

Die porcine Zona pellucida während Reifung, Befruchtung und früher Embryonalentwicklung - Eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung -

Peter Schwartz¹, Detlef Rath², Edda Töpfer-Petersen³ und Hans Wilhelm Michelmann⁴

Zusammenfassung

Oozyten sowie Präimplantationsembryonen des Schweins zeigen im Rasterelektronenmikroskop (REM) eine extrem heterogene Oberflächenstruktur der Zona pellucida (ZP). Da seit langem vermutet wird, dass diese heterogene Morphologie eine wichtige Rolle bei der Oozyten-Spermien-Interaktion spielt, sollte in einem Kooperationsprojekt die Zona-Morphologie sowie das Spermien-Bindungsmuster beim Schwein mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht werden. Die Oozyten wurden in vier Kategorien eingeteilt: unreif, in vivo gereift oder in vitro über 24 bzw. 48 Stunden gereift. Die Analyse der ZP und der Spermienbindung von frühen Embryonen richtete sich danach, ob die Embryonen in vivo oder in vitro entstanden waren. Vier verschiedene Typen der ZP waren zu unterscheiden. Ihre Morphologie reichte von einer porösen und netzartigen bis zu einer glatten und kompakten Struktur. Es bestand keine Korrelation zwischen der Heterogenität der Zona Morphologie und dem Reifezustand der Oozyten. Alle Oozyten innerhalb und zwischen Tieren zeigen extrem variable Erscheinungsbilder, ohne dass ein gewisser Trend sichtbar wurde. Während der In-vivo-Embryonalentwicklung ändert sich die Oberfläche der ZP von einem porösen zu einem mehr kompakten Zustand. Im Gegensatz dazu bleibt bei der In-vitro-Entwicklung die Zona immer in einem kompakten Zustand. Auch die Anzahl gebundener Spermatozoen sowie ihr Verteilungsmuster auf der Oberfläche der ZP zeigen innerhalb und zwischen Oozyten extreme Unterschiede. Diese waren nicht auf die unterschiedlichen Oberflächenstrukturen zurückzuführen. Massive Unterschiede in der Zahl gebundener Spermien traten nur auf, wenn durch Flowzytometrie geschlechtssortierte Spermatozoen eingesetzt wurden. Unabhängig von der Zahl inseminierter Spermien konnten immer nur sehr wenige (1 - 2) auf der ZP nachgewiesen werden. Dabei war es nicht entscheidend, ob die Oozyten in vivo oder in vitro gereift waren. Nicht sortierte Spermien banden in sehr viel höherer Zahl an der Zona. Ihre Anzahl war direkt von der Zahl inseminierter Spermien abhängig.

Schlüsselworte: Rasterelektronenmikroskopie, REM, Schwein, Zona pellucida, Oozyte, Befruchtung, Embryonalentwicklung, gesexetes Ebersperma

Abstract

The porcine Zona pellucida during maturation, fertilization and early embryo development - A scanning electron microscopic investigation -

Porcine oocytes and pre-implantation embryos from the same, as well as from different animals, have an extremely heterogeneous morphology of the zona pellucida surface, as shown by scanning electron microscopy (SEM). For years, it has been believed that this heterogeneous morphology plays an important role in the sperm-oocyte interaction. The aim of this study was to analyse the zona morphology and sperm-binding patterns on the porcine zona pellucida. Oocytes were divided into four categories: immature, matured in vivo, or matured in vitro over a time period of 24 or 48 hours. The zona morphology of early embryos grown in vivo or in vitro also was investigated. Four different types of zona morphology were detectable. They ranged from a porous, net-like structure to a nearly smooth and compact surface. No correlation could be established between the different kinds of maturation in terms of these zona types. All oocytes exhibited extremely heterogeneous zona morphology, with no clear trend. During subsequent in vivo embryo development, the zona surface changes from a porous structure to one with a compact surface, while the morphology of in vitro embryos remained compact at all stages of development. The analysis of the number and distribution patterns of spermatozoa trapped in the zona pellucida revealed extremely variable patterns, regardless of the zona morphology. Differences were only present if sorted or unsorted spermatozoa were used for insemination. Regardless of the number of inseminated spermatozoa after sorting, only a few (1 - 2) could be detected on the zona pellucida. Whether oocytes were matured in vivo or in vitro was not a relevant factor. Unsorted spermatozoa bound in higher numbers than sorted ones. The number was directly dependent on the number of spermatozoa used for insemination.

Keywords: Zona pellucida, sperm oocyte interaction, porcine embryo, SEM

¹ Universität Göttingen, Institut für Anatomie, Kreuzberggring 36, 37075 Göttingen/Deutschland

² Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Tierzucht, Höltystrasse 10, 31535 Neustadt/Deutschland

³ Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierernährung, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover/Deutschland

⁴ Frauenklinik der Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Reproduktionsmedizin, 37099 Göttingen/Deutschland; Email: hwmichel@med.uni-goettingen.de

1 Einleitung

Während der Ovulation wird die in vivo gereifte Oozyte mit all ihren für die Befruchtung und Embryonalentwicklung notwendigen Organellen und zytoplasmatischen Komponenten in das Ovidukt entlassen und kann dort von einem Spermatozoon befruchtet werden. Im Gegensatz zu der In-vivo-Befruchtung herrschen bei der In-vitro-Fertilisation (IVF) andere Bedingungen. Obwohl diese Technik in den letzten Jahren deutlich verbessert wurde und zu vielen Nachkommen geführt hat, ist die selektive Kompetenz von in vitro gereiften Oozyten immer noch sehr eingeschränkt und führt besonders beim Schwein gehäuft zu einer polyspermen Befruchtung.

Eine Voraussetzung für die Befruchtung ist, dass die Oozyte während der Meiose die Metaphase II erreicht und, parallel dazu, sowohl das Zytoplasma als auch die zytoplasmatischen Organellen ihren Reifungsprozess komplettiert haben müssen. Es ist bis heute unklar, ob auch die ZP einem Reifungsprozess unterworfen ist. Voraussetzung ist aber, dass die Glykoproteine der Zona pellucida ihre volle funktionelle Kompetenz erreicht haben müssen, um die Spermien-Oozyten-Interaktion zu vermitteln und um später den entstehenden Embryo adäquat schützen zu können. Die Glykoproteine sind ebenfalls am Auslösen der Akrosomreaktion und der nachfolgenden Penetration der Spermien durch die ZP beteiligt.

Die ZP ist eine hochspezialisierte, dreidimensionale Matrix mit einer Dicke von 16 µm beim Schwein und enthält 30 – 33 ng Glykoproteine. Sie ermöglicht die speziesspezifische Erkennung von potentiell befruchtungsfähigen Spermatozoen und die nachfolgende Gameteninteraktion. Danach schützt sie die Zygote und den präimplantatorischen Embryo bis zum Augenblick des Schlüpfens der Blastozyste (Hatching).

In der Literatur wird die ZP häufig als netzartige Struktur mit vielen Poren und Vertiefungen beschrieben, die ein filamentöses, dreidimensionales Gebilde darstellt (Magerkurth et al 1999; Michelmann 2006). Nach Aussage von Familiari et al. (2001) ist die poröse Struktur durch die Zytoplasmafortsätze der umgebenden Granulosazellen der Corona radiata entstanden. Diese Fortsätze durchdringen die Zona und stehen während der Oogenese mit dem Oolemm in Verbindung. Über Gap junctions werden Informationen ausgetauscht, die unter anderem den Zusammenbruch des germinalen Vesikulums vor der Ovulation steuern, indem sie inhibierende Substanzen aus der Follikelflüssigkeit in die Oozyte transportieren.

Neben der netzartigen, porösen Struktur wird in der Literatur aber auch eine kompakte und glatte Struktur der ZP beschrieben. Nach Aussage einiger Autoren tritt diese Struktur bei nicht ovulatorischen, unreifen Oozyten auf (Sundström 1982).

Es war das Ziel der vorliegenden Studie, die strukturellen und funktionalen Vorgänge auf der ZP des Schweins während Reifung, Befruchtung und Embryonalentwicklung mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) zu untersuchen. Unter anderem war es von besonderem Interesse herauszufinden, ob die Technik der flowzytometrischen Spermien-sortierung im Rahmen einer präkonzeptionellen Geschlechtsbestimmung (Spermien-Sexing) einen Einfluss auf die Spermienbindung an der ZP hat. Dazu wurden folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Hängt die Morphologie der ZP vom Reifegrad der Oozyte ab?
2. Gibt es Unterschiede in der Zona-Morphologie von Oozyten, die in vivo oder in vitro gereift wurden?
3. Ändert sich die Zona-Morphologie nach der Befruchtung und während der frühen Embryonalentwicklung?
4. Gibt es Unterschiede in der Zona-Morphologie zwischen In-vivo- und In-vitro-Embryonen?
5. Gibt es eine Korrelation zwischen der Anzahl gebundener Spermatozoen und
 - der Anzahl inseminierter Spermatozoen?
 - dem Reifungsverfahren (in vivo vs. in vitro) für Oozyten?
 - dem Einsatz sortierter und nicht unsortierter Spermatozoen?

2 Material und Methode

Die Oberflächen-Morphologie der ZP wurde an 425 befruchteten und unbefruchteten Schweine-Oozyten und an 264 frühen Embryonen mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen (REM) Bildern analysiert. Die Oozyten waren entweder unreif (n = 32), in vivo gereift (n = 90) oder für 24 h (n = 54) bzw. für 48 h (n = 249) in vitro gereift. Die Präimplantationsembryonen wurden entweder nach In-vivo-Entwicklung ausgespült (n = 155) oder in vitro kultiviert (n = 109).

In vivo gereifte Oozyten wurden von 4 bis 5 Monate alten, präpuberalen und hormonell stimulierten Schlachttieren aus der institutseigenen Versuchstierherde Mariensee gewonnen. Unreife Oozyten von Schlachthoftieren wurden nach der Methode von Rath et al. (1999) und Probst und Rath (2003) in vitro maturiert. Für die In-vitro-Fertilisation der in vivo und in vitro gereiften Oozyten mit nicht sortierten Spermien wurden zwischen 75 und 1500 Spermatozoen eingesetzt. Nach dem Sortieren im Flowzytometer wurden mit einer Ausnahme 75 bis 250 Spermien pro Oozyte inseminiert. Die Spermatozoenpräparation für die IVF geschah nach der Methode von Rath und Niemann (1997) mit nachfolgender Kryokonservierung (Westendorf et al. 1975) und Kryolagerung bis zur IVF.

Zur präkonzeptionellen Geschlechtsbestimmung wurden

Spermatozoen aus dem Nativejakulat mit einem Flow Cytometer (Cell Sorter; MoFlo. Dakocytomation, Fort Collins, CO, USA) gemäß ihrer X- oder Y-Chromosomen nach dem Verfahren von Rath et al. (1999) sortiert.

In vivo gewachsene Embryonen kamen, wie die in vivo gereiften Oozyten, aus geschlachteten, hormonell stimulierten Versuchstieren der institutseigenen Herde. Sie waren zuvor mit 10⁹ Spermatozoen/100 ml Androhep besamt worden.

Die rasterelektronenmikroskopische Aufarbeitung der Oozyten und Embryonen geschah nach dem Verfahren von Schwartz et al. (2003).

Die Analyse der Zona Morphologie sowie das Auszählen der gebundenen Spermatozoen auf der ZP war nur auf derjenigen Hälfte der Zona Oberfläche möglich, die im REM-Bild sichtbar wurde.

3 Ergebnisse

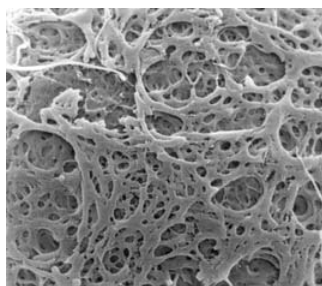
3.1 Morphologie der Zona pellucida

Um die Morphologie der ZP an Hand von REM-Aufnahmen analysieren und zuordnen zu können, war es notwendig, die verschiedenen Erscheinungsformen zu typisieren. Solch eine Zuordnung ist jedoch fast unmöglich, da es innerhalb und zwischen Oozyten fließende Übergänge der einzelnen Zona-Typen gibt. Deshalb ist jede Einordnung in hohem Maße subjektiv.

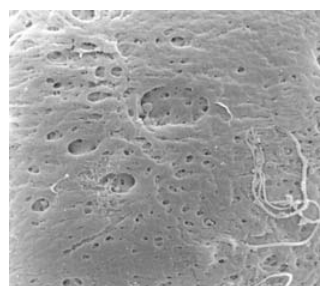
Trotz dieser Einschränkung wurden vier verschiedenen Zona-Typen festgelegt (Tabelle 1; Abbildung 1).

Tabelle 1:
Oberflächenmorphologie von Schweineoozyten und frühen Embryonen

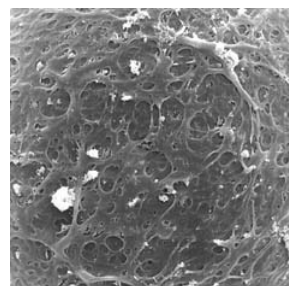
Typ 1:	Netzartige Struktur mit Poren, zerklüftete Oberfläche
Typ 2:	Glatte Oberfläche mit Poren durchsetzt, keine Netzstruktur sichtbar
Typ 3:	Netzartige Oberfläche ohne Poren; Oberfläche glatt
Typ 4:	Glatte Oberfläche ohne Netz und ohne Poren



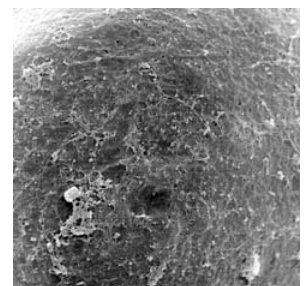
Typ I
Netzartige Struktur mit Poren, zerklüftete Oberfläche



Typ II
Glatte Oberfläche mit Poren durchsetzt, keine Netzstruktur sichtbar



Typ III
Netzartige Oberfläche ohne Poren, Oberfläche glatt



Typ IV
Glatte Oberfläche ohne Netz und ohne Poren

Abbildung 1:
Oberflächenmorphologie von Schweineoozyten

Der Typ I stellt eine netzartige Struktur dar mit vielen fensterartigen Löchern und Poren. Der Typ II hat eine raue Oberfläche, die manchmal gefaltet ist und viele Risse und Poren aufweist. Die Netzstruktur ist völlig verschwunden. Eine relativ glatte Oberfläche mit keinen oder sehr wenigen Poren zeigt Typ III, der aber eine ausgeprägte Netzstruktur aufweist. Typ IV hat weder Poren noch eine Netzstruktur. Die Oberfläche erscheint kompakt, eben und manchmal gewellt.

3.2 Die Zona-Morphologie von unreifen sowie in vitro und in vivo gereiften Oozyten

Die Analyse sowohl unreifer als auch reifer Oozyten ergab eine sehr heterogene Zona-Morphologie ohne einen einheitlichen Trend (Tabelle 2). Diese Heterologie war auf einzelnen Oozyten und zwischen Oozyten einzelner Reifegruppen zu beobachten. Nur unreife Oozyten hatten zum größten Teil (40,6 %) den netzartigen und porigen Typ (Typ I). Typ IV mit seiner kompakten und geschlossenen Oberfläche kam kaum vor (Abbildung 2). Nach einer In-vivo- bzw. In-vitro-Reifung veränderte sich die Zona Struktur hin zu dem geschlossenen und kompakten Typ (Typ III und IV).

Tabelle 2:
Oberflächenmorphologie unreifer (u), in vivo gereifter (VV) und über 24 (vt24) bzw. 48 (vt48) Stunden in vitro gereifter Oozyten

	Typ I (%) Netz und Poren	Typ II (%) Poren	Typ III (%) Netz	Typ IV (%) glatt
u n = 32	40,6	28,1	28,1	3,1
vv n = 90	21,1	5,6	41,1	32,2
vt24 n = 54	11,1	31,5	13,0	44,4
vt48 n = 249	15,7	7,2	47,0	30,1

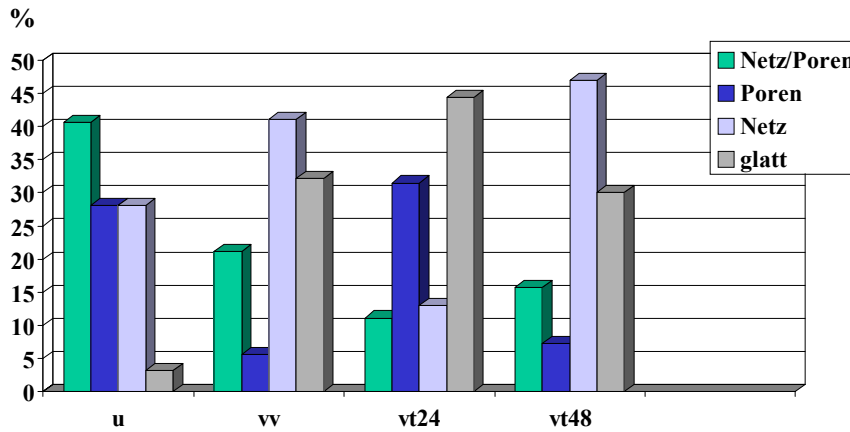


Abbildung 2: Oberflächenmorphologie unreifer (u), in vivo gereifter (vv) und über 24 (vt24) bzw. 48 (vt48) Stunden in vitro gereifter Oozyten

3.3 Spermatozoenbindung an den Oozyten

Es wurde das Bindungsmuster von Spermatozoen nach In-vitro-Fertilisation an in vivo (vv) und in vitro (vt) gereiften Oozyten überprüft. Zur Insemination eingesetzten Spermatozoen waren vorher gemäß ihres X- oder Y-Chromosoms sortiert worden. Als Kontrolle dienten unsortierte Samenzellen (Tabelle 3). Trotz der Tatsache, dass in einigen Gruppen die Zahl ausgewerteter Oozyten sehr gering war, ist es

offensichtlich, dass sortierte Spermatozoen im Vergleich zu unsortierten Samenzellen nur in sehr geringer Zahl an der Zona binden (Tabelle 4; Abbildung 3). Bei den sortierten Samenzellen war es auch ohne Bedeutung, in welcher Anzahl (75 oder 250) sie zur Insemination eingesetzt wurden (Tabelle 3). Dies war mit unsortierten Samenzellen anders. Die Anzahl der an der Zona gebundenen, unsortierten Spermatozoen nahm proportional mit zunehmender Zahl inseminierter Samenzellen ebenfalls zu (Abbildung 4).

Tabelle 3: Anzahl der an die Zona pellucida gebundenen Spermien (n = 277)

	vv75	vv75	vv75	vt75	vt75	vv250	vv750	vt1500
		sort Y	sort X	sort Y	sort X			
n	24	5	2	45	50	8	24	112
\bar{x}	13,3	0,6	0	1,4	1,1	1,8	19	32,9
\pm SD	7,7	0,8		1,9	1,8	3,2	14	14,2

vv: in vivo gereift:75/250/750/1500: Anzahl inseminierter Spermien
vt: in vitro gereift: sort Y / sort X: für Y- oder X-Chromosom sortierte Spermien

Tabelle 4: Bindungsfähigkeit sortierter und unsortierter Spermien (75 Spermien/Oozyte)

Oozyten IVF* mit	In vivo gereift unsortierten Spermien	In vivo gereift sortierten Spermien	In vitro gereift sortierten Spermien
n	24	7	95
\bar{x}	13,3	0,4	1,2
\pm SD	7,7	0,7	1,8

* 75 Spermien/Oozyte

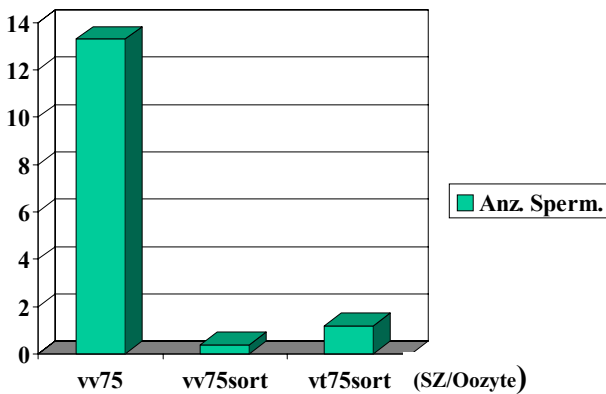


Abbildung 3: Bindungsfähigkeit sortierter und nicht sortierter Spermatozoen (SZ) (75 Spermatozoen/Oozyte)

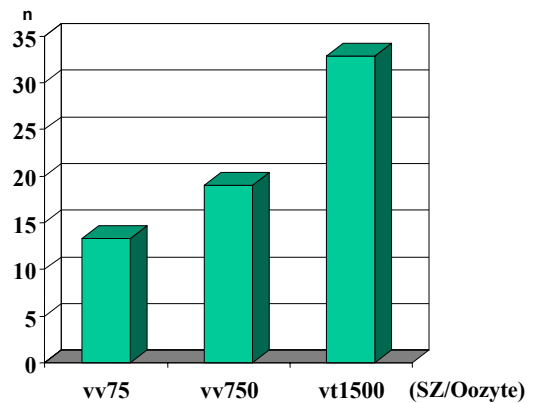


Abbildung 4: Anzahl der pro Oozyte gebundenen, nicht sortierten Spermien (160 Oozyten)

Die Verteilung gebundener Spermatozoen auf der Oberfläche der Zona war auf allen Oozyten sehr heterogen. Es gab sowohl eine gleichmäßige als auch eine ungleichmäßige, clusterförmige, Verteilung. Bereiche ohne ein einziges Spermatozoon lagen häufig dicht neben Bereichen, die mit Samenzellen überladen sind.

Die Inseminationsdauer betrug *in vitro* 18 Stunden. Die Bindung der Samenzellen war häufig nur sehr oberflächlich ohne tiefes Eindringen der Köpfe in die Zona (Abbildung 5). Das anschließende Eindringen der Spermatozoen in die Zona war kein Prozess, der ausschließlich durch mechanische oder enzymatische Einwirkungen des Spermatozoons durchgeführt wird. Auch die Zona war aktiv daran beteiligt, in dem sie den Spermatozoenkopf überwucherte und ihn so in sich integrierte (Abbildung 6). Vereinzelt

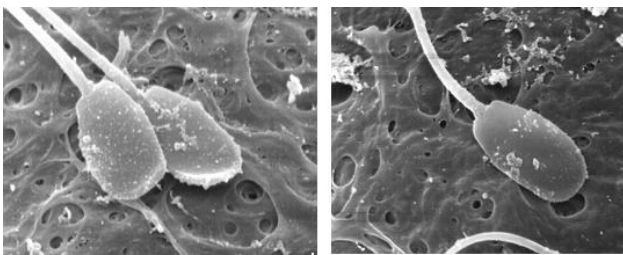


Abbildung 5: Lockere Bindung von Y-Spermatozoen auf der Zona pellucida (Typ III) von *in-vitro* gereiften Eizellen

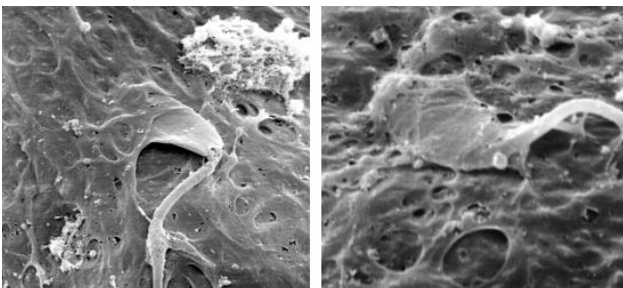


Abbildung 6: Überwuchern des Spermatozoon-Kopfes durch Zona-Material

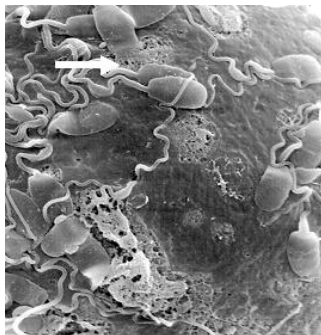


Abbildung 7: Mögliche Wirkung des Akrosins auf die Zona pellucida (weißer Pfeil)

Tabelle 5: Oberflächenmorphologie *in vivo* produzierter Embryonen (n = 155)

	Typ I (%) Netz und Poren	Typ II (%) Poren	Typ III (%) Netz	Typ IV (%) glatt
Zygote (n = 26)	76,9	3,9	3,9	15,3
2-Zeller (n = 84)	79,8	11,9	1,2	7,1
4-Zeller (n = 23)	56,5	17,4	4,4	21,7
Blastozyste (n=22)	0	9,1	9,1	81,8

Tabelle 6: Oberflächenmorphologie *in vitro* erzeugter Embryonen

	Typ I (%) Netz und Poren	Typ II (%) Poren	Typ III (%) Netz	Typ IV (%) glatt
2-Zeller (n = 15)			13,3	86,7
4-Zeller (n = 13)			7,7	92,3
Morula (n = 38)	18,4	7,9	15,8	57,9
Frühe Blastozyste (n = 19)	5,3	15,8	5,3	73,7
Späte Blastozyste (n = 24)			20,8	97,2

schien die Wirkung des Akrosins auf die Zona sichtbar, und ließ sich als lytischer Prozess darstellen (Abbildung 7).

3.4 Morphologie der Zona pellucida von *in vivo* gewachsenen Embryonen

Es wurden 155 *in vivo* gewachsene Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht (Tabelle 5). Diese Stadien reichten von der Zygote bis zur geschlüpften Blastozyste. Es wurde deutlich, dass mit fortschreitender *In-vivo*-Entwicklung die Zona immer kompakter, glatter sowie geschlossen wurde und sich immer mehr zum Zona-Typ IV entwickelte (Abbildung 8a).

Ein Vergleich der *in vivo* gereiften Oozyten mit den *in vivo* gewachsenen Embryonen zeigte, dass sich die Zona Morphologie nach der Befruchtung ändert (Abbildung 9a). Während die Mehrzahl der Oozyten eine porenfreie Zona aufwies, dominierte nach der Befruchtung von der Zygote bis zum 4-Zeller die netzartige, porige ZP. Erst bei der Blastozyste überwog wieder der kompakte, glatte Zona Typ.

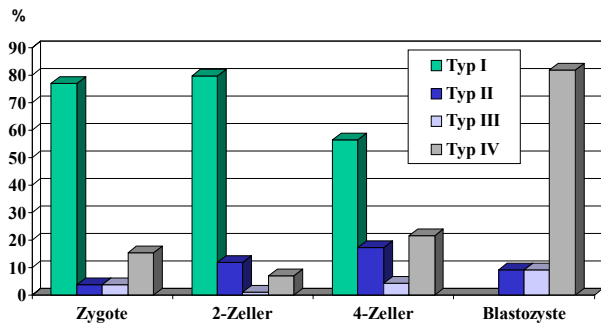


Abb. 8a: Oberflächenmorphologien (%) von in-vivo erzeugten Embryonen (n = 155)

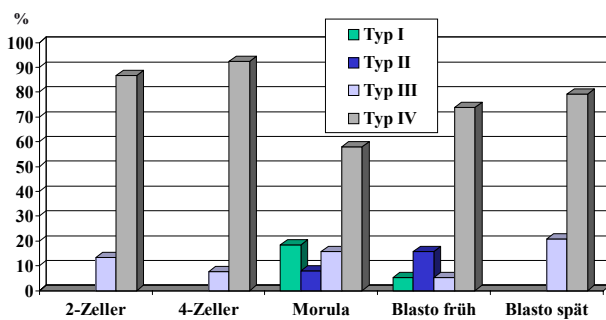


Abb. 8b: Oberflächenmorphologien (%) von in-vitro erzeugten Embryonen (n = 109)

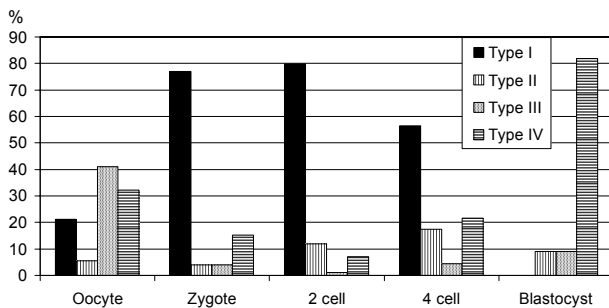


Abb. 9a: Oberflächenmorphologien (%) von in vivo gereiften Oozyten sowie in vivo gewachsenen Embryonen

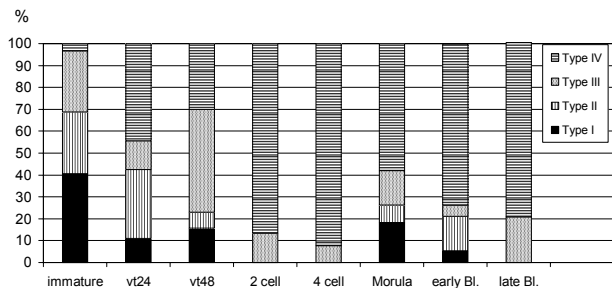


Abb. 9b: Oberflächenmorphologien (%) von unreifen und in vitro gereiften Oozyten sowie in-vitro erzeugten Embryonen

3.5 Morphologie der Zona pellucida von in vitro gewachsenen Embryonen

Die Oberflächenmorphologie von in vitro gewachsenen Embryonen zeigte ein mehr oder weniger einheitliches Erscheinungsbild (Tabelle 6). Mehr alle 70 % aller Embryonalstadien hatte eine kompakte Zona mit keinen oder wenigen Poren, keiner Netzstruktur und einer glatten Oberfläche (Abbildung 8b). Fasst man die Daten von unreifen sowie in vitro gereiften Oozyten sowie in vitro gewachsenen Embryonen zusammen, so wird deutlich, dass es große Unterschiede in der Zona Morphologie zwischen Oozyten und Embryonen gibt (Abbildung 9b). Während unreife Oozyten eine raue, poröse, gefensterte und netzartige Zona aufwiesen, veränderte sich diese nach der Befruchtung und während der Embryonalentwicklung zu einer kompakten, ebenen und geschlossenen Form ohne Netzstruktur und ohne oder nur wenigen Poren.

3.6 Spermatozoenbindung auf In-vivo-Embryonen

Nach einer Insemination mit 10^9 Spermatozoen wurden unterschiedliche Embryonalstadien zu unterschiedlichen Zeiten ausgespült. Die Analyse der frühen Embryonal-

Tabelle 7:

Mittelwert der an die Zona pellucida von in-vivo und in-vitro produzierten Embryonen gebundenen Spermien

	Zygote (\bar{x} ± SD)	2-Zeller (\bar{x} ± SD)	4-Zeller (\bar{x} ± SD)	Morula (\bar{x} ± SD)	Blasto- zyste (\bar{x} ± SD)	ge- schlüpfte Blasto- zyste (\bar{x} ± SD)
In vivo (n = 154)	4,7 ± 7,6	17,8 ± 18,8	13,0 ± 16,8		21,3 ± 15,6	
In vitro (n = 19)		6,9 ± 5,5	11,3 ± 9,0	8,3 ± 7,9	1,3 ± 1,5	7,6 ± 6,7

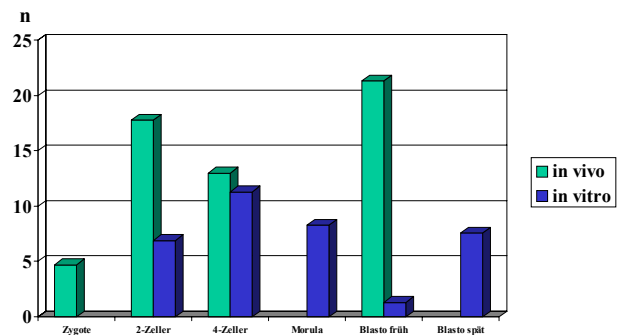


Abbildung 10: Anzahl gebundener Spermien an in-vivo und in-vitro erzeugten Embryonen (n = 263)

stadien machte eines sehr deutlich: Mit zunehmender Embryonalentwicklung nimmt die Zahl gebundener Spermatozoen an der Zona zu (Tabelle 7; Abbildung 10). Dies bedeutet, dass während der Passage der Embryonen durch das Ovidukt sich mehr und mehr Spermatozoen an die Zona binden. Dies passiert trotz des vorhandenen Zona-Blocks. Die Spermatozoen hatten sich nicht nur lose angeheftet sondern sind so tief in die Zona eingedrungen, dass nur noch ihre Schwänze sichtbar waren (Abbildung 11).

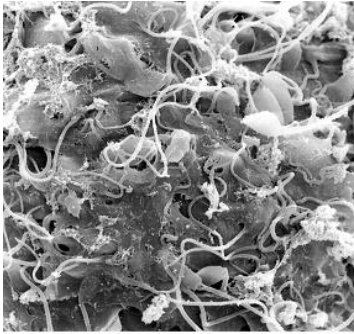


Abbildung 11:
Zahlreiche Spermatozoen auf einem In-vivo-Embryo

3.7 Spermatozoenbindung auf In-vitro-Embryonen

Im Gegensatz zu den In-vivo-Embryonen zeigten die In-vitro-Embryonen keine Zunahme von gebundenen Spermatozoen mit zunehmender Embryonalentwicklung (Tabelle 8; Abbildung 12). Solch eine Zunahme ist auch nicht zu erwarten, da die Oozyten für eine In-vitro-Fertilisation nur maximal 18 Stunden mit den Spermatozoen zusammen

Tabelle 8:

Anzahl der an die Zona pellucida gebundenen Spermien bei in vitro erzeugten Embryonen

	2-Zeller	4-Zeller	Morula	Frühe Blastozyste	Späte Blastozyste
n	15	13	38	19	24
$\bar{x} \pm SD$	$6,9 \pm 5,5$	$11,3 \pm 9,0$	$8,3 \pm 7,9$	$1,3 \pm 1,5$	$7,6 \pm 6,7$

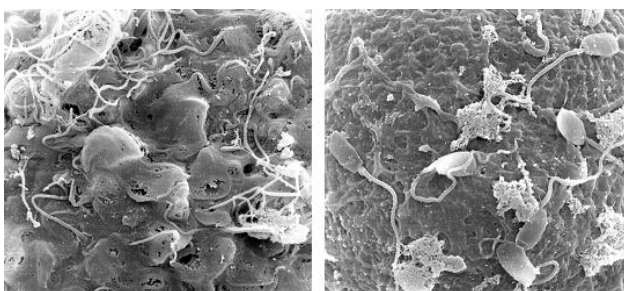


Abbildung 12:
Spermatozoenbindung an späten Blastozysten

bleiben. Danach findet ein Mediumwechsel statt, bei dem die Zygoten aus der Spermasuspension entfernt werden. Es gibt einen weiteren Unterschied zu den In-vivo-Embryonen: Bei den In-vitro-Embryonen ist die Interaktion zwischen Oozyte und Spermien nur sehr locker ohne ein tiefes Eindringen der Spermatozoen.

4 Diskussion

4.1 Oberflächenstruktur der Zona pellucida

Die Oberflächenstruktur von Oozyten verschiedener Säugetiere wurde bereits von vielen Autoren beschrieben. Sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen, Hamstern, Schweinen und Rindern können zwei Strukturtypen klar voneinander unterschieden werden. Zum einen wird die netzartige, poröse Struktur, die aus mehreren Lagen eines perlartigen, filamentösen Materials aufgebaut wird, beschrieben. Andererseits tritt die Zona mit einer glatten, kompakten Struktur ohne Netz und ohne Poren auf. Beide Strukturtypen können sowohl auf den Oozyten und Embryonen eines Tieres als auch auf einzelnen Oozyten bzw. Embryonen auftreten.

Gegensätzliche Meinungen bestehen darüber, wann diese unterschiedlichen Strukturtypen auftreten. Es wird dabei einen Zusammenhang zwischen der Oberflächenmorphologie und dem Reifestadium der Oozyte (Calafell et al. 1992) vermutet. Andere Autoren schreiben der reifen Oozyte die poröse, netzartige Oberfläche zu, wohingegen die unreife Oozyte eine mehr oder weniger kompakte, porenfreie Oberfläche haben soll (Familiari et al. 1992). Diese Aussage konnte von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden. Sie fanden eine netzartige, poröse Zona bereits im Stadium des germinalen Vesikulums der unreifen Oozyte. In diesem Stadium soll die poröse Struktur dadurch entstehen, dass zytoplasmatische Ausläufer der Corona-Radiata-Zellen durch die Zona Kontakt mit dem Oolemm aufnehmen (Macchiarelli et al. 1992; Suzuki et al. 1994; Sathananthan 1994).

4.2 Vergleich der Zona Morphologie zwischen unbefruchteten Oozyten und frühen Embryonen

Nach der Penetration des Spermatozoons in die ZP bildet sich der sog. Zona Block, der zu Änderungen der physikalischen und chemischen Charakteristika der Zona führt. In Verbindung mit diesen biochemischen Veränderungen wären auch morphologische Modifikationen auf der Zona-Oberfläche zu erwarten. Diese müssten in REM-Aufnahmen sichtbar werden. In der Literatur gibt es darüber widersprüchliche Aussagen. Familiari et al. (1992) konnten keine Veränderungen auf der Zona-Oberfläche entdecken, die mit einer Befruchtung zusammenhängen.

Suzuki et al. (1994) dagegen stellten einen signifikanten Unterschied zwischen unbefruchteten und befruchteten Oozyten bzw. Embryonen fest. Nach ihren Untersuchungen haben unbefruchtete Oozyten eine ZP, die dem Typ I entspricht, während nach der Befruchtung der Typ IV mehrheitlich auftritt.

Unsere eigenen Daten zeigen Unterschiede in der Zona Morphologie zwischen Oozyten und Embryonen, die entweder in vivo oder in vitro gereift und gewachsen sind. In vivo tritt ein dramatischer Wechsel nach der Befruchtung in der Oberflächenstruktur der Zona auf. Während die reifen, unbefruchteten Oozyten in der Mehrzahl eine kompakte und porenfreie Oberfläche zeigen, erscheint nach der Befruchtung die netzartige und poröse Oberfläche. Der Anteil an Embryonen mit dieser Form nimmt dann während der weiteren Entwicklung ab um im Blastozystenstadium wieder die kompakte Struktur zu erreichen, die auch bei unbefruchteten Oozyten zu beobachten ist. Die Gründe für diese Veränderung bleiben spekulativ. Es ist auffällig, dass auch die Mehrzahl der in vitro gereiften Oozyten im Gegensatz zu unreifen Oozyten eine porenfreie, kompakte Oberfläche aufweist. Diese Struktur bleibt jedoch erhalten, wenn sich eine In-vitro-Kultur anschließt. Bis zur Blastozyste gibt es bei den In-vitro-Embryonen keine Veränderungen der Zona Morphologie mehr.

4.3 Spermatozoenbindungsmuster an Oozyten und frühen Embryonen

Nachdem das Spermium die Oberfläche der Zona erreicht hat, kann eine Bindung zwischen beiden auf eine sehr heterogene Art und Weise stattfinden. Von lichtmikroskopischen Bildern ist bekannt, dass die Anzahl gebundener Spermatozoen sowie das Bindungsmuster große Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen Oozyten aufweisen. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Oozyten von verschiedenen oder denselben Tieren stammen. Auch auf REM Bildern wird diese Heterogenität deutlich. Es gibt keine einheitliche Bindungsform. In der Mehrzahl der Fälle sieht man eine flache, tangentielle Anlagerung des Äquatoralsegmentes des Spermatozoenkopfes mit einer nachfolgenden Verschmelzung in genau dieser Position. Es gibt jedoch auch die vertikale Bindung mit der Kopfspitze voran. Besonders an Stellen, an denen viele Samenzellen dicht an dicht nebeneinander an der Zona gebunden sind, kann man diese Art der Bindung am häufigsten sehen.

Die Anzahl gebundener Samenzellen hängt sehr stark davon ab, ob sie vorher einem Sortierungsvorgang unterworfen waren oder nicht. Nach der flowzytometrischen Sortierung der Spermatozoen im Hinblick auf ihr Geschlechtschromosom können nur extrem wenige Spermien auf der Zona nachgewiesen werden. Dabei ist es egal, ob mit 75 oder 250 Spermatozoen inseminiert wurde und ob

die Oozyten in vivo oder in vitro gereift waren. Dies bedeutet, dass der Sortiervorgang das Bindungspotenzial der Samenzellen deutlich herabsetzt. Welche der für die Bindung notwendigen Rezeptoren durch die Einwirkung des Fluoreszenzfarbstoffes, des Lasers oder der mechanischen und elektrischen Belastung dabei die entscheidend negative Rolle spielt, ist unbekannt. Von unsortierten Spermatozoen wird stets eine sehr viel größere Spermienzahl an der Zona gebunden. Diese Zahl hängt proportional von der Zahl inseminierter Spermatozoen ab.

Es ist auffällig, dass selbst in sehr ausführlichen Übersichtsartikeln, in denen im Detail auf alle Vorgänge während der Oozyten-Spermien-Bindung eingegangen wird, die Penetration der Zona pellucida durch die Samenzelle nur oberflächlich abgehandelt wird. Als Standarderklärung wird fast immer angeführt, dass die Penetration der Zona sowohl durch Bewegung als auch enzymatisch durch Proteasen und Glykosidasen vollzogen wird. Nach Bedford (2004) ist es aber als sicher anzusehen, dass die bei der Akrosomenreaktion freigesetzten Enzyme die Zona pellucida an der Bindungsstelle nicht auflösen. Dies steht im Widerspruch zu Hardy et al. (1991) und Yamagata et al. (1998), die eine enzymatische Reaktion beschreiben. Bedford (2004) vertritt die Ansicht, dass sich das Spermatozoon allein durch mechanische Kraft durch die Zona bohrt, während nach Sutovsky et al. (2004) die Penetration des Spermatozoons allein durch proteolytische Aktivitäten von akrosomalen Proteasomen gewährleistet wird. Vertreter beider Denkrichtungen führen unzählige Beweise an, warum die Enzym-Theorie bzw. das mechanische Modell richtig sein sollen (Yanagimachi 1988).

Zur Frage der Mechanik der Spermatozoenpenetration in und durch die Zona pellucida liefern REM Aufnahmen aufschlussreiche Bilder. Es wird auf diesen deutlich, dass Spermien nicht ausschließlich durch Druck oder enzymatische Einwirkung ihren Weg durch die Zona bahnen, sondern dass möglicherweise die Zona selbst an der Penetration beteiligt ist. Wie auch beim Menschen (Schwartz et al. 2006), ist die ZP des Schweins aktiv an der Penetration des Spermiums beteiligt. Nach ihrer Bindung an die Zona werden die Spermien von filamentös erscheinender, extrazellulärer Matrix aus Zona Material umschlossen und so in die Zona integriert.

Vergleicht man die Zahl gebundener Samenzellen an In-vivo- und In-vitro-Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstufen so wird deutlich, dass die In-vivo-Embryonen mit fortschreitendem Entwicklungsstadium eine immer größere Zahl gebundener Samenzellen zeigen. Es finden also während der Eileiterpassage weitere Bindungen trotz vorhandenem Zonablock statt. Diese Bindungen sind so intensiv, dass die Spermatozoenköpfe tief in der Zona stecken und nur noch ihre Schwänze sichtbar sind. Damit ist die Aussage von Hoodbhoy und Dean (2004) nicht richtig,

dass an frühe Embryonen keine Samenzellen mehr binden.

Da die In-vitro-Embryonen während ihrer Entwicklung keinen weiteren Kontakt mehr mit Spermatozoen haben, ist dieses Phänomen einer zusätzlichen Bindung nicht zu sehen. Auch ist die Bindung nach IVF nur sehr locker und oberflächlich und deutet auf eine insuffiziente Bindung hin. Weitere Optimierungsschritte der In-vitro-Befruchtungsmethoden sind daher für Nutztiere ebenso notwendig wie für die Befruchtung menschlicher Oozyten.

Literatur:

- Bedford JM (2004) Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev* 79:429-460
- Calafell JM, Nogues C, Ponsa M, Santalo J, Egozcue J (1992) Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes : analysis by scanning electron microscopy. *J Assisted Reprod Genet* 9:365-372
- Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM (1992) Human zona pellucida during in vitro fertilization : an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbonylhydrazide. *Mol Reprod Dev* 32:51-61
- Hardy DM, Oda MN, Friend DS, Huang TTF (1991) A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem J* 275:759-766
- Hoodbhoy T, Dean J (2004) Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* 127:417-422
- Macchiarelli G, Vizza E, Nottola SA, Familiari G (1992) Cellular and microvascular changes of the ovarian follicle during folliculogenesis : a scanning electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* 55:191-204
- Magerkurth C, Töpfer-Petersen E, Schwartz P, Michelmann HW (1999) Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida : influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. *Hum Reproduction Oxf* 14:1057-1066
- Michelmann HW (2006) Oozyten-Morphologie und Eizell-Samenzell-Interaktion. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 3:180-183
- Probst S, Rath D (2003) Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 59:961-973
- Rath D, Niemann H (1997) In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen/thawed ejaculated or frozen/thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47:785-793
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA (1999) In vitro production of sexed embryos for gender preselection : high speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce piglets after embryo transfer. *J Anim Sci* 77 3346-3352
- Sathananthan AH (1994) Ultrastructural changes during meiotic maturation in human oocytes : unique aspects of the human oocyte. *Microscopy Res Technique* 27:145-164
- Schwartz P, Hinney B, Nayudu PL, Michelmann HW (2003) Oocyte-sperm interaction in the course of IVF : a scanning electron microscopy analysis. *RBM online* 7:83-88
- Schwartz P, Hinney B, Rath D, Michelmann HW (2006) Auf dem Weg der Samenzelle in die Eizelle entdeckt die Forschung immer noch neue Phänomene und Hindernisse. *J Reprodmed Endokrinol* 1:39-44
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN (2004) Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol Reprod*

71(5):1625-1637

- Suzuki H, Yang X, Foote RH (1994) Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilisation in vitro. *Mol Reprod Dev* 38:421-430
- Westendorf P, Richter L, Treu H, Heidecke FW, Zimmermann F (1977) Tiefgefrierung von Ebersperma : Besamungsergebnisse mit dem Hülseberger Paillettenverfahren. *Dtsch Tierärztl Wschr* 84:41-42
- Yamagata K, Murayama K, Kohno N, Kashiwabara S, Baba T (1998) p-Aminobenzidine-sensitive acrosomal protease(s) other than acrosin serve the sperm penetration of the egg zona pellucida in mouse. *Zygote* 6:311-319
- Yanagimachi R (1988) Sperm-egg fusion. *Curr Top Membr Transp* 32:3-43

