierungsreihe für das Embryofreezing stellte sich als weitere wichtige Erkenntnis dar, dass die Messung und Protokollierung der Seedingzeiten eine wesentliche Aussagekraft für die zu erwartende Überlebensrate der Embryonen haben kann. Bei Werten, die bei Verwendung der Minitübs und dem beschriebenen Einfrierprotokoll deutlich über zwei Minuten liegen, sollten Maßnahmen wie die Überprüfung des Mediums und Einfrierprozesses zur Sicherstellung des Kryokonservierungserfolgs getroffen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass eine positive Wirkung von Ectoin bei den üblichen assistierten Reproduktionstechniken an drei sich hierbei sehr unterschiedlich verhaltenden Mausstämmen nicht festgestellt werden konnte. Somit ist fraglich, ob weitere Untersuchungen mit Ectoin für diesen Anwendungsbereich sinnvoll sind.

VI. Zusammenfassung

In vielen Versuchstierhaltungen werden murine Embryonen und Spermien routinemäßig kryokonserviert. Durch die Anwendung bewährter Kryoprotektiva wird versucht, den Schutz der Zellmembran vor Eiskristallbildung weitestgehend sicherzustellen. Das kompatible Solut Ectoin, eine biologisch inerte, nicht toxische, zyklische Aminosäure, wird unter extremen Bedingungen von halophilen Bakterien des Genus *Ectothiorhodospira* erzeugt, um sich gegen osmotischen Stress zu schützen. Untersuchungen an Embryonen des Auszuchtmausstammes Crl:CD1(ICR) zeigten nach Kryokonservierung unter Zusatz von Ectoin eine signifikante Erhöhung des Anteils vitaler Vorkernembryonalstadien, eine Verbesserung der Überlebens- und Entwicklungsrate der aufgetauten Embryonen und eine Steigerung des Embryotransfererfolgs (Lohmer et al., 2008). Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten weitere Anwendungsmöglichkeiten von Ectoin bei der Kryokonservierung von murinen Embryonen und Spermien getestet werden, mit dem Ziel, seine protektive Wirkung zu überprüfen und möglicherweise eine Verbesserung des Kryokonservierungserfolgs zu erreichen.

Die Untersuchungen fanden an drei Wildtyp-Mausstämmen (Crl:CD-1(ICR)/DCM (CD-1), C3HeB/FeJ/DCM (C3H) und C57BL/6J/DCM (B6)) statt, da verschiedene Mausstämme unterschiedliche Kryokonservierungseigenschaften zeigen. Für die Kryokonservierung von Zwei-Zell-Embryonen und von Spermien wurden zunächst *in vitro* Dosierungsreihen durch Zugabe von steigenden Ectoin-Konzentrationen zu den Einfriermedien (D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium, D2: 10 mg/1 ml, D3: 25 mg/1 ml, D4: 50 mg/1 ml) im Vergleich zur Negativkontrolle (D0) durchgeführt. Für die Beurteilung der Qualität der Embryonen wurden nach dem Auftauen die Auftaurate (AR) und die *In-vitro*-Entwicklungsrate (ER) bestimmt. Wenn sich eine Dosierung als optimal erwies, sollte mit dieser die Wirkung von Ectoin auf die Vitalität der eingefrorenen Embryonen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden jeweils ohne oder mit Zusatz von Ectoin eingefrorene Embryonen aufgetaut, in Rezipienten transferiert und die Revitalisierungsraten (RR) bestimmt. Als Parameter für den Kryokonservierungserfolg bei den Spermien wurden die Motilität und die Progressivität jeweils vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen gemessen und daraus der entsprechende Quotient (Progressivitätsindex, Motilitätsindex) ermittelt. Mit der

jeweils optimalen Dosierung von Ectoin wurde im Anschluss seine Wirkung auf die Vitalität von kryokonservierten Spermien und deren Effektivität bei Durchführung einer *In-vitro*-Fertilisation (IVF) untersucht. Dabei wurden die Fertilisationsrate (FR) und die *In-vitro*-Entwicklungsrate (ER) jeweils ohne oder mit Zusatz von Ectoin eingefrorenem Sperma bestimmt.

Bei den ohnehin zuverlässig zu rederivierenden Stämmen CD-1 und C3H zeigte Ectoin keinen positiven Einfluss auf die AR bzw. *In-vitro*-ER. Lediglich bei dem problematisch zu archivierenden Mausstamm B6 konnte eine Verbesserung der AR mit Ectoin festgestellt werden (D0: 59,2 % vs. D3: 82,1 %). Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt bei B6 der Effekt von Ectoin in der Dosierung D3 beim Embryotransfer mit kryokonservierten Embryonen *in vivo* untersucht. Hierbei wurde eine Verschlechterung der RR in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (D0: 41,0 % vs. D3: 16,3 %), so dass eine Anwendung des Ectoins bei der Kryokonservierung von Embryonen nicht empfohlen werden kann. Die Ergebnisse der Dosierungsreihe beim Spermfreezing zeigten bei CD-1 und C3H eine signifikante Verbesserung des Motilitäts- (Mot) und Progressivitätsindex (Prog) bei der Dosierung D3 im Vergleich zur Kontrollgruppe D0 (CD-1 Mot: 50,3 vs. 67,3 %, Prog: 31,1 vs. 40,6 %; C3H Mot: 42,8 vs. 63,1 %, Prog 55,5 vs. 72,9 %). Beim Stamm B6 erwies sich die Dosierung D2 als optimal (B6 Mot: 46,6 vs. 55,9 %, Prog: 32,7 vs. 39,7 %). Allerdings wirkte sich Ectoin in der Dosierung D3 bei CD-1 und C3H bei den im Anschluss durchgeführten IVF-Durchgängen im Vergleich zu den Kontrollgruppen D0 negativ auf die FR aus (CD-1: 15,8 vs 6,6 %; C3H: 37,8 vs. 19,9 %). Bei B6 kam es dagegen zu keiner Verschlechterung der FR durch die Anwendung von Ectoin im Einfriermedium (D0: 7,5 % vs. D2: 8,7 %). Da aber auch keine signifikante positive Wirkung von Ectoin auf die Fertilisationsrate festgestellt werden konnte, ist auch bei der Kryokonservierung von Spermien die Anwendung von Ectoin nicht anzuraten.

In dieser Arbeit erwies sich die Messung der Motilität und der Progressivität als nicht geeignet, um Rückschlüsse auf die Fertilisationsfähigkeit der Spermien ziehen zu können. Zudem wurde deutlich, dass Kenntnisse über die Eigenschaften der verschiedenen Mausstämmen bei den üblichen assistierten Reproduktionstechniken

(ARTs) Grundvoraussetzungen für eine sichere Archivierung oder Rederivierung von Mauslinien sind, um dabei Kosten einsparen und Tierzahlen reduzieren zu können.

VII. Summary

Assessing the ability of ectoine as additive to the cryoprotectant in archiving murine embryos and sperm

In many animal facilities mouse embryos and sperm are routinely cryopreserved. Efforts are made to ensure the protection of the cell membrane against ice crystals by using proven cryoprotectants. However, there still is a loss of genetic material caused by irreversible degradation during the freezing and thawing process. The compatible solute ectoine is a biologically inert, non-toxic, cyclic amino acid, which is synthesized by halophilic microorganisms and enables them to survive under extreme conditions. First investigations revealed that ectoine is able to improve the success of cryopreservation and rederivation of pronucleus-stage embryos of Crl:CD-1(ICR) mice (Lohmer et al., 2008). In the scope of this study, further application possibilities of ectoine for cryopreservation of murine embryos and sperm should be assessed to verify the effects of ectoine.

The aim of this study was to examine the effects of different dosages of ectoine added to the cryoprotectant on the cryopreservation success of embryos and sperm in Crl:CD-1(ICR)/DCM (CD-1), C3HeB/FeJ/DCM (C3H) und C57BL/6J/DCM (B6) strains. It is well established that there are differences in the cryopreservation success between different mouse strains. Five different dosages of ectoine (D1: 1 mg ectoine/1 ml cryoprotectant, D2: 10 mg/1 ml, D3: 25 mg/1 ml, D4: 50 mg/1 ml and the control without ectoine, D0) were tested *in vitro* in embryo and sperm freezing. For embryo freezing the best dosage for each strain was determined by the thawing rate and the development rate. If one dosage appeared to be superior to the others, the next step was to examine the effect of ectoine on the viability of frozen/thawed embryos by embryo transfer. Again, embryos were frozen with and without ectoine and after thawing they were transferred to pseudopregnant recipients. The success of rederivation was determined. For the assessment of sperm quality, the motility and the progression of sperm were measured before freezing and after thawing and the ratio before/after was calculated (progression index and motility index). For each strain, the most efficient dose was chosen to perform *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes of the same strain. Fertilization rate and development rate were determined compared to the control group without ectoine.

The thawing rates of the mouse strains CD-1 and C3H, which are usually uncomplicated to archive straightforward, did not show any positive effects of ectoine supplementation. There was a significant improvement of the thawing rate for B6 (D0: 59.2 % vs. D3: 82.1 %). This strain is one of the most important strains commonly used for creating and maintaining genetically modified lines and is difficult to cryopreserve because the thawing rates are low in general. The ectoine D3 dosage was then retested *in vivo* by embryo transfer using frozen/thawed B6 embryos. There was a significant decrease in the success of rederivation in the ectoine group compared to the control group without ectoine (D0: 41.0 % vs. D3: 16.3 %). For sperm freezing of CD-1 and C3H mice, the best results for motility index (Mot) and progression index (Prog) were obtained with the dosage D3 compared to the control D0 (CD-1 Mot: 50.3 vs. 67.3 %, Prog: 31.1 vs. 40.6 %; C3H motility index: 42.8 vs. 63.1 %, Prog: 55.5 vs. 72.9 %). In B6, the ectoine dosage D2 produced the best results (B6 Mot: 46.6 vs. 55.9 %, Prog: 32.7 vs. 39.7 %). With the chosen ectoine dose, in subsequent experiments no effect on the fertilization rate of B6 sperm (D0: 7.5 % vs. D2: 8.7 %) and even decreases of the fertilization rate in C3H and CD-1 mice (CD-1: 15.8 vs 6.6 %; C3H: 37.8 vs. 19.9 %) were found. For this reason, the application of ectoine cannot be recommended for cryopreservation of both mouse two-cell embryos as well as sperm.

In this study it was not possible to draw conclusions from the measurement of motility and progression on the fertilization ability of sperm. Furthermore, it became clear that knowledge of the different mouse strains' properties in view of the assisted reproductive technologies (ARTs) is an essential basis of archiving mouse lines. Thus, it is possible to reduce costs and the number of animals required.

VIII. Literaturverzeichnis

- An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kasai M. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2000; 40: 237-49.
- Arakawa T, Timasheff SN. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch Biochem Biophys* 1983; 224: 169-77.
- Auerbach AB, Norinsky R, Ho W, Losos K, Guo Q, Chatterjee S, Joyner AL. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res* 2003; 12: 59-69.
- Bahat A, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Perioviductal increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Hum Reprod* 2005; 20: 2118-21.
- Bahat A, Eisenbach M. Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252: 115-9.
- Bath ML. Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Biol Reprod* 2003; 68: 19-23.
- Bath ML. Inhibition of in vitro fertilizing capacity of cryopreserved mouse sperm by factors released by damaged sperm, and stimulation by glutathione. *PLoS One* 2010; 5: e9387.
- Bath ML. Optimized cryopreservation of mouse sperm based on fertilization rate. *J Reprod Dev* 2011; 57: 92-8.
- Becker SD, Hurst JL. Female behaviour plays a critical role in controlling murine pregnancy block. *Proc Biol Sci* 2009; 276: 1723-9.
- Braden AWH. The relationship between the diurnal light cycle and the time of ovulation in mice. *J Exp Biol* 1957; 34: 177-88.
- Bradley LT. Cryopreservation of bovine spermatozoa. Thesis, 1999, University of Guelph: p.124.
- Bruce HM. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 1959; 184: 105.

- Buenger J, Driller H. Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 2004; 17: 232-7.
- Busch W, Holzmann A (2001) *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart. 76-79.
- Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 2006; 65: 1716-26.
- Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF. Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology* 1982; 19: 306-16.
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1998; 61: 117-53.
- Depypere HT, McLaughlin KJ, Seamark RF, Warnes GM, Matthews CD. Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 205-11.
- Dinnyes A, Wallace GA, Rall WF. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 429-35.
- Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod* 2003; 68: 87-94.
- Edashige K, Tanaka M, Ichimaru N, Ota S, Yazawa K, Higashino Y, Sakamoto M, Yamaji Y, Kuwano T, Valdez DM, Jr., Kleinhans FW, Kasai M. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol Reprod* 2006; 74: 625-32.
- Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, L. SA (2007) *The Mouse in Biomedical Research*, 2. edn. Elsevier Academic Press: 91-121.

- Furimsky A, Vuong N, Xu H, Kumarathasan P, Xu M, Weerachayanukul W, Bou Khalil M, Kates M, Tanphaichitr N. Percoll gradient-centrifuged capacitated mouse sperm have increased fertilizing ability and higher contents of sulfogalactosylglycerolipid and docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine compared to washed capacitated mouse sperm. *Biol Reprod* 2005; 72: 574-83.
- Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* 1985; 149: 135-9.
- Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Pedrazzini T, Hornung JP. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 microm diode laser beam. *Hum Reprod* 1996; 11: 1043-8.
- Glenister PH, Thornton CE. Cryoconservation-archiving for the future. *Mamm Genome* 2000; 11: 565-71.
- Green M, Bass S, Spear B. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. *Biotechniques* 2009; 47: 919-24.
- Grein TA, Freimark D, Weber C, Hudel K, Wallrapp C, Czermak P. Alternatives to dimethylsulfoxide for serum-free cryopreservation of human mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2010; 33: 370-80.
- Hau AR, Hau J. Correlation between duration of courtship and litter size in outbred NMRI mice. *In Vivo* 2007; 21: 33-4.
- Haueter S, Kawasumi M, Asner I, Brykczynska U, Cinelli P, Moisyadi S, Burki K, Peters AH, Pelczar P. Genetic vasectomy-overexpression of Prm1-EGFP fusion protein in elongating spermatids causes dominant male sterility in mice. *Genesis* 2010; 48: 151-60.

- Hawes SM, Gie Chung Y, Latham KE. Genetic and epigenetic factors affecting blastomere fragmentation in two-cell stage mouse embryos. *Biol Reprod* 2001; 65: 1050-6.
- Hedrich HJ (2008) *The Laboratory Mouse*, 3. edn. Elsevier Academic Press, London.
- Honadel TE, Killian GJ. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology* 1988; 25: 331-7.
- Hoogenkamp H, Lewing P. Superovulation in mice in relation to their age. *The Veterinary quarterly* 1982; 4: 47-8.
- Jin B, Yamasaki C, Yamada N, Seki S, Valdez DM, Jr., Kasai M, Edashige K. The mechanism by which mouse spermatozoa are injured during freezing. *J Reprod Dev* 2008; 54: 265-9.
- Kaneko T, Yamamura A, Ide Y, Ogi M, Yanagita T, Nakagata N. Long-term cryopreservation of mouse sperm. *Theriogenology* 2006; 66: 1098-101.
- Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 2002; 17: 1863-74.
- Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *J Reprod Dev* 2006; 52: 561-8.
- Kawase Y, Iwata T, Ueda O, Kamada N, Tachibe T, Aoki Y, Jishage K, Suzuki H. Effect of partial incision of the zona pellucida by piezo-micromanipulator for in vitro fertilization using frozen-thawed mouse spermatozoa on the developmental rate of embryos transferred at the 2-cell stage. *Biol Reprod* 2002; 66: 381-5.
- Kota V, Rai P, Weitzel JM, Middendorff R, Bhande SS, Shivaji S. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 2010; 77: 773-83.
- Krüssel J. Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der Embryonalen Implantation. Habilitationsschrift, 2001, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: p.71.

- Landel CP. Archiving mouse strains by cryopreservation. *Lab Anim (NY)* 2005; 34: 50-7.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 2006; 131: 53-61.
- Lathrop AE, Loeb L. Further Investigations on the Origin of Tumors in Mice : I. Tumor Incidence and Tumor Age in Various Strains of Mice. *J Exp Med* 1915; 22: 646-73.
- Leibo SP. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 2008; 69: 37-47.
- Linder CC. Genetic variables that influence phenotype. *ILAR J* 2006; 47: 132-40.
- Lippert K, Galinski E. Enzyme Stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 37: 61-5.
- Liu L, Nutter LM, Law N, McKerlie C. Sperm freezing and in vitro fertilization in three substrains of C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009; 48: 39-43.
- Liu L, Sansing SR, Morse IS, Pritchett-Corning KR. Mouse sperm cryopreservation and recovery using the i-cryo kit. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2011; e3713: 1-4.
- Lohmer A, Schmidt J, van Echten-Deckert G, Schmidt MFG, Tolba R (2008) Protective effects of Ectoine in cryopreservation of mouse embryonic cells 45. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS), 14./17.9.2008. Dresden.
- Luo C, Zuniga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parker-Thornburg J. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50: 471-8.
- Ma W, Miao Z, Novotny MV. Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited. *Biol Reprod* 1998; 59: 1317-20.

- Marschall S, Hrabé de Angelis M. Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space. *Trends Genet* 1999; 15: 128-31.
- Marschall S, Huffstadt U, Balling R, Hrabé de Angelis M. Reliable recovery of inbred mouse lines using cryopreserved spermatozoa. *Mamm Genome* 1999; 10: 773-6.
- Mayer A, Bulian D, Scherb H, Hrabé de Angelis M, Schmidt J, Mahabir E. Emergency prevention of extinction of a transgenic allele in a less-fertile transgenic mouse line by crossing with an inbred or outbred mouse strain coupled with assisted reproductive technologies. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 984-94.
- Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-69.
- Mazur P, Rigopoulos N, Jackowski S, Leibo S. Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys J* 1976; 16: 232a (abstract).
- Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 2005; 51: 29-53.
- Mazur P, Pinn IL, Kleinhans FW. The temperature of intracellular ice formation in mouse oocytes vs. the unfrozen fraction at that temperature. *Cryobiology* 2007; 54: 223-33.
- Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173-83.
- Monzavifar M, Ellendorff F, Smidt D. [Temperature, humidity and reproduction in mice. I. Influence of 35 degrees C and 65-70 per cent relative humidity on fertility]. *Int J Biometeorol* 1970; 14: 77-84.
- Movassaghi S, Saki G, Javadnia F, Panahi M, Mahmoudi M, Rhim F. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 2009; 12: 19-25.

- Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Nonneman RJ, Segall SK, Andrade GM, Crawley JN, Magnuson TR. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 2008; 191: 118-29.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vinterstein K, Behringer R (2003) *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.*, 3. edn. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Nakagata N. Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females. *Jikken dobutsu. Experimental animals* 1992; 41: 519-22.
- Nakagata N, Matsumoto K, Anzai M, Takahashi A, Takahashi Y, Matsuzaki Y, Miyata K. [Cryopreservation of spermatozoa of a transgenic mouse]. *Jikken dobutsu. Experimental animals* 1992; 41: 537-40.
- Nakagata N, Takeshima T. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Jikken Dobutsu* 1993; 42: 317-20.
- Nakagata N. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab Anim Sci* 1996; 46: 236-8.
- Nakagata N, Okamoto M, Ueda O, Suzuki H. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol Reprod* 1997; 57: 1050-5.
- Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm Genome* 2000; 11: 572-6.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2009) *Andrologie*, 3. edn. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, Taft RA. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PLoS One* 2008; 3: e2792.
- Ozgunen KT, Erdogan S, Mazmanoglu N, Pamuk I, Logoglu G, Ozgunen T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. *Theriogenology* 2001; 56: 435-45.

- Parkening TA, Chang MC. Strain differences in the in vitro fertilizing capacity of mouse spermatozoa as tested in various media. *Biol Reprod* 1976; 15: 647-53.
- Parkes AS. The length of the oestrus cycle in the unmated normal mouse: records of one thousand cycles. *J Exp Biol* 1928; 5: 371-7.
- Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdez DM, Jr, Tanaka M, Edashige K, Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev* 2005; 51: 235-46.
- Pomeroy KO. Cryopreservation of transgenic mice. *Genet Anal Tech Appl* 1991; 8: 95-101.
- Pomp D, Eisen EJ. Genetic control of survival of frozen mouse embryos. *Biol Reprod* 1990; 42: 775-86.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
- Reed DR, Bachmanov AA, Tordoff MG. Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav* 2007; 91: 593-600.
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London.
- Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* 1998; 59: 128.
- Schenkel J (2006) *Transgene Tiere*, 2. edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Schmidt PM, Hansen CT, Wildt DE. Viability of frozen-thawed mouse embryos is affected by genotype. *Biol Reprod* 1985; 32: 507-14.
- Schnoor M, Voss P, Cullen P, Boking T, Galla HJ, Galinski EA, Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 867-72.

- Seki S, Mazur P. The temperature and type of Intracellular ice formation in preimplantation mouse embryos as a function of the developmental stage. *Biol Reprod* 2010; 82: 1198–205.
- Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 583-605.
- Si W, Men H, Benson JD, Critser JK. Osmotic characteristics and fertility of murine spermatozoa collected in different solutions. *Reproduction* 2009; 137: 215-23.
- Snell GD, Fekete E, Hummel KP, Law LW. The relation of mating, ovulation and the estrous smear in the house mouse to time of day. *The Anatomical Record* 1940; 76: 39-54.
- Songsasen N, Betteridge KJ, Leibo SP. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 56: 143-52.
- Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology* 1997a; 35: 240-54.
- Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 1997b; 35: 255-69.
- Steensma DP, Kyle RA, Shampo MA. Abbie Lathrop, the "mouse woman of Granby": rodent fancier and accidental genetics pioneer. *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Clinic 2010; 85: e83.
- Storey KB, Storey JM. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* 1986; 83: 613-7.
- Suzuki-Migishima R, Hino T, Takabe M, Oda K, Migishima F, Morimoto Y, Yokoyama M. Marked improvement of fertility of cryopreserved C57BL/6J mouse sperm by depletion of Ca²⁺ in medium. *J Reprod Dev* 2009; 55: 386-92.

- Suzuki O, Asano T, Yamamoto Y, Takano K, Koura M. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 975-80.
- Sztejn JM, Farley JS, Young AF, Mobraaten LE. Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing. *Cryobiology* 1997; 35: 46-52.
- Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 2000; 63: 1774-80.
- Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 511-6.
- Taguma K, Nakamura C, Ozaki A, Suzuki C, Hachisu A, Kobayashi K, Mochida K, Ogura A, Kaneda H, Wakana S. A practical novel method for ensuring stable capacitation of spermatozoa from cryopreserved C57BL/6J sperm suspension. *Exp Anim* 2009; 58: 395-401.
- Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Toyodome H, Arima H, Yamamura K, Irie T, Nakagata N. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod* 2008; 78: 546-51.
- Takeo T, Nakagata N. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim* 2010; 44: 132-7.
- Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S. [Cryopreservation of mouse spermatozoa]. *Jikken Dobutsu* 1991; 40: 493-7.
- Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 398-405.

- Thornton CE, Brown SD, Glenister PH. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mamm Genome* 1999; 10: 987-92.
- Van Der Lee S, Boot LM. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 1955; 4: 442-4.
- Vandenbergh JG. Coordination of social signals and ovarian function during sexual development. *J Anim Sci* 1989; 67: 1841-7.
- Walters EM, Men H, Agca Y, Mullen SF, Critser ES, Critser JK. Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility. *Cryobiology* 2005; 50: 193-205.
- Wayss K, Klefenz M, Schenkel J. Cryopreservation of transgenic mouse embryos – an eight years experience. *J Exp Anim Sci* 2005; 43: 69-85.
- Wei L, Wedeking A, Buttner R, Kalff JC, Tolba RH, van Echten-Deckert G. A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm in vitro reperfusion injury. *Pathobiology* 2009; 76: 212-20.
- Whitten WK. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Endocrinol* 1959; 18: 102-7.
- Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 1971; 233: 125-6.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972; 178: 411-4.
- Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, Critser JK. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 55: 715-27.
- Yan J, Suzuki J, Yu X, Kan FW, Qiao J, Chian RC. Cryo-survival, fertilization and early embryonic development of vitrified oocytes derived from mice of different reproductive age. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 605-11.

Yanagimachi R. Is an animal model needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and other assisted reproduction technologies? Human reproduction 1995; 10: 2525-6.

Zanoni M, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. The 2-cell block occurring during development of outbred mouse embryos is rescued by cytoplasmic factors present in inbred metaphase II oocytes. Int J Dev Biol 2009; 53: 129-34.

Webseiten:

Seite 20: bitop AG, <http://www.bitop.de/cms/website.php?id=/de/index/produkte.htm>;
(abgerufen am 23.03.2012)

Seite 20: Fa. Biomol GmbH: www.biomol.de; (abgerufen: 23.03.2012)

Seite 73: The Jackson Laboratory, JAX[®] NOTES Issue 434, July 1988,
Superovulation Technique <http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/434c.html>;
(abgerufen am 23.03.2012)

IX. Anhang

IX.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikrographien von gefrorenen Proben mit 6 %iger Glycerollösung. Die Proben wurden in Straws bei vier verschiedenen Abkühlgeschwindigkeiten eingefroren: 0,1°C/min (A), 1°C/min (B), 10°C/min (C), 100°C/min (D) und anschließend in flüssigem Stickstoff versenkt (Bradley, 1999).....	12
Abbildung 2: Strukturformel von Ectoin	18
Abbildung 3: Präparation der Eileiter.....	34
Abbildung 4: Spülen eines Eileiters. Die Hamiltonkanüle befindet sich im Infundibulum.	34
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines befüllten Minitübs.	35
Abbildung 6: 5 Kategorien von Beschädigungen von Zwei-Zell-Embryonen nach dem Auftauen.	38
Abbildung 7: Präparation des Nebenhodenschwanzes.....	39
Abbildung 8: Feinpräparation der Nebenhodenschwänze.....	40
Abbildung 9: Aufziehen der vorgelegten Spermaproben in einen Straw mit einer 1 ml Spritze.	41
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines befüllten Straws.....	41
Abbildung 11: Befüllung der Zählkammern mit den Spermaproben.	42
Abbildung 12: Eröffnen der Ampulla (A+B). Gewonnener Kumulus-Oozyten-Komplex im HTF Tropfen (C).	44
Abbildung 13: Durchschnittliche <i>plug</i> Raten für die 3 Mausstämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils 5 Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung].....	47
Abbildung 14: Durchschnittliche Anzahl an Zwei-Zell-Embryonen pro <i>plug</i> positives Weibchen der Stämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils 5 Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung].....	48
Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl an Oozyten pro superovuliertem Weibchen der Stämme CD-1, C3H und B6 aus jeweils 5 Terminen. [MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung].....	49
Abbildung 16: Durchschnittliche Seedingzeiten (min) bei der Kryokonservierung von Zwei-Zell-Embryonen der 3 Stämme CD-1, C3H und B6 für die verschiedenen Ectoin-Dosierungen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung].....	50
Abbildung 17: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Zwei-Zell-Embryonen an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium;	

D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 53

Abbildung 18: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Zwei-Zell-Embryonen an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 55

Abbildung 19: Auftauraten (AR) und Entwicklungsraten (ER) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D2: 10 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; D4: 50 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 57

Abbildung 20: Auftauraten (AR) und Revitalisierungsraten (RR) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei der Kryokonservierung und Revitalisierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an 3 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D3: 25 mg Ectoin/1 ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung] 59

Abbildung 21: Progressivitätsindex (Prog; $MW \pm SD$) und Motilitätsindex (Mot; $MW \pm SD$) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Spermien an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 62

Abbildung 22: Progressivitätsindex (Prog; $MW \pm SD$) und Motilitätsindex (Mot; $MW \pm SD$) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Spermien an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 63

Abbildung 23: Progressivitätsindex (Prog; $MW \pm SD$) und Motilitätsindex (Mot; $MW \pm SD$) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Spermien an 5 verschiedenen Terminen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$). [D0: CPA ohne Ectoin; D1: 1 mg Ectoin/1 ml CPA; D2: 10 mg Ectoin/1 ml CPA; D3: 25 mg Ectoin/1 ml CPA; D4: 50 mg Ectoin/1 ml CPA; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 64

Abbildung 24: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei 5 IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei CD-1 Mäusen. [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D3: 25 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 66

Abbildung 25: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei 5 IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei C3H Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$). [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D2: 10 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung]..... 67

Abbildung 26: Fertilisationsraten (FR), Entwicklungsraten (ER), Progressivitätsindex (Prog) und Motilitätsindex (Mot) für die Ectoin-Dosierungen D0 und D2 bei 5 IVF Terminen mit aufgetautem Sperma bei B6 Mäusen. [D0: Einfriermedium ohne Ectoin; D2: 10 mg Ectoin/ml Einfriermedium; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung] ... 68

IX.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitschema für die Superovulation für die <i>In-vivo</i> -Produktion von Embryonen.	33
Tabelle 2: Programmablauf des Kryostaten.	36
Tabelle 3: Zeitschema für die Superovulation zur Gewinnung von Oozyten für IVF. ...	43
Tabelle 4: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von CD-1 Embryonen an 5 verschiedenen Terminen.	51
Tabelle 5: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von C3H Embryonen an 5 verschiedenen Terminen.	54
Tabelle 6: Gesamtzahlen der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen und Gesamtzahlen der intakten Blastozysten (BZ) für die Ectoin-Dosierungen D0 bis D4 bei der Kryokonservierung von B6 Embryonen an 5 verschiedenen Terminen.	56
Tabelle 7: Anzahl der kryoarchivierten (k.a.), wiedergefundenen (w.g.), morphologisch intakten (m.i.) Zwei-Zell-Embryonen sowie Gesamtzahlen der transferierten (trans.) Embryonen, Anzahl der geborenen Nachkommen und deren Geschlecht im Absetzalter für die Ectoin-Dosierungen D0 und D3 bei der Kryokonservierung und Revitalisierung von B6 Zwei-Zell-Embryonen an 3 verschiedenen Terminen.	58
Tabelle 8: Vorkommen 5 verschiedener Kategorien von Beschädigungen (A: morphologisch intakt, B: ein Blastomer morphologisch intakt, C: Zwei-Zell-Struktur vorhanden, D: Zwei-Zell-Struktur nicht vorhanden, E: Zellmembran zerstört und ohne Inhalt) bei den 3 Mauslinien nach dem Einfrieren mit den Ectoin-Dosierungen D0 bis D4.	60

IX.3. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der <i>plug</i> Rate (%).	46
Formel 2: Berechnung der Auftaureate (%).	52
Formel 3: Berechnung der Entwicklungsrate (%).	52
Formel 4: Berechnung der Revitalisierungsrate (%).	58
Formel 5: Berechnung des Progressivitäts- (%) bzw. Motilitätsindexes (%) nach dem Auftauen bezogen auf die jeweils vor dem Einfrieren gemessenen Werte.	61
Formel 6: Berechnung der Fertilisationsrate (%).	65

IX.4. Abkürzungsverzeichnis

AM	Auftaumedium
AR	Auftaurate
ART	Assistierte Reproduktionstechnik
B6	C57BL/6J/DCM
BZ	Blastozyste
bzw.	beziehungsweise
C3H	C3HeBFeJ/DCM
ca.	circa
CD-1	CrI:CD-1(ICR)/DCM
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPA	cryo protectant agent
D0	Dosierung 0 (Kontrolle)
D1	Dosierung 1
D2	Dosierung 2
D3	Dosierung 3
D4	Dosierung 4
DCM	Department of Comparativ Medicine
deg.	degeneriert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFM	Einfriermedium
ER	Entwicklungsrate
ET	Embryotransfer
F1	Filialgeneration 1
Fa.	Firma
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FR	Fertilisationsrate
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
geb.	geboren
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HTF	Human Tubal Fluid

I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
ICR	siehe CD-1
ICSI	intracytoplasmic sperm injection
IIF	intracellular ice formation
IMSR	international mouse strain resource
IVC	individually ventilated cages
IVF	<i>In-vitro</i> -Fertilisation
IVOS	integrated visual optical system
k.a.	kryoarchiviert
KGW	Körpergewicht
KSOM	Kalium Simplex Optimized Medium
LH	Luteinisierendes Hormon
LZD	laser zona dissection
M	Mol
m.i.	morphologisch intakt
M2 Medium	Waschmedium für Embryonen
MBCD	Methyl-Beta-Cyclodextrin
mg	Milligramm
MGI	mouse genome informatics
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Mot	Motilitätsindex
MRC	medical research council
MTG	Monothioglycerol
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
OZ	Oozyten
p	p-Wert
P/S	Penicillin/Streptomycin

PCR	Polymerase chain reaction
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PR	<i>plug</i> Rate
Prog	Progressivitätsindex
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PZD	partial zona dissection
3R	Grundprinzip bei Tierversuchen: refine, reduce, replace
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RR	Revitalisierungsrate
RT	Raumtemperatur
RWTH Aachen	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
s.	siehe
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SPF	spezifiziert Pathogen-frei
T	T-Wert
trans.	transferiert
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w.g.	wiedergefunden
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZIP	zona incision by Piezo-Micromanipulator
ZZ	Zwei-Zell-Embryo

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Schmidt und Herrn Dr. Brielmeier recht herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Professor Dr. Aigner danke ich für die Betreuung meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät und für seine konstruktive Kritik bei den Thesis Committee Treffen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Tolba bedanken, der mir als Thesis Committee Mitglied beratend zur Seite stand und mir bereitwillig Ectoin zur Verfügung stellte.

Mein Dank geht auch an meine erste Betreuerin Frau Dr. Esther Mahabir-Brenner, die mir die Möglichkeit zu dieser Dissertation gegeben hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Angelika Scheideler, die sich spontan als nachfolgende Betreuerin zur Verfügung stellte und jederzeit, nicht nur bei fachlichen Problemen, ein offenes Ohr für mich hatte. Vor allem für das intensive Korrekturlesen, ihre Ratschläge, ihre Geduld und die vielen aufbauenden Worte bin ich ihr sehr dankbar.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Kollegin Diana Bulian bedanken, deren jahrelange Erfahrung für mich von unschätzbarem Wert war und die dadurch einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet hat.

Auch Susan Feistenauer schulde ich großen Dank für ihre tatkräftige Unterstützung in der Endphase des Schreibens.

Ferner gilt mein Dank Ramona Böhm, Dr. Julia Zorn und Ed Hollingsworth für das Korrekturlesen und ihre großartige moralische Unterstützung.

Auch meinen übrigen Arbeitskolleginnen und –kollegen möchte ich danken, die mir alle jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders zu erwähnen sind meine

Bürokollegin Dr. Monika Kraus, Nadja Lebedeva, Viola Maag, Carolin Dirr, Anja Wohlbier und Sakia Ettl.

Nicht wegzudenken sind die Tierpfleger der AVM Martina Konradt, Ingolf Krüger, Katrina Fruhmann, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden, meiner Familie und meinem Freund Michi von ganzem Herzen danken. Ihr steter Glaube an mich und Ihre Unterstützung jeglicher Art haben mir auch in den schwierigen Zeiten dieser drei Jahre viel Kraft gegeben.