

6. SUMMARY

The present study is comprised of two major parts:

- I. in vivo production of zygotes and investigations of the pronucleus development on the light microscopic and ultrastructural level,
- II. in vitro production of zygotes obtained from in vivo or in vitro matured oocytes and comparative investigations of pronucleus development on the light microscopic level.

I.
For the study on in vivo pronucleus development, gilts were synchronized by ingestion of Zink-Metallibur in the feed for 15 days. On Day 16 each gilt was treated with PMSG (1200 IU) followed 72 h by hCG (500 IU i.m.). Gilts were inseminated 24 and 36 h after the onset of estrus followed by slaughter at 40 h, 44 h, 48 h, 52 h, 56 h, 60 h and 64 h after hCG injection.

The following results were obtained:

1. The ovulation rate increased from 38% to 87% from 40 to 45 h and remained constant thereafter.
2. At 40 h, 36% of oocytes were penetrated by a single spermatozoon. The rate of fertilization increased from 36% (40 h), 59% (44 h), 65% (48 h), 73% (52 h), to 76% (56 h), 80% (60 h) and to 64% (64 h). At 40 h all fertilized ova contained a decondensed sperm head. After another 4 to 8 h early pronuclei were a common feature, and 52 h after hCG treatment apposed pronuclei were predominant. The first cleavage stages were recorded 64 h after hCG injection.
3. The onset of DNA replication was observed at flushing at 56 h after hCG when 3 ova displayed both ^3H - and ^{14}C -labelling. Another 9 ova displayed ^3H -labelling, while additional ^{14}C -labelling was only observed in a single pronucleus in 3 ova. At flushing at 60 h, 6 ova displayed weak ^3H -labelling, however no labelling was observed in the remaining 8 ova. At flushing at 64 h, all 12 ova had pronuclei without labelling.
4. At 51 h after hCG formation of pronuclear envelope was observed, while no nucleolus precursor bodies or earlier stages to these structures were found. At 55 h a few clusters of small electron dense granules were observed together with condensed chromatin. At 59 h the apposed regions of both pronuclei contained nucleolus precursor bodies and condensed chromatin in close contact with both clusters of small granules and clusters of an additional category of large granules, and the nuclear envelope. Additionally, large accumulations of the small granules were found in vicinity of similarly sized accumulations of the large granules without chromatin association. At 63 h the spherical accumulations of large granules on some occasions presented a central vacuole, and condensed chromatin and clusters of small granules were

attached to its periphery. Within the vacuole, electron-dense material was found.

II.

To elucidate the developmental differences occurring after *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured either *in vitro* or *in vivo*, the present experiment investigated the morphological changes from penetration to the two cell stage. Oocytes were examined every 2 to 4 h from 4 to 32 h after *in vitro* insemination.

In this part of the study following results were obtained:

1. The penetration rate was significantly higher ($p < 0.05$) for *in vivo* matured oocytes (69.8%) as compared to *in vitro* matured oocytes (35.0%).
2. Penetration of spermatozoa into the ooplasm was first recorded 6 h (*in vitro* matured oocytes) and 4 h (*in vivo* matured oocytes), respectively, after addition of the spermatozoa to the oocytes.
3. For *in vivo* and *in vitro* matured oocytes, a 2 h period was required for sperm head decondensation, however, the maximum of sperm head decondensation was detected two hours later in *in vitro* matured oocytes. Within 6 h $41.7 \pm 5.6\%$ of the *in vivo* matured oocytes had completed second meiotic division, whereas only $20.8 \pm 6.5\%$ of the *in vitro* matured oocytes reached this developmental stage ($p < 0.01$).
4. For *in vitro* matured oocytes it was found that male pronucleus formation was retarded 2-4 h after onset of insemination and development of the female pronucleus was enhanced as compared to *in vivo* matured oocytes. Synchronized apposed pronuclei were observed 14 h after insemination in *in vitro* matured oocytes and 8 h in *in vivo* matured ones. Synkaryosis was first observed at 16 and 18 h in *in vivo* and *in vitro* matured oocytes, respectively. First cleavage was observed 32 h (*in vitro* matured oocytes) and 28 h (*in vivo* matured oocytes) after insemination.

It is concluded that under *in vivo* conditions at 40 h after hCG all fertilized ova contain a decondensed sperm head and after another 4-8 h early pronuclei are common. At 52 h after hCG treatment apposed pronuclei are predominant. The S-phase in porcine zygotes is initiated at 56 h post hCG injection and is of a duration of $4\frac{1}{2}$ to $7\frac{1}{2}$ h. The progress of the S-phase is in parallel to the appearance of and a complex interaction between different granules in the nucleoplasm testifying specific dynamics of RNA/RNP at that early stage in pig pronuclei. Under *in vitro* conditions it was documented that oocytes matured *in vitro* display lower penetration and cleavage rates, and asynchronous pronucleus development as well as delayed cleavage as compared to oocytes matured *in vivo*.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Jozef Laurincik

Morphologie des ersten Zellzyklus des präimplantatorischen Schweineembryos

In vivo gereifte und durch Aspiration von präovulatorischen Follikeln gewonnene porcine Oocyten können in vitro mit frischem Ebersamen (CHENG et al. 1986; YOSHIDA 1987; YOSHIDA et al. 1990; RATH 1992) oder mit tiefgefrorenem/aufgetautem Nebenhodensperma (NAGAI et al. 1988) befruchtet werden. Ebenso ist es gelungen, in vitro gereifte porcine Oozyten in vitro zu befruchten (MATTIOLI et al. 1988a; YOSHIDA et al. 1993). Hierbei aber führen Polyspermie (NAGAI et al. 1984; CHENG 1985; MATTIOLI et al. 1988a) und eine asynchrone Bildung des männlichen Vorkernes (MOTLIK und FULKA 1974; NAGAI et al. 1984; MATTIOLI et al. 1988a; NAITO et al. 1988) zu einer gestörten frühembryonalen Entwicklung, wodurch eine mögliche praktische Anwendung der IVF- Technologie, beispielsweise zur Erzeugung transgener Schweine durch Mikroinjektion in den Vorkern von Zygoten, begrenzt wird.

Vor diesem Hintergrund waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- (1) den Zeitpunkt der Ovulation, den Ablauf von Befruchtung und Vorkementwicklung bei superovulierten Jungsauen zu definieren,
- (2) Vorkementwicklung und Ultrastruktur in Relation zur Chronologie der S-Phase in porcinen, in vivo gewonnenen Zygoten zu charakterisieren,
- (3) die Reihenfolge der morphologischen Veränderungen zu untersuchen, welche auf die Befruchtung von in vivo oder vitro gereiften, porcinen Kumulus-Oocyten-Komplexen (COC) folgen.

- (1) Zeitpunkt von Ovulation und Vorkementwicklung bei superovulierten Jungsauen

Bei 45 geschlechtsreifen Jungsauen wurde im Alter von ca. 6 Monaten durch die Gabe von Zink-Methallibur mit dem Futter (0,125 g in 2 kg Alleinfuttermittel) über 15 Tage der Zyklus synchronisiert. Am Tag 16 wurde jede Jungsau mit PMSG behandelt, gefolgt von einer hCG-Injektion nach 72 h. Der Samen wurde per Hand gewonnen, seine Motilität beurteilt und verdünnt auf eine Konzentration von ca. 3×10^9 Spermien pro Besamungsdosis. Der Samen wurde am Tage der Insemination gewonnen, und die Jungsauen wurden 24 h und 36 h nach Östrusbeginn besamt. Die Jungsauen wurden gruppenweise 40 h (n = 5), 44 h (n = 5), 48 h (n = 4), 52 h (n = 4), 56 h (n = 4), 60 h (n = 4) oder 64 h (n = 4) nach der hCG-Injektion geschlachtet. Die Zahl der nicht ovulierten (>7 mm, POPE et al. 1988) und ovulierten Follikeln wurde festgestellt. Die Eileiter wurden zweimal mit je 20 ml TCM 199, mit Zusatz von 2,92 mM Ca-Laktat, 2 mM Na-Pyruvat, 33,9 mM Na-Bicarbonat, 4,34 mM Hepes (PAVLOK et al. 1988), 10 µg/ml Gentamicin und 20 % hitzeinaktiviertem östrischem Rinderserum (ECS), gespült. Oocyten und Embryonen im Spülmedium wurden unter einem Stereomikroskop bei 125facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien der Kumulusschicht, dem Vorhandensein von Polkörpern und Teilung beurteilt. Darauf wurden sie in Eisessig-Ethanol (1:3 v/v) fixiert und nach 24 h mit Aceto-

orcein (1 %) gefärbt (XU und GREVE 1988). Alle gefärbten Präparate wurden unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 400 facher Vergrößerung auf Befruchtung, Vorkernentwicklung und Position des paternalen und maternalen Vorkernes (HUNTER 1972) hin untersucht. Wenn nach dem Färben keine chromosomalen Strukturen oder Vorkerne zu erkennen waren, wurden die Oocyten oder Zygoten als degeneriert klassifiziert. Vierzig Stunden nach der hCG Applikation waren nur 38 % der Follikel ovuliert, während es 4 h später bereits 65 % waren. Nach 48 h waren 87 % der Follikel ovuliert und bis 64 h nach Applikation war keine weitere Steigerung der Ovulationsrate mehr zu verzeichnen. Vierzig Stunden nach hCG-Gabe zeigten 10 von 22 gewonnenen Eizellen (Oocyten/Zygoten) eine expandierte Kumulusschicht. Zu jedem späteren Zeitpunkt waren alle Eizellen vom Kumulus befreit. Von den 10 Eizellen waren 8 (36 % der zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Oocyten) normal befruchtet. Ein gradueller Anstieg der Befruchtungsrate bis zu 80 % nach 60 h wurde beobachtet.

Vierzig Stunden nach der hCG-Injektion war das maternale Chromatin in allen befruchteten Oocyten in Ana- oder der Telophase II. Das paternale Chromatin wurde in diesen Zygoten als leicht geschwollener Spermienkopf identifiziert. Nach 44 h wurde eine Vergrößerung der Spermienköpfe in 70 % der befruchteten Eizellen beobachtet, während die restlichen 30 % zwei sphärische, sich zeitgleich entwickelnde Vorkerne aufwiesen. Die Größe eines jeden Vorkernes zu diesem Zeitpunkt betrug etwa 1/3 der voll entwickelten Vorkerne. Die Vorkerne lagen periphär, und der Spermischwanz war mit dem paternalen Vorkern assoziiert. 48 h nach hCG besaßen 53 % der Zygoten Vorkerne wie oben beschrieben, während bei 28 % die Vorkerne dicht beieinander in der zentralen Region des Ooplasmas lagen. Der maternale Vorkern lag in der Nähe des zweiten Polkörpers und war geringfügig kleiner als der paternale. In diesem Stadium hatte der paternale Vorkern seine Verbindung zum Spermischwanz verloren. Nach 52 h besaßen 52 % der Oocyten gegenüberliegende Vorkerne, und nach 56 h und 60 h hatten 75-76 % dieses Stadium der Entwicklung erreicht. Nach 64 h befanden sich 48 % der Embryonen im Zweizell-Stadium. 37 % bildeten gegenüberliegende Vorkerne aus, die in einigen Fällen gleiche Größe erreichten. Während der gesamten Periode der Untersuchung zeigte ein bestimmter Anteil der befruchteten Oocyten frühe Stadien der Befruchtung, z.B. Spermienkopf-Dekondensation.

Ablauf und Dauer der Ovulationen beim Schwein können nur rückblickend beurteilt werden. Frühere Studien haben gezeigt, daß Jungsauen 39-40 h nach dem Beginn des spontanen Östrus ovulieren (HUNTER 1990) und 40 h (DZIUK und BAKER 1962) bis 42 h (POLGE 1978) nach der hCG-Applikation. HUNTER (1972) beobachtete, daß bei 60-100 % der Jungsauen die Ovulation 44-46 h nach der hCG-Applikation beendet war. Ähnliche Daten wurden von POPE et al. (1988) erhoben, wo der Ovulationsvorgang bei 68-95 % der Jungsauen ungefähr 40 h nach Beginn des Östrus endete. Die eigenen Ergebnisse stimmen mit diesen Daten überein. Die höchste Ovulationsrate war nach 44-58 h nach hCG-Injektion erreicht, aber im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Autoren (BURGER 1952; PITKJANEN 1958; BETTERIDGE und RAESIDE

1962) dauerte die Ovulationsperiode (4-8 h) etwas länger, basierend auf der Ovulationsrate zwischen 40 h und 52 h nach hCG-Applikation. Obwohl ein signifikanter Anstieg der Ovulationsrate zwischen 40 h und 44 h auftrat, scheint doch die Superovulationsbehandlung die Ovulationsperiode zu verlängern.

Man nimmt an, daß die Befruchtung unmittelbar nach dem Eintritt der reifen Oozyten in den Eileiter, in dem sich bereits die kapazitierten Spermien befinden (CROZET und DUMONT 1984; HUNTER 1967; HYTTEL et al. 1988; THIBAUT 1967), erfolgt. Unsere Daten unterstützen diese Hypothese, da sowohl Ovulations- als auch Teilungsraten fast zeitgleich ansteigen.

Wie schon früher gezeigt (für das Schwein: HUNTER 1972; für das Rind: CROZET 1984; HYTTEL et al. 1988; für das Schaf: CROZET und DUMONT 1984), verlieren die Oozyten die sie begleitenden Kumuluszellen während oder bald nach der Ovulation, was den Spermien einen direkten Kontakt zur Oberfläche der Zona pellucida ermöglicht. Entsprechend waren auch in dieser Studie weniger als die Hälfte der 40 h nach hCG-Behandlung gewonnenen Oocyten von Kumuluszellen umgeben. Die verbliebenen Kumuluszellen stellen aber kein Hindernis für die Befruchtung dar.

HUNTER (1972; 1967) berichtete, daß unter in-vivo-Bedingungen die Befruchtung von Schweineoozyten in 95 % der Fälle durch ein einzelnes Spermium erfolgt (Monospermie). Die Polyspermierate in unserem Experiment liegt bei 3-16 %. Der Eintritt von mehr als einem Spermium könnte durch eine abnormale hormonelle Umgebung vor der Befruchtung (DAY und POLGE 1968) oder durch eine verspätete Freisetzung der kortikalen Granula verursacht werden. Die Polyspermie bei der in-vitro-Fertilisation von in vivo gereiften Oozyten war verursacht durch eine verspätete Wanderung der kortikalen Granula an die Peripherie des Ooplasmas (CRAN und CHENG 1986). Die Superovulationsbehandlung könnte ein Grund für die asynchrone Reifung und Entwicklung der Zellkompartimente der Oocyten sein.

Bei der Keimzellfusion wird die Eizelle aktiviert, und es findet eine Serie von Zellkern assoziierten Veränderungen sowohl bei den maternalen Chromosomen als auch beim befruchtenden Spermium statt. Die Transformation eines Spermienkopfes mit leicht geschwollener Struktur in einen frühen Vorkern mit intakter Membran dauert 1,5-2 h, und das Auftreten von Vorkernen kann ungefähr 6 h nach der Paarung beobachtet werden (HUNTER 1972). Die Vorkernentwicklung, wie sie in diesem Experiment beobachtet wird, ähnelt diesem Muster, obwohl der zeitliche Ablauf offenbar länger dauert: Die Mehrzahl der Spermienköpfe benötigte 12-16 h, um sich zu einem paternalen Vorkern zu entwickeln. Vermutlich wird diese Verzögerung auch durch die hormonelle Vorbehandlung hervorgerufen.

Im Vergleich zur spontanen Ovulation entwickelten sich maternale und paternale Vorkerne synchron. Diese Daten stimmen mit früheren Beobachtungen bei Rind (HYTTEL et al. 1988), Hamster (WRIGHT und LONGO

1988) und Mensch (LASSALLE und TESTART 1991) überein. Innerhalb der Intervalle nach der Insemination wurden keine vergrößerten Spermienköpfe beobachtet. Obwohl eine verzögerte Penetration nicht ausgeschlossen werden kann, wird die fehlende Vergrößerung als Insuffizienz des Ooplasmas (THIBAUT et al. 1975) interpretiert, wie z.B. Mangel an männlichem Vorkern-Wachstumsfaktor (male pronucleus growth factor, MPGF), der für die Bildung des männlichen Vorkernes verantwortlich ist (CALVIN et al. 1986; HUNTER 1967).

(2) DNA Synthese und Ultrastruktur während der Vorkernentwicklung in vivo

Zwanzig geschlechtsreife Jungsauen im Alter von etwa sechs Monaten (Gewicht 60-80 kg) wurden durch die Gabe von Zink-Metallibur in einer Dosis von 0,125 g in 2 kg Alleinfuttermittel pro Tier und Tag über 15 Tage lang synchronisiert. Am Tag 16 wurden 1200 IE. PMSG (ANTEX, Leo; Dänemark) und 72 h später 500 IE. hCG injiziert. Die Tiere wurden 24 h und 36 h nach Östrusbeginn inseminiert und 48 h (n = 4), 52 h (n = 4), 56 h (n = 4), 60 h (n = 4) und 64 h (n = 4) nach hCG-Behandlung geschlachtet. Zum zweimaligen Spülen der Eileiter wurde ein Spülmedium aus je 20 ml TCM 199, ergänzt mit 2,92 mM Ca-Laktat, 2 mM Na-Pyruvat, 33,9 mM Na-Bicarbonat, 4,34 mM Hepes (PAVLOK et al. 1988), 10 µg/ml Gentamicin und 20 % hitzeinaktiviertem östrischen Rinderserum (ECS), verwendet. Die dadurch gewonnenen Oocyten und Embryonen wurden unter einem Stereomikroskop bei 125 facher Vergrößerung nach Morphologie der Kumuluschicht, Vorhandensein von Polkörpern und Teilungen beurteilt und dann für die Untersuchung der DNA-Synthese und für die Transmissionselektronenmikroskopie zufällig auf zwei Gruppen verteilt.

Zum Zeitpunkt 48, 52, 56, 60 und 64 h nach hCG-Injektion wurden 16 Oocyten pro Zeitintervall einer autoradiographischen Markierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin (WALTER und MAURER-SCHULTZE 1989) nach dem folgenden Schema unterzogen: die Oocyten wurden für 30 min mit (Methyl- ^3H)-Thymidin inkubiert, das in equilibriertem Spülmedium in einer Konzentration von 1 µCi/ml (LUTHARD und DONAHUE 1973) enthalten war. Darauf wurden die Oocyten fünfmal in ^3H -Thymidin freiem Spülmedium gewaschen, darin für 2 h kultiviert und nach dieser Zeit für 30 min in einem Spülmedium inkubiert, das (Methyl- ^{14}C)-Thymidin in einer Konzentration von 0,075 µCi/ml enthielt (BÖSWALD et al. 1990). Anschließend erfolgte eine fünfmalige Waschung mit ^{14}C -Thymidin freiem Spülmedium. Alle Inkubationen fanden bei 39°C unter Paraffinöl in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 , 10 % O_2 und 85 % N_2 statt.

Nach der Inkubation mit den DNA-Vorläufern wurden die Oocyten in einer Mischung aus 2,5 % Glutaraldehyd und 0,6 % Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,2) fixiert. Auf diese Weise wurden die Oocyten 51, 55, 59, 63 und 67 h nach der hCG-Injektion fixiert. Nach der Fixation wurden die Proben unter Anwendung der Osmium-Ferricyanid-Methode (McDONALD 1984) im Puffer gewaschen, in Epon eingebettet und mit Hilfe eines NOVA

Ultramikrotomes geschnitten. Für die Autoradiographie sowie die morphologische Beurteilung der Pronukleuslokalisierung und -entwicklung (HUNTER 1972) unter dem Lichtmikroskop wurden semidünnschnitte (1,0 µm) verwendet. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Jeol JEM 1200 EX Elektronenmikroskop untersucht.

Die Autoradiographie erfolgte nach einer von SCHULZE et al. (1986) modifizierten Methode: Semidünnschnitte wurden mit einer ca. 15 µm dicken Schicht Ilford K5 Kernemulsion mit 1 % Glycerin überlagert, für drei Monate exponiert und in D-19 10 min lang bei 17°C entwickelt. Dann wurden einige Schnitte mit Toluidinblau gefärbt. Vor der Beurteilung der DNA-Markierung wurde die Kernemulsion mit einer 20 %igen Glycerinlösung zum Quellen gebracht und unter einem Deckglas mit Glyceringelatine präpariert. Kleine braune ¹⁴C-Spuren wurden überwiegend in den oberen Schichten der Emulsion angetroffen, große schwarze ³H-Körner waren tiefer in der Emulsion lokalisiert.

Nur normal befruchtete Oocyten wurden für die Beurteilung der Vorkernmorphologie und Chronologie der DNA-Synthese herangezogen. 51 h nach der hCG-Injektion zeigten drei Oocyten zwei sphärische Vorkerne, die noch in deutlicher Entfernung voneinander lokalisiert waren (wandernde Vorkerne), während die restlichen zehn Oocyten bereits benachbarte Vorkerne ausgebildet hatten. Nach 55 h hatten sieben Oocyten wandernde und neun benachbarte Vorkerne. Zu diesen beiden Zeitpunkten zeigte keiner der Vorkerne eine autoradiographische Markierung. Nach 59 h hatten drei Oocyten wandernde Vorkerne ausgebildet, die beide ³H- als auch ¹⁴C- Markierungen aufwiesen. Bei diesen beiden Vorkernen konzentrierte sich die Markierung des Nukleoplasmas an der dem anderen Vorkern zugewandten Seite und zeigte keine Verbindung mit den deutlich ausgebildeten sphärischen, dunklen Nukleolus-Vorläuferkörpern. Weitere neun Oocyten wiesen benachbarte Vorkerne auf, von denen in allen Fällen beide ³H-markiert waren, während zusätzliche ¹⁴C-Markierungen in nur einem einzigen Vorkern in drei Oocyten beobachtet werden konnten. Bei benachbarten Vorkernen war die Markierung auf der sich einander zugewandten Seite der Vorkerne konzentriert, und besonders die ³H-Markierung war nicht in den Nukleolus-Vorläufern, sondern um diese herum gelagert. Nach 63 h besaßen alle 14 Oocyten benachbarte Vorkerne. In sechs dieser Oocyten war eine schwache ³H-Kennzeichnung an der einander zugewandten Seite der Vorkerne zu erkennen. Doch in keinem der Fälle waren die Nukleolus-Vorläuferkörper selbst markiert. Die restlichen acht Oocyten wiesen keine Markierung auf. Nach 67 h waren in allen 12 Oocyten benachbarte, aber unmarkierte Vorkerne zu finden. Daraus ist zu schließen, daß die Länge der S-Phase 4,5-7,5 h beträgt.

51 h nach der hCG-Injektion war die Freisetzung der kortikalen Granula aus dem Ooplasma beendet, und ihr elektronendichter Inhalt hatte sich im perivitellinen Raum verteilt. Eine Vielzahl Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums und deutliche Golgi-Komplexe, zusammen mit einer großen Anzahl membrangebundener Vesikel, wurden in enger

Nachbarschaft zu den Vorkernen beobachtet, während größere Lipidtropfen mehr peripher gelagert waren. Die Vesikel und zu einem gewissen Grad auch die Lipidtropfen waren teilweise oder vollständig von den Zisternen des glatten endoplasmatischen Reticulums umgeben. Einige Male wurde der Spermienschwanz in enger Nachbarschaft mit dem paternalen Vorkern gefunden. Während der folgenden Zeitintervalle änderten sich die Charakteristika des Ooplasmas nicht. Es wurden jedoch nach 51 h und 55 h einige ringförmige Lamellen dicht bei den Vorkernen beobachtet, und nach 59 h traten diese Lamellen häufiger auf. Bei späteren Stadien wurden keine ringförmigen Lamellen mehr beobachtet.

51 h nach hCG-Injektion waren sowohl der paternale und als auch der maternale Vorkern von einer mehr oder weniger vollständigen Kernmembran umgeben, die vom glatten endoplasmatischen Reticulum gebildet wurde. In den Fällen mit unvollständiger Kernhülle stellte sich das Chromatin als Fibrillen in einem wellenähnlichen Muster dar. Keine Nukleolus-Vorläuferkörper oder deren Vorstadien wurden in diesen Strukturen beobachtet. Nach 55 h waren alle sphärischen Vorkerne von einer fast vollständigen Kernhülle umgeben. Ein oder mehrere große sphärische Nukleolus-Vorläuferkörper, die sich aus dichtem fibrillärem Material zusammensetzten, wurden in jedem Vorkern gefunden. Das meiste Chromatin war aufgelockert, aber kleine Anteile an kondensiertem Chromatin waren gleichmäßig über das Nukleoplasma verteilt, jedoch ohne räumlichen Zusammenhang mit den Nukleolus-Vorläuferkörpern. Einige wenige Ansammlungen von kleinen Granula, die sich aus elektronendichtem Material zusammensetzten, wurden zusammen mit kondensiertem Chromatin in der Nachbarschaft der Nukleolus-Vorläuferkörper beobachtet. Nach 59 h traten Poren in der Kernhülle häufiger auf, vornehmlich in der dem anderen Vorkern zugewandten Region. Diese Regionen enthielten auch sphärische Nukleolus-Vorläuferkörper und kondensiertes Chromatin. Das Chromatin stand in engem Kontakt sowohl mit den Ansammlungen kleiner Granula als auch mit der Kernmembran, aber zusätzlich wurden Gruppen von großen Granula derselben Elektronendichte wie die der kleinen im Zusammenhang mit dem Chromatin beobachtet. In diesen Regionen zeigte die Kernmembran eine ausgeprägte Wellenform. An anderen Stellen der Kernmembran existieren große Anhäufungen an kleiner Granula dicht neben ebenso großen Anhäufungen großer Granula. Die beiden Arten von Anhäufungen waren offensichtlich nicht durch eine sichtbare Struktur verbunden, ebenso wie sie ohne Kontakt zu dem kondensierten Chromatin waren. Nach 63 h war das Fehlen der Kernporen das typische Merkmal der wellenförmigen Vorkernhülle. Nukleolus-Vorläuferkörper und kondensiertes Chromatin standen in Kontakt mit beiden Typen von Granula und der Kernhülle und wurden in den sich gegenüberliegenden Vorkernregionen gefunden. Einige Male formten die runden Zusammenschlüsse der großen Granula eine große, zentral gelegene Vakuole und traten in Interaktion mit dem Chromatin und den Anhäufungen kleiner Granula. Das kondensierte Chromatin und die Ansammlungen kleiner Granula waren an der Peripherie von großen Granulahaufen lokalisiert. Innerhalb der Vakuole befand sich elektronendichtes

Material, das granuläre Strukturen von anderer Art als der großen und kleinen Granula aufwies.

Mit der Transformation der maternalen Chromosomen und des befruchtenden Spermiums in vollständig ausgebildete Vorkerne hängen folgende Ereignisse zusammen: der Aufbau der Kernhülle, die Reorganisation des Chromatins und die Entwicklung von substrukturellen Elementen des Nukleoplasmas (ZIRKIN et al. 1989; LONGO 1985; TESARIK und KOPECNY 1989a). Im Anschluß beginnen die Vorkerne aufeinander zu zuwandern, bis sie dicht einander gegenüber liegen. In der vorliegenden Studie wurde diese Aneinanderlagerung der Vorkerne bei den meisten porcinen Zygoten schon zum ersten Beobachtungszeitpunkt, 51 h nach der hCG- Injektion, also ca. 9 h nach der Ovulation, gefunden. Diese Daten stimmen gut mit vorangegangenen Beobachtungen an nicht stimulierten Schweinen überein, wo die Aneinanderlagerung der Vorkerne 6 h nach dem Decken stattfand (HUNTER 1972). Es wurden keine Unterschiede in der Entwicklungsrate der maternalen und paternalen Vorkerne beobachtet, was für eine gute Synchronisation des Prozesses in vivo beim Schwein spricht. Beim Rind (HYTTEL et al. 1988), Hamster (WRIGHT und LONGO 1988) und Menschen (LASSALLE UND TESTART 1991) ist dies schon früher festgestellt worden.

Vorausgegangene Untersuchungen bei Laborsäugetern (ZIRKIN et al. 1989; PERREAULT 1990; PERREAULT 1992) und beim Menschen (TESARIK und KOPECNY 1989b) haben klar gezeigt, daß die Replikation der paternalen, vom befruchtenden Spermium eingebrachten DNA nicht vor der Vollendung der Vorkermembranbildung und Erreichen der vollen Größe des Vorkernes aufgenommen wird. Diese Daten stimmen mit den hier für das Schwein erhobenen Befunde überein. Im vorliegenden Experiment tritt die S-Phase in einem Zeitraum zwischen 55 h und 62 h nach der hCG-Verabreichung, das heißt 13 h bis 20 h nach der Ovulation auf und hat damit eine Dauer von ungefähr 7 h. Beginn und Dauer der S-Phase bei bovinen Zygoten unter in-vitro Bedingungen verhalten sich ebenso (EYESTONE und FIRST 1988). Bei Mäusen (LUTHARDT und DONAHUE 1973; SIRACUSA et al. 1975; ABRAMCZUK und SAWICKI 1975) setzt die S-Phase des paternalen Vorkernes früher ein als die des maternalen; genau das Gegenteil wird beim Hamster berichtet (NAISH et al. 1987). Im vorliegenden Experiment deuten gleichartige radioaktive Markierungen beider Vorkerne in fast allen Zygoten auf ein synchrones Auftreten der maternalen und paternalen S-Phase beim Schwein hin.

Nachdem sich die Vorkerne ausgebildet hatten, traten dichte, sphärische Nukleolus-Vorläuferkörper auf. Basierend auf Studien an polyspermischen humanen Zygoten, vermutet man, daß diese Körper von Aggregationen kleiner, dichter Elemente, die im Zusammenhang mit kondensiertem Chromatin auftreten, gebildet werden (TESARIK und KOPECNY 1989a). Weiterhin ist von denselben Autoren vermutet worden, daß die Bildung dieser Vorläuferkörper in Zusammenhang mit einem gewissen Grad an RNA-Synthese steht (TESARIK und KOPECNY 1989b). In der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche Entwicklung der dichten Vorläuferkörper nicht aufgezeigt werden, und es kann

in Frage gestellt werden, ob ihre Bildung den gleichen Gesetzmäßigkeiten folgt wie für den Menschen angenommen wird. Bei Oocyten und frühen Embryonen von Nagern ist von auffallenden, intranukleären Partikeln oder Granula berichtet worden (PALOMBI und VIRON 1977; FAKAN und ODARTCHENKO 1980; SZÖLLÖSI et al. 1990). Bei frühen Embryonen hat man festgestellt, daß das Auftreten einiger dieser Partikel mit dem Fortschreiten der nukleären Veränderungen während der Befruchtung zusammenhängt (SZÖLLÖSI et al. 1990; TAKEUCHI und TAKEUCHI 1989). Man stellte fest, daß einige Formen dieser Granula Ähnlichkeit mit Interchromatin oder ribonukleoproteinreichen Partikeln hatten. Gleichzeitig wurde aber auch eine spezielle Form von großer Granula (300-500 Å im Durchmesser) identifiziert, die in Gruppen im Nukleoplasma von frühen Mäuseembryonen, manchmal in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Nukleoli, lag (FAKAN und ODARTCHENKO 1980). Allgemein wird angenommen, daß die verschiedenen Granulaformen beim frühen Embryo eine Rolle im Metabolismus von RNA und Ribonukleoproteinen spielen und insbesondere im Zusammenhang mit der maternalen Versorgung mit Makromolekülen stehen (PALOMBI und VIRON 1977; FAKAN und ODARTCHENKO 1980). Bei frühen Schweineembryonen scheint die morphologische Variabilität der Granula sogar noch größer zu sein als bei Mäuseembryonen (TOMANEK et al. 1989). Mit der vorliegenden Arbeit kann diese Variabilität in Form und Größe der intranukleären Granula schon für das Vorkernstadium bestätigt werden. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien wird die steigende Anzahl, das aufeinanderfolgende Auftreten von kleinen und großen Granula und besonders die Bildung von mehr komplexen Konglomeraten dieser Granula und begleitendes "klebendes" Material im Zusammenhang mit dem Ablauf des ersten Zellzyklus dokumentiert. In einer anderen Arbeit über Zytochemie und Immunozytochemie der Feinstrukturen des Zellkernes von frühen Schweineembryonen (KOPECNY, FAKAN, BIGGIOGERA und LAURINCIK, in Vorbereitung) war es uns möglich, die ribonukleoproteinartige Natur aller Formen dieser Granula aufzudecken, obwohl mit Immunoprobe (BIGGIOGERA et al. 1993), die spezifisch für bestimmte RNA-Familien sind, klare Unterschiede unter zwischen entdeckt werden konnten. Wie diese Daten zeigen, deutet die steigende Anzahl, Größe und Interaktion der Granulaformen auf einige bis jetzt noch nicht verstandene Prozesse in der Dynamik der Ribonukleoproteine während der ersten Phase der Kerndifferenzierung im Schweineembryo hin. In dieser Hinsicht ist es bemerkenswert, daß die kleine, interchromatinartige Granulaformen (die typische nicht-nukleolare, kleine nukleare Ribonukleoproteine enthalten, die mit einem gemeinsamen Proteinanteil, dem Sm-Antigen nachgewiesen werden) ursprünglich in frühen Rinderembryonen entdeckt worden waren, dort in der Regel in enger Nachbarschaft zu den Nukleolus-Vorläuferkörpern (KOPECNY et al. 1991). Zusätzlich zu den intranukleären Interaktionen sind bei frühen Schweineembryonen runde, dichte Körper von vermutlich nukleärer Herkunft im Zytoplasma gefunden worden. Es wird angenommen, daß diese ein mögliches Ergebnis der Kern-Zytoplasma-Kommunikation darstellen (TOMANEK et al. 1989; HYTTTEL und NIEMANN 1990).

(3) Vorkernentwicklung nach in vitro-Befruchtung von in vivo oder in vitro gereiften Schweineoocyten

In vitro gereifte Oozyten (Gruppe 1):

Auf einem örtlichen Schlachthof wurden Eierstöcke von präpuberalen Jungsaunen gesammelt und bei Umgebungstemperatur innerhalb von 1 h nach dem Schlachten zum Labor transportiert. Follikel mit einem Durchmesser von 2-5 mm wurden punktiert, die Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) in modifizierter Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gesammelt und die aspirierte Flüssigkeit bei 10-60facher mikroskopischer Vergrößerung untersucht. Die KOK wurden einmal gewaschen und dann in vorinkubiertem (39°C, 5 % CO₂ in Luft, ca. 100 % Luftfeuchtigkeit) TCM 199 aufbewahrt. Das TCM war ergänzt mit 1 µg/ml reinem FSH (UCB, l'Alleude, Belgium), 0,1 mg/ml L-Glutamin, 25 mM HEPES, 10 % Neugeborenenkälberserum (NBCS) und 5 mg/100 ml Gentamicin (Reifungsmedium). Oozyten mit fest anhaftender Kumulusschicht und einem gleichmäßig granuliertem Zytoplasma wurden für die Reifung selektiert. Die Kultivierung erfolgte in 50 µl Mikrotropfen des Reifungsmediums unter vorinkubiertem (39°C, 5 % CO₂ in Luft, ca. 100 % Luftfeuchtigkeit) Silikonöl (Pierce, Rockford, Illinois, USA). 48 h später wurden die COC auf Kumulusexpansion und Integrität des Ooplasmas untersucht (RATH 1992).

In vivo gereifte Oozyten (Gruppe 2):

Sechshundsechzig präpuberale Jungsaunen wurde zunächst 1500 IE PMSG appliziert und 72 h später 500 IE hCG verabreicht. Zur Oozytengewinnung wurden die Jungsaunen 38 h nach der hCG-Injektion geschlachtet (RATH 1992). Follikel mit einem Durchmesser von 5-10mm wurden punktiert und gereifte KOK für 2 h in TCM 199, ergänzt mit 0,1 mg/ml L-Glutamin, 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 10 µg/ml Dibekacinsulfat, vorinkubiert.

Mit der Handschuhmethode wurde die spermienreiche Fraktion (20-30 ml) von Ejakulaten zweier Deutsche Landrasse-Eber mit geprüfter Fruchtbarkeit in einem vorgewärmte (38°C) Auffangröhrchen gesammelt. Unmittelbar nach der Samenentnahme wurden die Proben mit ANDROHEP® im Verhältnis 1:1 verdünnt und für die Induktion der Kapazitation aufbereitet. Der Samen wurde zweimal zentrifugiert und die Pellets mit dem Kapazitationsmedium (mTCM 199, pH 7,8) wiederverdünnt. Die Konzentration der Spermien wurde auf 2×10^8 Spermien pro ml eingestellt und die Proben für ca. 3,5 h bei 39°C, 5 % CO₂ und ca. 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert (RATH 1992).

Vor der in vitro-Befruchtung wurden die KOK auf mechanischem Wege, d.h. mit Hilfe einer feinen Glaspipette, von der Kumulusschicht befreit und anschließend im Befruchtungsmedium gewaschen. Als Befruchtungsmedium diente TCM 199, ergänzt mit 0,1 mg/ml L-Glutamin, 10 % FCS, 2,0 mM Coffein und 10 µg/ml Dibekacinsulfat. Die Oozyten wurden in 5 ml Befruchtungsmedium, das 5×10^5 Spermien/ml enthielt, befruchtet (30 Oozyten/Petrischale).

Vier-32 h nach der in vitro-Insemination wurden Oozyten aus beiden Gruppen in 2-4 h-Intervallen entnommen in Eisessig-Alkohol (1:3 v/v) fixiert und 24 h später mit Aceto-Orcein (1 %) gefärbt. Die Präparate wurden bei einer 1200 fachen Vergrößerung beurteilt und die Häufigkeit der Spermienpenetration in das Ooplasma, die maternale und paternale Vorkernbildung sowie die Syngamie festgestellt und in sechs Entwicklungsklassen (PN1 bis PN5 plus Syngamie) nach den für bovine Oozyten von XU und GREVE (1988) gegebenen Kriterien eingeteilt. Oozyten wurden als normal befruchtet klassifiziert, wenn im Ooplasma Chromosomen und ein Spermienkopf oder zwei Vorkerne mit einem benachbarten Spermenschwanz gefunden wurden. Bei der Kategorie PN1 war das Ooplasma vollständig von dem Spermium (paternale PN1, pPN1) penetriert, und die Wiederaufnahme der zweiten Reifeteilung hatte begonnen (maternale PN1, mPN1). In pPN2 war der Spermenschwanz abgelöst. In mPN2 waren die Dekondensation der Chromosomen, die Ausschleusung des zweiten Polkörpers oder die zweite Reifeteilung abgeschlossen. Die Kategorie PN3 wurde durch eine weitere Dekondensation der paternalen und maternalen Chromosomen und der Bildung der Vorkernhülle charakterisiert. Der zweite Polkörper war dicht neben dem maternalen Vorkern lokalisiert. In der Kategorie PN4 war die Dekondensation der Chromosomen abgeschlossen. Die sphärischen Vorkerne waren von einer vollständigen Hülle umgeben und erreichten ihre maximale Größe in Kategorie PN5. Zu dieser Zeit lagen beide Vorkerne dicht beieinander, und die Verschmelzung beider Vorkerne begann.

Kumulus-Korona Schichten bei in vivo gereiften Oocyten waren bei allen KOK vollständig expandiert. Ähnlich war auch die Kumulusschicht bei in vitro gereiften KOK voll expandiert, jedoch war bei mehr als der Hälfte der Oocyten ein dunkler Rand nicht expandierter Korona radiata noch sichtbar. Am Ende der Reifungsphase besaßen die Oocyten beider Gruppen eine Vergrößerung des perivitellinen Raumes und homogenes Ooplasma.

Über alle Beobachtungszeitpunkte hatten In vivo gereifte KOK eine höhere ($p < 0,05$) Penetrationsrate als in vitro gereiften KOK. Die durchschnittliche Gesamtdifferenz betrug 34,8 %. Die Art der Oozytenreifung beeinflusste den Anteil an monospermer Penetration ($p < 0,05$). In vivo gereifte Oozyten zeigten die ersten Anzeichen einer Spermienpenetration 4 h nach der Insemination. Die Penetrationsrate stieg während der folgenden 6 h an und blieb bis zum Ende der Beobachtungsperiode konstant. Im Gegensatz dazu trat die erste Penetration bei in vitro gereiften Oocyten 6 h nach der Insemination auf und erreichte ihr Maximum nach weiteren 2 h. Dieses Plateau blieb bis zum Ende der Beobachtungsperiode konstant, aber auf einem erheblich niedrigeren Niveau (35,2 % zu 85,3 %, $p < 0,01$) als für in vivo gereifte Oozyten. Die Polyspermierate war bei in vitro gereiften Oocyten signifikant höher ($p < 0,05$). Polygynie wurde nur in 8 Oocyten aus beiden Gruppen beobachtet.

Sechs Stunden nach der Insemination befanden sich $66,0 \% \pm 7,8 \%$ der in vitro und $54,2 \% \pm 4,2 \%$ der in vivo gereiften Oozyten im paternalen Pronukleusstadium 1 (pPN1). Jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Anteil mit paternaler PN2-Phase bei den in vivo gereiften Oocyten ($45,8 \% \pm 4,2 \%$) höher

($p < 0,05$), als bei den *in vitro* gereiften Oozyten ($13,2 \% \pm 5,9 \%$). *In vitro* gereifte Oozyten zeigten eine Verzögerung bei der Spermienkopfdekondensation von ungefähr 2 h. Innerhalb der ersten 6 h nach der Insemination hatten $41,7 \% \pm 5,6 \%$ der *in vivo* gereiften Oozyten die zweite Reifeteilung vollendet (mPN2), wogegen nur $20,8 \% \pm 6,5 \%$ der *in vitro* gereiften Oozyten dieses Entwicklungsstadium erreicht hatten ($p < 0,01$). Im Gegensatz zu den *in vivo* gereiften Oozyten entwickelten sich zu diesem Zeitpunkt $11,1 \% \pm 5,9 \%$ der *in vitro* gereiften Oozyten zur mPN4- und $8,3 \% \pm 4,3 \%$ zu der mPN5-Phase. Späte Vorkernstadien entwickelten sich bei den *in vivo* gereiften Oozyten synchron. Die Bildung des paternalen Vorkernes war bei den meisten *in vitro* gereiften Oozyten verzögert und fand zwischen 6 h und 12 h nach der Insemination statt. Sie wurde aber zwischen 12 h und 14 h beschleunigt und befand sich zu diesem Zeitpunkt in einem ähnlichen Stadium wie die der *in vivo* gereiften Oozyten. Beide Vorkerne entwickelten sich synchron zwischen 16 h und 32 h der Beobachtungsperiode. Die Synkaryose wurde das erste Mal 16 h (*in vivo*) bzw. 18 h (*in vitro*) nach der Insemination beobachtet. *In vivo* gereifte Oozyten erreichten den maximalen Anteil (33,3 %) an Synkaryose 20 h nach der Insemination, demgegenüber kam es bei den *in vitro* gereiften Oozyten zu einer Verzögerung von etwa 4 h. Ein zweiter Spitzenwert bei der Synkaryose wurde bei beiden Gruppen nach 32 h erreicht. Der prozentuale Anteil an Synkaryose war für *in vivo* gereifte Oozyten signifikant niedriger (23,9 % zu 30,8 %; $p < 0,05$) als bei *in vitro* gereiften, weil der Großteil ($52 \% \pm 7,3 \%$) schon zur ersten Teilung fortgeschritten war.

In der Literatur wurde der Ablauf der Befruchtung in Beziehung zum Östrusbeginn (THIBAUT 1967) oder zur Vorbehandlung mit humanem Chorion Gonadotropin (HUNTER 1972) oder zur Superovulation (LAURINCIK et al. 1994) gesetzt. Zeitabhängige Ereignisse nach einer Befruchtung *in vivo* sind für das Rind (XU und GREVE 1988), das Kaninchen (ZAMBONI und MASTROIANNI 1966) und die Maus (EDWARDS und GATES 1959) beschrieben worden. Die vorliegende Studie ist die erste, die zeitabhängige Stadien der frühen Embryonalentwicklung für Schweineoozyten nach einer *in vitro*-Befruchtung beschreibt. Die Resultate dieser Untersuchungen erlauben eine vergleichende Analyse früher Entwicklungsereignisse nach einer *in vitro*-Befruchtung von *in vitro* bzw. *in vivo* gereiften Schweineoozyten. Unsere Ergebnisse demonstrieren, daß *in vitro* gereifte Oozyten einige deutliche morphologische Abweichungen während und unmittelbar nach dem Befruchtungsprozeß zeigen. Im Vergleich zum Rind könnte dies mit der niedrigeren Befruchtungsrate nach *in vitro*-Fertilisation bei dieser Spezies zusammenhängen (BRACKETT und ZUELKE 1993).

Man nimmt an, daß *in vivo* die Befruchtung stattfindet, wenn die gereiften Oocyten den Eileiter, in dem sich zu diesem Zeitpunkt schon kapazitierte Spermien befinden erreichen (THIBAUT 1967; HUNTER 1972; LAURINCIK et al. 1993, 1994). Unter unseren Versuchsbedingungen war die Penetration von *in vivo* gereiften KOK ähnlich der von KOK aus nicht stimulierten Jungsauen (HUNTER 1972). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Daten, daß die

Penetration sich nach in vitro-Reifung der Oocyten verzögerte. Da der Samen für beide Gruppen in gleicher Art und Weise behandelt worden ist, wird angenommen, daß unzureichende Reifungsbedingungen (XU und GREVE 1988) und/oder eine unvollständig expandierte Koronalage (LAURINCIK et al. 1992a,b) eher für die Verzögerung und die geringeren Penetrationsraten verantwortlich sind, als Defizite im in vitro Kapazitationssystem der Spermien (CRAN und CHENG 1986).

Nach der Fusion von paternalen und maternalen Gameten wird die Oocyte aktiviert und eine Serie von nukleären Veränderungen sowohl in dem befruchtenden Spermium als auch am maternalen Chromosom finden statt. Im Eileiter (HUNTER 1972; CRAN und CHENG 1986) und unter unseren experimentellen Bedingungen benötigen in vivo gereifte Oocyten 2 h für die Spermienkopfd Kondensation und zusätzliche 2-4 h, um sich in nebeneinander liegende Vorkerne zu entwickeln. Dieser Prozeß trat in einer gut synchronisierten Weise bei beiden, dem maternalen wie paternalen Vorkern, auf. Ähnliche Ergebnisse erhielten für das Rind HYTTEL et al. (1988), für den Hamster WRIGHT und LOGO (1988) und für den Menschen LASSALLE und TESTART (1991).

Es wird allgemein anerkannt, daß die Bildung des paternalen Vorkernes von der Gegenwart eines Paternalen-Vorkern-Wachstumsfaktors (MPGF) in der ausgereiften Oocyte abhängig ist (IWAMATSU und CHANG 1972; THIBAUT et al. 1975). In unserem Experiment wurde eine unvollständige Bildung des paternalen Vorkernes während der ersten 14 h beobachtet, was die Ansicht unterstützt, daß der MPGF-Spiegel bei in vitro gereiften KOK beachtlich schwanken kann (HUNTER 1967; CALVIN et al. 1986). Für in vitro gereifte Oocyten konnte gezeigt werden, daß zur gleichen Zeit die Bildung des maternalen Vorkernes beschleunigt war, was darauf hindeutet, daß die Formation des maternalen Vorkernes vom MPGF unabhängig ist, wie schon früher angenommen worden ist (YANAGIMACHI 1988). Interessanterweise war die paternale und maternale Vorkernbildung nach 16 h gut synchronisiert, ein Hinweis darauf, daß bis zu diesem Zeitpunkt der Beobachtungsperiode eine Beschleunigung in der Entwicklung des paternalen Vorkernes stattgefunden haben muß. Im folgenden wurde jedoch bei in vitro gereiften Oocyten die erste Zellteilung um 8 h verzögert. Dies legt nahe, daß bei in vitro gereiften Oocyten der erste Zellzyklus verlängert war.

Polysperme Penetration ist einer der Hauptursachen für frühembryonale Fehlentwicklungen (BOMSEL-HELMREICH 1961; NAGAI et al. 1984; CHENG 1985; MATTIOLI et al. 1988b; HUNTER 1990; NAGAI und MOOR 1990; WANG et al. 1991; ZHENG und SIRARD 1992). Eine hohe Anzahl von Spermien am Ort der Befruchtung ist für den Anteil polyspermer Penetrationen verantwortlich (HUNTER und LEGLISE 1971). CRAN und CHENG (1985; 1986) beobachteten ein höheres Polyspermievorkommen bei in vitro-befruchteten Oozyten im Vergleich zu in vivo-befruchteten Oozyten. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Reduktion der Spermienzahl pro zu befruchtender Oocyte die Wahrscheinlichkeit einer normalen Befruchtung erheblich steigert (RATH

1992). Daher ist auch in unserem Experiment die Spermienzahl reduziert worden, und das geringe Auftreten von Polyspermie gleicht den physiologischen in vivo-Bedingungen (HUNTER 1967, 1972; LAURINCIK et al. 1994). Offensichtlich war der Polyspermieblock auf der Ebene der Zona und/oder des Ooplasmas in in vivo und in vitro gereiften COC ähnlich ausgebildet.

Im Vergleich zu früher veröffentlichten Daten (HUNTER 1972) fand die Teilung unter unseren experimentellen Bedingungen ungefähr 8-12 h später statt. Ein ähnliches Verhalten für in vivo gereifte Oozyten ist schon früher beobachtet worden (YOSHIDA 1987), was auf nukleare und/oder zytoplasmatische Unzulänglichkeiten hinweisen könnte (HUNTER 1990). Unsere Ergebnisse zeigen, daß in vitro gereifte Oozyten eine geringere Entwicklungsfähigkeit besitzen als in vivo gereiften Oocyten. Es muß noch näher untersucht werden, ob dies auf die zum Teil asynchrone Vorkernentwicklung oder auf eine generelle Inkompetenz des Ooplasmas zurückzuführen ist (YOSHIDA 1992b).

Das Vorkommen von Polygynie wird hauptsächlich der Befruchtung von unreifen oder gealterten Oozyten zugeschrieben (BEDFORD 1982). Die Zeit, die für eine vollständige Kernreifung in vitro benötigt wird, schwankt bei unreifen Oozyten beträchtlich (SATO et al. 1978; YOSHIDA et al. 1989), und die Häufigkeit chromosomaler Anomalien war sehr hoch (McGAUGHEY und POLGE 1971). Polygynie, die hauptsächlich durch das Versagen der Ausschleusung des ersten oder zweiten Polkörpers auftritt, ist in dieser Studie selten beobachtet worden, was darauf hindeutet, daß das Alter der Oozyten für diese Reifungsbedingungen geeignet war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unter in vivo-Bedingungen 40 h nach hCG-Injektion alle befruchteten Oocyten einen dekondensierten Spermienkopf und nach weiteren 4-8 h für gewöhnlich frühe Vorkerne aufweisen. 52 h nach hCG-Behandlung herrschen benachbarte, sich gegenüberliegende Vorkerne vor. Die S-Phase bei porcinen Zygoten wird 56 h nach hCG initiiert und dauert 4,5-7,5 h. Das Fortschreiten der S-Phase läuft mit dem Auftauchen und der komplexen Interaktion zwischen verschiedenartigen Granula im Nukleoplasma parallel, was von spezifischer RNA/RNP-Dynamik in diesem frühen Vorkernstadium bei Schweinezygoten zeugt. Unter in vitro-Bedingungen wurde dokumentiert, daß in vitro-gereifte Oozyten sowohl eine geringere Penetrations- und Teilungsrate als auch eine asynchrone Vorkernentwicklung und einen verzögerten Teilungsbeginn im Vergleich zu in vivo-gereiften Oozyten aufweisen. Dies macht weitere Forschungsarbeiten zur Verbesserung der In-vitro-Reifung porciner Oocyten erforderlich.