Aus dem Institut für Experimentelle Genetik
des GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH
Direktor: Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis

Vorgelegt über die Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. vet. U. Matis
Eingereicht von Prof. Dr. Dr. habil. J. Braun

Risikoeinschätzung einer Infektion mit Maus Hepatitis Virus bei der Anwendung von kryokonservierten Mausspermien in der *in vitro* Fertilisation mit intakten und laserbehandelten Oozyten

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

von
Dominika Peters
aus Breslau (Wroclaw)

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Braun
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard
2. Korreferentin:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann
3. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. A. Höflich
4. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 11 Februar 2005

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

2 Literaturübersicht 9
2.1 Die Maus als Modell für menschliche Erbkrankheiten 9
2.2 Kryokonservierung von Mausspermien 11
2.2.1 Aufbau eines Kryoarchivs 11
2.2.2 Vorteile der Kryokonservierung von Mausspermien 12
2.3 Revitalisierung von Spermaproben 14
2.3.1 In vitro Fertilisation 14
2.3.2 Fertilisationsprobleme 15
2.4 Assistierte Reproduktionstechniken 18
2.4.1 Chemische Behandlung der Eizelle 18
2.4.2 Mechanische Manipulation der Zona Pellucida 19
2.4.3 Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida (Laser Zona Dissection, LZD) 19
2.4.4 Direkte Einführung der Spermien in die Eizelle 20
2.5 Sanierung von Mausbeständen 21
2.6 Maus Hepatitis Virus als Übertragungsmodell für Pathogene 23
2.6.1 Allgemeine Beschreibung des Maus Hepatitis Virus (MHV) 23
2.6.2 Spezielle Beschreibung des Virus 26
2.6.2.1 Struktur 26
2.6.2.2 Genom 27
2.6.2.3 Infektionszyklus 28
2.6.3 Pathogenese 30
2.6.4 Klinisches Bild 31
2.6.5 Pathogenität des MHV für meist verwendete Mausstämme 32
2.7 Fragestellung der Arbeit 34

3 Material und Methode 35
3.1 Tiere 35
3.1.1 Tierhaltungsbedingungen 35

3.1.2 Haltung der Eizellenspender 35
3.1.3 Haltung der Embryonenempfänger 36
3.1.4 Haltung der Männchen für MHV-Inokulation 36
3.1.5 Probenentnahme 36
3.2 Angewendete Reproduktionstechniken 38
3.2.1 Bearbeitung der Eizellen 38
3.2.1.1 Superovulation der Weibchen 38
3.2.1.2 Präparation der Eizellen 38
3.2.1.3 Lasermikrodissektion der Zona Pellucida 39
3.2.2 Bearbeitung der Spermien 40
3.2.2.1 Präparation der Nebenhodenschwänze 40
3.2.2.2 Kryokonservierung der Mausspermien 40
3.2.2.3 Auftauen der Spermaproben 41
3.2.2.4 Qualitätsmessung der Spermaproben 42
3.2.3 *In vitro* Fertilisation 43
3.2.4 Lasermikrodissektion der Zona Pellucida 44
3.2.5 Embryotransfer 45
3.3 Virusbeschreibung 48
3.3.1 Virusbearbeitung 48
3.3.1.1 Anzucht der Zelllinien 48
3.3.1.2 Virusanzüchtung 49
3.3.1.3 Virustitration und Virustiterbestimmung 50
3.3.2 Virusnachweis 52
3.3.2.1 Indirekte Immunoperoxidase Färbung (IPF) 52
3.3.2.2 MHV RT-PCR Konditionen 53
3.3.2.3 ELISA Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 59
3.4 Virusanwendung bei der Reproduktionstechnik 60
3.4.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis pro Maus mittels Eileitertransfer 60
3.4.2 *In vitro* Fertilisation als Modell für die Pathogenübertragung 62
3.4.2.1 IVF mit virushaltigem Fertilisations-, Kultur- und Embryotransfer Medium 63
3.4.2.2 IVF mit virushaltigem Fertilisationsmedium 64
3.4.2.3 Gewinnung der Überstände aus IVF-Waschschritten 65

3.4.3 Inokulation der Männchen 66
3.4.3.1 Intraperitoneale Inokulation der Männchen 66
3.4.3.2 Intranasale Inokulation der Männchen 67
3.5 Statistische Auswertung 68

4 Ergebnisse 69
4.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis pro Maus mittels Eileitertransfer 69
4.2 *In vitro* Fertilisation als Modell für die Pathogenübertragung/ Experimentelle Gruppen 1-4 71
4.2.1 Immunantwort der Embryonenempfänger 72
4.2.2 MHV RT-PCR der IVF Überstände 74
4.2.3 Titration der IVF Überstände aus den experimentellen Gruppen 1-4 78
4.2.4 Teilungsraten und Anzahl der Nachkommen 79
4.3 Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida 85
4.3.1 Optimierung der Schnittgröße 85
4.3.2 Effekt der Laser Mikrodissektion auf die Teilungsraten und die Anzahl der Nachkommen 87
4.4 Inokulation der Männchen mit MHV-A59 89
4.4.1 Intraperitoneale (i.p.) Inokulation der Männchen 89
4.4.1.1 Nebenhodenuntersuchung 90
4.4.1.2 Untersuchung der Spermaproben 91
4.4.1.3 Infektiositätstest 93
4.4.2 Intranasale Inokulation (i.n.) der Männchen 93
4.4.2.1 MAP Test (CD-1, Balb/cAnNCrl, C3HeB/FeJ Männchen) 94
4.4.2.2 MHV RT-PCR Organanalyse der Balb/cAnNCrl Männchen 96
4.4.2.3 MHV RT-PCR Organanalyse der C3HeB/FeJ Männchen 99
4.4.3 Sequenzierung der PCR-Produkte 101

5 Diskussion 103
5.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis/Maus mittels Eileitertransfer 103
5.2 Immunantwort der Embryonenempfänger 104
5.3 Teilungsraten und die Anzahl der Nachkommen 108
5.4 Laser Manipulation der Zona Pellucida 112

5.5 Inokulation der Männchen mit MHV-A59 114
6 Zusammenfassung 118
7 Summary 120
8 Literaturverzeichnis 122

9 Anhang 149
9.1 Verwendete Medien und Lösungen 149
9.1.1 HTF-Medium - Medium für die Fertilisation 150
9.1.2 KSOM-Medium – Kulturmedium 152
9.1.3 PBS-BSA (Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum Albumin) 154
9.1.4 M2- Medium für Embryo Transfer 155
9.1.5 CPA: Cryo - Protecting - Agents 155
9.1.6 Hyaluronidaselösung 156
9.1.7 Narkose 157
9.1.8 PMSG (Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin) 158
9.1.9 HcG (Human Chorionic Gonadotropin) 159
9.2 IVOS Setup für Hamilton Thorne Sperm Analyzer 160
9.3 PALM Robo Energiekurve 161
9.4 PALM Setup 162
9.5 Bernoulli-Schema 163

10 Danksagung 164

1 Einleitung

Seitdem die Maus als Krankheitsmodell für menschliche Erbkrankheiten etabliert ist, wird jedes Jahr eine große Anzahl an Mauslinien mit künstlich induzierten Mutationen produziert. Aus verschiedenen Gründen wird das genetische Material der Mauslinien kryokonserviert und bei Bedarf mittels künstlicher Befruchtung (*in vitro*-Fertilisation) und Embryotransfer wiederbelebt.
Der Transfer von Embryonen in pathogenfreie, scheinträchtige Ammentiere gilt als eine anerkannte Methode, um Mausstämme hygienisch sanieren bzw. wiederbeleben zu können (Carthew, 1983, 1985; Reetz, 1988; Suzuki, 1996; Morrell, 1999). In vivo und in vitro produzierte Embryonen unterscheiden sich möglicherweise in ihrem Hygienestatus. Im Vergleich zur in vivo Produktion bietet die in vitro Produktion sehr viele Möglichkeiten der Kontamination außerhalb des weiblichen Geschlechtstrakts, z. B. durch infiziertes Sperma, kontaminierte Medien, Instrumente und Geräte. Es liegen nur vergleichsweise weniger Studien vor, die das Risiko einer Infektionsübertragung auf diesem Weg untersuchen (Suzuki, 1996).

Um die Kontaminationsgefahr bei der in vitro Produktion von Embryonen besser abschätzen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Risiko einer Pathogenübertragung für verschiedene Aspekte der in vitro Fertilisation und für daraus resultierende Embryonen untersucht und die Zuverlässigkeit eines standardisierten Waschverfahrens dargestellt. Die Untersuchungen wurden am Beispiel des Maus Hepatitis Virus (MHV), eines der wichtigsten Krankheitserreger in Maushaltungen, durchgeführt.

Alle Tiere, die mit MHV inokuliert wurden, wurden gemäß § 8, Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-8/02 bei der Regierung von Oberbayern angemeldet.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Maus als Modell für menschliche Erbkrankheiten

Nachdem das gesamte Genom des Menschen sequenziert wurde (Waterston, 2002: Mouse Genome Sequenzing Consortium), steht nun die Erforschung der einzelnen Genfunktionen im Vordergrund. Aus ethischen Gründen eignen sich besonders tierische Modellorganismen, um die Funktion der Gene zu entschlüsseln. Zur Aufklärung fundamentaler Genmechanismen wurden einfache Tiermodelle, wie der Fadenwurm (Brenner, 1974), die Fruchtfliege (Nusslein-Volhard & Wieschaus 1980; Lockett, 1989) und der Zebrafisch (Solnica-Krezel, 1994; Mullins, 1994; Driever, 1996; Haffter, 1996) untersucht. Für die Analyse krankheitsrelevanter Gene besitzt aber die Maus (*Mus musculus*) aufgrund der großen Übereinstimmungen zwischen Maus- und menschlichem Genom und vieler Ähnlichkeiten hinsichtlich Embryonalentwicklung, Physiologie und Biochemie beträchtliche Vorteile. Seit der vollständigen Sequenzierung des Mausgenoms (Waterston, 2002; Schwartz, 2003) ist bekannt, dass 99% der Mausgene Homologe beim Menschen haben.

Um eine systematische Analyse der biologischen Funktionen jedes einzelnen Gens bei der Maus durchzuführen, wurden zwei Strategien entwickelt:

1) Die vom-Gen-zum-Phänotyp-Strategie (u.a. das transgene Maussystem und die homologe Rekombination) setzt voraus, dass das zu untersuchende Gen bereits bekannt und isoliert ist. Die gewünschte Mutation wird zuerst als bekannte DNA-Sequenz in die befruchteten Eizellen eingebracht und die Funktion des eingeführten Gens bei der Maus analysiert (Thomas and Capecchi 1987; Ramirez-Solis et al. 1993; Evans, 1997; Wiles et al. 2000).

2) Bei der vom-Phänotyp-zum-Gen-Strategie werden im Genom der Mäuse zufällige Mutationen z.B. durch Injektion speziell mutagen wirkender Chemikalien erzeugt und deren Auswirkung auf den Phänotyp der Mäuse in speziellen Screens getestet. Nach der Phänotypanalyse werden Ort und Chromosomenbereich der Mutation im Genom eingegrenzt.

Am GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München-Neuherberg wurde im Rahmen des Deutschen Humangenomprojektes (DHGP) das „ENU-Maus Mutagenese Projekt“ aufgebaut, in dem neue Mausmutanten durch chemische Mutagenese (Injektionen mit Ethylnitrosoharnstoff, ENU) generiert werden (Hrabé de Angelis and Balling, 1998; Soewarto et al. 2000). ENU verursacht in erster Linie Punktmutationen im Erbgut der Spermien mutagenisierter Männchen und hat im Vergleich zu physikalischen (Röntgen-, Gamma- oder Neutronenstrahlen) und chemischen (wie z.B. Procarbazin, Chlorambucil) Mutagenen die höchste Wirksamkeit (Russel, 1982, 1988, 1991). Die mutagene Wirkung des ENU ist von der verwendeten Dosis, von dem Mausstamm und von dem Behandlungsprotokoll abhängig. Mutagenisierte Männchen werden nach einer Sterilitätsphase mit unbehandelten Weibchen verpaart und pro Männchen ca. 50-60 Nachkommen produziert. Der Phänotyp der Nachkommen wird anhand zahlreicher Parameter in unterschiedlichen Screens, wie z.B. im Allergie-, Immunologie-, Klinisch-Chemischen-, Dysmorphologie- und Nociceptive- Screen untersucht und somit eine phänotypische Charakterisierung von Mausmutanten erstellt (http://www.gsf.de/ieg/groups/enu-mouse.html.)

Zu den standardisierten Untersuchungsmethoden neurologischer Mutantenlinien gehört das SHIRPA Protokoll (Rogers et al. 1997, 1999, 2001). Mittels SHIRPA Protokoll (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, Imperial College School of Medicine at St. Mary’s, Royal London Hospital, St. Bartholomew’s and the Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment) werden Mäuse im primären, sekundären und tertiären Screen getestet und dadurch wird eine spezifische Charakterisierung der Mutation erstellt (Nolan, 2000).

Ein breites Untersuchungsspektrum für Mutationen unterschiedlicher Art (wie z.B. Transgene-, Knockout- und chemisch induzierte Mutationen) bietet die Deutsche Mausklinik an der GSF Neuherberg (German Mouse Clinic, GMC). Das Phänotypisierungszentrum besteht aus vielen Labormodulen, die jeweils für die Untersuchung eines speziellen Bereichs (z.B. Allergie-, Dysmorphologie- (Knochen und Knorpel), Immunologie-; Klinisch-Chemischen-; Metabolischen-; Neurologischen-; Pathologischen- und Verhaltens- Screen) ausgestattet sind (http://www.gsf.de/ieg/gmc/index.html). Die gesamten Untersuchungsergebnisse werden

in einer Datenbank gesammelt und verwaltet, welche eine wichtige Resource für alle am Mouse Mutagenese Screen beteiligten Institutionen darstellt.
In einem noch breiter angelegten Ansatz haben Wissenschaftler aus Europa, Japan und USA das International Mouse Mutagenesis Consortium, IMMC gebildet (Nadeau et al. 2001), in dem sämtliche Daten aus den beteiligten Zentren zusammengeführt werden. Es wird angestrebt, für jedes Mausgen mindestens eine Mutantenlinie zu entwickeln, was bei rund 30.000 Genen im Mausgenom eine beachtliche Aufgabe bedeutet. Das gemeinsame Datennetz ermöglicht einen effizienten Austausch von Informationen zwischen den beteiligten Institutionen und bietet Auskunft über bereits neu entdeckte Mutantenlinien.

2.2 Kryokonservierung von Mausspermien

2.2.1 Aufbau eines Kryoarchivs

Das komplette Genom der Mäuse enthält ca. 30.000 Gene (Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston 2002). Um die Funktion jedes einzelnen Gens aufzuklären, bräuchte man eine dementsprechend große Anzahl von Mutantenlinien, welche die derzeit verfügbaren Maushaltungskapazitäten bei weitem überschreiten würde. Die Etablierung eines Kryoarchivs stellt eine platz-, zeit- und kostensparende Lösung dieses Problems dar (Glenister, 2000, Marschall, 1999). Darüber hinaus bietet die Kryokonservierung genetischen Materials im Vergleich zur kontinuierlicher Erhaltungszucht einen Schutz vor Erkrankungen und genetischer Drift (Goto et al. 2002).
Nachdem genetisches Material von Mäusen erstmals erfolgreich im Jahr 1972 in Form von Embryonen eingefroren worden war (Whittingham, 1971; Wilmut, 1972), erfolgte eine Expansion der Embryonenkryokonservierung (so g. Mouse Embryo Cryobanking) in mehreren Mauslaboratorien: z.B. im Medical Research Council, im MRC Harwell, im Jackson Laboratory, Bar Harbor und in den National Institutes of Health, Bethesda, USA (Mobraaten, 1986). Der Einfrierprozess wurde vorerst nach dem originalen Protokoll von Whittingham, 1971 und Wilmut, 1972 praktiziert, im Laufe der Zeit wurden aber auch weitere Protokolle (Renard and Babinet, 1984; Rall and Wood, 1994) entwickelt.

Die Kryokonservierung von Mausspermien wurde erst in den 90-iger Jahren eingeführt (Yokoyama, 1990; Okuyama, 1990; Tada, 1990; Nakagata, 1992; Nakagata und Takeshima, 1993; Penfold, 1993), während die Kryokonservierung von Spermien anderer Tierarten schon seit den 50-iger Jahren routinemäßig angewendet wurde (z.B. beim Rind: Polge, 1949; Polge and Lovelock, 1952; Polge and Rowson, 1952 und bei Menschen: Sherman, 1978). Das erste Einfrierprotokoll für die Mausspermien wurde von Yokoyama et al., 1990 etabliert. Die Spermien wurden in 5% Glycerol und 10% Raffinoselösung erfolgreich eingefroren und aufgetaut. Noch im gleichen Jahr entwickelten Tada et al. 1990 mit 18% Raffinose plus 1,75% Glycerol und Okuyama et al. 1990 mit 18% Raffinose und 3% Magermilchpulver zwei weitere Einfrierprotokolle für die Kryokonservierung der Spermien, wobei die Einfriermethode von Okuyama anschließend als eine standardisierte Methode in vielen Mauslaboratorien eingeführt wurde (Marschall et al. 1999; Thornton et al. 1999; Nakagata, 2000; Sztein, 2000, Critser, 2000).
Um die wichtigen genetischen Resourcen der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung zu stellen und nach Bedarf auch einen schnellen Zugang zu angefragten Mutantenlinien zu ermöglichen, wurden weltweit in Institutionen, wie u.a. im Jackson Laboratory in Bar Harbor (http://www.jax.org), im MRC Harwell (http://www.mut.har.mrc.ac.uk), im European Mouse Mutant Archive, EMMA (www.emmanet.org) und im Japanese Mouse Mutant Archive (JMMA) große Kryoarchive aufgebaut. Obwohl das genetische Material der Mäuse vorwiegend in Form von Embryonen archiviert wird, nimmt die Bedeutung der Kryokonservierung von Spermien stetig zu und wird bereits routinemäßig eingesetzt.

2.2.2 Vorteile der Kryokonservierung von Mausspermien

Zu den wichtigsten Vorteilen der Kryokonservierung von Mausspermien gehören u.a.:
1) eine unkomplizierte Form des Einfrierprotokolls, 2) der geringe Zeitaufwand, 3) effektive Kosten pro kryokonservierte Maus (Nakagata, 2000) und 4) eine große Anzahl an Nachkommen, die aus den kryokonservierten Spermien produziert werden kann (Sharp and Mobraaten, 1997). Die Effizienz der Spermienkryokonservierung könnte rein theoretisch mittels folgender Tabelle dargestellt werden (Course on Cryopreservation of Mouse Germplasm, Monterotondo, 2003, C. Landel):

Tabelle 1 Effizienz der Spermienkryokonservierung vs. Embryonenkryokonservierung

Effizienz der Spermienkryokonservierung vs. Kryokonservierung von Embryonen		
	Max. Anzahl der Keimzellen, bzw. Embryonen pro Maus	**Max. Anzahl der Nachkommen nach der Kryokonservierung**
Spermien	10^7/ml Spermaprobe 10 Spermaproben pro Männchen	10 IVF (hybride Kreuzung) 1000 Nachkommen
Embryonen	16 Embryonen	4 Nachkommen

Da 1ml Spermaprobe durchschnittlich ca. 10 Millionen Spermien enthält, können aus 10 Spermaproben pro Männchen bei optimalen Voraussetzungen (hybride Rückkreuzung, gute Spermaqualität nach dem Einfier-/Auftauprozess) 10 *in vitro* Fertilisationen mit ca. 1000 Nachkommen (100 pro IVF) produziert werden. Im Vergleich dazu kann bei der Kryokonservierung von Embryonen pro superovuliertem Weibchen mit maximal 16 Embryonen gerechnet werden, was nach Einfrier-/Auftauverlusten und bei einer durchschnittlichen Embryotransferrate von 50% 4 Nachkommen ergeben würde.

Weiterhin benötigen die für die Spermienkryokonservierung vorgesehenen Männchen keine Hormonstimulation und die Mauszucht keine Kapazitätserweiterung, um eine ausreichende Anzahl an Spermien für die Kryokonservierung zu erreichen (Nakagata, 1996). Die große Anzahl produzierter Nachkommen kann zu einer Beschleunigung der Mutantenproduktion führen und auch für eine schnelle Rückkreuzung mit einem gewünschten Mausstamm dienen (Marschall et al. 1999; Thornton et al. 1999). Im Gegensatz dazu benötigt man zur sicheren Archivierung eines Mausstammes zahlreiche Embryonen (ca. 500 bis 1000), so dass der Embryonenkryokonservierung oftmals eine Zuchtexpansion vorausgeht, um Embryonenspender zu produzieren (Mobraaten, 1981; 1986).

Trotz der genannten Vorteile der Spermienkryokonservierung sind bei der Auswahl der Kryokonservierungsmethode noch weitere Faktoren zu bedenken (Sharp and Mobraaten, 1997): während mittels Embryonen das vollständige Genom der Maus konserviert wird,

stellen Spermien nur den Haplotyp dar, so dass für die Revitalisierung kryokonservierter Spermien Eizellenspender des selben genetischen Hintergrundes benötigt werden (Marschall et al. 1999; Thornton et al. 1999). Auch können Stämme, deren Mutationen ausschließlich mütterlicherseits vererbt werden, nicht über Spermienkryokonservierung abgesichert werden (Marschall et al. 1999).
Die Zuverlässigkeit der ausgewählten Kryokonservierungsmethode ist vom genetischen Hintergrund abhängig, da die Fertilisationsfähigkeit kryokonservierter Spermien nach dem Einfrier-Auftau-Prozess stammspezifisch ist und drastisch sinken kann (Sztein, 2000).

2.3 Revitalisierung von Spermaproben

Kryokonservierte Spermaproben können bei Bedarf mittels künstlicher Befruchtung (*in vitro*-Fertilisation, IVF), bzw. künstlicher Besamung (artificial insemination, AI) wiederbelebt werden (Nagy, 2003; Thornton et al. 1999; Marschall et al. 1999).

2.3.1 *In vitro* Fertilisation

Bei der *in vitro* Fertilisation werden zur Embryonenproduktion reife Eizellen mit befruchtungsfähigen Spermien in der Petrischale zusammengebracht. Diese Methode ermöglicht eine höhere Embryonenproduktion als *in vivo*, die durch die Synchronisation der Kapazitation der Spermien mit der Reifung der Eizellen optimiert wird (Nagy, 2003; Schenkel, 1995).
Um eine möglichst große Ausbeute an befruchtungsfähigen Eizellen zu erhalten, muss eine so g. Superovulation der Weibchen durchgeführt werden. Die Eizellenspender werden abhängig vom Tag/Nacht Zyklus des Tierlabors mit Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, PMSG (für die Stimulation des Follikelwachstums) und Human Chorionic Gonadotropin, HcG (für die Ovulationsauslösung) injiziert und die Eizellen gewonnen. Verschiedene Parameter, wie z.B. Mausstamm, Alter der Mäuse, Hormondosis und Zeit der Hormoninjektionen können die Effektivität der Superovulation beeinflussen.

Erfahrungsgemäß sind Hybride und Auszuchttiere meistens wesentlich bessere Eizellenspender als Inzuchtlinien (Edirisinghe, 1986; Auerbach, 2003; Revel, 2004). Oft ist die Superovulation bei schwierigen Inzuchtstämmen (wie z.B. Balb/cAnNCrl, C57BL/6J) mit aufwendigen Techniken verbunden (Bruce, 1968; Whitten, 1973; Ma, 1998). Das optimale Alter der Weibchen für die Superovulation wurde für zwei Altersgruppen beschrieben: 1) für die präpubertären Weibchen, im Alter von 21-28 Tagen, und 2) für die geschlechtsreifen Weibchen, die älter als 56 Tage sind (Ozgunen, 2001). Das optimale Alter der Weibchen für die Superovulation variiert von Stamm zu Stamm und sollte für unbekannte Stämme ausgetestet werden. Erfolgreiche Superovulation hängt auch von der Hormondosis und vom Zeitpunkt der Injektion ab. Grundsätzlich wird für die beiden Injektionen eine Hormondosis von 5.0 internationalen Einheiten (I.E.) benutzt (Nagy, 2003). Genaue Anpassung der Eizellengewinnung an die Zeit der Hormoninokulation und des Tag/Nacht Zyklus kann die Befruchtungsfähigkeit der Eizellen optimieren und die Aushärtung der Zona Pellucida verhindern (Kapitel 3.2.1.2 und Nagy, 2003).

Der Reifungsprozess der Spermien (Kapazitation) umfasst Veränderungen in der Zusammensetzung und Orientierung von Molekülen in der Spermienmembran (Gadella et al. 1999) und im Bewegungsmuster des Spermiums (so g. Hyperaktivität des Spermiums). Danach erfolgt die Akrosomenreaktion, wobei hydrolytische Enzyme, wie Hyaluronidase und Akrosin aus dem Akrosom (Membranstruktur des Spermienkopfes) freigesetzt werden. Der Kapazitationsprozess und die Akrosomenreaktion werden *in vivo* mit Hilfe von Sekreten aus dem weiblichen Geschlechtstrakt induziert und können *in vitro* durch ein spezielles Medium ausgelöst werden, dessen Zusammensetzung ähnlich der Flüssigkeit des weiblichen Genitaltrakts ist (Quinn et al. 1985, 1995). Erst nach erfolgreichem Verlauf beider Prozesse ist das Eindringen der Spermien in die Eizelle möglich (Yanagimachi, 1988).

2.3.2 Fertilisationsprobleme

Bis jetzt wurden viele Mausstämme bezüglich der Spermaqualität nach dem Einfrierprozess und der Fertilisationsrate in der IVF untersucht. Die Ergebnisse aus den

Untersuchungen können grundsätzlich in zwei Gruppen aufgeteilt werden und sind in der Tabelle 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2 IVF bei den Inzuchtstämmen:

Inzuchtstämme:	Fertilisationsrate (%):	Referenzen:
C57BL/6N	12,9[a]; 25,5[b]	[a]Tada, 1990; [b]Nakagata, 1993
C57BL/6J	3,0[a]; 6,0[b]	[a]Songsasen; 1997; [b]Sztein, 2000
129/J	17,2[a]; 6,0[b]	[a]Songsasen; 1997; [b]Sztein, 2000
Balb/c	18,9[a]; 46,8[b]; 12,0[c]	[a]Tada, 1990; [b]Nakagata, 1993; [c]Sztein, 2000
DBA/2N	63,5[a]; 88,9[b]	[a]Tada, 1990; [b]Nakagata, 1993
DBA/2J	34,0[a]	[a]Sztein, 2000
C3HeB/FeJ	52,9[a]	[a]Marschall, 1999
C3H/HeN	35,0[a]; 73,3[b]	[a]Tada, 1990; [b]Nakagata, 1993
FVB/N	42,0[a]	[a]Sztein, 2000
ddy	47,9[a]	[a]Tada, 1990
kk	31,5[a]	[a]Tada, 1990
CBA/JN	76,5[a]	[a]Tada, 1990

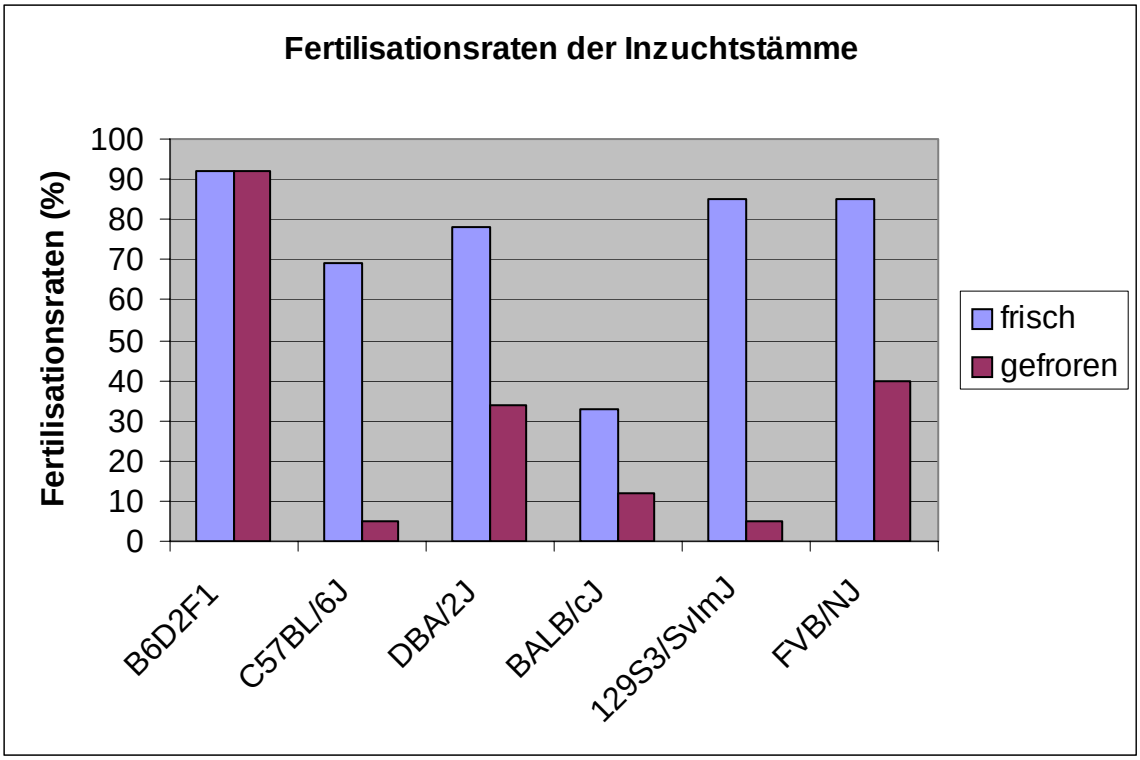
Tabelle 3 IVF bei den hybriden Stämmen :

Hybride Stämme:	Fertilisationsrate (%):	Referenzen:
CDF1(Balb/cxDBA/2N)	76,4[a]	[a]Nakagata, 1993
BDF1(C57BL/6NxDBA/2N)	74,6[a]	[a]Nakagata, 1993
B6C3F1(C57BL/6NxC3H/He)	59,3[a]	[a]Nakagata, 1993
B6D2F1(C57BL/6JxDBA/2J)	61,0[a]	[a]Songsasen, 1997
CB6F1xB6D2F1	92,0[a]	[a]Sztein, 2000
(C3H/HeHxBalb/c)F1	40,8[a]	[a]Thornton, 1999

Aus den Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden: a) prinzipiell wurden bei den hybriden Stämmen bessere Befruchtungsraten beobachtet als bei den Inzuchtstämmen, b) zwischen den Inzuchtstämmen gibt es gravierende Unterschiede der Befruchtungsraten (z.B. bei den Stämmen C3HeB/FeJ, C57BL/6J und 129/J), c) auch innerhalb eines Stammes wurden von verschiedenen Experimentatoren völlig unterschiedliche Ergebnisse erzielt (z.B. Balb/c: 12,0 %; 46,8 %; 18,9 %).

Unterschiede der Fertilisationsraten innerhalb der Inzuchtstämme wurden von Sztein et al. 2000 detailliert untersucht und die Ergebnisse in Abb. 1 zusammengestellt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse umfasst einen Vergleich der Fertilisationsraten zwischen frischen und gefrorenen Spermien der untersuchten Inzuchtstämme. Da die Fertilisationsraten der frischen Spermien (vor allem bei Stamm C57BL/6J, Balb/cJ und 129SVJ) gravierend bessere Ergebnisse erzielen, besteht die Vermutung, dass die Inzuchtstämme besonders empfindlich auf den osmotischen und thermischen Stress während des Einfrier-/Auftauprozesses reagieren (Watson, 1995; Katkov and Mazur, 1998 und 2000).

Abb.1 Graphische Darstellung von Fertilisationsraten der Inzuchtstämme (Sztein et al. 2000)



2.4 Assistierte Reproduktionstechniken

Die eingeschränkte Fruchtbarkeit der Männchen, die u.a. durch die Kryokonservierung der Spermien verursacht wird, kann mittels assistierter Reproduktionstechniken verbessert werden.

Zu diesen Techniken zählen:

1) assistierte Reproduktionstechniken ohne direkten Einfluss auf die Mauskeimzellen, wie z.B.: die *in vitro* Fertilisation, künstliche Besamung und Ovarientransplantation, die sowohl bei eingeschränkter Fruchtbarkeit der Weibchen als auch Männchen eingesetzt werden können,

2) Methoden mit direkter Behandlung der Keimzellen, wie z.B. eine chemische, mechanische, bzw. lasergesteuerte Behandlung der Eizellen, oder eine direkte Einführung der Spermien in die Eizelle.

Durch diese Methoden kann das Eindringen der Spermien in die Eizelle erleichtert und sogar mit immotilen Spermien, wie z.B. bei gefriergetrockneten Spermien, eine Befruchtung erreicht werden (Wakayama, 1998).

Um die Befruchtungsraten in der IVF mit kryokonservierten Spermien zu erhöhen, wurden bis jetzt folgende Methoden angewendet:

2.4.1 Chemische Behandlung der Eizelle

Zona Drilling (ZD)

Diese Methode wurde erstmals von Gordon und Talanski (1986) beschrieben. Hierbei wurden die Schutzhüllen der Mauseizellen (so g. Zona Pellucida) punktuell mittels einer Kanüle mit Acid Tyrode's Lösung (niedriger pH-Wert=3,0) verdaut und dadurch das Eindringen der Spermien in die Eizellen erleichtert (besonders bei niedriger Spermienkonzentration, so g. Oligospermie). Aufgrund des sehr hohen Prozentsatzes degenerierter Eizellen bei Menschen (Payne, 1995) wird diese Technik kaum noch angewendet.

Bei einer alternativen Anwendung, dem so g. Zona Melting, werden die Mauseizellen komplett in Acid Tyrode's Lösung gebracht und der pH-Wert nach ca. 30-45 sec. mit PBS-BSA Medium neutralisiert. Die vorläufigen Ergebnisse (Course of Cryopreservation

on Mouse Germplasm in Monterotondo, 2003; AIVF Lecture; www.jax.org/cryo) gestalteten sich bei dieser Methode relativ vielversprechend, da sich die Befruchtungsraten für kryokonservierte Spermien von C57BL/6J und 129S1/SvJmJ Mäusen von unter 10% auf 20-30% steigern ließen (C. Landel, persönliche Mitteilung).

2.4.2 Mechanische Manipulation der Zona Pellucida

Partial Zona Dissektion (PZD) und Zona Incision by Piezo-Micromanipulator (ZIP)

Bei der mechanischen Manipulation der Zona Pellucida wurden die Eizellen punktuell mit Hilfe einer Kanüle, PZD (Depypere, 1988; Barlow, 1991; Payne, 1995; Nakagata, 1997), bzw. eines Piezo-Mikromanipulators, ZIP (Kawase, 2002; 2004) angeschnitten. Die Schnittgröße variierte, je nach angewendeter Technik, zwischen 70-80 µm (Payne, 1995), 20-40 µm PZD, 26 µm ZIP (Kawase, 2002); 20-40 µm (Nakagata, 1997), 10-20 µm (Barlow, 1991) und war für die weitere Entwicklung des Embryos ausschlaggebend. Payne (1995) beobachtete, dass es durch den im weiblichen Genitaltrakt ausgeübten Druck zu einem Verlust von Blastomeren durch die 70-80 µm große Öffnung der Zona Pellucida kommen kann. Diese Gefahr war bei 4-Zell-Embryonen (Größe 50-60 µm) größer, als bei 8-Zell Embryonen, da diese schon so g. tight-junctions ausbilden und dadurch kompakter sind. Daher konnte Payne (1995) die Ergebnisse des Embryotransfers verbessern, wenn der Transfer von Tag 2 auf Tag 3 verlegt wurde.

2.4.3 Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida (Laser Zona Dissection, LZD)

Eine in der Humanmedizin in neuerer Zeit angewendete und sehr viel versprechende Methode ist die Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida (Germond, 1995; Baruffi, 2000; Blake, 2001; Sagoskin, 2002). Hierbei erfolgt das Anschneiden der Zona nicht mechanisch, sondern mit Hilfe eines Laserstrahls, der unter einem Stereomikroskop computergestützt äußerst präzise eingesetzt werden kann. Diese Technik wurde bis jetzt mit Hilfe unterschiedlicher Laserstrahlen (1.48-µm Diode Laser Beam: Germond, 1995

und 1996; Nitrogen-pumped VSL-337ND Laser: Liow, 1996; Enginsu, 1995; 1,48 nm InGaAsP Diode Laser: Hollis, 1997) getestet und wurde auch in der Mausreproduktion angewendet (Germond, 1995 und 1996; Enginsu, 1995; Liow, 1996; Hollis, 1997). Die Schnittgröße in der Zona Pellucida lag hierbei zwischen 2-20 µm und führte je nach Expositionszeit durch die gesamte oder nur durch einen Teil der Zona Pellucida hindurch. Durch die Lasermanipulation der Eizellen konnte eine Steigerung der Befruchtungsraten für kryokonservierte Spermien von 30-50 % auf 70-90% (verwendete Mausstämme: Germond, 1995, 1996: B6D2F1, Liow, 1996: CBA/C57; Enginsu, 1995: CBAB1F1) beobachtet werden.

2.4.4 Direkte Einführung der Spermien in die Eizelle

Diese Methode ermöglicht eine Befruchtung der Eizellen mit Spermien, die unbeweglich und dadurch auch befruchtungsunfähig sind (z.B. gefrier-/getrocknet).

Subzonal insemination, SUZI

Bei dieser erstmals von Ng, 1989 publizierten Technik werden die Spermien durch ein Loch in der Zona Pellucida direkt in Kontakt mit dem Oolemma (Eizellenmembran) gebracht und somit die Fertilisation erleichtert. Diese Methode wurde vorwiegend mit menschlichen Gameten durchgeführt (Ng, 1989; Cohen, 1991; Fishel, 1991; Palermo, 1992, Payne, 1995). Bei der in vitro Fertilisation der Mäuse wurde mit dieser Methode keine Verbesserung der Trächtigkeitsrate bei CBAB1F1 Oozyten beobachtet (Enginsu et al. 1995).

Intracytoplasmic sperm injection, ICSI

Die ersten erfolgreichen ICSI Experimente bei Mäusen wurden von Yanagimachi und Kimura, 1995 durchgeführt. Immotile Spermien wurden dabei direkt ins Zytoplasma der Eizelle injiziert. Yanagimachi und Kimura (1995) verwendeten dafür den hybriden Stamm B6D2F1 als Keimzellendonor und generierten die ersten Nachkommen. Das erfolgreiche Resultat wurde auch für Stämme B6C3F1 und C57BL/6 von Kawase and Yanagimachi (2001) wiederholt. Die Befruchtungsraten stiegen dabei sowohl bei dem hybriden, als auch bei dem Inzuchtstamm von 0 auf 60-80%.

2.5 Sanierung von Mausbeständen

Der Gesundheitsstatus der Versuchstiere besitzt eine große Bedeutung in der biomedizinischen Forschung, besonders auf dem Gebiet der Immunologie.
Subklinische Infektionen können Physiologie und Reaktion der Mäuse auf die Versuchsbedingungen ändern und einen störenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben (Homberger, 1996). Daher sind Mausbestände mit standardisierter mikrobiologischer Qualität, so g. specific pathogen freie (SPF) Mäuse (SPF nach FELASA-Empfehlungen, Nicklas et al. 2002), für die Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse die Voraussetzung.
Da Mäuse, die in eine Tierhaltung importiert werden sollen, ihren eigenen hygienischen Zustand haben, besteht die Gefahr, dass der SPF-Zustand der Tierhaltung gefährdet wird (Schenkel, 1995). Daher müssen die Mauslinien vorher saniert werden, wofür es grundsätzlich zwei Möglichkeiten gibt: 1) trächtigen Weibchen wird kurz vor dem Wurftermin der Uterus mit Feten mittels Kaiserschnitt entnommen (so g. Hysterektomie) und nach Desinfektion des Uterus die Nachkommen in einem hygienisch sauberen Bereich einer Ersatzmutter (so g. Amme) gegeben, oder 2) in vivo produzierte Embryonen kontaminierter Spendertiere werden entnommen und mittels Embryotransfer in ein hygienisch sauberes Tier gebracht.
Der Transfer von Embryonen in pathogenfreie, scheinträchtige Ammentiere gilt als eine anerkannte Methode, um Mausstämme hygienisch sanieren, bzw. wiederbeleben zu können (Carthew, 1983, 1985; Reetz, 1988; Suzuki, 1996; Morrell, 1999). Da transferierte Embryonen unterschiedliche Herkunft haben können (*in vitro*, bzw. *in vivo* produziert), kann der Hygienestatus der Embryonen nicht als gleichmäßig eingestuft werden. Die *in vitro* Produktion von Embryonen (z.B. zur Revitalisierung kryokonservierter Spermaproben) bietet grundsätzlich aufgrund der Fertilisation außerhalb des weiblichen Genitaltraktes mehrere Kontaminationsgefahren, als die *in vivo* Produktion von Embryonen. Alle Gegenstände, mit denen die Eizellen in Kontakt kommen, wie z.B. Medien, Präparationsinstrumente, Geräte, Spermaproben, können ein erhöhtes Risiko einer Infektionsübertragung darstellen.

Bei der Befruchtung *in vitro* werden auch die zu fertilisierenden Eizellen direkt mit dem Nebenhoden-Homogenat inkubiert. Der Nebenhodenschwanz wird zerkleinert, so dass die Spermien ausschwimmen können (Nakagata, 2000; Marschall et al. 1999). Die daraus resultierende Suspension wird üblicherweise ohne weitere Aufreinigung für die *in vitro* Fertilisation genutzt. Die Wahrscheinlichkeit der Pathogenübertragung wird dabei durch das standarisierte Waschen der Eizellen vor dem Embryotransfer minimiert (Suzuki, 1996), wie hoch sie sich aber für die kryokonservierten Spermaproben von Männchen, die sich in einem infektiösen Stadium befinden, gestaltet, ist unklar.

2.6 Maus Hepatitis Virus als Übertragungsmodell für Pathogene

2.6.1 Allgemeine Beschreibung des Maus Hepatitis Virus (MHV)

Das MHV gehört zur Familie der Coronaviren. Die Familie Coronaviridae umfasst eine Gruppe positiv gerichteter RNA-Viren, die aufgrund von morphologischen Unterschieden zu anderen Viren als eigene Familie definiert wurden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Siddell et al. 1983) zeigten Viruspartikel, die von einer Membranhülle mit eingelagerten Proteinen umgeben waren, durch die eine strahlenartige, kranzähnliche Struktur der Viren (auf lateinisch Strahlenkranz: *corona*) erkennbar war. Coronavireninfektionen wurden vorwiegend in Verbindung mit Krankheiten des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes gefunden (Tabelle 4).
Das häufige Auftreten der MHV-Infektionen bei Mäusen machte das MHV zu einem wichtigen Störfaktor in der biomedizinischen Forschung und dadurch zu einem der wichtigsten viralen Pathogene in heutigen Mauskolonien. Anhand des Gewebetropismus und unterschiedlicher Pathologie wurden bis jetzt viele MHV-Serotypen definiert, die in eine respiratorische und enterotropische Gruppe eingeteilt wurden (Tabelle 5). Die Übertragung des Virus erfolgt durch direkten Kontakt und über Vektoren wie kontaminierte Käfige, Geräte und Personen. Das Virus wird von der Maus oronasal aufgenommen und im Kot und im Sekret des Nasen-Rachen-Traktes ausgeschieden (Barthold, 1986). Der Krankheitsverlauf ist je nach Virusstamm und Mausstamm perakut bis inapparent. Das Virus verursacht bei Mäusen Leberentzündungen, Enteritis, Durchfall, Bronchitis und Enzephalitis. Neugeborene Tiere sind für eine MHV-Infektion sehr anfällig und haben eine hohe Mortalitätsrate. Bei adulten Tieren verläuft die Infektion meist inapparent (Homberger, 1996)
Der Nachweis basiert in erster Linie auf serologischen Bestandsuntersuchungen mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), kann aber auch mittels RT-PCR durchgeführt werden (Compton, et al. 1993). Der MHV-infizierte Bestand kann durch sichere Methoden wie Embryotransfer, Hysterektomie (Jacoby, 1984; Reetz, 1988), bzw. Zuchtunterbrechung (Weir et al. 1987) saniert werden.

Tabelle 4 Die Mitgliedern der Familie Coronaviridae (Compton, 1993)

Name	**Vorkommen**
Bovine Coronavirus **(BCV)**	Enteritis of cattle
Canine Coronavirus **(CCV)**	Enteritis of dog
Feline Enteric Coronavirus **(FECV)**	Enteritis of cat
Feline Infectious Peritonitis Virus **(FIPV)**	Peritonitis of cat
Haemagglutinating Encephalomyelitis Virus **(HEV)**	Wasting disease of pig
Human Respiratory Coronavirus 229E **(HCV-229E)**	Respiratory disease of human
Human Respiratory Coronavirus OC43 **(HCV-OC43)**	Respiratory disease of human
Infectious Bronchitis Virus **(IBV)**	Respiratory disease of chicken
Mouse Hepatitis Virus **(MHV)**	Hepatitis, enteritis of mouse
Porcine Respiratory Coronavirus **(PRCV)**	Pig Disease
Rabbit Coronavirus **(RbCV)**	Rabbit disease
Rabbit Enteric Coronavirus **(RECV)**	Enteritis of rabbit
Rat coronavirus **(RCV)**	Respiratory disease of rat
Transmissible Gastroenteritis Virus **(TGEV)**	Enteritis of pig
Turkey coronavirus **(TCV)**	Enteritis of turkey

Tabelle 5 Respiratorische und enterotropische Serotypen des Maus Hepatitis Virus (Barthold, 1986)

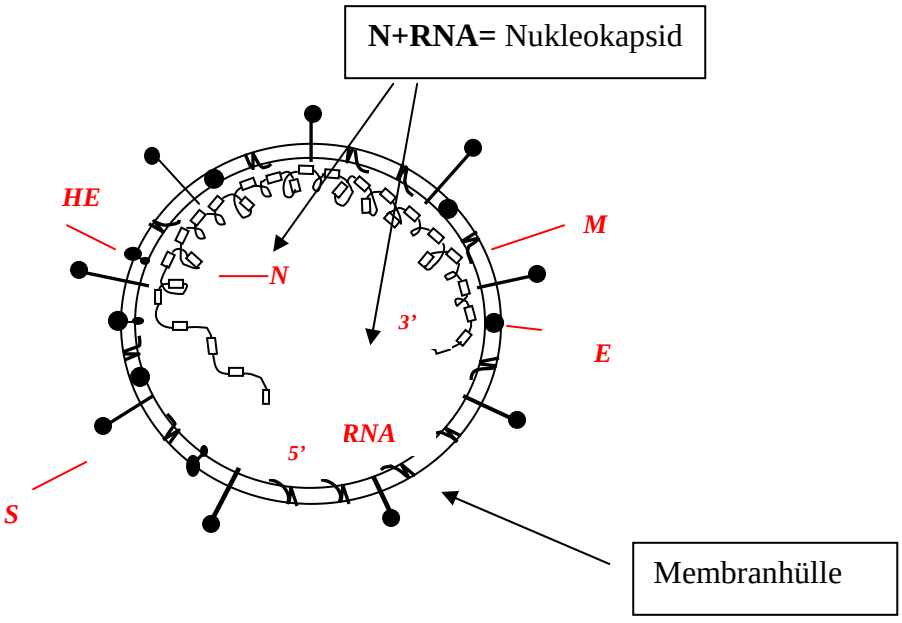
Respiratorische Serotypen	**Enterotropische Serotypen**
MHV-1 (Carthew and Sparrow, 1981; Barthold et al. 1986; Barthold and Smith, 1993)	MHV-RI (Homberger et al. 1992;1997)
MHV-2 (PRV) (Dveksler et al. 1993)	MHV SR3
MHV-3 (Carthew and Sparrow, 1981; Barthold et al. 1986; Homberger et al. 1998)	MHV SR4
MHV-4 (JHM) (Katami et al. 1978; Carthew and Sparrow, 1981; Barthold et al. 1986; Barthold and Smith, 1987; 1989; 1990; Barthold et al. 1988; Barthold et Smith, 1992; Smith et a. 1992; Dveksler et al. 1993)	LIVIM (Lethal Intestinal Virus of Infant Mice) (Homberger, 1997)
MHV-A59 (Carthew and Sparrow, 1981; Barthold et al. 1986; Lavi and Weiss, 1984; Smith et al. 1991; Dveksler et al. 1993; Lavi et al. 1984; Wessner et al. 1998)	MHV-D
MHV-S (Barthold et al. 1986; Barthold and Smith, 1989; 1990; Smith et al. 1992)	MHV-Y (Barthold, 1987; Barthold et al. 1988; Homberger and Barthold,1992; Homberger et al. 1992; Barthold et al. 1993)
MHV (C3H) (Shif and Bang, 1970; Lavelle and Bang, 1972)	DVIM (Diarrhea Virus of Infant Mice) (Homberger, 1997)
EHF 120 (MHV-B)	Tettnang Virus
H747	MHV-NuA
ANA	MHV-Nu66
MHV-C (MHV-Balb/c)	MHV-Kyoto
MHV (Braunsteiner/Friend)	MHV-S/CDC
MHV (SR1)	
NHV (SR2)	

2.6.2 Spezielle Beschreibung des Virus

2.6.2.1 Struktur

Die membrangehüllten Virionen der Coronaviren haben einen Durchmesser von 80-220 nm (Siddell, 1983). Die (+) gerichtete RNA bildet zusammen mit dem Nukleoprotein (N) eine lange helikale Struktur (so g. Nukleokapsid) im Zentrum des Virus (Abb.2). Das Nukleokapsid ist von einer Membranhülle umgeben, die aus einer Lipiddoppelschicht und zellulären Proteinen besteht. Zu den Proteinen zählen u.a.: das Membran- (M) und Spikeprotein (S).

Abb.2 Schematische Darstellung des Maus Hepatitis Virus (Homberger 1996).
(**N:** Nukleoprotein, **M:** Membranprotein, **S:** Spikeprotein,
HE: Haemagglutinin-Esterase-Protein, **E:** Small-Membranprotein)



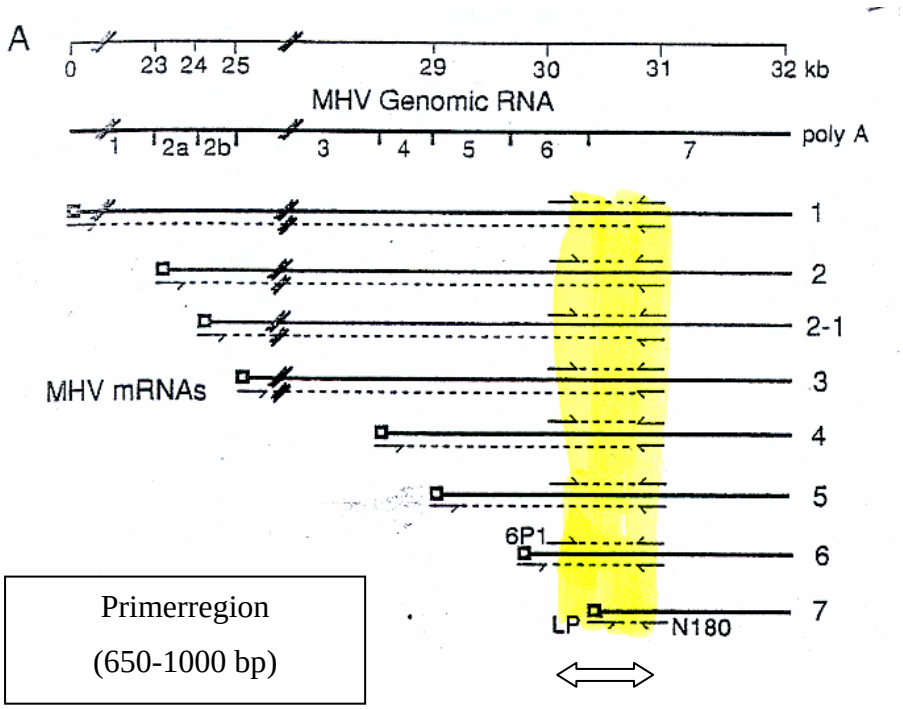
Während die M- und N-Proteine sehr deutlich bei allen MHV-Serotypen exponiert sind, ist das S-Protein gruppenspezifisch. Das S-Protein bildet charakteristische, strahlenartige Strukturen, welche der Virusfamilie ihren Namen gegeben haben und ist auch Träger der antigenetischen Varianz und der Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper und Zell-Rezeptoren (Collins et al. 1982, Williams et al. 1990). Anhand von Unterschieden

innerhalb der Bindungsstellen existiert, wie zuvor bereits dargestellt, ein Gewebetropismus der MHV Serotypen, anhand dessen man sie in eine respiratorische und enterotropische Gruppe einteilt (Boorman et al. 1982; Williams et al. 1090; 1991; Dveksler et al. 1991). Das vierte Strukturprotein, das Haemagglutinin-Esterase-Protein (HE), wurde bis jetzt nur bei wenigen Serotypen, wie DVIM, nachgewiesen (Sugiyama et al. 1986; 1998, Taguchi et al. 1985). Das Small Membranprotein (E) tritt nur selten auf und übt vermutlich eine katalytische Funktion bei der Freisetzung der Nukleinsäure in der Virusreplikation aus (Yu et al.1994, 1995).

2.6.2.2 Genom

Das Genom des Maus Hepatitis Virus besteht aus einer linearen, einzelsträngigen, (+) gerichteten RNA. Die Größe des Genoms wird auf ca. 27-32 Kilobasen geschätzt und dadurch zu den größten (+) gerichteten RNA-Viren eingeteilt (Boursnell et al. 1987).

Abb.3 Schematische Darstellung des MHV-Genoms (Yamada, 1993)



Die (+) gerichtete genomische RNA (MHV Genomic RNA) wird während der Translation vorerst zu einem großen Vorläuferprotein umgewandelt. Die Vorläuferproteine werden proteolytisch in die viralen Strukturproteine und Enzyme gespalten, von denen die RNA-abhängige RNA-Polymerase für die Genomreplikation sehr wichtig ist. Die Polymerase katalysiert unter Verwendung der (+) gerichteten RNA die Synthese eines komplementären (-) RNA–Stranges, der als Matrize für sieben (+) gerichtete subgenomische mRNAs (MHV mRNAs 1-7) gilt (Siddell, 1982; Lai, 1990). Die MHV mRNAs 1-7 kodieren folgende Strukturproteine des MHV:

- mRNA 1 kodiert die RNA-Polymerase,
- mRNA 2: das HE-Haemagglutinin-Esterase-Protein,
- mRNA 3: das S-Spikeprotein,
- mRNA 5: das E-Small Membranprotein,
- mRNA 6: das M-Membranprotein
- und mRNA 7: das N-Nukleoprotein.

Aufgrund der oft bei der Virusreplikation auftretenden Mutationen basiert die MHV RT-PCR auf der für alle Serotypen homologen Region zwischen Basenpaar 600 und 1000 (bei Taylor & Copley, 1994: Region zwischen 750-950 bp) und kann zum allgemeinen Nachweis von MHV verwendet werden (Homberger, 1991; Yamada et al. 1993; Taylor & Copley, 1994)

2.6.2.3 Infektionszyklus

Infektion

Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der Anheftung des Virus an die Zelloberfläche (so g. Absorption) und wird durch die Membranproteine vermittelt. Die Anheftung und die spezifische Bindung des Mäuse Hepatitis Virus an die Zelloberfläche wird über das Spikeprotein (S) vermittelt und ist für respiratorische und enterotropische Serotypen sehr spezifisch (Homberger, 1997, Holmes, 1986). Nach der Absorption wird das an die Zelloberfläche gebundene Viruspartikel in das Innere der Zelle aufgenommen (so g. Penetration). Das MHV wird durch Endocytose als Membranvesikel von der Zelle aufgenommen und das Nukleokapsid des Virus (bestehend aus Nukleokapsidprotein (N) und (+) gerichteter RNA) ins Cytosol der Wirtszelle entlassen (Siddell et al. 1982).

Replikation und Morphogenese

Nach der Entlassung des Nukleokapsids (so g. Freisetzung der viralen Nukleinsäure) wird die RNA durch Translation in eine Form von einem oder mehreren 200K Polypeptiden umgewandelt (Holmes, 1986). Diese Polypeptide bilden unter anderem eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Dieses Enzym transkribiert die genomische RNA in eine einzelsträngige, (-) gerichtete RNA, die nach einer zweiten Transkription wieder in eine (+) gerichtete RNA umgeschrieben wird und als Matrize für die (+) gerichteten subgenomischen mRNAs (MHV mRNAs 1-7) gilt.

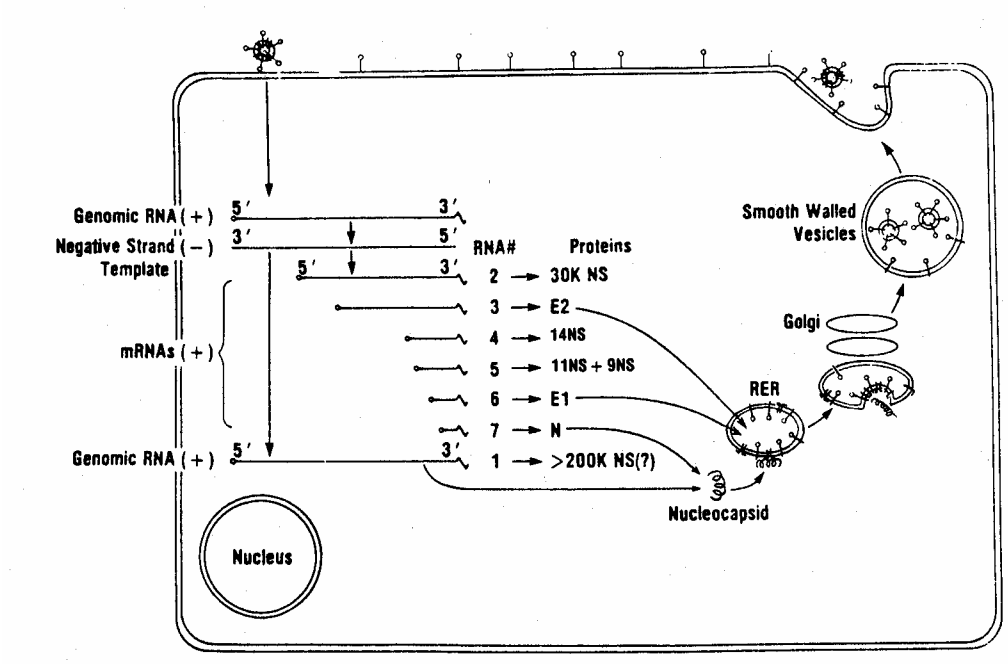


Abb. 4 Schematische Darstellung der Replikation des MHV (Holmes, 1986).

Nach dem Replikationsprozeß erfolgt der Zusammenbau der viralen Strukturproteine und des Genoms zu infektiösen Viruspartikeln (so g. Morphogenese des Virus). Der Zusammenbau der verschiedenen Komponenten zu partikulären Strukturen, Capsiden und infektiösen Viruspartikeln findet an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (RER) statt (Holmes, 1986).

Transport und Reifungsknospung

Nach der Virusmorphogenese (ca 16-24 h nach der Virusinfektion) findet der Transport und die Freisetzung der infektiösen Viruspartikeln, so g. Knospung, statt (Carthew, 1978; Lavi et al. 1996). Viren, die ins endoplasmatische Retikulum knospen, werden über den Golgi-Apparat in Vesikel (Smooth Walled Vesicles) geschleust. Diese werden an die Plasmamembran der Wirtszelle gebracht und das Virus aktiv aus der Zelle freigesetzt (Holmes,1986). In Folge einer massiven Ansammlung von Viruspartikeln im Cytoplasma der Wirtszelle kann die Freisetzung der Nachkommenviren auch zu einer Lysis der Wirtszelle führen (so g. budding).
Eine Zellkulturinfektion zeigt nach dieser Zeit charakteristische Synzytienformation, bzw. Zelllysis innerhalb der L-929 Zellen, die in Verbindung mit Defragmentierung und Reorganisation des Golgi Apparatus stattfindet (Lavi et al. 1996).

2.6.3 Pathogenese

Der Krankheitsverlauf in der Maus ist von verschiedenen Faktoren abhängig: 1) auf der Wirtsseite gehört dazu das Alter der Mäuse, der Mausstamm und der Gesundheitsstatus der Mäuse; 2) auf der Virusseite handelt es sich um den Infektionsweg, die Virusdosis und den Virusstamm (Barthold, 1986; Compton et al. 1993; Homberger, 1996). Anhand des Gewebetropismus der MHV-Serotypen zeigen respiratorische und enterotropische Stämme eine deutlich unterschiedliche Pathologie.

Respiratorische Virusstämme

Die Primärvermehrung des Virus findet in den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes statt. Die Virusnachkommen gelangen nach einer Virämie in eine Vielzahl von Geweben und Organen (Barthold, 1986; Homberger, 1996). Die Sekundärvermehrung der Virusnachkommen kann in vielen Organen, wie z. B in Gehirn, Knochenmark, Leber, Milz, sowie in den lymphatischen Knoten stattfinden (Barthold, 1986). Im Gehirn kann je nach Virulenz des Virus eine Enzephalitis oder Demyelinisierung ausgelöst werden. In anderen Organen, vor allem in der Leber, wurden

fokale Nekrosen mit pathognomischer Synzytienbildung gefunden (Barthold and Smith, 1983), die je nach Gesundheitsstatus der Tiere zum Tod, bzw. zu einer chronisch-progressiven „Wasting-Disease“ führten.

Enterotropische Virusstämme

Primärvermehrung der enterotropischen Virusstämme erfolgt im Darmtrakt, wobei im Colon die höchsten Virustiter gemessen wurden. In seltenen Fällen erfolgt anschließend eine Dissemination des Virus in andere Organe, vor allem in Gehirn und Leber (Barthold, 1986) Die Veränderungen der Darmschleimhaut können je nach Virusstamm in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden: von einzelnen Synzytien in oberflächlichen Enterozyten bis zur kompletten Zerstörung und Lysis der Kryptenstruktur des Darmes (Compton et al. 1993).

Anhand des Erscheinungsbildes der infizierten Zellen bzw. Organe können bei den respiratorischen und enterotropischen Virusstämmen pathognomonische Eigenschaften festgestellt werden: 1) bei den Mitgliedern der respiratorischen Gruppe kommt es meist zu einer Synzytienbildung innerhalb der infizierten Zellen (Barthold et al. 1984; Taguchi 1979) und 2) bei den Mitgliedern der enterotropen Gruppe zu einer Zelllysis, die meist innerhalb des Verdauungstrakts zu sehen ist (Biggers, 1964; Ishida, 1982). Diese Eigenschaften sind für diagnostische Zwecke hilfreich, um die Infektion feststellen und den MHV-Serotyp definieren zu können (Barthold, 1986).

2.6.4 Klinisches Bild

In den meisten Fällen verläuft eine natürliche MHV-Infektion inapparent (National Research Council, 1991). Enzootisch infizierte Bestände können jahrelang symptomfrei bleiben, da die Jungtiere im Alter von 3-4 Wochen noch durch die maternale Antikörper geschützt sind. Bei epizootischen Infektionen treten Symptome, wie Durchfall und hohe Mortalitätsrate, vor allem bei neugeborenen Tieren auf. Adulte Tiere zeigen meist unspezifische Symptome wie Inappetenz, Gewichtverlust, Apathie, gesträubtes Fell, Durchfall, Symptome aus dem ZNS, in seltenen Fällen Ikterus (National Research

Council, 1991, Homberger, 1996). Im Zeitraum von 3 bis 30 Tagen, je nach Virusstamm und Infektionsweg, scheidet das Tier Viren aus (höchster Virustiter am Tag 5 nach der Infektion), danach ist das Virus im Körper nicht mehr nachweisbar (Barthold und Smith, 1989, 1990; Compton et al. 1993). Der Nachweis erfolgte vorwiegend in Leber, Milz, Gehirn und Darm der intranasal- (Cheever et al. 1949; Carthew, 1981; Garlinghouse and Smith, 1985; Barthold et al. 1986, Lavi, et al. 1986; Barthold und Smith 1983; 1987; 1992), oral- (Cheever et al. 1949; Barthold, 1988; Barthold und Smith, 1993) und intraperitoneal- (Cheever et al. 1949; Taguchi et al. 1976; 1977; 1979; 1980; Lavi et al. 1986) inokulierten Tiere, aber auch in den Schleimhäuten des respiratorischen Traktes, in Knochenmark, lymphatischen Knoten, Lungen und Geschlechtsorganen (Barthold and Smith, 1987) wurde MHV gefunden.

MHV infizierte Mäuse entwickeln bereits 10 Tage nach der Infektion eine Immunität gegen das Virus und die ersten Antikörper gegen MHV können im Serum nachgewiesen werden (Homberger, 1992; Barthold, 1993). Die Immunität schützt die Tiere gegen Reinfektion mit dem gleichen Serotyp, aber nur bedingt gegen Neuinfektionen mit einem anderen Virusstamm, und nimmt bei jungen Tieren mit der Zeit ab (Homberger, 1996).

2.6.5 Pathogenität des MHV für meist verwendete Mausstämme

Die Pathogenität des MHV wurde für verschiedene Virus- und Mausstämme untersucht (Tabelle 6) und anhand der Antikörperproduktion der Mäuse (Nakanaga, 1983: MHV-NuU; Homberger et al. 1992: MHV-Y, -RI), unterschiedlicher Rezeptoren für MHV (Dveksler, 1993: MHV-2, -JHM, -A59; Ohtsuka, 1997: MHV-JHM; Knobler, 1981: MHV-JHM), spezifischer Virus/Makrophagenreaktion (Bang, 1959: MHV-PRI, -C3H) und Virusausscheidung durch Organe (Barthold, 1986: MHV-1, -3, -A59, -JHM, -S; 1987: MHV-Y ; Barthold et al. 1988: MHV-JHM; 1993: MHV-Y; Barthold and Smith, 1987: MHV-JHM; 1992: MHV-JHM; Raspa und Scavizzi, 2004: MHV) nachgewiesen.

Tabelle 6 Literaturangaben zur Pathogenität von MHV für verschiedene Mausstämme:

Suszeptibilität	**Mausstämme und Literaturstellen**					
	C57BL/6N	**C3H/HeN**	**Balb/c**	**SJL/J**	**DBA/2N**	**CD-1 (ICR)**
Vorhanden	Nakanaga et al. 1983 Dveksler et al. 1993 Ohtsuka and Taguchi, 1997; Knobler et al.. 1981	Dveksler et al. 1993; Ohtsuka and Taguchi, 1997; Knobler et al. 1981 Nakanaga et al.1983; Barthold et al. 1986	Dveksler et al. 1993; Ohtsuka and Taguchi, 1997; Knobler et al. 1981; Smith et al. 1984; Smith et al. 1992 Compton et al. 1993; Barthold et al. 1988; 1993; Barthold and Smith, 1987; 1992 Barthold et al. 1986 Homberger et al. 1992 Nakanaga et al. 1983		Ohtsuka and Taguchi, 1997; Smith et al. 1984 Nakanaga et al. 1983	Barthold and Smith, 1987; Barthold and Smith, 1990
Nicht vorhanden Bzw. Gering vorhanden		Compton et al. 1993; Bang, 1959		Dveksler et al. 1993; Ohtsuka and Taguchi, 1997; Knobler et al. 1981; Smith et al. 1984; Compton et al. 1993 Barthold et al. 1993; Barthold and Smith, 1987; 1992 Barthold et al. 1986		

2.7 Fragestellung der Arbeit

Obwohl der Embryotransfer als eine sichere und anerkannte Methode gilt, um die Mausbestände hygienisch sanieren bzw. wiederbeleben zu können (Carthew, 1983, 1985; Reetz, 1988; Suzuki, 1996; Morell, 1999), bietet die in vitro Produktion von Embryonen (z.B. zur Revitalisierung kryokonservierter Spermaproben) aufgrund der Fertilisation außerhalb des weiblichen Genitaltraktes mehr Kontaminationsgefahren als die in vivo Produktion von Embryonen.

Ziel vorliegender Arbeit war es, das Risiko einer Pathogenübertragung für verschiedene Aspekte der in vitro Fertilisation und für daraus resultierende Embryonen zu untersuchen und die Zuverlässigkeit eines standardisierten Waschverfahrens darzustellen. Folgende Fragestellungen wurden am Beispiel des Maus Hepatitis Virus (MHV), eines der wichtigsten Krankheitserregers in Maushaltungen, untersucht.

1) Führt eine Viruskontamination im Fertilisationsmedium bei der IVF zu einer Infektion der Embryonenempfänger? Wie ist der Effekt eines standarisierten Waschverfahren auf das Risiko der Virusübertragung?

2) Stellt eine intakte Zona Pellucida eine natürliche Barierre für die Erreger dar?

3) Was passiert, wenn die Zona Pellucida durch eine Lasermikrodissektion, eine moderne assistierte Reproduktionstechnik, punktuell eröffnet wird? Wird das Infektionsrisiko einer Pathogenübertragung dabei erhöht?

4) Können bei künstlich mit MHV infizierten Männchen Virusbestandteile im Nebenhodenschwanz (aus dem die Spermien für die in vitro Fertilisation gewonnen werden) mittels RT-PCR nachgewiesen werden? Falls ja, kann es zu einer Übertragung der MHV-Infektion auf die Ammenmutter und die Nachkommen durch in vitro Fertilisation mit infektiöser Spermiensuspension kommen?

Um die Fragestellungen zu beantworten, wurden als Eizellen- und Spermiendonor Tiere der Mausstämme C3HeB/FeJ und Balb/c, als Embryonenempfänger CD-1 Mäuse eingesetzt.

3 Material und Methode

3.1 Tiere

3.1.1 Tierhaltungsbedingungen

Die Mäuse wurden mit spezifisch-pathogen-freiem (SPF) Status gezüchtet und der Hygienestatus nach den Kriterien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) Richtlinien definiert. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug 20-24°C, die Luftfeuchtigkeit 50% +/- 5%. Das Lichtprogramm war auf einen 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus eingestellt. Das Licht ging um 7.00 Uhr an und um 19.00 Uhr aus. Im Tierraum erfolgte ein 20-facher Luftwechsel pro Stunde. Die Tiere wurden, je nach Versuchsgruppe, entweder in einem SPF-Raum in Filtertop-Käfigen (PTS Pharma-Techn.-Service, Sasbach) oder in IVC Filterkäfigen (Individually Ventilated Cages, Ventirack, Biozone, England) gehalten. Die Käfige mit Einstreu (Altromin, Lage, Deutschland), das Futter (1314, Altromin) und Flaschen mit Wasser wurden komplett vor dem Gebrauch autoklaviert. Die Infektionsüberwachung erfolgte durch so g. Sentinel Mäuse (FELASA Empfehlugen 1996, 2002), die separat jeweils für 12 Wochen in der Zeit der Experimente in einem so genannten Sentinelkäfig gehalten wurden.

3.1.2 Haltung der Eizellenspender

Es handelte sich dabei um weibliche Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Mäuse. Die Balb/cAnNCrl Mäuse wurden von Charles River Laboratories (CRL) eine Woche vor dem Beginn der Superovulation bezogen. Die C3HeB/FeJ Mäuse wurden in der GSF gezüchtet. Die Superovulation der Mäuse erfolgte in einem SPF-Raum, wo die Mäuse in Filtertop Käfigen gehalten wurden.

3.1.3 Haltung der Embryonenempfänger

Die CD-1 Swiss Webster Mäuse wurden ursprünglich von CRL Deutschland bezogen und in der GSF gezüchtet. Die Mäuse wurden in Filtertop-Käfigen mit SPF-Bedingungen gehalten. Die weiblichen Mäuse wurden im Alter von 8-10 Wochen als Embryonenempfänger benutzt und nach dem Embryotransfer separat in IVC-Filterkäfigen gehalten. Alle Manipulationen der Tiere wurden unter einer sterilen Werkbank (Class-II Laminar Flow Biological Safety Cabinet, Heraeus Instruments, Deutschland) durchgeführt.

3.1.4 Haltung der Männchen für MHV-Inokulation

In die MHV-Inokulation wurden männliche C3HeB/FeJ, Balb/cAnNCrl und CD-1 Swiss Webster Mäuse im Alter von 12 Wochen eingesetzt. Die C3HeB/FeJ und CD-1 Männchen wurden an der GSF gezüchtet und die Balb/cAnNCrl Männchen wurden von CRL bezogen. Eine Woche vor Beginn und während des Experiments wurden die Mäuse separat in IVC- Filterkäfigen gehalten. Alle Manipulationen der Tiere wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.1.5 Probenentnahme

Serumproben wurden separat von jeder Maus unter einer sterilen Werkbank entnommen. Das Blut wurde mit einer sterilen Kanüle (B.Braun, Gr. 14, Best. Nr. 4657640, Melsungen) in ein steriles Probengefäß mit Gerinnungsmittel (Probengefäß 1ml Z-Gel, Kat. No. 41/1378.005, Sarstedt AG & Co. Nümbrecht) gewonnen.
Bestecke wurden nach der Organentnahme, bzw. Embryotransfer für 20 min in eine 1% Dekontaminationslösung (Edisonite Schnellreiniger, Best. No. 44205, Brand GmbH. Co KG, Wertheim) eingelegt und danach gründlich mit destilliertem Wasser ausgespült (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg). Vor dem Gebrauch wurden sie nochmal in die 1% Edisonite Schnellreiniger Lösung eingelegt (1 Stunde,

50-70°C), gründlich mit RNase freiem Wasser ausgespült und für 20 min bei 180°C sterilisiert. Jedes Organ wurde einzeln mit separatem Besteck, bzw. mit sterilem Einmalskalpell (B. Braun, Aesculap AG & Co. Tuttlingen, Best. No. 5518083) in ein steriles Eppendorf Gefäß entnommen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C bis zur RNA Präparation aufbewahrt.

3.2 Angewendete Reproduktionstechniken

3.2.1 Bearbeitung der Eizellen

3.2.1.1 Superovulation der Weibchen

Um zu einer spezifischen Zeit eine möglichst große Ausbeute an entwickelten Eizellen zu erhalten, wurden die Weibchen im Alter von 21-28 Tagen (Stamm C3HeB/FeJ) und von 56 Tagen (Stamm Balb/cAnNCrl) superovuliert. Die Ovulation erfolgte nach einer einmaligen intraperitonealen (i.p.) Injektion mit PMSG und HcG:

PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) Injektion

(Stimulation des Follikelwachstums)

Die Injektion mit PMSG erfolgte 3 Tage vor der in vitro Fertilisation. Die Mäuse wurden mit 5.0 I.E. PMSG (Intergonan 1000, Kapitel 9.1.8) injiziert. Die Injektion erfolgte zwischen 16.00 und 18.00 Uhr.

HcG (Human Chorionic Gonadotropin) Injektion

(Ovulationsauslösung)

Die Injektion mit HcG wurde einen Tag vor der in vitro Fertilisation durchgeführt. Injiziert wurden 5.0 I.E. HcG (Ovogest 1500; Kapitel 9.1.9). Die Injektion erfolgte um 18.00 Uhr (ca. 48-50 Stunden nach der Injektion mit PMSG).

3.2.1.2 Präparation der Eizellen

Die Gewinnung der Eizellen erfolgte etwa 13,5-14 Stunden nach der Injektion mit HcG (um ca. 7.30 Uhr). Die Weibchen wurden durch Zervikale Dislokation getötet, beide Eileiter entnommen und in eine Petrischale (58x15 mm, Nunc, Wiesbaden, Kat. No. 150326) mit Mineralöl (Sigma-Aldrich, Kat. No. M-8410) gegeben. Die Eizellenpräparation erfolgte sofort nachdem die Eileiter in eine neue Petrischale mit 400 µl HTF-Medium unter Mineralöl umgelegt wurden. Die Eileiterampullen wurden im Mineralöl mit Präparationsnadeln aufgerissen, die Kumulus-Eizellen-Komplexe in den 400 µl HTF-Tropfen gezogen und anschließend möglichst schnell in die

Fertilisationsschalen gegeben. Durch diesen Waschschritt sollten Blut- und Gewebereste aus der Präparationsschale entfernt werden. Die Zeit von der Eileiterpräparation bis zu der Zugabe der Eizellen in die Fertilisationsschalen sollte möglichst kurz gehalten werden (bis max. 16 Stunden nach der HcG Injektion), da sonst das Risiko einer Aushärtung der Zona Pellucida entstand.

3.2.1.3 Lasermikrodissektion der Zona Pellucida

Falls die Eizellen für eine Lasermikrodissektion der Zona Pellucida vorgesehen waren, wurde die Präparation der Eizellen im PBS/BSA Medium ohne Mineralöl durchgeführt. Die Eileiter wurden entnommen und in eine Petrischale (40x15 mm, Nunc, Wiesbaden Kat. No. 150326) mit PBS/BSA-Medium gegeben. Die Eizellenpräparation erfolgte in einer neuen Petrischale mit frischem PBS/BSA-Medium. Die Eileiterampullen wurden im PBS/BSA mit Präparationsnadeln aufgerissen und die Kumulus-Eizellen-Komplexe auf einer Seite der Petrischale im PBS/BSA Medium angesammelt.

Um die Zona Pellucida mit dem Laser behandeln zu können, wurden die Kumuluszellen durch einen Waschvorgang mit Hyaluronidase (Kapitel 9.1.6) von der Oberfläche der Eizellen entfernt. Zu 30 µl Hyaluronidase Stocklösung (10 mg/ ml) im Eppendorf Gefäß wurden 500 µl PBS/BSA mit Kumulus-Eizellen-Komplexe gegeben und die gesamte Mischung (2 mal Gebrauchskonzentration mit 300 µg/ ml) nach mehrmaligem auf- und abpipettieren mit Hilfe einer 1000 µl Pipette in eine Petrischale gegeben (58x15 mm, Nunc). Nach einer kurzen Einwirkungszeit (ca. 2 min) wurden die Eizellen mittels einer Mundpipette (Biomedical Instruments, Zöllnitz) aus dem Tropfen herausgesucht und in eine Petrischale (40x15 mm) mit PBS/BSA Medium gegeben.

Nach dieser Bearbeitung konnten die Eizellen unverzüglich für die Laserbehandlung der Zona Pellucida genommen werden.

3.2.2 Bearbeitung der Spermien

3.2.2.1 Präparation der Nebenhodenschwänze

Um Spermien für die Kryokonservierung zu gewinnen, wurden die Männchen durch Zervikale Dislokation getötet und die Nebenhodenschwänze (caudae epididymis) mit Samenleiter (vas deferens) entnommen. Die Präparation der Nebenhodenschwänze erfolgte in einer 4-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Kat. No. 176740), die für die Präparation der Nebenhodenschwänze von gleichzeitig zwei Männchen ausreichend war. Zwei Vertiefungen der Schale wurden dafür mit je einem Tropfen 0,9 % NaCl-Lösung und zwei weitere Vertiefungen mit je 210 µl CPA-Medium (Cryo Protecting Agents, Kapitel 9.1.5) befüllt. Zuerst wurden die Nebenhodenschwänze in die NaCl-Lösung gegeben und die restlichen Blutgefäße, bzw. das restliche Fettgewebe entfernt (so g. Feinpräparation). Das Aufschneiden der Nebenhodenschwänze erfolgte in der CPA-Lösung. Um den Spermien das Herausschwimmen aus dem Gewebe zu erleichtern, wurde die Schale mit den aufgeschnittenen Nebenhodenschwänze für 10 min in den Brutschrank (37°C, 5% CO_2) gestellt. Da Spermien sehr empfindlich gegenüber mechanischen Manipulationen sind (Katkov and Mazur, 1998), dürfen sie nicht pipettiert werden. Daher wurden die Schalen mit den Spermien vorsichtig geschüttelt, bis eine homogene Spermiensuspension entstanden war.

Für die Qualitätsmessung der Spermien (Kapitel 3.2.2.4) wurden 2 µl von der homogenen Suspension in 100 µl HTF (bedeckt mit Mineralöl) gegeben und ca. 10 min im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.2 Kryokonservierung der Mausspermien

Die Kryokonservierung der Maus-Spermien erfolgte nach der Methode von Nakagata, 1997 und Sztein, 1997.

Zum Einfrieren der Proben wurden 0,25 ml Minipailletten (Minitüb, Tiefenbach/Landshut, Kat. No. 13407/0010) verwendet. Die Minipailletten wurden vor dem Kryokonservierungsprozess mit CILS Etiketten (Kat. No. 44BGR249) beschriftet.

Die Beschriftung erfolgte mittels HP Laserdrucker und die Etiketten wurden direkt auf die Minipaillette geklebt.

Pro Männchen wurden ca. 210 µl Spermasuspension als 10 Aliquots, je 20 µl, eingefroren. Die Minipailletten wurden mittels einer Insulinspritze (Terumo Europe N.V. Typ BS-01T, Belgien), die an einem Ende der Minipaillette aufgesteckt wurde, befüllt. An diesem Ende befand sich auch ein Watteplug mit PVA-Pulver, das beim Kontakt mit Flüssigkeit polymerisiert und die Minipaillette abdichtet.

Zuerst wurden ca. 100 µl HTF-Medium in die Minipaillette eingesaugt, dann kam eine ca. 1 cm große Luftblase, dann ein Spermatropfen (20 µl), dann eine zweite Luftblase und anschließend, nachdem der gesamte Inhalt der Minipaillette bis zu dem PVA-Plug eingesaugt war, wurde die Minipaillette am Ende ohne PVA-Plug mit einem Zangenschweißgerät verschlossen (Polystar, Art. No. 1500/100GE, Gropack Gräfelfing). Dabei wurde sicher gestellt, dass das PVA-Pulver gut mit dem HTF Medium durchgenässt wurde und dass die Schweißnaht dicht war.

Die befüllten Minipailletten wurden kurz auf Eis in vorgekühlten Cryo-Cups (Sigma, Kat. No. C-3928) gelagert und anschließend für 10 min in die Gasphase des flüssigen Stickstoff gestellt (Äquilibrationsphase, ca. -120°C). Nach der Äqulibrationszeit konnten die Proben direkt in flüssigen Stickstoff eingetaucht werden (-196°C).

Die eingefrorenen Spermaproben wurden langfristig in einem Stickstofftank (Cryo Anlagen Bau GmbH, Wilnsdorf, Systeme für verflüssigte Gase, Typ CS 350B) gelagert. Die Lagerung der Proben wurde mit einem Backup System durchgeführt, d.h. dass die gleichen Proben eines Männchen auf zwei Stickstofftanks (2 mal 5 Proben pro Tank) aufgeteilt wurden.

3.2.2.3 Auftauen der Spermaproben

Zum Auftauen der Spermaproben wurden die Minipailletten aus dem Stickstoff entnommen und nach kurzer Aufwärmphase in der Luft (ca. 5 sec), in ein 37°C warmes Wasserbad eingetaucht. Nach ca. 2 min wurden die Pailletten aus dem Wasser herausgenommen, mit Alkohol desinfiziert, abgetrocknet und beide Seiten (der PVA-Plug und die Schweißnaht) abgeschnitten. Beim Aufschneiden der Minipailletten war wichtig zu beachten, dass sie dabei horizontal gehalten wurden und die Spermatropfen möglichst nicht mit dem HTF-Medium vermischt wurden. Der Spermatropfen wurde in

eine Petrischale gegeben und auf die Fertilisationsschalen verteilt. In jede Fertilisationsschale (200 µl HTF unter Mineralöl, 40x15mm) wurden 4 µl der Spermasuspension pipettiert. Die Spermien wurden bis zur Fertilisation im Brutschrank (37°C, 5% CO2) inkubiert. Die Inkubationszeit der Spermien (so.g. Kapazitationszeit) dauerte ca. 30 min.

3.2.2.4 Qualitätsmessung der Spermaproben

Die Qualitätsmessung wurde mit einem Hamilton Thorne IVOS Sperm Analyzer (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA 01915, USA) durchgeführt. Das Programm wurde speziell für die Messung der Spermaproben von Mäusen eingestellt, die detaillierten Einstellungen (IVOS Setup) befinden sich in Kapitel 9.3.

Zur Messung wurden 15 µl der Spermienlösung aus dem HTF-Tropfen mit frischen/aufgetauten Spermien (Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2.) in eine Zählkammer (Baumann Medical, Kat. No. 26.HT-2xcell-t) pipettiert und mit einem Deckgläschen (Baumann Medical, Wetzikon, Schweiz, Kat. No. 26.HTR-5903) bedeckt.

Gemessen wurden folgende Spermaparameter:

1) Konzentration der Spermien

d.h. die gesamte Zahl der Spermien pro Milliliter.

2) Motilität der Spermien

Als Prozentsatz der gesamten Spermien, die Bewegung aufzeigen.

3) Progressive Motilität der Spermien

Als Prozentsatz der gesamten Spermien, die sich „progressiv“, d.h. mit einer Mindestgeschwindigkeit (Path Velocity VAP) von 50µm/s und geradeaus (Straightness STR>50%) bewegen.

3.2.3 *In vitro* Fertilisation

Die Eileiter der superovulierten Weibchen wurden ab 7.30 Uhr präpariert. Das Auftauen der Spermien (Kapitel 3.2.2.3.) erfolgte etwa 14 Stunden nach der HcG-Gabe, also gegen 8.00 Uhr. Danach wurden die Kumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen (Kapitel 3.2.1.2.) und zu den Spermien gegeben. Pro Fertilisationsschale wurden die Eizellen von ca. 5 Weibchen vorgesehen.

Die Fertilisationsschalen wurden ca. 4-6 Stunden im Brutschrank bei 5% CO2 und 37°C inkubiert. Danach wurden die Eizellen mit Hilfe einer Mundpipette (Kapitel 3.2.5) durch vier 100 µl-Tropfen KSOM gewaschen, in einen weiteren 100 µl-Tropfen KSOM gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen im Zweizell-Stadium (Tag 1,5 post coitum p.c.) aus dem KSOM-Medium mit der Mundpipette herausgesucht, viermal in 100 µl Tropfen M2-Medium gewaschen, in einen weiteren 100 µl Tropfen M2-Medium unter Mineralöl gegeben und auf eine Wärmeplatte (37°C) bis zum Embryotransfer gestellt.

Bei der Auswahl der Embryonen wurde eine optische Qualitätsbeurteilung durchgeführt (d.h. ausgewählt wurden nur diese Embryonen, die möglichst symmetrische Blastomeren hatten). Für die Beurteilung der IVF wurde die Fertilisationsrate (so g. cleavage rate) berechnet. Diese Zahl berechnet den Prozentsatz der Zweizeller aus der Gesamtzahl der Eizellen in der IVF:

CR (cleavage rate)= Zahl der Zweizeller*100/ Gesamtzahl der Eizellen in der IVF

Die herausgesuchten Embryonen wurden in den Eileiter eines Tag 0,5 p.c. scheinträchtigen Weibchens transferiert (Kapitel 3.2.5.)

3.2.4 Lasermikrodissektion der Zona Pellucida

Die Laserbehandlung der Eizellen wurde mit einem Lasergerät Typ PALM-Kombisystem (PALM Microlaser Technologie, Bernried, Germany) durchgeführt. Das System enthält zwei kombinierte Lasersysteme: UV- und IR-Laser. Der UV-Laser (VSL-337ND-S Nitrogen Laser) kann äußerst präzise verschiedene Zell- und Gewebetypen aufschneiden und wurde für die Lasermikrodissektion der Zona Pellucida benutzt. Der IR-Laser ermöglicht eine zusätzliche Bewegung kleiner Zellpartikel, womit z.B. die Spermien in die Oozyten gebracht werden könnten.

Nach vielen Vorversuchen wurden die besten Voraussetzungen für die Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida, nach der sich alle embryonalen Stadien aus den laserbehandelten C3HeB/FeJ Oozyten entwickelten (Abb. 5), bestimmt: 1) Einstellung des Lasers (hauptsächlich die Fokusierung des Laserstrahls in der Ebene der betrachteten Eizellen) wurde mit Hilfe eines mit Membran beschichteten Objektträgers (PALM Laser, Technologies, Bernried), auf dem die Auswirkung des Laserstrahls sichtbar war, durchgeführt (PALM Robo Setup und PALMRobo Energiekurve: Kapitel 9.3); 2) Die Mediumauswahl wurde aufgrund der Empfehlungen im „Course on Cryopreservation of Mouse Germplasm“, Monterotondo 2003 (Part of Assisted Reproduktive Techniques) getroffen.

Die Lasermikrodissektion wurde mit einem speziellen Objektiv (40x Typ LD Achroplan) und in speziell für die Arbeit mit UV-Strahlen geeigneten Schalen (PetriPALM50 hydrophilic, P.A.L.M. Microlaser Technologie, Kat.No. IV-76077300) durchgeführt.

Abb.5 Entwicklung der befruchteten Eizellen bis zu 84 Stunden nach der Fertilisation: **A**. Zweizellerstadium: 24h p.c. (Tag 1,5), **B**. Vierzeller: 48h p.c., **C**. kompakte Morula: 72h p.c., **D**. Blastozyste: 84h p.c. (Tag 3,5); Stamm C3HeB/FeJ, 400-fach

Die Schalen wurden für die Laser Mikrodissektion mit 4 mal 100 µl Tropfen PBS/BSA Medium unter Mineralöl befüllt und die speziell dafür vorbereiteten Eizellen (Kapitel 3.2.1.3) mittels einer Glaskapillare auf diese Tropfen aufgeteilt (ca. 20-30 Eizellen pro Tropfen). Jede Eizelle wurde separat durch die Tischbewegung des Mikroskops in Richtung des Laserstrahls gebracht und durch die Maussteuerung angeschnitten. Die Größe und die Tiefe der Laserbehandlung konnten dadurch manuell gesteuert werden. Um die Oberfläche der Oozyte nicht zu beschädigen, wurde die Laserbehandlung möglichst weit entfernt vom Polkörperchen und im Bereich, wo der perivitelline Spalt am breitesten war, durchgeführt. Die Schnitttiefe wurde mittels eines in die PALM-Software integrierten Lineals gemessen und mit einer integrierten Kamera (3CCD Color Video Camera, Sony Corporation, Japan) aufgenommen.
Nachdem alle Eizellen laserbehandelt waren, wurden sie in die Fertilisationsschalen zu den kapazitierten Spermien (Kapitel 3.2.3) gegeben. Die Inkubation der Eizellen und die Vorbereitung zum Embryotransfer wurden wie bei einer normalen in vitro Fertilization durchgeführt (Kapitel 3.2.5.).

3.2.5 Embryotransfer

Embryonen aus der IVF wurden am Tag 1,5 p.c. (Zweizellerstadium) in die Eileiter eines Tag 0,5 p.c. scheinträchtigen Weibchen transferiert.
Die scheinträchtige Maus wurde mit einer i.p. Injektion Rompun/Ketamin (Kapitel 9.1.1.8.) narkotisiert. Nach vollständiger Narkose wurde das Fell mit einem Desinfektionsmittel (Kodan Tinktur Forte, Best. Nr. 50100, Frohnhäuser Medizintechnik, Unterhaching) besprüht (Abb.6a), Augensalbe auf die Augen aufgetragen (Regepithel, Alcon Pharma GmbH, Freiburg) und die Haut mit einem 0,8 cm langen dorsalen Schnitt entlang der Wirbelsäule, etwa 1 cm cranial der Kniegelenke, geöffnet (Abb.6b). Ovar, Eileiter und ein Stück von Uterus wurden vorsichtig durch einen seitlichen, ca. 0,3 cm langen Schnitt in den Bauchmuskeln herausgezogen und mit Hilfe einer Klemme, die am Fettpolster des Ovars befestigt wurde, fixiert (Abb.6c, d, e, f). Unter einem Stereomikroskop wurde die Haut (so g. Bursa ovarica) über dem Eileiter mit einer Federschere (Vannas-Tübingen spring scissors, FST, Heidelberg, Kat. No. 15003-08) möglichst zwischen den Blutgefäßen

aufgeschnitten und mittels zwei Dumont Pinzetten (Dumont Forceps, FST, Heidelberg, Kat. No. 11251-20) erweitert. Jetzt konnte das Infundibulum vorsichtig mit einem Sugi Saugtupfer (Kettenbach GmbH, Eschenburg, Kat. No. 30601) vorverlagert werden (Abb.6g). Je nach Bedarf wurde das Blut mit 0,9% NaCl gespült und mit einem Sugi Saugtupfer abgetupft.

Eine Transferkapillare mit ca. 10 Embryonen wurde möglichst weit in das Infundibulum eingeführt (Abb.6h) und die Embryonen vorsichtig in den Eileiter transferiert.

Die Transferkapillaren wurden in einem autoklavierbaren Griffstück aus Metall mit Mundstück (Biomedical Instruments, Zöllnitz) befestigt und die Embryonen in M2 Medium aufgenommen. Die Embryonen befanden sich zwischen zwei kleinen Luftblasen, die zusammen mit den Embryonen transferiert wurden. Die Luftblasen waren im Eileiter sichtbar, wodurch die Position der Embryonen markiert werden konnte. Anschließend wurden die Organe wieder in die Bauchhöhle zurückgelagert und die Haut wurde mit einem resorbierbaren Nahtmaterial (Vicrylrapid 4-0, Kat.No. V494OH, Ethicon GmbH, Norderstedt) genäht. Nachdem die Maus oral mit ca. 5-10 µl Analgetikum versorgt wurde (Vetalgin, verdünnt 1:9 mit 0,9 % NaCl, Intervet Deutschland GmbH; entspricht ca. 0,2-0,5 mg Metamizol-Natrium und 0,002-0,004 mg Chlorbutanol pro Maus), wurde sie zum Aufwachen in einen warmen, ruhigen Käfig gelegt.

Herstellung der Transferkapillaren

Die Transferkapillaren wurden aus speziellen Glaskapillaren (Sodaglaskapillaren mit offenen Enden, Durchmesser von 1,4 mm, Fa. Heidelberg) hergestellt. Zuerst wurden die Glaskapillaren über der Flamme eines Gas-Bunsenbrenners zum Schmelzen gebracht, aus der Flamme herausgenommen und dann etwa 20 cm weit auseinandergezogen, bis eine feine Kapillare von etwa 100 µm+/-10 Innendurchmesser entstand. Die ausgezogene Glaskapillare wurde in der Mitte der feinen Kapillare auseinandergebrochen und die Länge der feinen Kapillare auf ca. 6 cm gekürzt. Um eine Beschädigung der Embryonen zu vermeiden, wurden dann die unregelmäßigen Kanten der Kapillare in einer Mikroschmiede (Mikroschmiede de Fonbrune, F-1000, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) angeschmolzen und begradigt.

Abb.6 Chirurgische Darstellung eines Eileitertransfers (Nagy, 2003) (Beschreibung im Text oben)

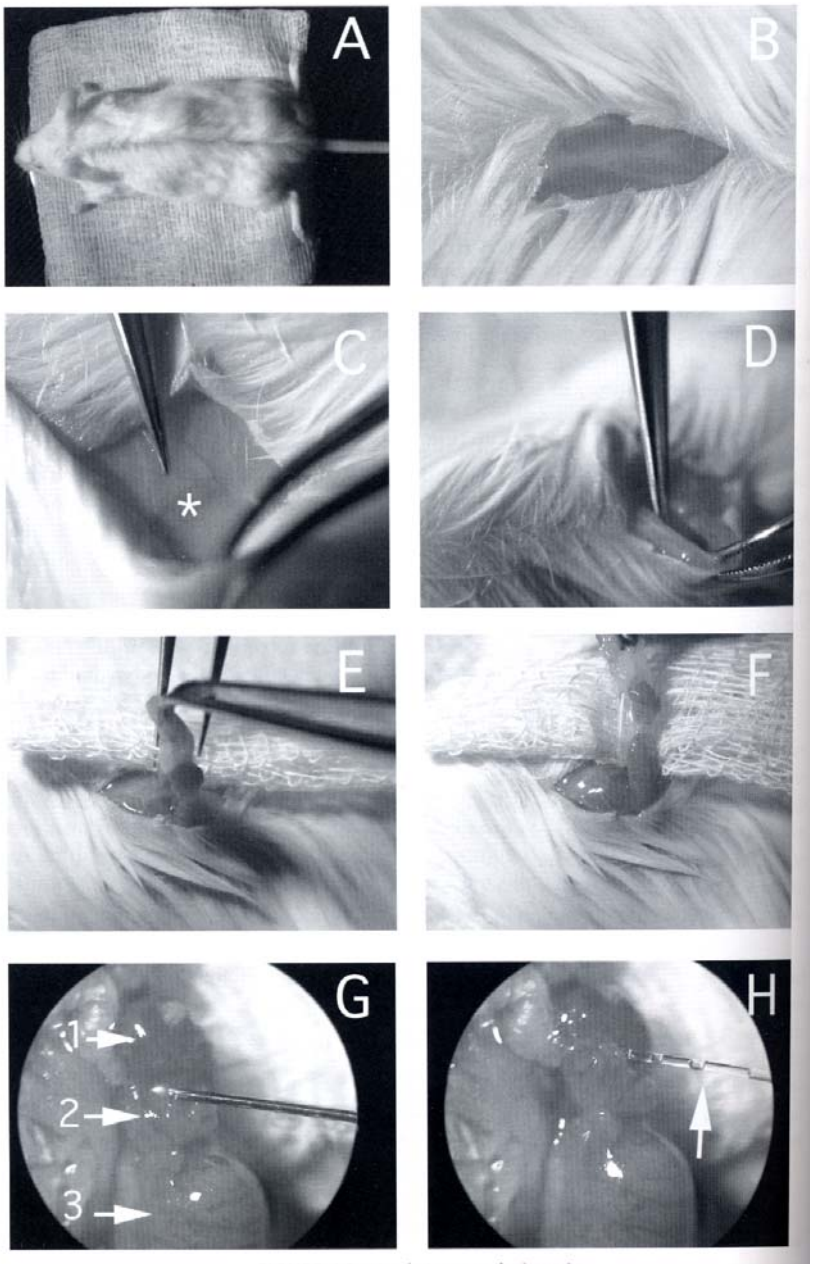


FIGURE 6.3. *(See facing page for legend.)*

3.3 Virusbeschreibung

3.3.1 Virusbearbeitung

3.3.1.1 Anzucht der Zelllinien

Um den Virusstamm MHV-A59 zu vermehren, bzw. eine Virustiterbestimmung durchzuführen, wurden zwei verschiedene Zelllinien angezüchtet: die Zelllinie NCTC clone 1469 (ATCC Number: CCL-9.1, Maus Milz-Leber Suspension) und die Zelllinie L-929 (ATCC-Nr. CCL-1, Mausfibroblasten).

Das Aussäen der Zelllinie NCTC clone 1469 erfolgte in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche (Costar Flasks 75 cm^2, Kat. No. 3376, Corning B.V., Schiphol-Rijk, The Netherlands). Die Zellen wurden in 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco's MEM, Biochrom AG, Berlin, Kat. No. FG04359) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom/Seromed, Kat. No. C0115) bei 37°C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchtigkeit 2 Tage angezüchtet. Aufgrund der für diese Zelllinie charakteristischen nicht konfluenten Vermehrungsart vermehrten sich die Zellen sowohl frei im Zellkulturmedium, als auch am Boden der Zellkulturflasche haftend. Die frei schwimmenden Zellen mussten daher beim Mediumwechsel abzentrifugiert (1200 rpm, 5-10 min.), das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche zurück gegeben werden. Für eine weitere Kultur der Zelllinie wurden die am Boden der Zellkulturflasche haftenden Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber (Corning Costar, Cambridge, Maryland, USA, Kat. No. 3010) abgekratzt, mit frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Ein Trypsinierungsprozess der Zellinie NCTC clone 1469 durfte auf Grund einer besonderen Sensibilität der Zelllinie gegenüber Trypsin nicht durchgeführt werden.

Die Zelllinie L-929 wurde in einer 80 cm^2 Zellkulturflasche (Nunclon TM, Kat. No. 147589) angezüchtet. Die Zellen wurden in 10 ml DMEM-Medium mit 10% FKS bei 37°C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am dritten Tag der Kultur wurde das Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche aufgenommen, die Zellen wurden 2 mal mit jeweils 5 ml PBS und 1 mal mit 2 ml Trypsin gewaschen und anschließend in 1 ml

Trypsin (Trypsin 0,05 %/ EDTA 0,02 % in PBS, Biochrom AG, Kat. No. L2143) von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde auf einer Wärmeplatte mit 37°C unter Sichtkontrolle durchgeführt und die abgelösten Zellen wurden 1:5 bzw. 1:10 geteilt, wobei die restlichen Zellen für die Herstellung der Zellkulturplatten (mit 2,4 x 10^4 Zellen pro Well) für die Virustiterbestimmung verwendet wurde.

3.3.1.2 Virusanzüchtung

Der Virusstamm MHV-A59 wurde ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC Number: VR-764) in Manassas, USA bezogen. Die Anzüchtung der Viren erfolgte auf der Zelllinie NCTC clone 1469.

Um die Zellkultur mit Viren infizieren zu können, wurde zuerst die Zelllinie NCTC clone 1469 in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche (Costar Flasks 75cm^2, Kat. No. 3376, Corning B.V., Schiphol-Rijk, The Netherlands) bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das Zellkulturmedium (DMEM+10% FKS) aus der Zellkulturflasche aufgenommen, ein frisches Medium (DMEM+10% FKS) mit 1 ml Virusstocksuspension gemischt und in die Zellkulturflasche gegeben. Um das Eindringen der Viren in die Zellen zu erleichtern, wurden 100 µl Polybrene dazugegeben (10 µl pro 1 ml Medium, Feinbiochemica, Heidelberg, Stocklösung 400 µg/ ml), das gesamte Medium durch sanftes Schwenken gleichmäßig verteilt und die Zellkultur noch mal 2 Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde das virushaltige Kulturmedium aus der Zellkulturflasche aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml Kulturmedium resuspendiert und zu den restlichen Zellen in der Zellkulturflasche gegeben. Durch diesen Mediumwechsel wurden toxische Metabolite und tote Viren aus der Zellkulturflasche entfernt.

So vorbereitete Zellkulturflaschen wurden 3 Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend 3 mal eingefroren und 3 mal aufgetaut. Durch den Einfrier-/Auftauprozess wurden die Zellwände der Zellen zerstört und die Viren ins Kulturmedium freigesetzt. Anschließend wurde das virushaltige Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche abpipettiert, abzentrifugiert (1200 rpm, 5-10 min.) und der Überstand als 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.3.1.3 Virustitration und Virustiterbestimmung

Die Virustitration wurde auf der Zelllinie L-929 durchgeführt. Das Aussäen der Zellen erfolgte auf einer 96-Well-Platte (Nunclon, Kat. No. 167008) in einer Dichte von $2{,}5x10^4$ Zellen pro Loch, die jeweils in 150 µl Kulturmedium pro Loch aufgenommen wurden. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Beckmann Coulter Counters Z2 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) mit speziell angepasstem Programm.

Für die Virustitration wurden Verdünnungen des Virusstocks in $\log_{10}$-Stufen von 10^0 bis 10^{-10} hergestellt. Am Folgetag der Virustitration wurde das Zellkulturmedium in der 96-Well Platte mit den Virusverdünnungen ersetzt. Jede Verdünnungsstufe wurde vertikal in 6 Löcher der 96-Well-Platte (jeweils 100 µl pro Loch) pipettiert und dazwischen als Kontrolle eine vertikale und 2 horizontale Vertiefungsreihen mit reinem Kulturmedium (DMEM+10% FKS) beigefügt.

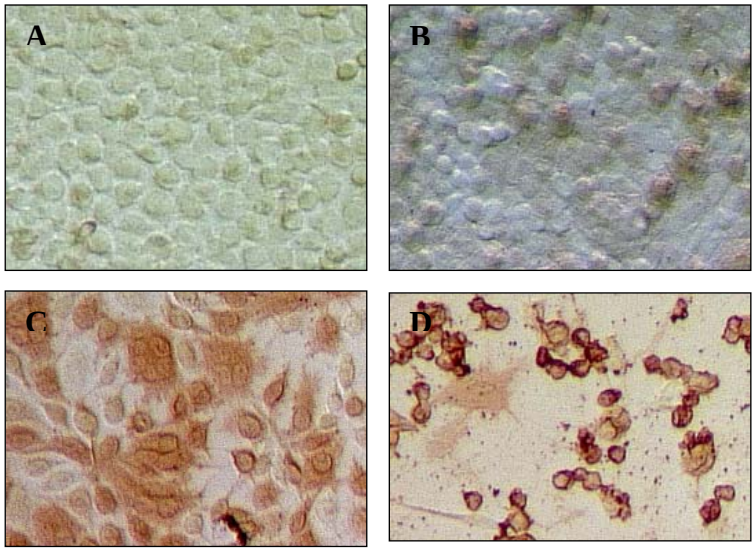
Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Virussuspensionen mit frischem Kulturmedium ersetzt.

Um den Virustiter zu bestimmen, wurde der nach 18-24 h auftretende zytopathische Effekt (CPE) durch die Abschätzung des prozentuellen Anteils veränderter Zellen (siehe Tabelle 7 und Abb.7) beurteilt. Die Ergebnisse der 6 Wiederholungen pro Verdünnung wurden zu einem durchschnittlichen Wert für die Infektiosität der Proben gemittelt.

Tabelle 7 Beurteilung des zytopathischen Effektes nach einer Virustitration mit MHV-A59

Einstufung des zytopathischen Effektes:	**Prozentueller Anteil veränderter Zellen:**
0	kein zytopathischer Effekt
1	<50%
2	50%
3	75%
4	100%

Abb 7 Einstufung des zytopathischen Effektes in der Zellkultur L-929 (Immunoperoxidase Färbung, IPF; 100-fach) A. Stufe 0 (kein zytopathischer Effekt), B. Stufe 1 (<50% veränderter Zellkultur), C. Stufe 2 (50% veränderter Zellkultur), D. Stufe 3 (75% veränderter Zellkultur)



Virustiterbestimmung nach Kaerber and Spearman:

Die Virustiterbestimmung erfolgte nach Spearman and Kaerber (Spearman, 1908; Kaerber 1931).

Die kulturinfektiöse Dosis 50 (=KID_{50}, englisch: Tissue Culture Infectious Dose 50=$TCID_{50}$) wurde durch eine Endpunktverdünnungsmethode (siehe Tabelle 8) als Virustiter berechnet.

Tabelle 8 Die Endpunktangaben für die Kalkulation der $TCID_{50}$

Endpunktverdünnungsstufen	Infizierte Testeinheiten/ Gesamtzahl
-6	6/6
-7	5/6
-8	3/6
-9	3/6
-10	0/6

Berechnung der $TCID_{50}$:

$TCID_{50}$= die höchste Verdünnung, die in der 100% CPE vorhanden waren + 1/2-Gesamtzahl der infizierten Testeinheiten/ Gesamtzahl der Testeinheiten

$TCID_{50}$= -6+ 1/2-17/6= -6+ 0,5-2,83= -6+ -2,33= -8,33 $TCID_{50}$

-8,33 $TCID_{50}$= $10^{8,33}$ $TCID_{50}$ $0,1ml^{-1}$= $10x10^{8,33}$ $TCID_{50}$ ml = $10^{9,33}$ $TCID_{50}$ ml

Der Virustiter beträgt somit: $10^{9,33}$ $TCID_{50}$ ml

3.3.2 Virusnachweis

3.3.2.1 Indirekte Immunoperoxidase Färbung (IPF)

Die Spezifizierung des zytopathischen Effektes wurde mittels indirekter Immunoperoxidase-Färbung (IPF) durchgeführt. Die MHV bedingte zytopathische Veränderungen der Zellkultur L-929 wurde mit MHV spezifischen Antikörper bedeckt und mit Carbazollösung angefärbt.

Um die Immunoperoxidase Färbung durchzuführen, wurde zuerst das Zellkulturmedium aus der 96-well Platte mit zytopathisch veränderten Zellen mittels einer Saugkapillare entfernt.

Nach einem Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mit einer Azeton-Methanol Mischung fixiert. Eine bei –20°C vorgekühlte Azeton-Methanol Mischung (1:1) wurde dafür drei mal auf die Zellkultur aufgetragen. Die erste und zweite Zugabe wurde sofort nach einem kurzen Schwenken abgesaugt und mit einer frischen Mischung ersetzt. Die dritte Azeton-Methanol Zugabe wurde erst nach ca. 5-7 Minuten abgesaugt. Nach diesem Schritt wurden die Zellen an der Luft getrocknet.

Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen zusätzlich mit einer 2% BSA Lösung in PBS bei Raumtemperatur 15 min vorinkubiert. Um die spezifischen Bindungsstellen nicht zu beschädigen und keine falsch negativen Zellen zu erhalten, durfte die Zellkultur ab diesem Zeitpunkt nicht mehr antrocknen.

In der Zwischenzeit wurden zwei Antikörperverdünnungen mit einer 1% BSA-Lösung (1 g BSA in 100 ml PBS) angesetzt.

Es wurden zwei Antikörper (AK1 und AK2) vorbereitet:

AK1: mouse anti MHV-A59 Serum (in der GSF hergestellt), Verdünnung 1:10 und

AK2 goat anti mouse IgG (H+L)/PO (Dianova, Hamburg), Verdünnung 1:500, Best.-Nr. 115-035-003, Lot. Nr. 58150.

AK1 reagierte spezifisch mit den Viruspartikeln in der Zellkultur, AK2 reagierte spezifisch auf das Mausserum in der Zellkultur.

Nach 15 min. wurde die BSA Lösung von der Zellkultur abgesaugt, die Zellen mit dem ersten Antikörper AK1 gleichmäßig bedeckt (50 µl pro Loch) und bei 37°C 120 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen.

Die dritte PBS-Zugabe wurde nach 10 min abgesaugt und die Zellen sofort mit dem zweiten Antikörper AK2 bedeckt (50 µl pro Loch). Nach 120 min Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen.

Der spezifische Bindungseffekt an das MHV konnte durch die zusätzliche Reaktion mit AK2 gezeigt werden. Um den spezifischen Bindungseffekt der Antikörper an die MHV-Viren sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit einer Carbazollösung (Substrat nach Nexö, Kapitel 3.3.) angefärbt. Die Carbazollösung reagierte spezifisch mit der Peroxidase (PO) Bindungsstelle auf dem AK2.

Die Farbreaktion der Zellen wurde unter Sichtkontrolle (ca. 5-20 min) durchgeführt und die Carbazollösung unter fließendem Wasser abgewaschen. Die Zellen wurden an der Luft getrocknet und zum Mikroskopieren aufbewahrt.

3.3.2.2 MHV RT-PCR Konditionen

Allgemeine Informationen:

Die MHV-PCR erfolgte nach Taylor and Copley (1994). Die beiden Primer Nr. 1177 (f) und 1175 (r) wurden für die DNA Amplifikation und der Primer 1175 (r) auch für die Reverse Transkription verwendet. Die gesamte mRNA Menge wurde mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Kat. No. 74104), bzw. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Kat. No. 52904) aus den untersuchten Proben präpariert und die restlichen DNA-Fragmente mit Rnase freier DNase (Qiagen, Hilden, Kat. No. 79254) verdaut. Die relevanten RNA Fragmente wurden mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Kat.No. 205111) in cDNA transkribiert und die DNA Amplifikation mit der Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Kat. No. 201203) durchgeführt. Alle RNA Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei –80°C

gelagert. Alle Behandlungen der RNA wurden auf Eis durchgeführt. Die DNA wurde bei –80°C gelagert.
Die PCR Produkte aus Leber und Spermaproben, in denen MHV nachgewiesen werden konnte, wurden mit QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden, Kat. No. 28104) aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt (Kapitel 4.4.4).

1 RNA-Präparation:

Organe:

Die RNA-Präparation aus Organen wurde entsprechend dem RNeasy Mini Kit Protokoll für die Isolation der gesamten RNA aus Gewebe durchgeführt.
Die geeigneten Mengen an Probenmaterial (die Säulen binden maximal 100 µg RNA) wurden steril entnommen (Kapitel 3.1.5), gewogen und mit sterilen Kanülen (B. Braun, Melsungen AG, Best. No. 4657640) in die Schüttel-Behälter (Shaking Flask PTFE, 7ml, B.Braun Biotech International, Melsungen) gegeben.
Die Schüttel-Behälter wurden nach dem Gebrauch in eine 1% Dekontaminationslösung (Edisonite Schnellreiniger, Brand GmbH+CO KG, Wertheim, Kat.No. 44205) für 20 min eingelegt und danach gründlich mit destilliertem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) ausgespült. Vor dem Gebrauch wurden sie noch mal für 1 Stunde bei 50-70°C in die 1% Dekontaminationslösung eingelegt und gründlich mit destilliertem Wasser ausgespült. Nach der Reinigung wurden sie mit 0,1% DEPC Lösung in Millipore Wasser (Diethyl Bicarbonate 97%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Kat. No. D5758), bzw. mit RNase Off Spray (Applichem GmbH, Darmstadt, Kat. No. A2861) RNase frei gemacht, mit destilliertem Wasser (Ampuwa, Fresenius) ausgespült und mit 100% Alkohol ausgetrocknet.
Die Schüttel-Behälter wurden nach einer Vorkühlung bei –80°C in flüssigen Stickstoff eingetaucht und mit einem Micro-Dismembrator S (230V, 50-60Hz, B.Braun Biotech International, Kat.No. 8531528) 2 mal 30 s bei 2000 rpm homogenisiert. Das pulverförmige Homogenat wurde mit dem RLT-Puffer aus den Behälter ausgespült und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße gegeben. Anschließend wurde die RNA Isolation gemäß des RNeasy Protokolls für die RNA-Isolation aus Gewebe durchgeführt.

Mausspermien:

Die RNA-Präparation aus den Mausspermien wurde gemäß des RNeasy Mini Kit Protokolls für die Isolation der gesamten RNA aus Zellen durchgeführt.

Auf einer Säule des RNeasy Mini Kits konnte die RNA von maximal $1x10^7$ Zellen isoliert werden. Um die Zellenmenge nicht zu überschreiten, wurde pro Präparation der Mausspermien nur eine Spermaprobe pro Männchen aufgetaut und steril in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäße gegeben. In einer 20 µl Spermaprobe mit der Spermienkonzentration von 100 Millionen/ml befanden sich ca. $2x10^7$ Spermien. Die geeignete Menge an RLT-Puffer (siehe Tabelle 9) wurde dazupipettiert.

Tabelle 9 RLT Menge pro Zellkonzentration

Puffer RLT (µl)	**Zellzahl:**
350	bis $5x10^6$
600	$5x10^6$ bis $1x10^7$

Die Spermien wurden 3 mal eingefroren, 3 mal aufgetaut und mit QIAshredder (Qiagen, Kat. No. 79654) 2 min bei maximalen Geschwindigkeit 16060 g (Biofuge Fresco Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) homogenisiert. Anschließend erfolgte eine RNA Gewinnung nach dem RNeasy Mini Kit Protokoll für die Isolation der totalen RNA aus Zellen.

Überstand:

Die RNA-Präparation aus Serum bzw. aus einem Zellkulturüberstand erfolgte mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit, gemäß des QIAamp Viral RNA Mini Spin Protokolls. Ca. 100-140 µl Serum, bzw. Zellüberstand wurden gemäß des Protokolls bearbeitet.

2 DNA Verdau:

Mögliche DNA-Verunreinigungen wurden bei allen RNA Präparationen mit der RNase freien DNase entfernt. Der DNA-Verdau erfolgte während der RNA-Präparation nach dem ersten Waschvorgang mit RW1 (Rneasy Mini Kit) bzw. mit AW1 Puffer (QIAamp Viral RNA Mini Kit). Das DNase Pulver wurde in 550 µl RNase freiem Wasser aufgelöst. 10 µl DNase wurde in 70 µl RDD Puffer aufgenommen und auf die Säule

pipettiert. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die DNase mit 500 µl AW1 bzw. RW1 Puffer von der Säule entfernt und anschließend weiter mit AW2 Puffer, gemäß des QIAamp Viral Mini Spin Protokolls, bzw. mit RPE Puffer, gemäß des RNeasy Mini Kit Protokolls, bearbeitet.

3 Reverse Transkription:

Die RNA wurde mit dem Omniscript RT Kit in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde die RNA-Konzentration mit dem Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg) bestimmt.

Master-Mix für die Reverse Transkription:

In einer Reaktion konnten 50 ng bis 2 µg RNA in cDNA umgeschrieben werden. Aus der Quantifizierung ergab sich die RNA-Konzentration und dementsprechend wurde die geeignete RNA Menge zum Master-Mix gegeben. Die Wassermenge wurde auf ein Endvolumen von 20 µl angepasst.

Tabelle 10 Reaktionsansatz:

Komponente	Menge
RNA Probe	Max. 12 µl (dann kein Wasser!)
10x RT-Puffer	2
DNTP’s mix (5 mM)	2
Primer 1175 (r) 10 µM	2
RNase Inhibitor (10U/µl)	1
Reverse Transcriptase RT (4U/µl)	1
Rnase freies Wasser	Bis 20 µl

Die bestimmten Mengen an RNA-Proben wurden mit dem Master Mix 60 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Einsetzen der cDNA in eine PCR wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 93°C für 5 min inaktiviert. Danach erfolgte ein sofortiges Abkühlen der cDNA auf Eis.

4 DNA Amplifikation:

Primer (Taylor&Copley,1994):

Primer Nr.1177(f) 5’ CAG CCT GCC TCT ACT GTA AAA CC (Basenpaare 753 bis 775)

Primer Nr.1175(r) 5’ GCC TCC AAA ATT CTG ATT GGG GC (Basenpaare 977 bis 955)

Produktgröße: 225 bp

Tabelle 11 PCR-Master Mix:

Komponente	Menge	Endkonzentration
DNA Probe	5 µl	0,1-0,5 µg
Q-Solution (5x)	6	1x
PCR-Buffer (10x)	3	1x
DNTP mix (10 mM)	3	2 mM
$MgCl_2$ (25 mM)	0,6	0,5 mM
Primer 5’ (50 pmol/µl)	1	0,8 µM
Primer 3’ (50 pmol/µl)	1	0,8 µM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,5	2,5U/ Rkt
H_2O	Bis 30 µl (9,9 µl)	

Tabelle 12 Thermocyclerkonditionen (Thermocycler: *RoboCycler Gradient 96*, Fa. Stratagene)

PCR Einstellungen	Temperatur(°C)	Zeit	Zyklenzahl
1 Denaturierung (Melting)	94°C 57°C 72°C	4’ 0 0	1
2 Amplifikation (Melting, Anealing, Polymerisation)	94°C 57°C 72°C	1’ 1’ 45’’	35
3 Polymerisation	94°C 57°C 72°C	0 0 10’	1
4 Abkühlung	94°C 57°C 72°C 6°C	0 0 0 20’	1

Bestimmung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze für die MHV RT-PCR zu bestimmen, wurden die Virusverdünnungen von 10^0 bis 10^{-10} mit DMEM Medium angesetzt, die RNA präpariert, mit RNase freier DNase verdaut und in cDNA transkribiert.

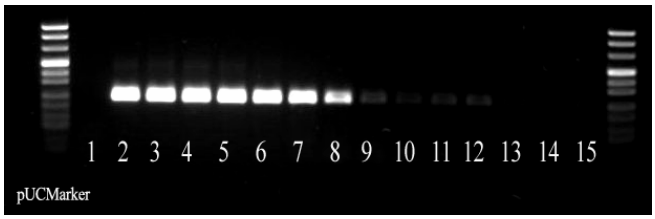


Abb.8 Nachweisgrenze für MHV-A59

Probenbeschreibung:

1, 15	Wasserkontrolle
2	Positiv Kontrolle
3-13	MHV-Verdünnungen von 10^0 (Spur 3) bis 10^{-10} (Spur 13)
14	Negativ Kontrolle

5. Gelelektrophorese

Um die spezifischen DNA Fragmente sichtbar zu machen, wurde ein 1,5 % Agarose Gel hergestellt (Agarose, Sigma A-9539, 1x TBE als Puffer), mit Ethidiumbromid (1 % Lösung im Wasser, Merck KGaA, Darmstadt) gemischt (1 µl pro 100 ml) und in einer Gelkammer (Thermo EC Classic, CSSU1214, E-C Apparatus Corporation) zum Erhärten stehen gelassen. Nachdem das Gel erhärtet war, wurde die Gelkammer mit 1x TBE Puffer aufgefüllt, die DNA-Proben mit Loading Buffer LB gemischt (2 µl LB pro 10 µl DNA) und in die Slots des Gels aufgetragen. Der LB wurde zusammen in einem Set mit dem pUC Mix Marker 8 (MBI Fermentas Kat. No. SMO301, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) bestellt, mit 50%-igem Glycerin 1:6 verdünnt und als 6x Loading Buffer verwendet. 100 µl von pUC Mix Marker 8 wurden mit 330 µl der 6x LB gemischt, mit 1570 µl Ampuwa-Wasser verdünnt und als Basenlängekontrolle auf das Gel aufgetragen (25 µl pro Spur). Die Gelkammer wurde an ein Netzgerät (Consort E835, 300v-500mA) angeschlossen und das Gel bei 100 V ca. 60 min. laufen gelassen. Das

Ethidiumbromid wurde an die DNA Sequenzen gebunden und das fluoreszierte Resultat unter einem Transluminator (Herolab UVT-28M) mit einer Digitalkamera festgehalten und dokumentiert.

3.3.2.3 ELISA Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Blutentnahme

Mittels ELISA-Test wurden die Serumproben auf Antikörper gegen MHV getestet. Am Tag 14, 21, 28 und 42 nach der MHV-Exposition wurde das Blut aus den lateralen Schwanzvenen unter der sterilen Werkbank (Heraeus Instruments GmbH, München) entnommen. Die Tiere wurden dafür in einem Plexiglas-Behälter fixiert und das Blut mit einer sterilen Kanüle (B.Braun, Gr. 14, Best. Nr. 4657640, Melsungen) in ein Probengefäß mit Gerinnungsmittel entnommen (Probengefäß 1 ml Z-Gel, Kat. No. 41/1378.005, Sarstedt AG & Co. Nümbrecht). 30 min nach der Blutentnahme wurden die Proben bei 5000 rpm, 10 min, bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau), um das Serum durch eine dünne Gelschicht von dem restlichen Blutinhalt zu trennen. So vorbereitete Serumproben wurden zu TML Microbiology Laboratories, North Harrow, England geschickt und dort untersucht.

Durchführung der ELISA Untersuchung (TML, North Harrow)

Die Serumproben wurden bei 56°C 30 min inaktiviert und 1:10 mit PBS (Phosphate Buffered Saline, Oxoid, Hants, UK) und 0,05% Tween 20 (R&L Slaughter, Essex, England) verdünnt. Die Proben wurden auf Antikörper gegen MHV mit negativen und positiven Kontrollseren (Churchill, Applied Biotechnology, Ltd. Cambridgeshire, England) getestet. Die optische Dichte (OD) der Antikörper wurde mittels Multiscan ELISA Plate Reader (Therma Life Sciences, Hampshire, England) gemessen und folgendermaßen eingestuft:

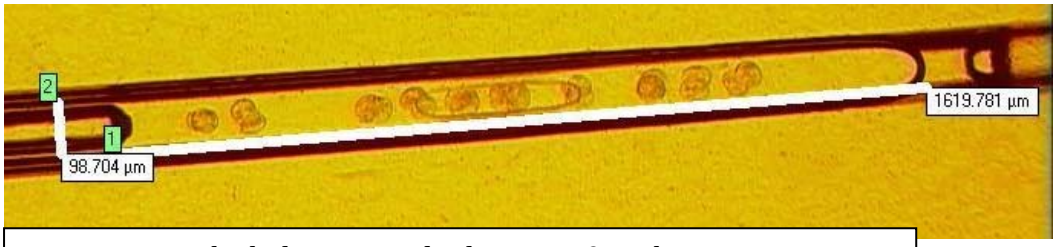
- **als positiv:** OD Wert > als 0.799
- **als schwach positiv** ≤0.600 OD Wert ≤ 0.799
- **als negativ:** OD Wert<0.600.

3.4 Virusanwendung bei der Reproduktionstechnik

3.4.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis pro Maus mittels Eileitertransfer

Um die Virusdosis pro Maus, die zu einer Serokonversion der Embryonenempfänger führte, zu bestimmen, wurden 10 nacheinander folgende Verdünnungen aus der Virusstocklösung hergestellt (Verdünnungsfaktor für jede Stufe 1:10) und in die Eileiter der SPF Ammentiere transferiert. Transferierte Lösungsmengen pro Eileiter (Abb.9) entsprachen dem transferierten Volumen eines normalen Embryotransfers mit 20 Embryonen pro Maus (10 Embryonen pro Seite).

Abb.9 Volumenmessung einer Transferkapillare mit 10 Embryonen
(PALM Kombisystem, Microlaser Technologies, Bernried)



Messung1=Höhe h des Kreiszylinders mit 10 Embryonen
Messung2= Durchmesser des Kreiszylinders

Berechnung der Lösungsmenge pro Eileiter

Um das Volumen der transferierten Viruslösung zu ermitteln, wurden mit 10 Embryonen befüllte Transferkapillaren vermessen (Abb.9). Es handelt sich um einen geraden Kreiszylinder mit Radius r (Messung 2) und Höhe h (Messung 1), dessen Volumen berechnet wurde. Der Radius der verwendeten Transferkapillaren variierte zwischen 50 und 60 µm. Die Höhe des Zylinders lag zwischen 1500 und 3500 µm. Der Mittelwert und die Standardabweichung der transferierten Volumina sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 Transferiertes Volumen pro Eileiter (µl)

Radius (µm)	Transferiertes Volumen (µl) (Lösungshöhe 1500-3500µm)	Mittelwert ±Standard Abweichung
50	0,011-0,027	0,019±0,0062
52	0,012-0,029	0,021±0,0067
54	0.013-0,032	0,022±0,0072
56	0,014-0,034	0,024±0,0077
58	0,015-0,036	0,026±0,0083
60	0,016-0,039	0,028±0,0089
55	⇦ Mittelwert Gesamt ⇨	0,023±0,0075

Das transferierte Volumen wurde mittels folgender Formel berechnet:

V= Volumen; R=Radius (Mittelwert Gesamt=55 µm); H= Höhe des Kreiszylinders (Mittelwert Gesamt=2.5 mm)

V= 3,14 x r^2 x h=3.14 x (55 µm)^2 x ca. 2.5 mm= 3,14 x 3025 µm^2 x 2.5 mm= 9498.5 µm^2 x 2500 µm= 23.746.250 µm^3

1 µl= 1.000.000.000 µm^3

V= 23.746.250 µm^3= 0.023 µl pro Eileiter= ca 0.05 µl pro Maus

Berechnung der Virusdosis pro Maus

Aus der $TCID_{50}=10^8$/ ml der Viruslösung und dem transferiertem Volumen ergab sich die Virusdosis pro Maus, die beim Embryotransfer übertragen wurde (Tabelle 14)

Tabelle 14 Virusdosis pro Maus:

$TCID_{50}$/ml für transferierte Viruslösung	Virusdosis pro Maus ($TCID_{50}$)
10^9	$5x10^4$
10^8	$5x10^3$
10^7	$5x10^2$
10^5	$5x10^0$
2xNaCl, 2xDMEM, 2xM2	0

Der Virustiter des Virusstocks lag bei $TCID_{50}=10^9$/ ml (Kapitel 3.3.1.3) und die Virusdosis bei 5 x 10^4 $TCID_{50}$/ Maus für ein transferiertes Volumen von 0,05 µl. Bei der ersten 1:10 Virusstockverdünnung lag die Virusdosis bei $5x10^3$ $TCID_{50}$/ Maus, für die Verdünnung 1:100 ($TCID_{50}=10^7$/ ml) bei $5x10^2$ $TCID_{50}$/ Maus und für die Verdünnung von 1:10000 ($TCID_{50}=10^5$/ ml) war die Virusdosis gleich 10^0 $TCID_{50}$/ Maus.
Als Negativkontrollen wurden jeweils 2 Transfers mit NaCl, M2 und DMEM-Medium durchgeführt.
Die Ammentiere wurden separat in IVC Filterkäfigen (Individually Ventilated Cages, Ventirack, Biozone, England) gehalten. Am Tag 14, 21, 28 und 42 wurden die Serumproben entnommen und auf Antikörper gegen MHV untersucht (Kapitel 3.3.2.3)

3.4.2 *In vitro* Fertilisation als Modell für die Pathogenübertragung

Um das Risiko einer Pathogenübertragung mittels *in vitro* Fertilisation und Embryotransfer zu ermitteln, wurden in vier experimentellen Gruppen *in vitro* Fertilisationen mit viruskontaminierten Medien ($TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59) durchgeführt. Die Gruppen wurden folgendermaßen eingeteilt:

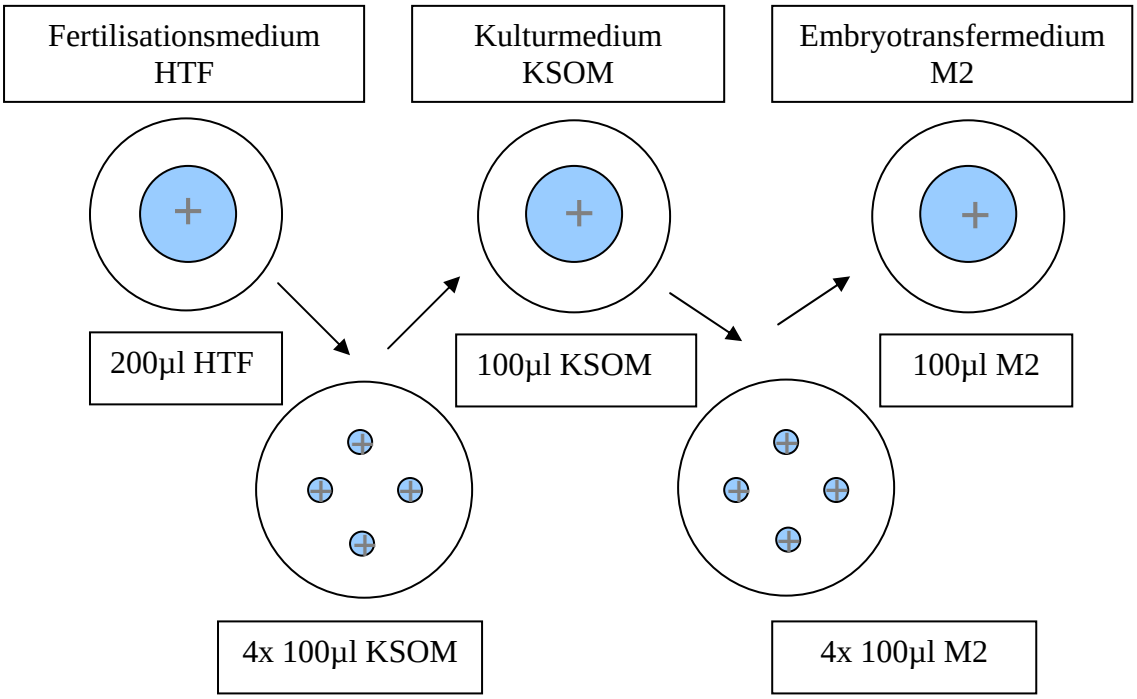
Gruppe 1: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-, KSOM- und M2-Medium;
Gruppe 2: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-Medium; KSOM und M2 virusfrei;
Gruppe 3: Experiment mit intakten Balb/cAnNCrl Oozyten und virushaltigem HTF-Medium; KSOM und M2 virusfrei;
Gruppe 4: Experiment mit laserbehandelten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-Medium; KSOM und M2 virusfrei.
Untersuchungen innerhalb jeder experimentellen Gruppe wurden fünf mal wiederholt.

3.4.2.1 IVF mit virushaltigem Fertilisations-, Kultur- und Embryotransfer Medium

Für die IVF mit virushaltigem Fertilisations- (HTF), Kultur- (KSOM) und Embryotransfer (M2) Medium wurden alle verwendeten Medien mit einer $TCID_{50}=10^8$/ml angesetzt. Die $TCID_{50}=10^8$/ml wurde nach einer Verdünnung 1:10 aus dem Virusstock hergestellt.

Die Eizellen wurden in 200 µl HTF Medium fertilisiert (Abb.10). Nach 6-stündiger Inkubation wurden sie vier mal gewaschen (je Waschschritt 100µl KSOM) und in 100 µl KSOM inkubiert. Die daraus resultierenden Embryonen wurden noch mal gewaschen (4x 100 µl M2) und in 100 µl M2 transferiert. Die Serumproben der Ammentiere wurden am Tag 14, 21, 28 und 42 nach dem Transfer entnommen und auf Antikörper gegen MHV untersucht.

Abb.10 Schematische Darstellung der IVF mit virushaltigem Fertilisations-, Kultur- und Embryotransfer Medium



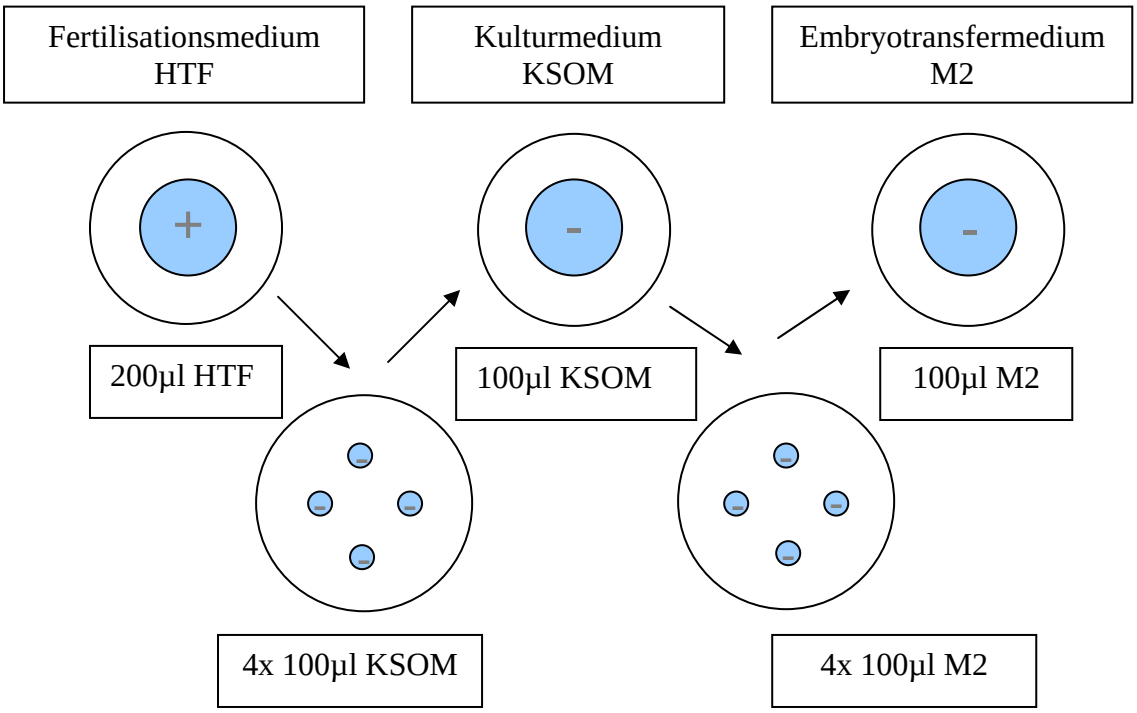
* (+) bezeichnet virushaltige Medium-Tropfen

3.4.2.2 IVF mit virushaltigem Fertilisationsmedium

Für die IVF mit virushaltigem Fertilisationsmedium wurde ausschließlich das HTF-Medium mit Virus angesetzt. Die $TCID_{50}=10^8$/ml wurde nach einer Verdünnung 1:10 aus dem Virusstock hergestellt. Nach der Fertilisation wurden die Eizellen insgesamt 10 mal durch virusfreies KSOM und M2 Medium gewaschen, wobei jeder Waschschritt einer Verdünnung von ca. 1:100 entsprach.

Die 10x gewaschenen Embryonen wurden transferiert und die Serumproben der Ammentiere am Tag 14, 21, 28 und 42 entnommen und mittels ELISA untersucht.

Abb.11 Schematische Darstellung der IVF mit kontaminiertem Fertilisationsmedium:



* (+) bezeichnet virushaltige Medium-Tropfen
* (-) bezeichnet virusfreie Medium-Tropfen

3.4.2.3 Gewinnung der Überstände aus IVF-Waschschritten

Die Eizellen wurden nach der Fertilisation mittels einer Transferkapillare (Kapitel 3.2.5) aus dem HTF-Medium herausgesucht und insgesamt 10 mal durch 100 µl-Tropfen KSOM- und M2-Medium gewaschen, wobei jeder Waschschritt einer Verdünnung von ca. 1:100 entsprach.

Die Transferkapillaren wurden aus speziellen Glaskapillaren (Sodaglaskapillaren, Durchmesser von 1,4 mm, Fa. Heidelberg) steril hergestellt und beim Waschen bei jeder neuen Fertilisationsschale gewechselt. Die Überstände aus den Waschschritten wurden in 1,5ml Eppendorf Gefäße aufgenommen und bis zur RNA-Präparation für die RT-PCR, bzw. bis zur Titration auf die Zellkultur L-929 bei –80°C gelagert.

3.4.3 Inokulation der Männchen

Um die Übertragungsaspekte der MHV-Infektion für Spermaproben zu testen, wurde eine intraperitoneale und intranasale Inokulation der Männchen durchgeführt. Für die Inokulation wurden 10 Wochen alte C3HeB/FeJ und Balb/c Männchen im für die Kryokonservierung relevanten Alter ausgewählt. Zur allgemeinen Darstellung der effektiven Virusdosis pro Maus wurden CD-1 Männchen benutzt. Die Infektion der Männchen wurde anhand der Virusausscheidung durch Organe und Antikörperproduktion gegen MHV untersucht.

3.4.3.1 Intraperitoneale Inokulation der Männchen

Die intraperitoneale Inokulation der Männchen wurde vorerst als Virusdosistest mit 17 CD-1 Tiere durchgeführt. Die Tiere wurden intraperitoneal (i.p.) mittels einer sterilen Kanüle jeweils mit 500 µl Virussuspension, bzw. 0,9% NaCl (2 Kontrolltiere) injiziert. Aus der $TCID_{50}=10^8$/ ml der Viruslösung und dem transferiertem Volumen ergab sich die Virusdosis pro Maus, die bei der Inokulation übertragen wurde (Tabelle 14).
Am Tag 5, 7 und 9 nach der Inokulation wurden von den Männchen Organe entnommen (Nebenhoden, Spermaproben), jeweils von zwei Tieren pro Virusdosis und Tag, und mittels RT-PCR auf MHV untersucht.

Tabelle 14 Virusdosis pro Maus bei der i.p. Inokulation der CD-1 Männchen

$TCID_{50}$/ml	**$TCID_{50}$ pro Tier**	**Anzahl der Tiere**
10^9	$5x10^8$	6
10^5	$5x10^4$	6
10^2	$5x10^1$	6
0 (NaCl Kontrolle)	0	2

Um die MHV-positiven Viruspartikel von der Spermienoberfläche zu entfernen, wurde ein Waschprozess mit HTF-Medium durchgeführt, wobei die Spermien drei mal mit

HTF gewaschen und abzentrifugiert wurden (15 min, 400g: Katkov and Mazur, 1998). Die drei mal gewaschenen Spermaproben wurden mittels RT-PCR untersucht.

3.4.3.2 Intranasale Inokulation der Männchen

Die intranasale Inokulation der Männchen wurde vorerst als Virusdosistest mit 10 CD-1 Männchen durchgeführt. Anschließend wurden die getesteten Virusdosen für 10 Balb/cAnNCrl und 10 C3HeB/FeJ Männchen verwendet. Die Tiere wurden intranasal (i.n.). mittels einer sterilen Kanüle mit jeweils 50 µl Viruslösung, bzw. 0,9 % NaCl (Kontrolltiere) tröpfchenweise inokuliert und am Tag 14, 21, 28 und 42 nach der Inokulation die Serumproben entnommen und auf Antikörper gegen MHV untersucht. Aus der $TCID_{50}=10^8$/ ml der Viruslösung und dem transferiertem Volumen ergab sich die Virusdosis pro Maus, die bei der Inokulation übertragen wurde (Tabelle 15).

Tabelle 15 Virusdosis pro Maus bei der i.n. Inokulation der CD-1, C3HeB/FeJ und Balb/cAnNCrl Männchen

$TCID_{50}$/ml	$TCID_{50}$ pro Tier	Anzahl der Tiere/Stamm	Tag 14, 21, 28, 42
10^{9*}	$5x10^7$	2	Antikörpertest
10^8	$5x10^6$	2	
10^7	$5x10^5$	2	
10^6	$5x10^4$	2	
10^5	$5x10^3$	2	
0 (NaCl Kontrolle)	0	2	

*Für den Stamm C3HeB/FeJ wurde die Virusdosis um eine Stufe ($5x10^7$, $5x10^6$, $5x10^5$ und $5x10^4$ TCID50) erhöht, weil dieser Stamm als semi-resistent gegenüber MHV-Infektion bekannt war (Literaturübersicht 2.6.5).

Die Virusdosen $5x10^7$ und $5x10^6$ $TCID_{50}$ pro Maus wurden anschließend für 12 Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Männchen verwendet (Tabelle 16), um die Reproduktionsorgane (inkl. Spermien und Nebenhoden) am Tag 5 nach der Inokulation mittels RT-PCR und Titration zu testen:

Tabelle 16 Organanalyse der i.n. inokulierten Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Männchen am Tag 5 p. inf.

$TCID_{50}$ pro Tier	**Anzahl der Tiere/Stamm**	**Leber, Milz, Serum, Hoden, Nebenhoden, Akzessorische Drüsen, Spermaproben**
$5x10^7$	6	
$5x10^6$	6	RT-PCR
0 (NaCl Kontrolle)	2	

3.5 Statistische Auswertung

Die IVF Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Vergleiche zwischen Gruppen wurden mit Hilfe des Chi^2-Testes angestellt. Immunantwort der Ammentiere der experimentellen Gruppen 1-4 wurde mit Hilfe des Bernoulli-Schema (Kapitel 9.5) verglichen. In allen Fällen wurden p-Werte von <0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis pro Maus mittels Eileitertransfer

Um die Virusdosis pro Maus, die zu einer Serokonversion der Embryonenempfänger führte, zu bestimmen, wurden 10 nacheinander folgende Verdünnungen aus der Virusstocklösung ($TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59) hergestellt (Verdünnungsfaktor für jede Stufe 1:10) und in die Eileiter der SPF Ammentiere übertragen. Transferierte Lösungsmengen pro Eileiter entsprachen dem transferierten Volumen eines normalen Embryotransfers mit 20 Embryonen pro Maus (Kapitel 3.4.1). Die Serumproben der Ammentiere wurden am Tag 14, 21, 28 und 42 nach der Übertragung entnommen und mittels ELISA untersucht (sog. Mouse Antibodies Produktion Test, MAP-Test), die Ergebnisse sind in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17 Immunantwort der Ammentiere (MAP-Test) nach Eileitertransfer mit Viruslösungen (0,025µl Viruslösung pro Eileiter)

Virustiter ($TCID_{50}$/ml)	Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	Tag 14		Tag 21		Tag 28		Mortalität
		Positive Tiere	OD*	Positive Tiere	OD*	Positive Tiere	OD*	
10^9	$5x10^4$	2/6	0.734	5/6	0.849	5/6	1.044	1/6
10^8	$5x10^3$	4/6	0.713	4/6	0.862	4/6	1.265	1/6
10^7	$5x10^2$	0/5	<0.600	0/5	<0.600	0/5	<0.600	0/5
10^5	$5x10^0$	0/5	<0.600	0/5	<0.600	0/5	<0.600	0/5
NaCl	0	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2
M2	0	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2
DMEM	0	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2	<0.600	0/2

*OD = Optische Dichte < 0.600: negativ; 0.600 – 0.799: schwach positiv; > 0.799: positiv; OD wurde als Mittelwert aus allen positiv untersuchten Serumproben pro Virusdosis am Tag 14, 21 und 28 ermittelt.

Bei den Untersuchungen der Serumproben wurde am Tag 14 nach der Inokulation mit Virusdosis=$5x10^4$$TCID_{50}$/Maus eine optische Dichte der Antikörper gegen MHV von 0.734 festgestellt. Der OD Wert wurde als Mittelwert von zwei an diesem Tag positiv getesteten Mäusen ermittelt. Bei den restlichen vier mit dieser Virusdosis inokulierten Mäusen wurden an diesem Tag keine Antikörper gegen MHV festgestellt. Am Tag 21 und 28 nach der Inokulation mit der Virusdosis=$5x10^4$$TCID_{50}$/Maus wurde ein kontinuierlicher Anstieg der optischen Dichten von 0.849 auf 1.044 beobachtet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten 4 von 6 inokulierten Mäusen reagiert.

Bei den Untersuchungen der Serumproben nach der Inokulation mit der Virusdosis=$5x10^3$$TCID_{50}$/Maus war eine optische Dichte von 0.713 am Tag 14 festzustellen. Am Tag 21 und 28 wurde eine kontinuierliche Steigerung der optischen Dichte von 0.862 auf 1.265 festgestellt. Nach der Inokulation mit dieser Virusdosis/Maus hatten 4 von 6 inokulierten Mäusen am Tag 14 p.inf. und 5 von 6 inokulierten Tieren am Tag 21 und 28 reagiert.

Nach der Inokulation mit Virusdosis $5x10^2$ und $5x10^0$ lagen die optischen Dichten der am Tag 14, 21 und 28 nach der Virusübertragung entnommenen Serumproben unter 0.600. Nach der Inokulation der Kontrolltiere mit NaCl-, M2- und DMEM-Medium wurden ebenfalls keine Antikörpern gegen MHV festgestellt (OD>0.600).

Darüber hinaus konnte die erste kritische Virusdosis pro Maus ermittelt werden ($5x10^3$ $TCID_{50}$), bei der es zur Serokonversion inokulierter Mäuse kam.

Anhand dieser Ergebnisse wurde der Virustiter von 10^8/ml $TCID_{50}$ für die Herstellung der viruskontaminierten IVF Medien verwendet.

4.2 *In vitro* Fertilisation als Modell für die Pathogenübertragung/ Experimentelle Gruppen 1-4

Um das Risiko einer Pathogenübertragung mittels *in vitro* Fertilisation und Embryotransfer zu ermitteln, wurden die *in vitro* Fertilisationen mit viruskontaminierten Medien ($TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59) in vier experimentellen Gruppen durchgeführt (Kapitel 3.4.2).
Die Gruppen wurden folgendermaßen eingeteilt:
Gruppe 1: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-, KSOM- und M2-Medium;
Gruppe 2: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-Medium, KSOM und M2 virusfrei;
Gruppe 3: Experiment mit intakten Balb/cAnNCrl Oozyten und virushaltigem HTF-Medium, KSOM und M2 virusfrei;
Gruppe 4: Experiment mit laserbehandelten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-Medium, KSOM und M2 virusfrei.

Untersuchungen innerhalb jeder experimentellen Gruppe wurden fünf mal wiederholt und der Effekt des Virus, bzw. der Laser Mikrodissektion auf:
1) die Immunantwort der Embryonenempfänger
2) Viruskontamination der IVF Überstände (MHV RT-PCR)
3) Infektiosität der IVF-Überstände (Titration auf Zelllinie L-929)
4) Fertilisationsraten und Anzahl der Nachkommen
untersucht.

4.2.1 Immunantwort der Embryonenempfänger

Als erstes wurden Untersuchungen der exp. Gruppe 1 als Positivkontrollen für die Antikörperproduktion der Ammentiere durchgeführt (Tabelle 18). Die für die *in vitro* Fertilisation verwendeten Medien enthielten alle eine konstante TCID50=10^8/ml und wurden wie üblich für die IVF angesetzt (Kapitel 3.4.2). Die Serumproben der Ammentiere wurden am Tag 21, 28 und 42 nach der Embryonenübertragung entnommen und auf Antikörperproduktion gegen MHV untersucht.

Bei den Untersuchungen waren am Tag 21 nach dem Embryotransfer bei 9 von 14 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV festzustellen. Der durchschnittliche OD-Wert lag bei 1.126. Am Tag 28 produzierten 10 von 14 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV und es wurde eine Steigerung der optischen Dichten auf 1.330 festgestellt. Am Tag 42 produzierten 10 von 14 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV und es wurde keine weitere Steigerung der optischen Dichten festgestellt.

Bei den Untersuchungen der Nachkommen aus der exp. Gruppe 1 wurden Antikörper gegen MHV am Tag 21 nach der Geburt bei allen Tieren nachgewiesen. Drei Wochen nach dem Absetzten der Nachkommen von den Ammenmütter wurden jedoch keine Antikörperproduktion der Tiere gegen MHV festgestellt.

Tabelle 18 Immunantwort der Embryonenempfänger

Exp. Gruppe	Tag 21		Tag 28		Tag 42		Mortalität
	Positive Tiere	OD*	Positive Tiere	OD*	Positive Tiere	OD*	
1	9/14	1.126	10/14	1.330	10/14[a]	1.325	1/14
2	0/12	<0.600	0/12	<0.600	0/12[b]	<0.600	0/12
3	0/8	<0.600	0/6	<0.600	0/6[b]	<0.600	0/6
4	0/14	<0.600	0/14	<0.600	0/14[b]	<0.600	0/14
M2	0/8	<0.600	0/8	<0.600	0/8[b]	<0.600	0/8

*OD = Optische Dichte < 0.600: negativ; 0.600 – 0.799: schwach positiv; > 0.799: positiv; OD wurde als Mittelwert aus allen positiv untersuchten Serumproben pro Virusdosis am Tag 21, 28 und 42 ermittelt.

a,b: unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (Bernoulli Schema: a,b=p<0,001; b,b=p>0.05)

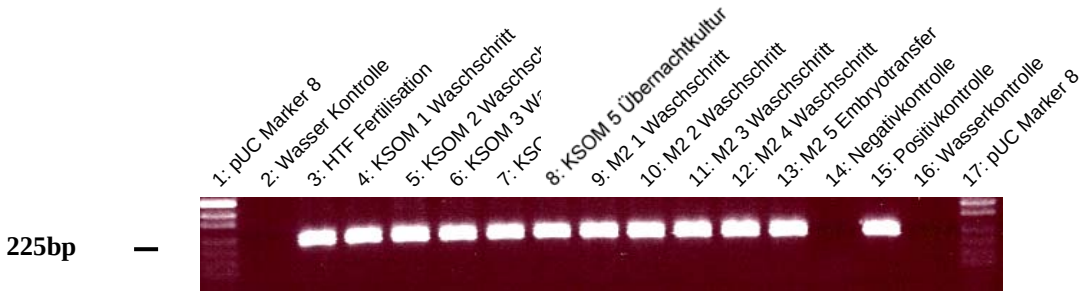
Um die Auswirkung des Waschens durch virusfreies KSOM und M2 Medium auf die Übertragung des Virus und die daraus resultierende Antikörperproduktion der Ammentiere zu untersuchen, wurden die Eizellen aus der exp. Gruppe 2, 3 und 4 in viruskontaminiertem HTF-Medium fertilisiert ($TCID_{50}=10^8$/ml) und nach der Fertilisation insgesamt durch 10 Tropfen virusfreies KSOM und M2 Medium gewaschen. Bei den Untersuchungen der Serumproben wurde am Tag 21, 28 und 42 nach der Embryonenübertragung bei keinem der 32 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV festgestellt.
Bei den Untersuchungen der Nachkommen aus den exp. Gruppen 2-4 wurden keine Antikörper gegen MHV festgestellt.
Bei den Untersuchungen der Ammentiere und deren Nachkommen nach einer Eileiterinokulation mit reinem M2 Medium wurde am Tag 21, 28 und 42 keine Antikörperproduktion gegen MHV festgestellt.

Zur Abschätzung, ob sich die experimentellen Gruppen statistisch unterscheiden lassen, wurde aus der positiven Kontrollgruppe (Gruppe 1) die Frequenz des Auftretens positiver Ammentiere bestimmt (10:14 = 0.71). Unter Annahme dieser Frequenz wurde die Wahrscheinlichkeit dafür definiert, dass unter dieser Bedingung nur zufällig MHV-freie Ammentiere in der gesamten Stichprobe der Testpopulation auftreten (Kapitel 9.5). Aus der statistischen Auswertung ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der experimentellen Gruppe 1 und den exp. Gruppen 2, 3 und 4 (a,b: $p<0.001$).

4.2.2 MHV RT-PCR der IVF Überstände

Bei den MHV RT-PCR Untersuchungen der gepoolten Überständen aus fünf in vitro Fertilisationen mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virushaltigem HTF-, KSOM- und M2-Medium (Gruppe 1) wurden spezifische Banden für MHV im HTF- und in allen Waschschritten durch KSOM- und M2-Medium nachgewiesen (Abb.12). Die diagnostischen Banden im Gelbild hatten eine Größe von 225 bp und waren bei allen Waschschritten deutlich zu sehen.

Abb 12 Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter MHV-DNA aus den Überständen der exp. Gruppe 1

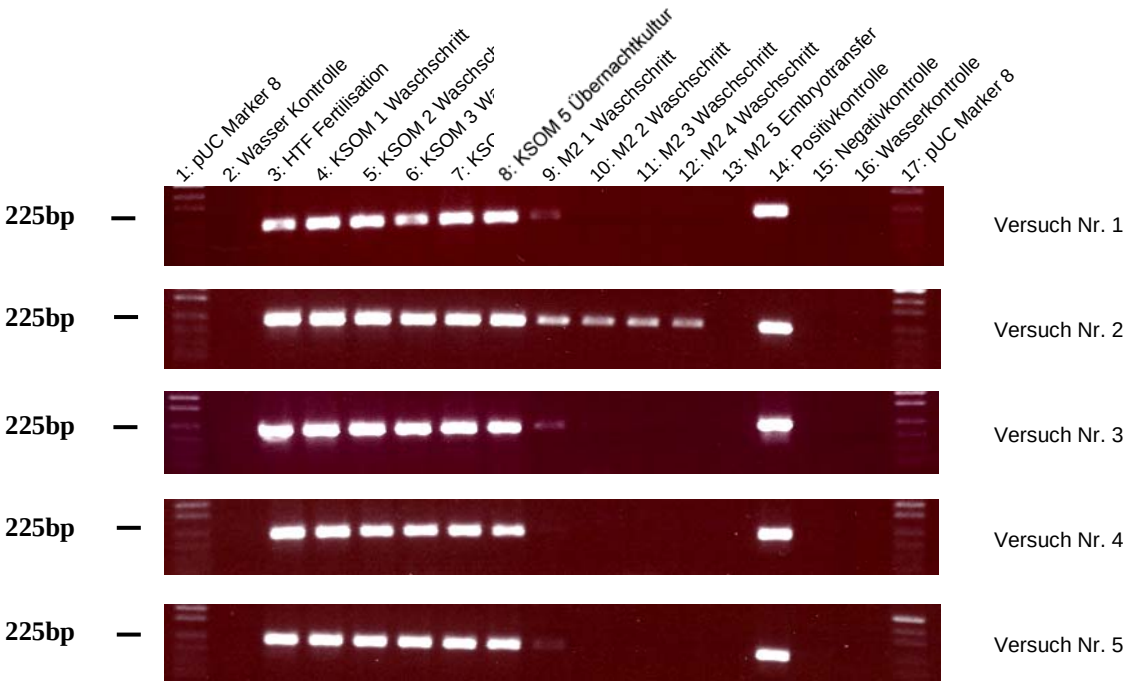


Bei den MHV RT-PCR Untersuchungen der gepoolten Überständen aus drei in vitro Fertilisationen mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten und virusfreien IVF-Medien (Negativ Kontrolle) waren keine spezifischen Banden für MHV festzustellen (Abb. 13).

Abb 13 Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter MHV-DNA aus den Überständen der Negativkontrolle

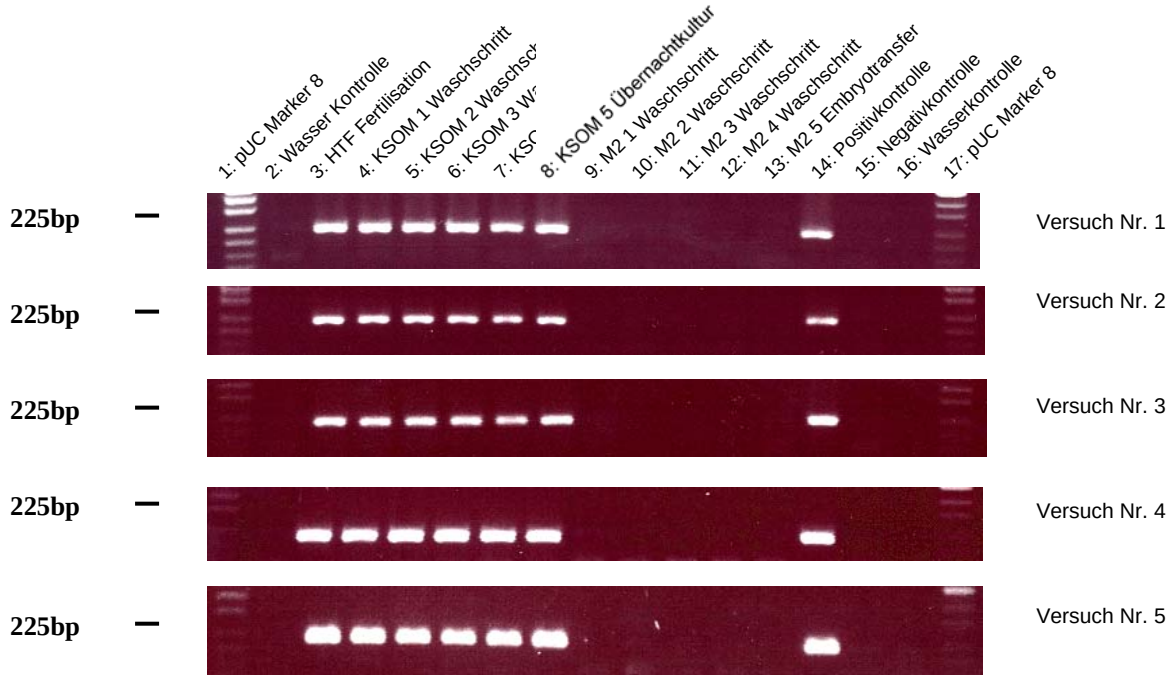
Bei den MHV RT-PCR Untersuchungen der Überstände aus der in vitro Fertilisation mit intakten Oozyten des C3HeB/FeJ Stammes und virushaltigem HTF Medium (Gruppe 2) wurden spezifische MHV Banden im HTF-Medium und in allen Waschschritten durch KSOM Medium festgestellt (Abb. 14). Die diagnostischen Banden waren in allen fünf Versuchen deutlich erkennbar. Die Untersuchungen der Waschschritte durch M2 Medium ergaben bei allen fünf Versuchen eine schwache Bande beim dem ersten Waschschritt und beim Versuch Nr. 2 insgesamt vier schwache Banden bei den M2-Waschschritten 1-4. Bei den Untersuchungen des fünften Waschschrittes durch M2 Medium wurden bei keinem der 5 Versuche diagnostische Banden gefunden.
In den Wasser- und Negativkontrollen wurden keine spezifischen MHV-Banden festgestellt.

Abb 14. Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter MHV-DNA aus den Überständen der exp. Gruppe 2



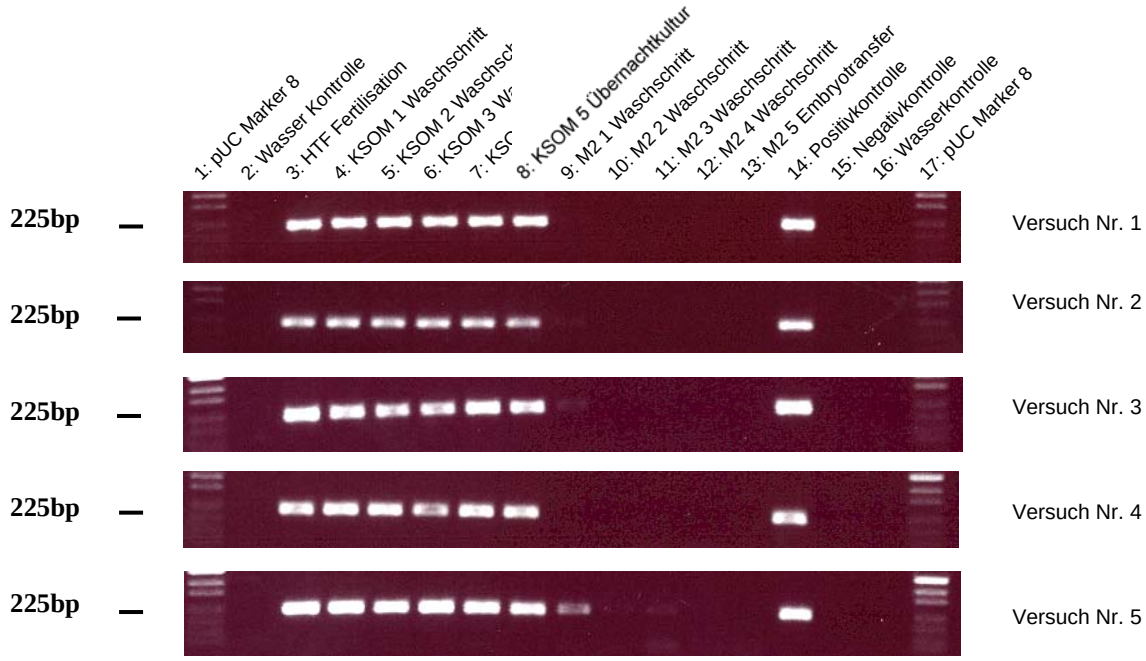
Die MHV RT-PCR Untersuchungen der Überstände aus der in vitro Fertilisation mit intakten Oozyten des Balb/cAnNCrl Stammes und virushaltigem HTF Medium (Gruppe 3) ergaben positive Befunde im HTF-Medium und in allen Waschschritten durch KSOM Medium (Abb. 15). Die diagnostischen Banden waren in allen fünf Versuchen deutlich erkennbar. Bei den Untersuchungen der Waschschritte durch M2 Medium wurden bei keinem der 5 Versuche diagnostische Banden gefunden.
In der Wasserkontrolle und Negativkontrolle aus einem virusfreiem M2-Medium wurden keine positiven Ergebnisse festgestellt.

Abb 15 Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter MHV-DNA aus den Überständen der exp. Gruppe 3



MHV RT-PCR Untersuchungen der Überstände aus der in vitro Fertilisation mit laserbehandelten Oozyten und virushaltigem HTF Medium (Gruppe 4) ergaben spezifische Banden für MHV im HTF-Medium und in allen Waschschritten durch KSOM Medium (Abb.16). Während bei der Untersuchung der Waschschritte durch KSOM-Medium bei allen fünf Versuchen deutliche Banden erkennbar waren, ergaben Untersuchungen der M2 Waschschritte beim Versuch Nr. 2, 3 und 5 nur in erstem Waschschritt insgesamt vier schwächere Banden.
In der Wasserkontrolle und Negativkontrolle aus einem virusfreiem M2-Medium wurden keine positiven Ergebnisse festgestellt.

Abb 16 Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter MHV-DNA aus den Überständen der exp. Gruppe 4



4.2.3 Titration der IVF Überstände aus den experimentellen Gruppen 1-4

Die Titration der IVF Überstände wurde auf der Zelllinie L-929 durchgeführt (Kapitel 3.3.1.3). Um die infektiösen Viruspartikel zu bestimmen, wurde der nach 18-24 h auftretende zytopathische Effekt (CPE) der Zellkultur L-929 durch die Abschätzung der veränderten Zellen beurteilt (Tabelle 7, Abb.7).

Bei der Titration der Überstände aus der IVF mit virushaltigem HTF-, KSOM- und M2 Medium (exp. Gruppe 1) konnte infektiöses MHV-Virus im HTF-Medium und in allen untersuchten Waschschritten durch KSOM und M2-Medium nachgewiesen werden. Durch die Abschätzung des prozentualen Anteils veränderter Zellen in der Zellkultur L-929 konnte die Einstufung des zytopathischen Effekts ermittelt werden. Der auftretende zytopathische Effekt nach der Titration der Überstände aus der IVF mit virushaltigem HTF-, KSOM- und M2-Medium wurde als Stufe 3 beurteilt.

Bei der Titration der Überstände aus der IVF mit virushaltigem HTF-Medium und virusfreiem KSOM und M2 (exp. Gruppe 2, 3 und 4) wurden infektiöse Viruspartikel im HTF- und in den ersten fünf Waschschritten durch KSOM-Medium festgestellt. Der auftretende zytopathische Effekt nach der Titration der Überstände aus dem HTF-Medium wurde als Stufe 3 beurteilt, die Titration der ersten zwei Waschschritte durch KSOM-Medium als Stufe 2 und der restlichen drei Waschschritte durch KSOM als Stufe 1 beurteilt. Nach der Titration der Überstände aus den fünf Waschschritten durch M2-Medium war kein zytopathischer Effekt auf der Zellkultur L-929 festzustellen.

4.2.4 Teilungsraten und Anzahl der Nachkommen

Bei der exp. Gruppe 1 (Tabelle 19) lagen die Teilungsraten zum 2-Zellstadium bei der Kontrolle (IVF ohne Virus) bei 51,1 %. Nach der Embryonenübertragung in SPF Ammentiere wurde durchschnittlich für fünf durchgeführte *in vitro* Fertilisationen eine Trächtigkeitsrate von 87,5 % ermittelt. Pro IVF wurden durchschnittlich 53,3 Embryonen übertragen und daraus ergab sich eine durchschnittliche Anzahl der Nachkommen pro IVF von 8,6. Die durchschnittliche Prozentzahl der Nachkommen lag dabei bei 16,1 %. Nach der Fertilisation in virushaltigem HTF-, KSOM- und M2-Medium war im Vergleich zur Kontrolle ein nicht signifikanter Abfall der Teilungsrate auf 43,0 % festzustellen ($p>0.05$). Die Trächtigkeitsrate mit 69,2 % und die Prozentzahl der Nachkommen mit 13,8 % unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle ($p>0,005$).

Bei der exp. Gruppe 2 (Tabelle 20) entwickelten sich nach der Fertilisation in virushaltigem HTF-Medium 39,9 % der Eizellen zum 2-Zellstadium. Nach einer Übertragung von durchschnittlich 36 Embryonen pro IVF war eine Trächtigkeitsrate von 75,0 % festzustellen. Die Prozentzahl der Nachkommen lag dabei mit durchschnittlich 5,4 Nachkommen pro IVF bei 15,0 %. Im Vergleich dazu entwickelten sich bei der Kontrolle 58,5 % der Eizellen zum 2-Zellstadium. Nach einer statistischen Auswertung der Teilungsraten bei der Kontrolle und nach der Fertilisation in virushaltigem HTF-Medium wurde eine Signifikanz von $p<0.001$ festgestellt.

Die Teilungsraten bei der exp. Gruppe 3 (Tabelle 21) lagen sowohl in Ab-, als auch in Anwesenheit von MHV in einem ähnlichen Bereich (22,0 bzw. 20,1 %, $p>0,05$). Nach der Embryonenübertragung aus der IVF mit virushaltigem HTF-Medium wurde eine Trächtigkeitsrate von 83,3 % ermittelt. Die Prozentzahl der Nachkommen lag dabei mit durchschnittlich 5,0 Nachkommen pro IVF bei 21,1 %.

Bei der exp. Gruppe 4 (Tabelle 22) entwickelten sich bei der Kontrolle (laserbehandelte Oozyten ohne Virus) 73,0 % der Eizellen zum 2-Zellstadium. Nach der Embryonenübertragung ergab sich eine Trächtigkeitsrate von 50,0 %. Die durchschnittliche Prozentzahl der Nachkommen lag nach einer Übertragung von 60

Embryonen pro IVF bei 3,3 %. Nach der Fertilisation in virushaltigem HTF-Medium war eine signifikante Absenkung der Teilungsraten auf 39,9 % zu beobachten ($p<0,001$). Nach der Embryonenübertragung ergab sich ebenso wie bei der Kontrolle eine Trächtigkeitsrate von 50,0 %. Aus durchschnittlich 56 transferierten Embryonen pro IVF entwickelten sich 6,8 % zur Nachkommen (3,8 Nachkommen pro IVF). Bei einer statistischen Auswertung der Prozentzahl der Nachkommen aus der Kontrollgruppe und aus der IVF mit virushaltigem HTF Medium war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p>0,05$).

Tabelle 19 Ergebnis der IVF aus der experimentellen Gruppe 1 (intakte C3HeB/FeJ Oozyten, HTF-, KSOM- und M2-Medium mit $TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59) : Schwankungsbereich, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

Gruppe 1	Zahl der Eizellen in der IVF	Zahl der 2-Zeller MW±Stabw	Teilungs Rate (%)	Zahl der Rezipienten MW±Stabw	Zahl der trächtigen Mäuse	Trächtigkeits Rate (%)	Zahl der transf. Embryonen MW±Stabw	Zahl der Nachkommen MW±Stabw	Durchschnitt. Prozentzahl der Nachkommen (%)
MHV-IVF*	120-223	27-124	43.0[a]	1-3	1-3	69.2[a]	20-60	1-15	13.8[a]
	176±37.5	75.8±36.6		2.6±0.9	1.8±0.8		36±16.7	5±5.7	
Kontroll-IVF*	28-315	17-144	51.1[a]	1-4	1-4	87.5[a]	20-80	3-14	16.1[a]
	158.3±145.3	81.0±63.5		2.6±1.5	2.3±1.5		53.3±30.5	8.6±5.5	

a,b : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,a: $p>0,05$)

*gefrorene Spermaproben, n.g. = nicht getestet

Tabelle 20 Ergebnis der IVF aus der experimentellen Gruppe 2 (intakte C3HeB/FeJ Oozyten, HTF-Medium mit $TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59, KSOM und M2 virusfrei) : Schwankungsbereich, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

Gruppe 2	**Zahl der Eizellen in der IVF**	**Zahl der 2-Zeller** MW±Stabw	**Teilungs Rate (%)**	**Zahl der Rezipienten** MW±Stabw	**Zahl der trächtigen Mäuse**	**Trächtigkeits Rate (%)**	**Zahl der transf. Embryonen** MW±Stabw	**Zahl der Nachkommen** MW±Stabw	**Durchschnitt. Prozentzahl der Nachkommen (%)**
MHV-IVF*	96-201	36-73	39.9[a]	1-3	1-3	75.0	20-60	1-11	15.0
	142.6±52.9	57.0±16.4		2.4±0.9	1.8±1.1		36±21.9	5.4±4.3	
Kontroll-IVF*	26-65	8-40	58.5[b]	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	37.6±16.4	22.0±12.8							

a,b : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,b: $p<0,001$)

*gefrorene Spermaproben, n.g. = nicht getestet

Tabelle 21 Ergebnis der IVF aus der experimentellen Gruppe 3 (intakte Balb/cAnNCrl Oozyten, HTF -Medium mit $TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59, KSOM und M2 virusfrei) : Schwankungsbereich, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

Gruppe 3	**Zahl der Eizellen in der IVF**	**Zahl der 2-Zeller** MW±Stabw	**Teilungs Rate (%)**	**Zahl der Rezipienten** MW±Stabw	**Zahl der trächtigen Mäuse**	**Trächtigkeits Rate (%)**	**Zahl der transf. Embryonen** MW±Stabw	**Zahl der Nachkommen** MW±Stabw	**Durchschnitt. Prozentzahl der Nachkommen (%)**
MHV-IVF*	111-184	18-42	20.1[a]	1-2	1	83.3	18-40	1-8	21.1
	144.8±29.8	29.2±10.6		1.2±0.4	1.0±0		23.6±9.2	5.0±3.1	
Kontroll-IVF*	18-42	4-8	22.0[a]	n.g.	n.g.	n.g	n.g.	n.g.	n.g.
	27.2±11.1	6.0±1.4							

a,b : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,a: $p>0.05$)

*gefrorene Spermaproben, n.g. = nicht getestet

Tabelle 22 Ergebnis der IVF aus der experimentellen Gruppe 4 (laserbehandelte C3HeB/FeJ Oozyten, HTF -Medium mit $TCID_{50}=10^8$/ml MHV-A59, KSOM und M2 virusfrei) : Schwankungsbereich, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

Gruppe 4	Zahl der Eizellen in der IVF	Zahl der 2-Zeller MW±Stabw	Teilungs Rate (%)	Zahl der Rezipienten MW±Stabw	Zahl der trächtigen Mäuse	Trächtigkeits Rate (%)	Zahl der transf. Embryonen MW±Stabw	Zahl der Nachkommen MW±Stabw	Durchschnitt. Prozentzahl der Nachkommen (%)
MHV-*IVF	152-285	51-99	39.9[a]	2-3	0-2	50.0[a]	40-60	0-4	6.8[a]
	187.6±56.1	75.0±19.5		2.8±0.44	1.4±0.9		56±8.9	3.8±3.3	
Kontroll-*IVF**	35-56	25-43	73.0[b]	3-3	0-3	50.0[a]	60-60	0-4	3.3[a]
	47.2±8.8	34.5±7.7		3	1.5±2.1		60	2±2.8	

a,b : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,b: $p<0,001$; a,a: $p>0.05$)

*gefrorene Spermaproben

**laserbehandelte Oozyten ohne Virus

4.3 Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida

4.3.1 Optimierung der Schnittgröße

Die Laserbehandlung der Eizellen wurde mit einem Lasergerät Typ PALM-Kombisystem (PALM Microlaser Technologie, Bernsried, Germany) durchgeführt. Das Anschneiden der Zona Pellucida erfolgte mit UV-Laser Typ VSL-337ND-S Nitrogen. Die Optimierung der Schnittgröße benötigte eine Reihe von Vorversuchen, nach der sich alle embryonalen Stadien bis zur kompakten Morula aus den laserbehandelten C3HeB/FeJ Oozyten entwickelten (Abb. 17 und 18, Tabelle 23):

Abb 17 C3HeB/FeJ Oozyten mit ca. 8 µm breiter Schnittgröße (Pfeil bzw. weißer Balken) in der Zona Pellucida; A, B: Vergrößerung 400-fach; C: Scanning-elektronenmikroskopische Aufnahme einer Oozyte mit 8 µm breiter Schnittgröße, SEM Vergrößerung 6000-fach

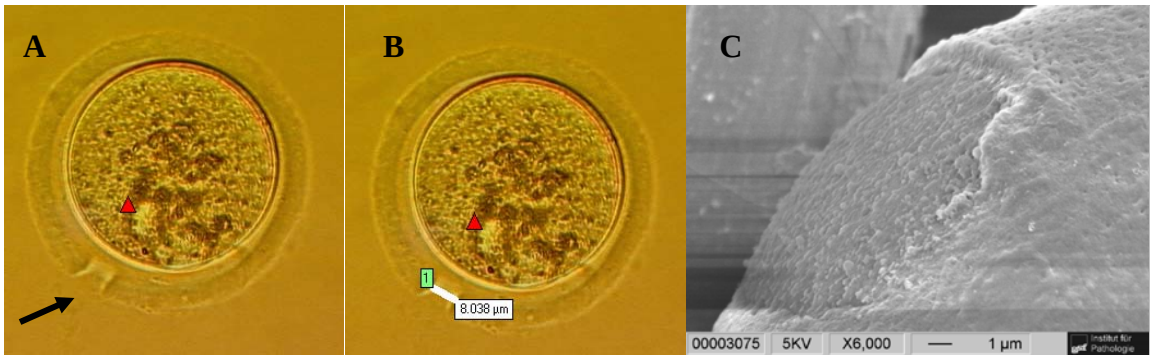


Abb 18. C3HeB/FeJ Oozyten mit ca. 3 µm breiter Schnittgröße in der Zona Pellucida; A, B: Vergrößerung 400-fach, C: Scanning-elektronenmikroskopische Aufnahme einer Oozyte mit 3 µm breiter Schnittgröße, SEM Vergrößerung 6500-fach

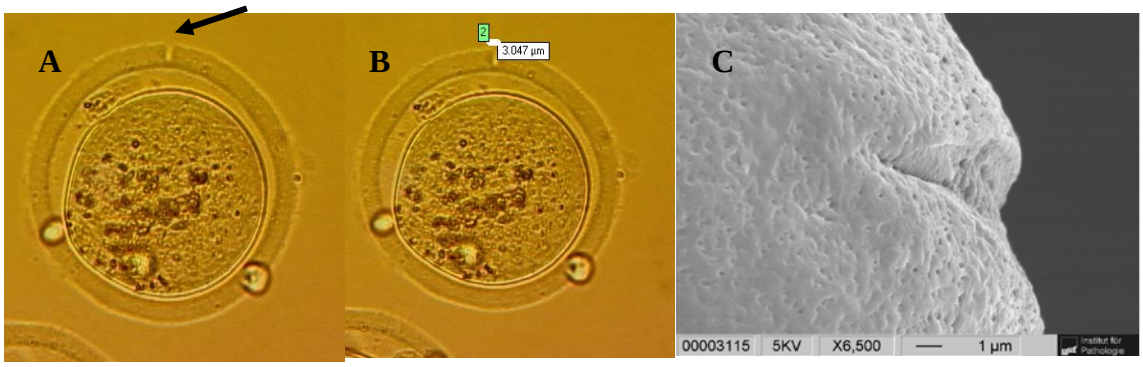


Tabelle 23 Vergleich der Teilungsraten und Weiterentwicklung von Embryonen nach 3 µm und 8 µm breiter Schnittgröße in der Zona Pellucida (Stamm C3HeB/FeJ)

	Teilungsraten		**Weiterentwicklung**	
1xIVF*	**Gesamtzahl der Eizellen in IVF**	**Zahl der 2-Zeller (%)**	**Zahl der 4-Zeller (%)**	**Kompakte Morulae (%)**
Kontrolle	51	34 (66,7)[a]	31 (91,2)	31 (100)
Schnittgröße 3µm	67	59 (78,2)[b]	42 (71,2)	42 (100)
Schnittgröße 8µm	10	10 (100)[c]	7 (70,00)	0 (0)

a,b,c : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,b: $p<0.01$, a,c: $p<0.001$)

*frische Spermaprobe

In der Kontrollgruppe (unbehandelte Eizellen) lag die Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo bei 66,7 %. In beiden Gruppen der lasermanipulierten Oozyten (3 und 8 µm Schnittgröße) war im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Steigerung der Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo von 78,2 % (3 µm Schnittgröße, $p<0.01$) und 100 % (8 µm Schnittgröße, $p<0.001$) festzustellen.

Die befruchteten Eizellen wurden bis 84 Stunden nach der Fertilisation beobachtet. In dieser Zeit entwickelten sich in der Kontrollgruppe 91,2 % der 2-Zeller zum 4-Zell-Stadium weiter und davon 100 % zur kompakten Morula. Bei den Eizellen mit 3 µm Schnittgröße entwickelten sich 71,2% zum 2-Zeller und davon 100% zur kompakten Morula. Die Eizellen mit 8µm Schnittgröße wiesen nach 100 %-iger Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo eine Weiterentwicklung von 70% zum 4-Zeller auf. Es fand jedoch keine Weiterentwicklung zur kompakten Morula statt (0%).
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den weiteren Experimenten ausschließlich mit einer Schnittgröße von 3 µm gearbeitet.

4.3.2 Effekt der Laser Mikrodissektion auf die Teilungsraten und die Anzahl der Nachkommen

Die Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo lag in der Kontrollgruppe bei 50,5 % (Tabelle 24).
Nach der Embryonenübertragung wurde eine Trächtigkeitsrate von 85,7 % ermittelt. Die Prozentzahl der Nachkommen lag nach einer Übertragung von durchschnittlich 70 Embryonen pro IVF bei 16,4 % (durchschnittlich 11,5 Nachkommen pro IVF). Nach der Laser Mikrodissektion der Eizellen war ein signifikanter Anstieg der Teilungsraten auf 73,0 % zu beobachten ($p<0,001$). Die Trächtigkeitsrate lag bei den laserbehandelten Oozyten bei 50,0 % und im Vergleich zur Kontrolle wurde dabei ein deutliches Absinken der Trächtigkeitsraten festgestellt. Dieser Abfall war wegen der geringen Zahl der durchgeführten Transfers nicht signifikant ($p>0,05$). Die Prozentzahl der Nachkommen lag nach der Übertragung der laserbehandelten Embryonen durchschnittlich bei 3,3 % pro IVF und war im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger ($p<0,01$).

Tabelle 24 Ergebnis der IVF mit bzw. ohne Lasermikrodissektion der Eizellen (Stamm C3HeB/FeJ): Bereich, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

IVF	Zahl der Eizellen in der IVF	Zahl der 2-Zeller MW±Stabw	Teilungs Rate (%)	Zahl der Rezipienten MW±Stabw	Zahl der trächtigen Mäuse	Trächtigkeits Rate (%)	Zahl der transf. Embryonen MW±Stabw	Zahl der Nachkommen MW±Stabw	Prozentzahl der Nachkommen (%)
Kontrolle*	44-114	21-46	50.5[a]	3-4	2-4	85,7[a]	80-60	9-14	16.4[c]
IVF 1-2	72.6±29.8	37.2±9.6		3.5±0.7	3.0±1.4		70±14.4	11.5±3.5	
Laser*	35-56	25-43	73,0[b]	3-3	0-3	50,0[a]	60-60	0-4	3.3[d]
IVF 1-2	47.2±8.8	34.5±7.7		3	1.5±2.1		60	2±2.8	

a,b : unterschiedliche hochgestellte Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte an (chi^2 Test: a,b: $p<0,001$; c,d: $p<0.01$; a,a: $p>0,05$)

*gefrorene Spermaproben

4.4 Inokulation der Männchen mit MHV-A59

Um das Übertragungsrisiko der MHV Infektion durch Spermaproben zu testen, wurde eine intraperitoneale und intranasale Inokulation von Männchen durchgeführt. Für die Inokulation wurden Männchen im Alter von 12 Wochen ausgewählt, da dieses Alter optimal für die Spermienkryokonservierung ist. Die Anfälligkeit zur Infektion wurde zwischen dem Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Inzuchtstamm verglichen, wobei zur allgemeinen Darstellung der effektiven Virusdosis pro Maus CD-1 Männchen benutzt wurden. Die Infektion der Männchen wurde anhand der Virusausscheidung durch Organe und Antikörperproduktion gegen MHV untersucht.

4.4.1 Intraperitoneale (i.p.) Inokulation der Männchen

Die intraperitoneale Inokulation der Männchen wurde vorerst als Virusdosistest mit drei unterschiedlichen Virusdosen ($5x10^8$, $5x10^4$ und $5x10^1$ $TCID_{50}$/Maus) an 20 CD-1 Männchen durchgeführt. Am Tag 5, 7 und 9 nach der Inokulation wurden von den Männchen beide Nebenhoden entnommen und mittels RT-PCR untersucht. Ein Nebenhoden war als ganzes Organ für die Untersuchung vorgesehen, der zweite Nebenhoden wurde zur Spermienpräparation und anschließender Kryokonservierung verwendet.

Das Ziel dieser Untersuchungen war zu überprüfen, an welchen Tagen die Nebenhoden, bzw. Spermien MHV-positiv sind und ob das Virus sowohl in den Nebenhoden, als auch in der Spermiensuspension nachweisbar ist.

Besonders auffällig bei den Untersuchungen war eine sehr hohe Mortalität der inokulierten Tiere, die durch die MHV Infektion ausgelöst wurde. Nachdem die Tiere unspezifische Symptome wie Inappetenz, Gewichtsverlust, Apathie, gesträubtes Fell und Durchfall zeigten, kam es meist innerhalb der ersten 5 Tagen nach der Inokulation zu Auszehrung der Tieren (so g. Wasting Disease) mit Todesfolge. Tabelle 25 zeigt die Mortalität der CD-1 Männchen nach der Inokulation mit MHV-Viren.

Tabelle 25 Mortalität der CD-1 Männchen nach einer i.p. Inokulation mit MHV

Virustiter ($TCID_{50}$/ml)	Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	Anzahl der Tiere	Mortalität			Mortalität Gesamt
			Tag 5	Tag 7	Tag 9	
10^9	$5x10^8$	6	5/6	0	0	5/6
10^5	$5x10^4$	6	1/6	0	2/5	3/6
10^2	$5x10^1$	6	1/6	0	0	1/6
0 (NaCl)	0	2	0/2	0/2	0/2	0/2

Nach der experimentellen Infektion mit $5x10^8$ $TCID_{50}$ MHV starben fast alle Mäuse (5/6) bis zum Tag 5 nach der Inokulation. Bei der Virusdosis von $5x10^4$ starb die Hälfte der inokulierten Mäuse (3/6) und nach der Inokulation mit Virusdosis von $5x10^2$ starb nur ein Tier von 6 inokulierten Männchen. Im Kontrollexperiment überlebten alle Tiere.

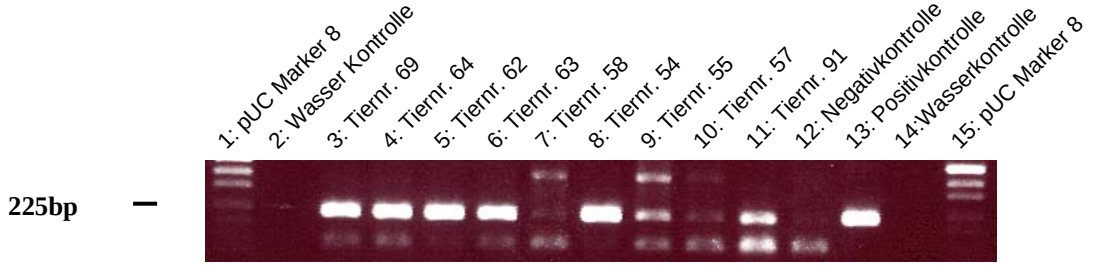
4.4.1.1 Nebenhodenuntersuchung

Bei den MHV RT-PCR Untersuchungen der Nebenhoden wurden ca. 200 mg große Nebenhodenstücke von 9 Tieren, welche die Inokulation überlebt hatten, untersucht (Kapitel 3.3.2.2). Die Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in der Tabelle 26 und Abb. 19 dargestellt.

Tabelle 26 MHV RT-PCR-Analyse der Nebenhodenproben der i.p. MHV infizierten männlichen CD-1 Mäusen

Virusdosis/Maus ($TCID_{50}$)	Anzahl der positiven Tieren	Nr. der positiven Tieren am Tag 5, 7, 9 p.inf.		
		Tag 5	Tag 7	Tag 9
$5x10^8$	1	69	-	-
$5x10^4$	3	64	62, 63	-
$5x10^1$	5	58	54, 55	57, 91
0 (NaCl)	0	-	-	negativ

Abb 19 MHV RT-PCR-Analyse der Nebenhoden der i.p. MHV inokulierten CD-1 Männchen; 5, 7 und 9 Tage p.inf.



Bei den RT-PCR Untersuchungen der Nebenhoden am Tag 5, 7 und 9 nach der i.p. Inokulation mit MHV (Abb.19) wurde MHV-Virus bei allen untersuchten Tieren nachgewiesen. Die diagnostischen Banden waren bei den Tieren Nr. 69, 64, 62, 63, 54, 55 und 91 sehr deutlich zu erkennen. Untersuchungen der Nebenhoden bei Tieren Nr. 58 und 57 ergaben jeweils schwächere Banden.

In der Wasserkontrolle und Negativkontrolle bei einer mit NaCl inokulierten Maus wurden keine positiven Ergebnisse festgestellt.

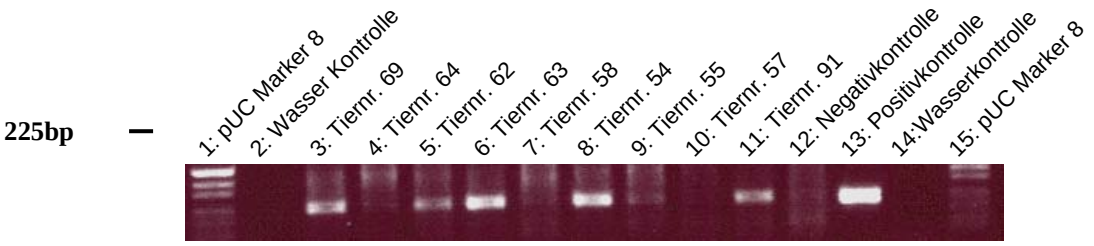
4.4.1.2 Untersuchung der Spermaproben

Bei den kryokonservierten Spermaproben wurde ebenfalls ein MHV-Nachweis mittels RT-PCR durchgeführt. Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in der Tabelle 27 und Abb. 20 dargestellt.

Tabelle 27 MHV RT-PCR-Analyse der Spermaproben der i.p. MHV infizierten männlichen CD-1 Mäusen

Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	**Anzahl der positiven Tieren**	**Nr. der positiven Tieren am Tag 5, 7, 9 p.inf.**		
		Tag 5	**Tag 7**	**Tag 9**
$5x10^8$	1	69	-	-
$5x10^4$	2	negativ	62, 63	-
$5x10^1$	3	negativ	54, 55	91
0 (NaCl)	0	-	-	negativ

Abb.20 MHV RT-PCR-Analyse der Spermaproben der i.p. MHV inokulierten CD-1 Männchen; 5, 7 und 9 Tage p.inf.

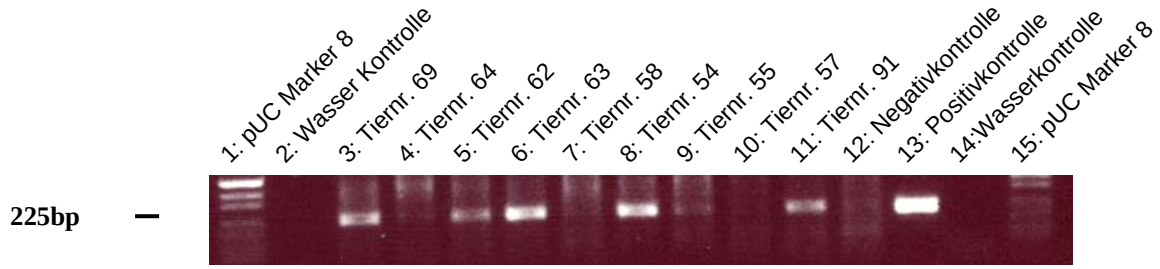


Bei der Untersuchung der Spermaproben (Abb. 20), die am Tag 5, 7 und 9 nach i.p. Inokulation gewonnen worden waren, konnte bei 6 von 9 untersuchten Tieren MHV nachgewiesen werden. Die spezifischen Banden waren bei den Tieren Nr. 69, 62, 63, 54 und 91 deutlich sichtbar, beim Tier Nr. 55 nur schwach zu erkennen. In den Spermaproben der Tiere Nr. 64, 58 und 57, als auch in der Wasser- und Negativkontrollen war MHV nicht nachweisbar.

Um die Lokalisation der Viren in den positiv getesteten Spermaproben aufzuklären, wurden die Spermaproben nach 3-maligem Waschen (3–malige Zentrifugation und Resuspension mit HTF) resuspendiert und nochmal mittels MHV RT-PCR analysiert.

Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der MHV RT-PCR-Analyse nachdem die Spermasuspension aus dem Versuch 4.4.1.2 drei mal gewaschen worden war.

Abb.21 MHV RT-PCR-Analyse der positiv getesteten CD-1 Spermien nach 3-maligem Waschen mit HTF-Medium



Bei der MHV RT-PCR-Analyse der drei mal gewaschenen Spermaproben wurden positive MHV-Banden bei Tieren Nr. 69, 62, 63, 54, 55 und 91 nachgewiesen. Bei den Tieren Nr. 64, 58 und 57, als auch bei den Wasser- und Negativkontrollen waren keine spezifischen Banden für MHV festzustellen.

4.4.1.3 Infektiositätstest

Die Titration der IVF Überstände wurde auf der Zelllinie L-929 durchgeführt (Kapitel 3.3.1.3). Um die infektiösen Viruspartikel zu bestimmen, wurde der nach 18-24 h auftretende zytopathische Effekt (CPE) der Zellkultur L-929 durch die Abschätzung der veränderten Zellen beurteilt.

Die positiv getesteten Spermaproben aus Versuch 4.3.1.2 wurden 10 mal in Verdünnungsstufen 1:10 mit HTF-Medium verdünnt und auf die Zellkultur L-929 aufgetragen. Nach zwei Kulturtagen wurden die Zellkulturplatten ausgewertet Es wurden bei keiner der untersuchten Spermaproben zytopathische Effekte festgestellt, d.h. dass keine infektiösen Viruspartikel in den Spermaproben vorhanden waren.

4.4.2 Intranasale Inokulation (i.n.) der Männchen

Mit dieser Inokulation wurde ein Mouse Antibody Production Test (MAP-Test) durchgeführt, um die Immunantwort der CD-1, Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Männchen zu vergleichen. Nachdem die Virusdosis bestimmt war, welche bei dem MAP Test zur Antikörperproduktion geführt hatte, wurden weitere Tiere mit dieser Virusdosis/Maus i.n. inokuliert. Am Tag 5 nach der Inokulation wurde eine Organuntersuchung durchgeführt, in der Leber-, Milz-, Hoden-, Serum-, Akzessorische Geschlechtsdrüsen-, Nebenhoden- und Spermaproben mittels MHV RT-PCR untersucht wurden.

4.4.2.1 MAP Test (CD-1, Balb/cAnNCrl, C3HeB/FeJ Männchen)

Die intranasale Inokulation der Männchen wurde vorerst als Virusdosistest mit 10 CD-1 Männchen durchgeführt (Tabelle 28). Anschließend wurden die getesteten Virusdosen bei 10 Balb/cAnNCrl (Tabelle 29) und 10 C3HeB/FeJ Männchen (Tabelle 30) angewendet. Am Tag 14, 21, 28 und 42 nach der Inokulation wurden die Serumproben der Tiere auf Antikörper gegen MHV untersucht.

Tabelle 28 Immunantwort der CD-1 Männchen nach einer i.n. Inokulation mit MHV

Virustiter ($TCID_{50}$/ml)	Volumen/ Maus (µl)	Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	Tag 28		Tag 42		Mortalität
			Positive Tiere	OD	Positive Tiere	OD	
10^8	50	5 x 10^6	1/2	0.820	1/2	1.187	0/2
10^7	50	5 x 10^5	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
10^6	50	5 x 10^4	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
10^5	50	5 x 10^3	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
0 (Kontrolle)	50	0	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2

*OD = Optische Dichte, < 0.600: negativ, 0.600 – 0.799: schwach positiv > 0.799: positiv

Am Tag 28 nach Inokulation mit der Virusdosis $5x10^6$ $TCID_{50}$/ Maus hat bei einem von zwei mit dieser Virusdosis inokulierten CD-1 Männchen die Serokonversion stattgefunden. Die optische Dichte lag dabei bei 0,820. Am Tag 42 nach der Inokulation war bei diesem Tier ein Anstieg der optischen Dichte auf 1.187 zu beobachten. Bei den Untersuchungen der Serumproben der restlichen Tieren am Tag 28 und 42 nach Inokulation mit Virusdosis $5x10^5$, $5x10^4$ und $5x10^3$$TCID_{50}$/ Maus, als auch bei den Kontrolltieren waren keine Antikörper gegen MHV festzustellen (optische Dichte lag unter 600).

Darüber hinaus konnte die kritische Virusdosis pro Maus ermittelt werden ($5x10^6$ $TCID_{50}$/ Maus) , bei der am Tag 28 und 42 nach Inokulation eine Serokonversion stattgefunden hatte. Bei keiner anderen Verdünnungsstufe ($5x10^5$, $5x10^4$ und $5x10^3$$TCID_{50}$/ Maus) wurde eine Immunreaktion festgestellt.

Anhand der Ergebnisse wurden die identischen Virusdosen zur Durchführung des MAP Tests bei Balb/c (Tabelle 29) verwendet.

Tabelle 29 Immunantwort der Balb/cAnNCrl Männchen nach einer i.n. Inokulation mit MHV

Virustiter ($TCID_{50}$/ml)	Volumen/ Maus (µl)	Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	Tag 28		Tag 42		Mortalität
			Positive Tiere	OD	Positive Tiere	OD	
10^8	50	5 x 10^6	2/2	1.164	2/2	1.129	0/2
10^7	50	5 x 10^5	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
10^6	50	5 x 10^4	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
10^5	50	5 x 10^3	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2
0 (NaCl)	50	0	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2

*OD = Optische Dichte, < 0.600: negativ, 0.600 – 0.799: schwach positiv, > 0.799: positiv

In den Serumproben der Balb/cAnNCrl Männchen konnten bei beiden Tieren, die mit der Virusdosis 5 x 10^6 $TCID_{50}$/Maus inokuliert worden waren, Antikörper gegen MHV nachgewiesen werden. Am Tag 28 nach der Inokulation lag die optische Dichte in den Serumproben beider Tiere durchschnittlich bei 1,164 und am Tag 42 bei 1,129. Bei den Untersuchungen der Serumproben der restlichen Tieren am Tag 28 und 42 nach der Inokulation mit Virusdosis $5x10^5$, $5x10^4$ und $5x10^3$ $TCID_{50}$/Maus waren keine Antikörper gegen MHV festzustellen (optische Dichte lag unter 600). Bei den Untersuchungen der Kontrolltiere wurden ebenfalls keine Antikörper gegen MHV nachgewiesen.
Darüber hinaus konnte eine Virusdosis pro Maus ermittelt werden ($5x10^6$ $TCID_{50}$/Maus), welche am Tag 28 und 42 nach der Inokulation zwei Balb/cAnNCrl Männchen zur Serokonversion brachte. Bei allen anderen Verdünnungsstufen (bei der Virusdosis $5x10^5$, $5x10^4$ und $5x10^3$ $TCID_{50}$/ Maus) reagierte keines der 6 untersuchten Tieren.

Aufgrund der Semi-Resistenz des C3HeB/FeJ Stammes gegen MHV (Kapitel 2.6.4), wurde bei diesem Stamm die Virusdosis/ Maus um eine Stufe ($5x10^7$, $5x10^6$, $5x10^5$ und $5x10^4$ $TCID_{50}$/ Maus) erhöht und die C3HeB/FeJ Männchen damit i.n. inokuliert. Die Ergebnisse aus der Inokulation sind in der Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30 Immunantwort der C3HeB/FeJ Männchen nach einer i.n. Inokulation mit MHV

Virustiter ($TCID_{50}$/ml)	Volumen/ Maus (µl)	Virusdosis/ Maus ($TCID_{50}$)	Tag 28		Tag 42		Mortalität
			Positive Tiere	OD	Positive Tiere	OD	
10^9	50	5 x 10^7	2/2	1.443	2/2	1.923	0/2
10^8	50	5 x 10^6	1/2	1.207	1/2	1.206	0/2
10^7	50	5 x 10^5	1/2	1.379	1/2	1.726	0/2
10^6	50	5 x 10^4	1/2	1.356	1/2	1.493	0/2
0 (NaCl)	50	0	0/2	< 0.600	0/2	< 0.600	0/2

*OD = Optische Dichte, < 0.600: negativ, 0.600 – 0.799: schwach positiv > 0.799: positiv

Bei der Untersuchung der Serumproben wurden bei beiden mit der Virusdosis $5x10^7 TCID_{50}$/Maus inokulierten Tiere Antikörper gegen MHV festgestellt. Die durchschnittlichen OD-Werte lagen dabei bei 1,443 am Tag 28 nach der Inokulation und bei 1,923 am Tag 42. Nach der Inokulation mit der Virusdosis $5x10^6$, $5x10^5$ und $5x10^4$ $TCID_{50}$/ Maus zeigte jeweils eines von zwei untersuchten Männchen eine Immunantwort. Die OD-Werte lagen dabei zwischen 1,207 und 1,379 am Tag 28 nach der Inokulation und zwischen 1,206 und 1,726 am Tag 42.

Untersuchungen der Kontrolltiere ergaben keine Antikörper gegen MHV in den am Tag 28 und 42 entnommenen Serumproben.

4.4.2.2 MHV RT-PCR Organanalyse der Balb/cAnNCrl Männchen

Mit der Virusdosis $5x10^7$ und $5x10^6$ $TCID_{50}$/ Maus wurden zusätzlich 12 Balb/cAnNCrl Männchen inokuliert und die Organe im Hinblick auf die Virusausscheidung durch Reproduktionsorgane mittels RT-PCR getestet. Die Tiere wurden am Tag 5 nach der Inokulation durch Zervikale Dislokation getötet und Leber, Milz, Hoden, Serumproben, Akzessorische Drüsen, Nebenhoden sowie Nebenhodensperma entnommen.

Die Ergebnisse aus den RT-PCR Untersuchungen der Organe sind in Tabelle 31 und Abb. 22 dargestellt.

Tabelle 31 MHV RT-PCR Organanalyse der i.n. inokulierten Balb/cAnNCrl Männchen, Tag 5 p.inf.

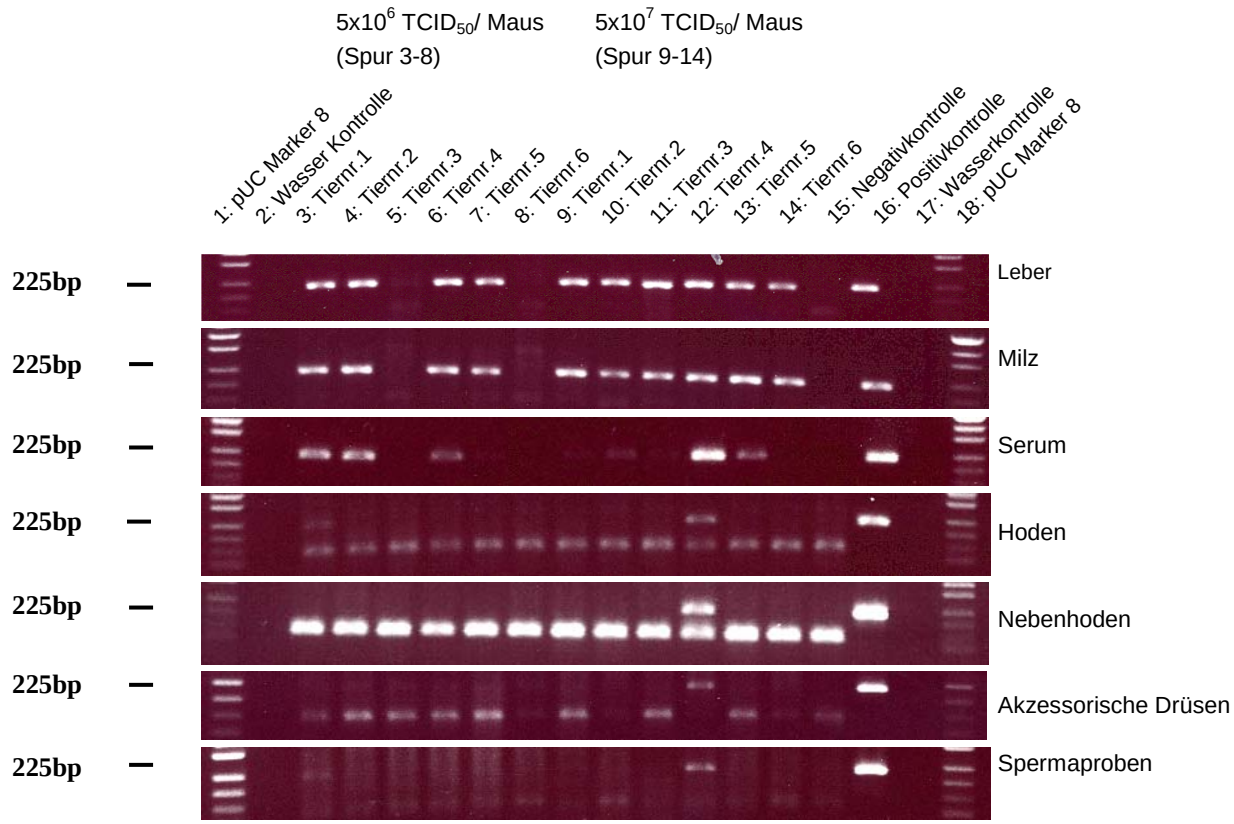
Virusdosis /Maus (TCID50)	**Anzahl der Tiere**	**Positiv getestete Männchen/ Anzahl der inokulierten Tiere**						
		Leber	**Milz**	**Serum**	**Hoden**	**Neben Hoden**	**Akz. Drüsen**	**Sperma**
$5x10^7$	6	6/6	6/6	5/6	1/6	1/6	1/6	1/6
$5x10^6$	6	4/6	4/6	4/6	1/6	0/6	0/6	0/6
0 (NaCl)	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

5 Tage nach der experimentellen Inokulation mit Virusdosis=$5x10^7 TCID_{50}$/Maus konnte MHV in Leber- und Milzproben bei allen mit dieser Virusdosis inokulierten Tieren nachgewiesen werden. In den Serumproben war MHV bei 5 von 6 inokulierten Tiere nachweisbar. Bei den Untersuchungen der Hoden-, Nebenhoden- und Spermaproben wurde MHV bei einem von 5 inokulierten Tieren positiv getestet.

Bei den mit Virusdosis=$5x10^6$ $TCID_{50}$/ Maus inokulierten Tieren wurde bei 4 von 6 getesteten Tieren MHV in Leber-, Milz- und Serumproben nachgewiesen. In den untersuchten Hoden wurde nur bei einer Probe MHV nachgewiesen. Untersuchungen der Nebenhoden- und Spermaproben verliefen bei allen Tieren negativ.

In der Negativkontrolle konnten bei keiner mit NaCl inokulierten Maus MHV-Viren in den Organen nachgewiesen werden.

Abb.22: MHV RT-PCR Organanalyse der i.n. inokulieren Balb/cAnNCrl Männchen (Tag 5 p. inf.)



Die diagnostischen Banden waren bei der Untersuchung der Leber- und Milzproben bei allen positiv getesteten Tieren deutlich erkennbar. Bei der Untersuchung der Serumproben nach der Inokulation mit Virusdosis $5x10^6 TCID_{50}$/Maus waren die spezifischen Banden bei 3 von 4 positiv getesteten Tieren deutlich zu sehen, beim Tier Nr. 5 war die Bande sehr schwach erkennbar. Nach der Inokulation mit Virusdosis $5x10^7 TCID_{50}$/Maus waren die Banden bei der Serumprobenuntersuchung bei Tier Nr.4 sehr deutlich zu sehen, bei den anderen positiv getesteten Tieren sehr schwach.

Untersuchungen der Hoden-, Nebenhoden- und Spermaproben verliefen bei beiden verwendeten Virusdosen/Maus mit einer Ausnahme negativ. Bei dem mit der Virusdosis $5x10^7$ $TCID_{50}$/ Maus inokulierten Tier Nr. 4 konnte in allen untersuchten Reproduktionsorganen und Spermaproben MHV nachgewiesen werden.

4.4.2.3 MHV RT-PCR Organanalyse der C3HeB/FeJ Männchen

Mit der Virusdosis $5x10^7$ und $5x10^6$ $TCID_{50}$/ Maus wurden auch 10 C3HeB/FeJ Männchen inokuliert und am Tag 5 nach der i.n. Inokulation durch Zervikale Dislokation getötet. Leber, Milz, Hoden, Serum, Akzessorische Drüsen, Nebenhoden sowie Nebenhodensperma wurden entnommen und mittels RT-PCR auf Virusausscheidung getestet. Ergebnisse aus den Untersuchungen sind in Tabelle 32 und Abb. 23 dargestellt.

Tabelle 32 MHV RT-PCR Organanalyse der i.n. inokulierten C3HeB/FeJ Männchen, Tag 5 p.inf.

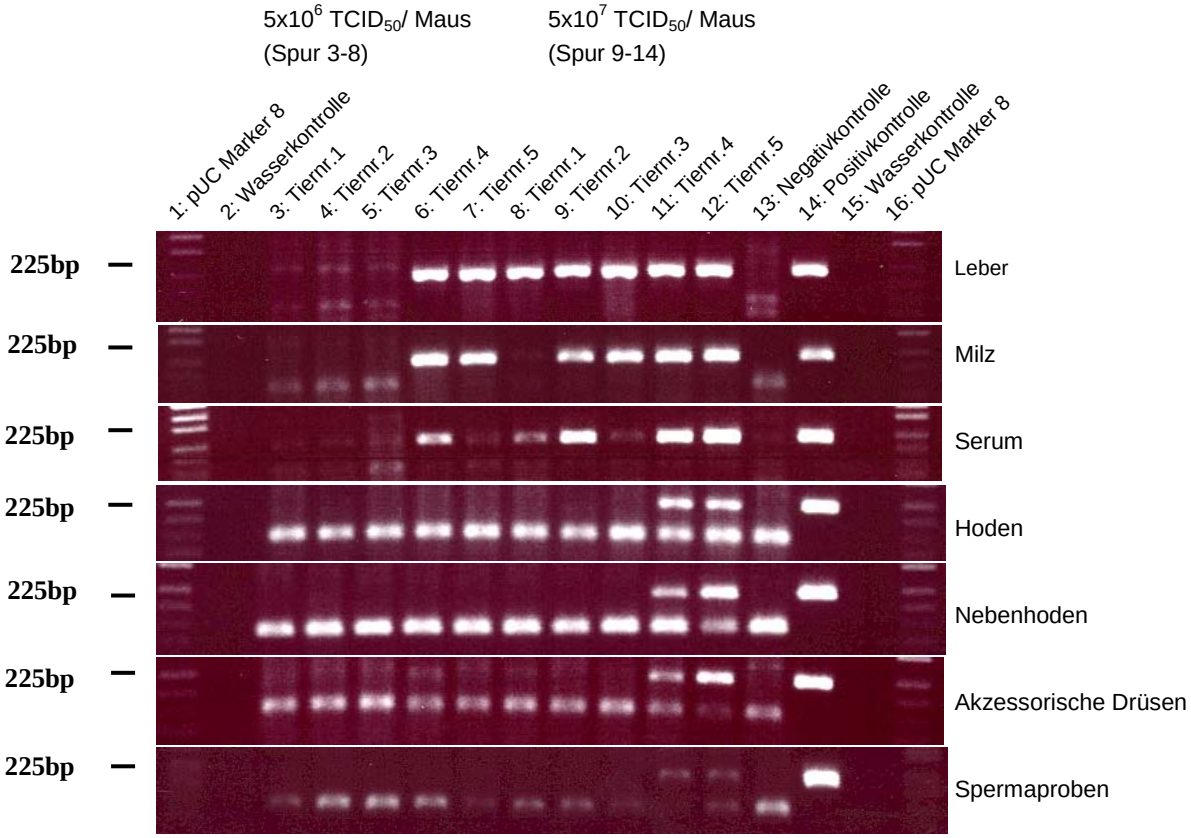
Virusdosis /Maus (TCID50)	Anzahl der Tiere	Positiv getestete Männchen/ Anzahl der inokulierten Tiere						
		Leber	Milz	Serum	Hoden	Neben Hoden	Akz. Drüsen	Sperma
$5x10^7$	5	5/5	4/5	5/5	2/5	2/5	2/5	2/5
$5x10^6$	5	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
0 (NaCl)	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Nach der experimentellen Inokulation mit Virusdosis $5x10^7TCID_{50}$/ Maus konnte MHV am Tag 5 p.inf. in den Leber- und Serumproben bei allen mit dieser Virusdosis inokulierten Tieren nachgewiesen werden. In den Milzproben war MHV bei 4 von 5 inokulierten Tieren nachweisbar. Bei den Untersuchungen der Hoden-, Nebenhoden- und Spermaproben wurde MHV jeweils bei zwei von 5 inokulierten Tieren positiv getestet.

Bei den Untersuchungen der Leber-, Milz- und Serumproben der mit Virusdosis=$5x10^6TCID_{50}$/Maus inokulierten Tiere wurde MHV bei 2 von 5 getesteten Tieren nachgewiesen. Untersuchungen der Hoden-, Nebenhoden- und Spermaproben ergaben bei diesen Tieren keinen MHV-positiven Nachweis.

In der Negativkontrolle konnten bei keiner mit NaCl inokulierten Maus MHV-Viren nachgewiesen werden.

Abb.23 MHV RT-PCR Organanalyse der i.n. inokulieren C3HeB/FeJ Männchen (Tag 5 p. inf.)



Die diagnostischen Banden waren bei den Untersuchungen der Leber- und Milzproben bei allen positiv getesteten Tieren deutlich erkennbar. Bei den Untersuchungen der Serumproben nach Inokulation mit Virusdosis $5x10^6 TCID_{50}$/Maus waren die spezifischen Banden bei 3 von 5 positiv getesteten Tieren deutlich zu sehen, bei Tieren Nr. 1 und 3 schwächer zu erkennen. Nach der Inokulation mit Virusdosis=$5x10^7 TCID_{50}$/Maus waren die Banden bei der Serumprobenuntersuchung bei Tier Nr. 4 sehr deutlich, bei den anderen positiv getesteten Tieren sehr schwach zu sehen.

Untersuchungen der Hoden-, Nebenhoden- und Spermaproben verliefen bei beiden verwendeten Virusdosen/Maus außer zwei Ausnahmen negativ. Bei den mit Virusdosis $5x10^7 TCID_{50}$/Maus inokulierten Tieren Nr. 4 und 5 konnte in allen untersuchten Reproduktionsorganen und Spermaproben MHV nachgewiesen werden.

4.4.3 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Bestätigung, dass die mit MHV inokulierten Tiere tatsächlich mit MHV infiziert waren, wurden 5 Tage nach der i.n. Infektion von allen inokulierten Balb/c Männchen Leber- , Milz-, Serum-, Hoden-, Akzessorische Geschlechtsorgane, Nebenhoden-, und Spermaproben entnommen und mittels RT-PCR untersucht. Untersuchungen der Proben lieferten eine diagnostische Bande von ca. 225 bp. Die PCR Produkte aus einer Leberprobe und Spermaprobe, in denen MHV nachgewiesen werden konnte, wurden aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit) und zur Sequenzierung geschickt (Sequiserve, Vaterstetten). Die aufgelistete Sequenz wurde in eine Genbank-Recherche (NCBI Blast: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) gegeben und ihre Übereinstimmung mit bekannten Gensequenzen analysiert.

Unter den ersten 16 Sequenzen befanden sich 3 mal Übereinstimmungen mit der Sequenz von MHV-A59 und 13 mal Übereinstimmungen mit Mouse Hepatitis virus. Bei einem direkten Vergleich der Sequenz des PCR Produktes mit der entsprechenden Sequenz des MHV ergab sich eine Übereinstimmung von 100% (Abb. 24)

Diese Ergebnisse zeigen, dass die diagnostischen Banden von ca. 225 bp auf die experimentelle Infektion mit MHV zurückzuführen waren.

Die Analyse der Sequenz des PCR-Produktes aus reiner MHV-A59 DNA, die in allen Experimenten als positiv Kontrolle verwendet wurde, ergab die identische Basensequenz, die aus der Leber und Spermaprobe der mit MHV infizierten Maus generiert wurde.

Abb. 24 Übereinstimmung der Basensequenz des PCR Produktes aus der Leber und Spermaprobe der mit MHV inokulierten Tiere mit der entsprechenden Basensequenz von MHV-A59 Genoms (NCBI Blast)

```
bp:1-50
cagcctgcctctactgtaaaacctgatatggccgaagaaattgctgctcttgttttggct

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MHV 30339
cagcctgcctctactgtaaaacctgatatggccgaagaaattgctgctcttgttttggct 30398 bp


bp:61-120
aagctcggtaaagatgccggccagcccaagcaagtaacgaagcaaagtgccaaagaagtc

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MHV 30399
aagctcggtaaagatgccggccagcccaagcaagtaacgaagcaaagtgccaaagaagtc 30458 bp


bp:121-180
aggcagaaaattttaaacaagcctcgccaaaagaggactccaaacaagcagtgcccagtg

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MHV 30459
aggcagaaaattttaaacaagcctcgccaaaagaggactccaaacaagcagtgcccagtg 30518 bp


bp:181-225   cagcagtgttttggaaagagaggccccaatcagaattttggaggc
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MHV 30519    cagcagtgttttggaaagagaggccccaatcagaattttggaggc
30563 bp
```

Die oberen Basensequenzen stellen die Sequenz des PCR Produktes dar (1-225 bp). Die unteren Basensequenzen zeigen die übereinstimmende Sequenz des MHV Genoms (zwischen 30339 und 30563 bp).

5 Diskussion

Der Hygienestatus von Versuchstieren spielt eine wichtige Rolle in der biomedizinischen Forschung. Subklinische Infektionen können die Versuchsbedingungen ändern und einen störenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben (Kraft et al. 1994; Rehbinder et al. 1996; Nicklas et al. 2002). Daher sind spezifisch-pathogen-freie (SPF) Mausbestände mit standardisierter mikrobiologischer Qualität eine wichtige Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der experimentellen Ergebnisse.

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, um Mäuse mit standardisierter mikrobiologischer Qualität zu bekommen (Schenkel, 1995). Zu einem durch die so g. Hysterektomie, bei der trächtigen Weibchen kurz vor dem Wurftermin der Uterus mit Feten entnommen wird und die Nachkommen in einem hygienisch sauberen Bereich durch Ersatzmütter großgezogen werden (Weir, 1987), zum anderen durch Transfer von Embryonen, die kontaminierten Spendertieren entnommen und in ein hygienisch sauberes Tier gebracht werden (Carthew et al. 1983; Reetz et al. 1988; Morrell, 1999). Zur Rederivation von Mausspermien kommt grundsätzlich der Embryotransfer in vitro produzierter Embryonen zur Anwendung (Suzuki, 1996). Aufgrund der geringen Anzahl diesbezüglich relevanter Studien war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Risiko einer Pathogenübertragung für verschiedene Aspekte der in vitro Fertilisation und für daraus resultierende Embryonen zu untersuchen und die Zuverlässigkeit eines standardisierten Waschverfahrens darzustellen.

5.1 Bestimmung der kritischen Virusdosis/Maus mittels Eileitertransfer

Durch die Übertragung von virushaltigen Lösungen in den Eileiter der scheinträchtigen Embryonenempfänger wurde zunächst die Virusdosis pro Maus ermittelt, die zu einer Serokonversion der Ammentiere führte. Die Virusdosis von $5x10^8$ $TCID_{50}$ pro Maus ergab sich aus dem transferierten Volumen (0,005 µl) und dem übertragenen Virustiter (10^8 $TCID_{50}$/ml).

Bisherige Untersuchungen hatten ergeben, dass ein akuter Verlauf der MHV-Infektion bereits nach einer Inokulation mit $1x10^3$ $TCID_{50}$ MHV-A59 zu erwarten war. Mit dieser Virusdosis diagnostizierten Barthold et al. (1986) bereits 5 Tage nach i.n. Inokulation der Männchen (C3H/HeJ und BALB/cByJ) eine akute MHV-Infektion. Daher war zu erwarten, dass nach einer Eileiterinokulation der Ammentiere mit einer 5-fach höheren Virusdosis/Maus ($5x10^3TCID_{50}$/Maus) eine Reaktion der Mäuse stattfand. Am Tag 14, 21 und 28 nach Inokulation wurde eine Antikörperproduktion gegen MHV bei 4 von 6 inokulierten Ammentiere nachgewiesen. Der Nachweis der Serokonversion ab Tag 14 nach Inokulation und der kontinuierlichen Anstieg des Antikörpertiters bis zum Tag 28 stimmten mit den Untersuchungen von Homberger (1992) und Barthold et al. (1993) überein, die einen erhöhten Antikörpertiter am Tag 10 (Barthold, 1993) und 30 (Homberger, 1992), bis zum Tag 30 (Barthold, 1993) bzw. bis zur 6 Monaten nach der Inokulation (Homberger, 1992) fanden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass durch das geringe transferierte Volumen beim Eileitertransfer auch bei sehr hohem Virustiter nur eine niedrige Virusdosis pro Maus übertragen wird. Daher ist davon auszugehen, dass eine Pathogenübertragung mittels *in vitro* Fertilisation und Embryotransfer erst bei einer Übertragung von sehr hoch kontaminiertem Material zu erwarten ist. Das Ergebnis zeigt einen neuen und sehr wichtigen Aspekt des Embryotransfers bei der Maus, da bis jetzt keine Literaturangaben zur Berechnung der transferierten Volumenlösung beim Eileiter- bzw. Uterustransfer vorhanden sind.

5.2 Immunantwort der Embryonenempfänger

In bisherigen Studien wurde das Waschen von Embryonen und die Immunantwort der Embryonenempfänger vorwiegend bei der in vivo Produktion von Embryonen untersucht. So zeigten beispielweise Carthew et al. (1983 und 1985) und Reetz et al. (1988), dass der Transfer von Embryonen, die aus den Uteri akut mit MHV, Sendai Virus bzw. Pasteurella pneumotropica infizierter Oozytenspender ausgespült worden waren, nicht zur Antikörperproduktion der Embryonenempfänger führte, d.h. keine Pathogene übertragen worden waren. Im Gegensatz dazu verwendeten Suzuki et al. 1996 bei der in vitro

Produktion von Embryonen Keimzellenspender, die sich nicht im akuten Stadium der MHV- bzw. Pasteurella pneumotropica Infektion befanden. Diese Studie zeigte zwar, dass nach der Übertragung der daraus resultierenden Embryonen auch keine Antikörper gegen MHV bzw. Pasteurella pneumotropica bei den Embryonenempfänger festzustellen waren, ob die in die IVF eingesetzten Keimzellen tatsächlich ein Risiko für die Pathogenübertragung darstellten, erscheint aber eher unwahrscheinlich. Scavizzi und Raspa, 2004 verwendeten für die in vitro Fertilisation Spermien, die von akut MHV-infizierten Männchen stammten, es wurde aber vorher nur eine Hodenuntersuchung der infizierten Tieren durchgeführt. Inwieweit die für die IVF verwendeten Spermien infektiös waren und eine Gefahr für die Pathogenübertragung darstellten, wurde nicht gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde tatsächlich infektiöses Material eingesetzt, um das Risiko einer Pathogenübertragung beim Embryotransfer nach der Inkubation und Fertilisation der Keimzellen in hoch kontaminiertem Medium zu untersuchen.

Zunächst wurden als Positivkontrollen fünf *in vitro* Fertilisationen mit viruskontaminiertem HTF, KSOM und M2-Medium ($10^8 TCID_{50}$/ml) durchgeführt. Da nach Eileiterübertragung dieses Virustiters bereits beim MAP-Test Ammentiere mit Antikörperproduktion reagiert hatten, war auch hier zu erwarten, dass eine Antikörperproduktion der Embryonenempfänger stattfinden würde. Bei den Untersuchungen der Serumproben wurden tatsächlich bei 10 von 14 Tieren Antikörper gegen MHV nachgewiesen.

Der Effekt des Waschens kontaminierter Keimzellen im Zusammenhang mit der Pathogenübertragung auf Ammentiere wurde nach einer Fertilisation in viruskontaminiertem HTF-Medium ($TCID_{50}=10^8$/ml) und einem Waschvorgang durch virusfreies KSOM- und M2-Medium in den experimentellen Gruppen 2, 3 und 4 untersucht. Anhand der Untersuchungen der Serumproben von Embryonenempfänger (Tabelle 18) wurden bei keinem der insgesamt 32 untersuchten Ammentiere in der experimentellen Gruppe 2-4 Antikörper gegen MHV nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass durch das standardisierte Waschen der Oozyten in virusfreiem KSOM- und M2-Medium sogar eine hohe Ausgangskontamination der Keimzellen entfernt wird und somit eine Pathogenübertragung für die Ammentiere und eine daraus resultierende Infektion der Nachkommen ausgeschlossen wird.

Carthew et al. 1983 und 1985 und Reetz, 1988 haben einen Verdünnungsfaktor für jeden Waschschritt von 1:2000 empfohlen, um die Kontamination der Ammentiere und deren Nachkommen zu verhindern. Suzuki et al. 1996 verwendeten in ihrer Studie zusätzlich eine Desinfektionslösung (eine 0,3 % Bezalkoniumchloride-Lösung), womit die weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane vor der Keimzellengewinnung desinfiziert wurden.

In unserer Studie wurde die anfängliche Viruskonzentration in jedem Waschschritt um einen Faktor von ca 1:100 verdünnt. Dies bedeutet, dass die Ausgangskontamination im HTF Medium von $10^8 TCID_{50}$/ml bereits beim vierten Waschschritt bei $10^0 TCID_{50}$/ml liegen sollte und dadurch kein Infektionsrisiko mehr vorliegt. Diese Hypothese wurde auch durch die RT-PCR Untersuchungen der Überstände aus den Waschschritten bestätigt (Abb. 14, 15 und 16), da die spezifischen MHV-Banden nur bis zum maximal fünften Verdünnungsschritt sichtbar waren. Eine Ausnahme dafür wurde bei Versuch Nr. 2 in der experimentellen Gruppe 2 beobachtet (Abb. 14), da die spezifischen Banden bis zum neunten Waschschritt nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen war jedoch in diesem eine höhere Anzahl 2-Zell-Embryonen (ca. 30%) in den Mediumtropfen gewaschen worden, wodurch möglicherweise mehr kontaminiertes Material zwischen den Waschschritten übertragen wurde. Diese Beobachtung stellt einen wichtigen Aspekt des Waschverfahrens bei der in vitro Fertilisation dar, da die Anzahl der pro Verdünnungsschritt gewaschenen 2-Zell-Embryonen einen wesentlichen Einfluss auf die Kontamination der Waschschritte hatte. In vorliegender Arbeit wurden durchschnittlich 150 Eizellen pro IVF angesetzt und zwischen 30 und 70 Embryonen pro IVF gewaschen. Da pro IVF grundsätzlich drei Fertilisationsschalen (eine für die Kontrolle und zwei für die virushaltigen in vitro Fertilisationen) angesetzt worden waren, wurden durchschnittlich ca. 15-35 Embryonen pro 10 Verdünnungsschritte gewaschen. Nach den Empfehlungen von Sztein (2000) sollten pro IVF Schale Kumulus-Oozyten-Komplexe von fünf superovulierten Weibchen eingesetzt werden, was bei durchschnittlich 10 Oozyten pro Weibchen, 50 Oozyten pro IVF-Schale bedeutet.

Eine intakte Zona Pellucida als Barriere gegen Pathogenübertragung beim Embryotransfer in vivo produzierter Embryonen wurde schon mehrfach untersucht (Carthew, 1985; Hill and Stalley, 1991). Die Ergebnisse zeigten, dass nach

Embryotransfer mit drei mal gewaschenen intakten Oozyten keine Antikörper gegen MHV bzw. *Mycoplasma pulmonis* bei den Ammentieren nachgewiesen wurden, d.h. kein Pathogentransfer stattgefunden hatte. Wurde jedoch die Zona Pellucida komplett entfernt (z.B. mit Acid Tyrode's Lösung), kam es zur Übertragung von Viren und es wurden bei allen untersuchten Ammentieren Antikörper gegen MHV und *Mycoplasma pulmonis* festgestellt. Ein wichtiger Punkt zu diesem Thema wurde im Manual of the International Embryo Transfer Society (Stringfellow and Seidel, 1998) angesprochen. Es handelt sich dabei um bestimmte Pathogene, wie z.B. *Mycoplasma pulmonis* bei Mäusen und *Leptospira spp.* bei Schweineembryonen, die an der Oberfläche der Zona Pellucida anheften können. Um solche Pathogene entfernen zu können, ist eine zusätzliche Behandlung mit Trypsin erforderlich. Außerdem sollten Medien für IVF eine vorgeschriebene Antibiotikakonzentration enthalten (minimal 100U/ml für Penicillin G und 10µg/ml für Streptomycin, Stringfellow and Seidel, 1998). Durch eine 24-stündige Inkubation in antibiotika-haltigen Medien wird die Gefahr einer Pathogenübertragung zusätzlich reduziert (Hill and Stalley, 1991).

Um das Risiko einer Pathogenübertragung bei der Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida zu testen, wurden in vorliegender Arbeit punktuell mit Laser behandelte C3HeB/FeJ Oozyten (Schnittgröße 3 µm) in viruskontaminiertem HTF-Medium fertilisiert ($TCID_{50}=10^8$/ml) und der Einfluss der 10 Waschschritte auf eine mögliche Pathogenübertragung und die daraus resultierende Antikörperproduktion der Ammentiere untersucht (exp. Gruppe 4). In den Serumproben der Ammentiere (Tabelle 22) waren bei keinem von 14 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV festzustellen. Dieses Experiment hat deutlich gezeigt, dass die 3µm breite Schnittgröße in der Zona Pellucida keine Gefahr einer Pathogenübertragung darstellt.

Dieser Aspekt könnte auch rein theoretisch durch eine Volumenberechnung der gesamten Eizelle betrachtet werden. Das Volumen der Eizelle (Durchmesser ca. 90 µm) ergibt einen Wert von 0,00052 µl pro Eizelle (Volumenberechnung der Kugel, $V = 4 \times 3{,}14 \times R^3/3 = 4{,}189 \times R^3$, R = Radius), was bei der Übertragung von 20 Embryonen pro Maus ein Volumen von 0,01 µl bedeutet. Wenn die Eizellen mit einer Viruslösung von $10^8 TCID_{50}$/ml MHV-A59 völlig ausgefüllt wären, würde bei einem Embryotransfer eine maximale Virusdosis $1x10^3 TCID_{50}$/Maus übertragen. Diese Virusdosis kann ausreichend sein, um eine akute Infektion der inokulierten Tiere zu erreichen (Barthold et al. 1986).

Da die Eizellen während der Fertilisation nur 6 Stunden im viruskontaminierten Medium inkubiert werden, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass in dieser Zeit so viele Viren die laserbehandelte Stelle in der Zona Pellucida passieren können. Mateusen et al. 2003 beobachteten z.B. eine Penetration der Zona Pellucida erst nach einer 24-stündiger Inkubation von Schweineembryonen mit Mikrosphären (20 nm), die den Porcine Circovirus Typ 2 simulierten. Eine Penetration der Zona Pellucida mit 200 nm großen Mikrosphären war im Gegensatz dazu nicht möglich. Da MHV Viren einen Durchmesser von ca. 100 nm haben, werden sie möglicherweise die laserbehandelte Stelle in der Zona Pellucida nicht besonders schnell passieren können.

5.3 Teilungsraten und die Anzahl der Nachkommen

Die Pathogenität des MHV wurde bereits mehrfach für verschiedene Virus- und Mausstämme untersucht (Tabelle 6) und anhand der Antikörperproduktion der Mäuse (Nakanaga, 1983), unterschiedlicher Rezeptoren für MHV (Dveksler, 1993; Ohtsuka, 1997; Knobler, 1981), spezifischer Virus-/Makrophagenreaktionen (Bang, 1959) und Virusausscheidung durch Organe (Barthold, 1986; 1987; 1990; Raspa & Scavizzi, 2004) nachgewiesen.

Es liegen aber keine Untersuchungen vor, welche die Empfänglichkeit der Mauskeimzellen gegenüber MHV-Infektion und die Beeinträchtigung der Teilungsraten zum 2-Zell-Embryo durch das Virus untersucht hätten. Aus diesem Grund wurde der Effekt des Virus auf die Teilungsraten der unterschiedlich suszeptiblen Mausstämmen (C3HeB/FeJ und Balb/cAnNCrl) getestet. Der Mausstamm C3HeJ wurde bis jetzt meistens als resistent bzw. semi-resistent (Compton et al. 1993; Bang, 1959) und der Stamm Balb/c als sehr sensitiv gegen MHV Infektionen beschrieben (Compton et al. 1993; Smith et al. 1984; 1992; Barthold et al. 1993; Barthold and Smith, 1987; Barthold et al. 1986, Taguchi, 1997).

Die bei der Kontroll-IVF mit C3HeB/FeJ Oozyten festgestellte Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo lag in unseren Studien bei 51,1 % (Tabelle 19). Diese Teilungsrate liegt bei der IVF mit gefrorenen und aufgetauten Spermaproben des C3HeB/FeJ Stammes in dem von der Literatur beschriebenem Bereich. Marschall et al. 1999 ermittelte z.B. für die Inzucht-

C3HeB/FeJ-IVF (wt x wt) eine Teilungsrate von 49,5 % und bei Verwendung von F1-Männchen, die von ENU-behandelten Männchen abstammten 48,0 %. Bei der Verwendung von Sperma von 10 verschiedenen Mutantenstämmen lag die durchschnittliche Befruchtungsrate sogar bei 52,9 %. Die Befruchtungsraten für einen anderen C3H-Stamm (C3H/HeN) unterschieden sich bei verschiedenen Autoren beträchtlich: Tada et al. 1990 ermittelten für diesen Stamm 35,0 %, Nakagata et al. 1993 dagegen 73,3 %. Dies zeigt, dass auch das Labor, in dem die IVF durchgeführt wird, sowie der Experimentator einen Einfluss auf die IVF-Ergebnisse haben. Wie in den Tabellen 2 und 3 gezeigt, unterscheiden sich auch die verschiedenen Inzuchtstämme sehr stark in ihren Befruchtungsergebnissen in der IVF mit gefrorenem Sperma, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Wurde die IVF in Anwesenheit von MHV-Virus in allen Medien durchgeführt (experimentelle Gruppe 1, Tabelle 19), sank die Befruchtungsrate auf 43,0 % ab. Dieser Abfall war jedoch zumindest bei der verwendeten n-Zahl statistisch nicht signifikant. In den experimentellen Gruppen 2 und 3 wurde in der IVF nur das Fertilisationsmedium mit MHV Viren kontaminiert, KSOM und M2 waren virusfrei. Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss des Virus auf die Teilungsraten von zwei, gegen MHV Infektionen unterschiedlich suszeptiblen Inzuchtstämmen (C3HeB/FeJ und Balb/cAnNCrl) darzustellen (Tabelle 20, 21). In der Kontrollgruppe der C3HeB/FeJ Oozyten lagen die Teilungsraten zum 2-Zellstadium bei 58,5 %, wurden die Oozyten in virushaltigem HTF Medium fertilisiert, war eine statistisch signifikante Erniedrigung der Teilungsrate (39,9 %) zu beobachten ($p<0,001$). Diese geringe Teilungsrate könnte eventuell auf die Anwesenheit des Virus im Fertilisationsmedium zurückzuführen sein.

Es liegen, soweit bekannt, in der Literatur keine Untersuchungen zum Einfluss von MHV-Virus auf IVF-Ergebnisse bei Mäusen vor. Heggie und Gaddis (1979) haben zwar nach einer Exposition der 2-Zell-Embryonen zu Coxsackie Virus B-4 und B-6, Reovirus Typ 2, Influenza Virus Typ A, Maus Zytomegalovirus, Adenovirus Typ 5 und Maus Adenovirus eine Beeinträchtigung der Weiterentwicklung zur Blastozyste festgestellt, der Einfluss von Viren auf die Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo wurde jedoch nicht getestet. Vanroose et al. 1999 untersuchten den Einfluss boviner Viren (Bovines Herpesvirus-1, BHV-1 und Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) auf ein bovines *in vitro* Produktion (IVP) System. Sie ermittelten signifikant niedrigere Teilungs- und

Blastozystenbildungsraten, wenn das Virus in jedem Schritt des IVP-Systems angewendet wurde. Nach einer Fertilisation in virushaltigem Fertilisationsmedium wurde ein signifikanter Abfall der Teilungsraten von durchschnittlich 65 auf ca. 30 % festgestellt. Sie kamen allerdings zu dem Schluss, dass hierfür die Vermehrung des Virus in den Eileiterzellen in dem verwendetem Medium einen Einfluss auf die Weiterentwicklung der Embryonen haben könnte. Solche Zellen wurden in der vorliegender Untersuchung jedoch nicht verwendet.

Die Teilungsraten der Balb/cAnNCrl Oozyten lagen dagegen in Ab- bzw. Anwesenheit von MHV im Fertilisationsmedium in einem ähnlichen Bereich (22,0 bzw. 20,1 %). Die Teilungsrate bei der Kontroll-IVF lag bei diesem Stamm mit 22,0 % in dem von der Literatur beschriebenem Bereich. Tada et al. (1990) ermittelten für die Inzucht-Balb/c-IVF eine Teilungsrate von 18,9 %, Sztein (2000) Teilungsraten von 12 %. Auch hier gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen Autoren, beispielweise Nakagata et al. (1993) beschrieben eine Teilungsrate für Balb/c Oozyten von 46,8 %. Da sich die MHV-Kontamination nicht signifikant auf die Teilungsrate auswirkte, wurde in unseren Experimenten eine höhere Suszeptibilität der Balb/c Oozyten gegenüber einer MHV Infektion ausgeschlossen.

Bei der experimentellen Gruppe 4 ergab sich für die Kontroll-IVF eine Teilungsrate zum 2-Zeller von 73,0 % und für die IVF mit virushaltigem HTF-Medium eine Teilungsrate von 39,9 %. Diesmal wurden aber in beiden Experimenten laserbehandelte Oozyten des C3HeB/FeJ Stammes verwendet. Der Abfall der Teilungsraten war statistisch signifikant ($p<0,001$) und möglicherweise auch auf die Kontamination des Fertilisationsmedium mit MHV zurückzuführen. Wie schon bei der Beschreibung der Ergebnisse aus der experimentellen Gruppe 2 erwähnt, wurden ähnliche Beobachtungen von Vanroose et al. 1999 bei der IVF mit virushaltigem Fertilisationsmedium und intakten Rinderembryonen festgestellt. Da sich die Teilungsrate laserbehandelter Oozyten nach Fertilisation in virushaltigem Fertilisationsmedium viel deutlicher, als bei der IVF mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten, reduzierte, ist zudem in Erwägung zu ziehen, dass es durch die Eröffnung der Zona mittels Laser Mikrodissektion zu einer größeren Auswirkung des Virus auf die Weiterentwicklung der Eizellen kam.

In vorliegender Arbeit wurde auch der Einfluss des Virus auf die Anzahl lebender Nachkommen aus der IVF untersucht. Bei der Kontroll-IVF mit C3HeB/FeJ Oozyten und kryokonservierten Spermaproben desselben Stammes (Tabelle 19) erhielt man aus allen transferierten Embryonen 16,1 % lebende Nachkommen. War allen Medien MHV zugesetzt worden, erhielt man 13,8 % lebende Nachkommen aus den transferierten Embryonen. In der Gruppe 2, bei der eine Viruskontamination nur im HTF-Medium vorlag, entwickelte sich 15,0 % der transferierten Embryonen zu lebenden Nachkommen. Zwischen den Gruppen lag jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Vergleichbar damit ist die Studie von Marschall et al. 1999, in deren Experimenten aus einer Inzucht IVF mit kryokonservierten Spermien 19,1 % Nachkommen resultierten. Obwohl bei C3HeB/FeJ Oozyten ein Einfluss von MHV auf die Entwicklung zum 2-Zell-Embryo aufgrund der vorliegenden Daten nicht auszuschließen ist, scheint es keine weiteren Auswirkungen auf Implantation und Trächtigkeit zu haben. Selbst wenn die Ammenmütter eine MHV-Infektion durchlaufen hatten, konnten keine deutlich negativen Auswirkungen auf die Nachkommenzahl beobachtet werden.

Wurde MHV in einer Inzucht-IVF mit kryokonservierten und aufgetauten Spermaproben des Balb/cAnNCrl Stammes im Fertilisationsmedium eingesetzt (Gruppe 3, Tabelle 21), lag die Prozentzahl der Nachkommen bei 21,1 %. Da nur eine diesbezüglich relevante Studie (Nakagata, 1993), die bei einer Inzucht-IVF des Balb/c Stammes eine Prozentzahl der Nachkommen von 35,1 % ermittelte, vorliegt, ist jedoch nicht unmittelbar daraus zu schließen, dass die geringe Rate der Prozentzahl der Nachkommen in unserer Studie auf die Auswirkung des Virus zurückzuführen ist. Da bei den Balb/c Oozyten die Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo nicht durch MHV beeinflusst war, erscheint ein Einfluss auf die spätere Entwicklung, nachdem MHV bereits weggewaschen war, eher unwahrscheinlich.

Im Fall einer Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida und einer MHV-Kontamination im Fertilisationsmedium (Gruppe 4, Tabelle 22) entwickelten sich 6,8 % aller transferierten Embryonen zu Nachkommen. Das Ergebnis war nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, bei der sich aus lasermanipulierten Oozyten 3,3 % aller transferierten Embryonen zu Nachkommen entwickelten. Die Rate an Nachkommen war jedoch deutlich niedriger als bei der C3HeB/FeJ-IVF ohne manipulierte Oozyten. Dieser

Einfluss scheint daher auf die Lasermikrodissektion zurückzuführen zu sein und wird im Kapitel 5.4 ausführlich besprochen.

5.4 Laser Manipulation der Zona Pellucida

Die eingeschränkte Fruchtbarkeit der Männchen, die u.a. durch die Kryokonservierung der Spermien verursacht wird, kann mittels assistierter Reproduktionstechniken verbessert werden. Die Lasermikrodissektion der Zona Pellucida wird als zuchterhaltende Maßnahme bei Inzucht- bzw. Mausmutantenlinien eingesetzt, deren Spermien nach dem Einfrier-/ Auftauprozess eine reduzierte Fertilitätsfähigkeit beweisen und bei konventioneller in vitro Fertilisation nur eingeschränkt revitalisiert werden können. Bei diesen Mauslinien wird die Zona pellucida mit Hilfe eines Laserstrahls punktuell eröffnet und damit das Eindringen der Spermien in die Eizelle erleichtert.

Die optimale Schnittgröße der Zona Pellucida wurde anhand einer Reihe von Vorversuchen bestimmt und lag bei einer Breite von 3 µm. Nach dieser Manipulation der Zona Pellucida konnte die Teilungsrate der Oozyten zum 2-Zell-Embryo deutlich gesteigert werden. Eine 8 µm breite Schnittgröße in der Zona Pellucida führte zwar im ersten Moment zu einer mal besseren Teilungsrate der Eizellen (100 %), bei den daraus resultierenden 2-Zell-Embryonen wurde aber keine Weiterentwicklung zur kompakten Morula festgestellt. Scanning-elektronenmikroskopische Aufnahmen der laserbehandelten Oozyten mit der 3 und 8 µm breiter Schnittgröße (Abb. 17 und 18) zeigten deutlich das Ausmaß der Laserbehandlung an der Oberfläche der Oozyte. Bei der 8 µm breiter Schnittgröße in der Zona Pellucida erscheint es möglich, dass durch die Laserbehandlung der Eizellen wichtige Strukturen an der Oberfläche der Oozyte beschädigt werden und dadurch keine Weiterentwicklung der Eizellen stattfindet.

Dieses Phänomen wurde von Payne et al. 1995 beschrieben, die anhand der Größe der Behandlung in der Zona Pellucida bei PZD- (Partial Zona Dissection) und ZIP- (Zona Incision by Piezo-Micromanipulator) Techniken eine Beeinträchtigung der Weiterentwicklung von Embryonen festgestellt hatten. Payne et al. beobachteten auch, dass es durch den im weiblichen Genitaltrakt ausgeübten Druck zu einem Verlust von Blastomeren durch eine große Öffnung in der Zona Pellucida kommen kann. Diese

Gefahr war bei 4-Zell-Embryonen größer als bei 8-Zell-Embryonen, da diese schon so g. tight-junctions ausbilden und dadurch kompakter sind. Daher konnten Payne et al. die Ergebnisse des Embryotransfers verbessern, wenn der Transfer von Tag 2 auf 3 post coitum (p.c.) verlegt wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Nichols and Gardner (1989) gemacht, die durch die Zona Pellucida eine Schutzwirkung der Embryonen gegen Muskelkontraktion des Ovidukts beschrieben haben.

Aufgrund der Ergebnisse wurde in vorliegender Arbeit bei weiteren Experimenten ausschließlich mit der 3 µm breiten Schnittgröße gearbeitet (Tabelle 24). Bei der Lasermikrodissektion der Eizellen wurde in der Kontrollgruppe eine Teilungsrate von 50,5 % ermittelt und nach der Laser Mikrodissektion der Eizellen war ein signifikanter Anstieg der Teilungsrate auf 73,0 % zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Laserbehandlung der Eizellen eine signifikante Steigerung der Teilungsrate möglich ist und damit eine größere Anzahl an 2-Zell-Embryonen produziert werden kann. Es ist jedoch zu beachten, dass die Fertilisationsrate bei einer konventionellen IVF mit C3HeB/FeJ Keimzellen deutlich bei ca. 50,0 % liegt (Marschall et a. 1999) und die Fertilisation der Oozyten ohne weiteres funktioniert. In weiterführenden Studien muss die Methode der Lasermikrodissektion bei den Inzuchtstämmen getestet werden, bei denen Fertilisationsprobleme z.B. bedingt durch Kryokonservierung der Spermien bestehen. In bisherigen Studien wurde bei Germond et al. 1995, 1996, Enginsu et al. 1995 und Liow et al. 1996 eine Steigerung der Befruchtungsraten nur bei den hybriden Stämmen (Germond, 1995, 1996: B6D2F1; Enginsu, 1995: CBAB1F1; Liow, 1996: CBA/C57) gezeigt. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf die Inzuchtstämme übertragen lassen, kann nicht generell gesagt werden, und es bedarf weiterer Untersuchungen. Als Kontrolle für die parthenogenetische Weiterentwicklung der Eizellen wurde in vorliegender Arbeit eine in vitro Fertilisation mit laserbehandelten Eizellen durchgeführt, in der keine Spermaproben angewendet wurden. Bei diesem Versuch wurde keine Weiterentwicklung der Eizellen zum 2-Zell-Stadium beobachtet.

Die Trächtigkeitsrate lag in unserer Studie bei der Kontrolle bei 87,5 % und nach der Laser Mikrodissektion der Zona Pellucida war ein deutliches Absinken der Trächtigkeitsrate auf 50,0 % festzustellen. Die Prozentzahl der Nachkommen lag dabei bei der Kontrolle bei 16,4 % und bei den lasermanipulierten Embryonen bei 3,3 % (Tabelle 24). Germond et al. 1995 ermittelten in ihren Experimenten ein Absinken der

Prozentzahl der Nachkommen aus den laserbehandelten Oozyten des hybriden B6D2F1 Stammes (von 48 auf 42 %). Bei den Untersuchungen von Liow (1996) und Germond (1996) wurden bei hybriden Stämmen B6D2F1 und CBA/C57 keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der Nachkommen aus intakten und laserbehandelten Oozyten festgestellt. Es liegen, so weit bekannt, keine Studien vor, welche den Einfluss der Lasermikrodissektion auf die Teilungsraten und die Anzahl der Nachkommen bei den Inzuchtstämmen untersucht hätten. Anhand der Ergebnisse konnte in Erwägung gezogen werden, dass die Embryonen der Inzuchtstämme besonders empfindlich auf den osmotischen und thermischen Stress reagieren und deswegen nach der Lasermikrodissektion der Eizellen schlechtere Prozentzahl der Nachkommen im Vergleich zur hybriden Stämmen erbrachten.

Anhand dieser Studie wurde gezeigt, dass durch die Lasermanipulation der Zona Pellucida in der IVF mit Hybriden- und Inzuchtstämmen das Eindringen der Spermien in die Eizellen tatsächlich erleichtert werden konnte und dadurch die Teilungsrate zum 2-Zell-Embryo gesteigert wurde. Da bis jetzt der Einfluss der Lasermikrodissektion auf die Anzahl der Nachkommen nur bei hybriden Stämmen und in vorliegender Studie bei ausschließlich C3HeB/FeJ Mäusen untersucht wurde, müssen in dieser Richtung weitere Untersuchungen und möglicherweise noch weitere Optimierungen der Methode vorgenommen werden.

5.5 Inokulation der Männchen mit MHV-A59

Da bei der *in vitro* Befruchtung die zu fertilisierenden Eizellen direkt mit dem Nebenhoden-Homogenat inkubiert werden, wurden bei künstlich mit MHV infizierten Männchen Virusbestandteile im Nebenhodenschwanz (aus dem die Spermien für die in vitro Fertilisation gewonnen werden) untersucht und die Übertragung der MHV-Infektion auf die Ammentiere und deren Nachkommen getestet. Um diese Fragestellung zu beantworten wurden MHV-freie Männchen experimentell mit MHV-A59 inokuliert und ein MHV-Nachweisverfahren für kryokonservierte Spermaproben durchgeführt.

Besonders auffällig bei den Untersuchungen der intraperitoneal inokulierten CD-1 Männchen war eine sehr hohe Mortalitätsrate der inokulierten Tiere (Tabelle 25), da nach

der experimentellen Infektion insgesamt 9 von 18 inokulierten Mäuse starben. Diese hohe Mortalitätsrate könnte damit zusammenhängen, dass MHV direkt in die Bauchhöhle inokuliert wurde und die verwendete Virusdosis/ Maus sehr hoch war. Die intraperitoneale Infektion der Mäuse mit MHV gehört nicht zu einer natürlichen Übertragung des Virus und wurde zusammen mit der intrazerebralen Inokulation der Mäuse als eine künstliche Art der Infektion beschrieben (Lavi et al. 1986). Bei diesen beiden Inokulationsarten wurde eine sehr hohe Sensitivität der inokulierten Mäuse nachgewiesen. Lavi et al. 1986 zeigten eine hohe Mortalitätsrate (50-100 %) der intrazerebral inokulierten Tiere bei einer Virusdosis von $3x10^3$ und $3x10^4$ Plague Forming Units (PFU)/ Inokulum und eine 25-100% Mortalitätsrate bei intraperitoneal inokulierten Tiere mit Virusdosis von $3x10^5$ und $3x10^6$ PFU/ Inokulum. Im Vergleich dazu wurde bei einer intranasalen und intragastralen Inokulation der Tiere mit Virusdosis $4x10^5$ und $4x10^6$ PFU/ Inokulum keine Mortalität festgestellt.

Bei den MHV RT-PCR Untersuchungen der Nebenhoden und Spermaproben der Tiere, welche die intraperitoneale Inokulation überlebt hatten, wurde MHV-Virus im Nebenhoden bei allen und in den Spermaproben bei 6 von 9 untersuchten Tieren nachgewiesen (Abb. 19, 20). Bei dem Infektiositätstest der positiv getesteten Spermaproben wurden keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen und nach einer 3-maligen Waschung der Spermaproben wurden positive MHV Banden in allen untersuchten Proben festgestellt (Abb. 21). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Inokulation des Virus in die Bauchhöhle möglicherweise alle Organe ohne eine systematische Infektion der Mäuse kontaminiert werden können und dadurch bei den MHV RT-PCR Untersuchungen positive MHV Banden im Gelbild zu sehen waren. Carthew et al. 1985 haben aufgrund ähnlicher Vermutung in ihrer Studie eine intranasale Inokulation der Mäuse durchgeführt. Die Tatsache, dass bei den positiv getesteten Spermaproben keine infektiösen Viruspartikel gefunden wurden, könnte darauf hinweisen, dass sich die in die Bauchhöhle inokulierten Viruspartikel sehr wahrscheinlich an der Oberfläche der Nebenhoden befanden und bei der Spermagewinnung auf das Nebenhoden-Homogenat übertragen wurden. Aufgrund einer sehr hohen Kontamination der Spermaproben war es auch nicht möglich die toten Viren zu entfernen.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurden in vorliegender Arbeit alle weiteren MHV-Experimente mit intranasal inokulierten Tieren durchgeführt. Da MHV durch die Maus

oronasal aufgenommen und im Kot und Sekret des Nasen-Rachen-Traktes ausgeschieden wird (Barthold, 1986), ist diese Art der Inokulation auch der natürlichen Übertragung des Virus ähnlich.

Es wurde zuerst durch die Antikörperuntersuchungen der intranasal inokulierten CD-1, Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Männchen (Tabelle 28, 29, 30) die Virusdosis/Maus bestimmt ($5x10^6TCID_{50}$), bei der eine Serokonversion der Tiere stattgefunden hatte. Mit dieser Virusdosis/Maus und mit einer Verdünnungsstufe höher ($5x10^7TCID_{50}$), wurden anschließend insgesamt 22 Balb/cAnNCrl und C3HeB/FeJ Männchen im Alter von 12 Wochen inokuliert und am Tag 5 nach der Inokulation die Organe hinsichtlich der Virusausscheidung durch Reproduktionsorgane mittels MHV RT-PCR getestet. Die RT-PCR Untersuchung wurde am Tag 5 nach der Inokulation durchgeführt, da Barthold et al. 1986; Barthold und Smith, 1987, Carthew und Sparrow, 1981; Barthold and Smith, 1992 an diesem Tag den höchsten MHV-Titer in untersuchten Organen beschrieben haben und diesen Tag als eine akute Phase der MHV-Infektion bezeichneten. Für die Inokulation der Männchen wurden 12 Wochen alte Tiere verwendet, da Männchen in diesem Alter besonders geeignet für die Kryokonservierung der Spermaproben sind.

Bei den Untersuchungen der Geschlechtsorgane- und Spermaproben intranasal inokulierter Männchen (12 Wochen alt) wurden insgesamt 3 von 22 inokulierten Tieren MHV-positiv getestet (Abb. 22 und 23). Diese Erkenntnis zeigt einen neuen Aspekt der MHV-Infektion der Mäuse, da bis jetzt nur junge Tiere als empfänglich gegenüber der Infektion beschrieben wurden. Barthold und Smith (1987) zeigten z.B., dass eine Woche nach intranasaler Inokulation der 7 Tage alten Balb/cByJ Mäuse MHV-JHM Viren im Hoden nachweisbar waren. Untersuchungen der Hoden zu einem späterem Zeitpunkt haben keine positiven MHV Nachweise gezeigt. Der Virusnachweis wurde jedoch in dieser Studie mit Hilfe immunohistochemischen Nachweismethoden durchgeführt und könnte im Vergleich zur PCR über eine andere Sensitivität verfügen. Raspa und Scavizzi (2004) haben eine Nachweisgrenze bis zu 6 Wochen nach einer natürlicher Infektion mit *MHV spp* im Hoden und Nebenhoden von CD-1 Männchen gezeigt. In dieser Studie wurde jedoch nicht bestimmt, wann die Tiere tatsächlich mit MHV infiziert hatten. Da in unserer Studie die Serumproben der MHV-positiven Männchen sehr starke Banden in der PCR-Analyse zeigten, war zu erwägen, dass die Kontamination der Spermaproben und anderer Geschlechtsorgane der Tiere auf eine akute Virämiephase zurückzuführen war.

Da die Spermaproben aus Nebenhoden-Homogenat entnommen wurden, konnten möglicherweise Viren aus den Blutgefäßen des Nebenhodens die Spermaproben kontaminieren. Die Kontamination der Spermaproben war jedoch zu gering, um ein Risiko einer Pathogenübertragung in dem IVF-ET System darzustellen. Wurden MHV-positive Spermaproben (Balb/c) in eine *in vitro* Fertilisation eingesetzt, konnte gezeigt werden, dass mit entsprechendem Waschprotokoll ebenfalls kein Risiko eines Pathogentransfers entstand.
Da zwei positive MHV-Befunde im Hoden, Nebenhoden und Spermaproben bei 12 Wochen alten C3HeB/FeJ Männchen ermittelt wurden, ist die in der Literatur mehrfach festgestellte Resistenz bzw. Semiresistenz des C3H-Stammes gegen MHV Infektion (Bang, 1959; Hirano et al. 1981; Compton et al. 1993; Woyciechowska et al. 1984; Barthold et al. 1986) in Frage gestellt. Um konkrete Aussage über die Suszeptibilität von C3HeB/FeJ Mäusen verschiedenen Alters machen zu können, müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Alle Ergebnisse, die in dieser Arbeit dargestellt wurden, weisen eindeutig darauf hin, dass durch die Kryoarchivierung der Mausmutantenlinien und Revitalisierung mittels künstlicher Befruchtung und Embryotransfer keine MHV-Übertragung auf die Ammentiere und deren Nachkommen möglich ist. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf andere Pathogene übertragen lassen, kann nicht generell gesagt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Die Kryokonservierung von Mausmutantenlinien und die Produktion von spezifisch-pathogen-freien (SPF) Mäusen haben eine besondere Bedeutung in der biomedizinischen Forschung. Revitalisierungsmethoden wie *in vitro* Fertilisation und Embryotransfer können bei Bedarf mittels assistierter Reproduktionstechniken (wie z.B. Lasermikrodissektion der Zona Pellucida, ICSI) optimiert werden. Da eine intakte Zona Pellucida eine natürliche Barriere für Erreger darstellt, stellt sich die Frage, ob das Infektionsrisiko einer Pathogenübertragung durch die Lasermikrodissektion der Zona Pellucida erhöht wird. Hierzu wurde ein PALM Laser-Kombisystem benutzt.

Die Zuverlässigkeit eines standardisierten Waschverfahrens bei der in vitro Produktion von Embryonen wurde am Beispiel des Maus Hepatitis Virus (MHV), eines der wichtigsten viralen Pathogene in heutigen Mauskolonien, untersucht. Das Risiko einer Pathogenübertragung durch IVF mit intakten und laserbehandelten Oozyten wurde in vier experimentellen Gruppen untersucht:

Gruppe 1: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten, wobei das in der IVF verwendete Fertilisations- (HTF), Kultur- (KSOM) und Transfermedium (M2) virushaltig war,

Gruppe 2: Experiment mit intakten C3HeB/FeJ Oozyten, wobei nur das in der IVF verwendete Fertilisationsmedium (HTF) virushaltig war, das Kultur- (KSOM) und Transfermedium (M2) waren dagegen virusfrei,

Gruppe 3: Experiment mit intakten Balb/cAnNCrl Oozyten, wobei nur das in der IVF verwendete Fertilisationsmedium (HTF) virushaltig war, das Kultur- (KSOM) und Transfermedium (M2) waren dagegen virusfrei,

Gruppe 4: Experiment mit laserbehandelten C3HeB/FeJ Oozyten, wobei nur das in der IVF verwendete Fertilisationsmedium (HTF) virushaltig war, das Kultur- (KSOM) und Transfermedium (M2) waren dagegen virusfrei.

Die aus der IVF hervorgehenden Embryonen wurden in pathogenfreie, scheinträchtige Ammentiere transferiert und die Serumproben der Ammentieren auf Antikörper gegen

MHV mittels ELISA untersucht. Alle verwendeten Medien wurden auf Vorhandensein und Infektiosität von MHV getestet.

Während bei den Embryonenempfängern aus der experimentellen Gruppe 1 bei 10 von 14 untersuchten Tieren Antikörper gegen MHV nachgewiesen wurden, wiesen die Embryonenempfänger aus den Exp. Gruppen 2-4 keine Antikörper gegen MHV auf.

Das Ergebnis zeigt, dass ein standardisiertes Waschverfahren bei der IVF, auch im Fall einer Lasermikrodissektion der Zona Pellucida, eine Übertragung von MHV verhindert und zuverlässig für die Sanierung von Mausbeständen bei MHV-Infektionen angewendet werden kann.

Da bei *in vitro* Befruchtung die zu fertilisierenden Eizellen direkt mit dem Nebenhoden-Homogenat inkubiert werden, wurden in dieser Arbeit auch Spermaproben MHV-inokulierter Männchen auf die Präsenz von Virus untersucht.

C3HeB/FeJ und Balb/cAnNCrl Männchen wurden im Alter von 12 Wochen i.n. mit MHV-A59 inokuliert. Am Tag 5 nach der Inokulation wurden Virusbestandteile in den Nebenhodenschwanz- und Spermaproben bei 3 von 11 mit Virusdosis $5x10^7$ $TCID_{50}$/ Maus inokulierten Männchen mittels MHV RT-PCR nachgewiesen. Bei den bislang mit positiv getesteten Spermaproben durchgeführten *in vitro* Fertilisationen war jedoch keine Kontamination der Fertilisations-, Kultur- und Embryotransfermedien festzustellen.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass das IVF-ET System eine zuverlässige Kontrolle über die Pathogenübertragung auf die Ammentiere und Mauszucht darstellt.

7 Summary

Risk assessment of Mouse Hepatitis Virus (MHV) infection by the use of crypreserved spermatozoa in the *in vitro* fertilization and embryo transfer with intact and laser microdissected oocytes.

Cryobanking of mouse mutants and allocation of specific pathogen free (SPF) animals is of particular importance for the scientific community. Routinely used rederivation methods have to be enhanced by new assisted reproductive technologies (e.g. Zona dissection, ICSI) but these methods need to be investigated with regard to possible pathogen transmission.

The most common viral pathogen in mouse facilities, the Mouse Hepatitis Virus (MHV), was chosen to ensure a well-defined washing procedure used for in-vitro fertilization (IVF) and to estimate the risk increase by zona microdissection using a PALM microbeam laser system. Zona pellucida (ZP) intact and laser dissected oocytes used for the IVF were scheduled in four experimental groups:

1) intact C3HeB/FeJ oocytes in IVF were exposed to virus during fertilization and culture without washing procedure
2) intact C3HeB/FeJ oocytes in IVF were exposed to virus during fertilization and cultured after washing procedure
3) intact BALB/cAnNCrl oocytes in IVF were exposed to virus during fertilization and cultured after washing procedure
4) laser microdissected C3HeB/FeJ oocytes in IVF were exposed to virus during fertilization and cultured after washing procedure

Resulting embryos were transferred to SPF recipients, sera from recipients and offspring were tested for MHV-antibodies using ELISA. All used media were tested for presence and infectivity of MHV.

In experiment 1 nearly all recipients showed immune response whereas in experiment 2, 3 and 4 neither in recipients nor in offspring antibodies against MHV could be detected.

Appropriate washing procedures applied in IVF protect against transmission of MHV even if the zona pellucida – the shield of the embryo – is disrupted.

Because superovulated oocytes are fertilized directly by preincubated cauda epididymis sperm in vitro, our study defined also presence of MHV in sperm samples of mouse males artificially inoculated with MHV.

The mouse males (strain C3HeB/FeJ and Balb/cAnNCrl) were inoculated intranasally with MHV-A59. Sperm samples and other organs were tested by RT-PCR on day 5 after inoculation. Three of 11 with the highest virusdose/mouse inoculated males showed MHV contamination in sperm suspension, but the risk of MHV infection using IVF-ET system was not detected.

In conclusion our study showed, that the IVF-ET system is an effective model to control disease and breeding in animals.

8 Literaturverzeichnis

An, T. Z., M. Iwakiri, et al. (2000). "Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa." Cryobiology **40**(3): 237-49.

Armstrong, J., H. Niemann, et al. (1984). "Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus." Nature **308**(5961): 751-2.

Auerbach, A. B., R. Norinsky, et al. (2003). "Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production." Transgenic Res **12**(1): 59-69.

Baker, H. J. (1988). "Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer." Lab Anim Sci **38**(6): 661-2.

Bang, F. B. (1978). "Genetics of resistance of animals to viruses: I. Introduction and studies in mice." Adv Virus Res **23**: 269-348.

Bang, F. B. (1981). "The use of a genetically incompatible combination of host and virus (MHV) for the study of mechanisms of host resistance." Adv Exp Med Biol **142**: 359-73.

Bang, F. B. and A. Warwick (1959). "Macrophages and mouse hepatitis." Virology **9**: 715-7.

Barlow, P., P. Van Der Zwalmen, et al. (1991). "Improvement of fertilizing performance by normal and abnormal mouse semen after zona opening of mature oocytes." Mol Reprod Dev **30**(4): 385-9.

Barthold, S. W. (1987). "Host age and genotypic effects on enterotropic mouse hepatitis virus infection." Lab Anim Sci **37**(1): 36-40.

Barthold, S. W. (1988). "Olfactory neural pathway in mouse hepatitis virus nasoencephalitis." Acta Neuropathol (Berl) **76**(5): 502-6.

Barthold, S. W. and D. S. Beck (1987). "Intranasal challenge immunity of mice to antigenically homologous and heterologous strains of mouse hepatitis virus." Adv Exp Med Biol **218**: 449-50.

Barthold, S. W., D. S. Beck, et al. (1986). "Mouse hepatitis virus nasoencephalopathy is dependent upon virus strain and host genotype." Arch Virol **91**(3-4): 247-56.

Barthold, S. W., D. S. Beck, et al. (1988). "Mouse hepatitis virus and host determinants of vertical transmission and maternally-derived passive immunity in mice." Arch Virol **100**(3-4): 171-83.

Barthold, S. W., D. S. Beck, et al. (1993). "Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease." Lab Anim Sci **43**(4): 276-84.

Barthold, S. W., M. S. de Souza, et al. (1990). "Susceptibility of laboratory mice to intranasal and contact infection with coronaviruses of other species." Lab Anim Sci **40**(5): 481-5.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1983). "Mouse hepatitis virus S in weanling Swiss mice following intranasal inoculation." Lab Anim Sci **33**(4): 355-60.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1984). "Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice." Arch Virol **81**(1-2): 103-12.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1987). "Response of genetically susceptible and resistant mice to intranasal inoculation with mouse hepatitis virus JHM." Virus Res **7**(3): 225-39.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1989). "Duration of challenge immunity to coronavirus JHM in mice." Arch Virol **107**(3-4): 171-7.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1989). "Virus strain specificity of challenge immunity to coronavirus." Arch Virol **104**(3-4): 187-96.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1990). "Duration of mouse hepatitis virus infection: studies in immunocompetent and chemically immunosuppressed mice." Lab Anim Sci **40**(2): 133-7.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1992). "Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice." Arch Virol **122**(1-2): 35-44.

Barthold, S. W. and A. L. Smith (1993). "Role of host age and genotype in murine enterotropic coronavirus infection." Adv Exp Med Biol **342**: 371-6.

Barthold, S. W., A. L. Smith, et al. (1993). "Infectivity, disease patterns, and serologic profiles of reovirus serotypes 1, 2, and 3 in infant and weanling mice." Lab Anim Sci **43**(5): 425-30.

Barthold, S. W., A. L. Smith, et al. (1982). "Epizootic coronaviral typhlocolitis in suckling mice." Lab Anim Sci **32**(4): 376-83.

Barthold, S. W., A. L. Smith, et al. (1985). "Enterotropic mouse hepatitis virus infection in nude mice." Lab Anim Sci **35**(6): 613-8.

Baruffi, R. L., A. L. Mauri, et al. (2000). "Zona thinning with noncontact diode laser in patients aged < or = 37 years with no previous failure of implantation: a prospective randomized study." J Assist Reprod Genet **17**(10): 557-60.

Bath, M. L. (2003). "Simple and Efficient In Vitro Fertilization with Cryopreserved C57BL/6J Mouse Sperm." Biol Reprod **68**(1): 19-23.

Biggers, D. C., L. M. Kraft, et al. (1964). "Lethal Intestinal Virus Infection of Mice (Livim). An Important New Model for Study of the Response of the Intestinal Mucosa to Injury." Am J Pathol **45**: 413-22.

Biggers, J. D., B. D. Moore, et al. (1965). "Development of mouse embryos in vivo after cultivation from two-cell ova to blastocysts in vitro." Nature **206**(985): 734-5.

Blake, D. A., A. S. Forsberg, et al. (2001). "Laser zona pellucida thinning--an alternative approach to assisted hatching." Hum Reprod **16**(9): 1959-64.

Blanchet, G. B., J. B. Russell, et al. (1992). "Laser micromanipulation in the mouse embryo: a novel approach to zona drilling." Fertil Steril **57**(6): 1337-41.

Boorman, G. A., M. I. Luster, et al. (1982). "Peritoneal macrophage alterations caused by naturally occurring mouse hepatitis virus." Am J Pathol **106**(1): 110-7.

Boursnell, M. E., T. D. Brown, et al. (1987). "The complete nucleotide sequence of avian infectious bronchitis virus: analysis of the polymerase-coding region." Adv Exp Med Biol **218**: 15-29.

Boursnell, M. E., T. D. Brown, et al. (1987). "Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus." J Gen Virol **68 (Pt 1)**: 57-77.

Brenner, S. (1974). "The genetics of Caenorhabditis elegans." Genetics **77**(1): 71-94.

Brown, R., A. Stretch, et al. (1986). "The nature of mutants induced by ionizing radiation in cultured hamster cells. II. Antigenic response and reverse mutation of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or ethyl methanesulphonate." Mutat Res **160**(2): 111-20.

Brown, S. D. (1998). "Mouse models of genetic disease: new approaches, new paradigms." J Inherit Metab Dis **21**(5): 532-9.

Brown, S. D. and R. Balling (2001). "Systematic approaches to mouse mutagenesis." Curr Opin Genet Dev **11**(3): 268-73.

Brown, S. D. and R. E. Hardisty (2003). "Mutagenesis strategies for identifying novel loci associated with disease phenotypes." Semin Cell Dev Biol **14**(1): 19-24.

Brown, S. D. and P. M. Nolan (1998). "Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function." Hum Mol Genet **7**(10): 1627-33.

Bruce, H. M., R. B. Land, et al. (1968). "Inhibition of pregnancy-block in mice by handling." J Reprod Fertil **15**(2): 289-94.

Carthew, P. (1978). "Immunoperoxidase technique for the rapid differentiation of murine enteric viruses in tissue culture." Vet Rec **103**(9): 188.

Carthew, P. (1978). "Peroxidase-labeled antibody technique for rapid detection of mouse hepatitis virus in cases of natural outbreaks." J Infect Dis **138**(3): 410-3.

Carthew, P. (1978). "Serological examination." Vet Rec **102**(8): 179.

Carthew, P. and S. Sparrow (1981). "Murine coronaviruses: the histopathology of disease induced by intranasal inoculation." Res Vet Sci **30**(3): 270-3.

Carthew, P., S. Sparrow, et al. (1978). "Incidence of natural virus infections of laboratory animals 1976--1977." Lab Anim **12**(4): 245-6.

Carthew, P., M. J. Wood, et al. (1983). "Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer." J Reprod Fertil **69**(1): 253-7.

Carthew, P., M. J. Wood, et al. (1985). "Pathogenicity of mouse hepatitis virus for preimplantation mouse embryos." J Reprod Fertil **73**(1): 207-13.

Casebolt, D. B., B. Qian, et al. (1997). "Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction." Lab Anim Sci **47**(1): 6-10.

Casebolt, D. B., D. M. Spalding, et al. (1987). "Suppression of immune response induction in Peyer's patch lymphoid cells from mice infected with mouse hepatitis virus." Cell Immunol **109**(1): 97-103.

Casebolt, D. B. and C. B. Stephensen (1992). "Monoclonal antibody solution hybridization assay for detection of mouse hepatitis virus infection." J Clin Microbiol **30**(3): 608-12.

Clement-Sengewald, A., T. Buchholz, et al. (2000). "Laser microdissection as a new approach to prefertilization genetic diagnosis." Pathobiology **68**(4-5): 232-6.

Clement-Sengewald, A., T. Buchholz, et al. (2002). "Noncontact, laser-mediated extraction of polar bodies for prefertilization genetic diagnosis." J Assist Reprod Genet **19**(4): 183-94.

Clement-Sengewald, A., K. Schutze, et al. (1996). "Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers." J Assist Reprod Genet **13**(3): 259-65.

Coghill, E. L., A. Hugill, et al. (2002). "A gene-driven approach to the identification of ENU mutants in the mouse." Nat Genet **30**(3): 255-6.

Cohen, J. and H. W. Jones, Jr. (2001). "How to avoid multiple pregnancies in assistive reproductive technologies." Semin Reprod Med **19**(3): 269-78.

Compton, S. R., S. W. Barthold, et al. (1993). "The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses." Lab Anim Sci **43**(1): 15-28.

Compton, S. R., A. L. Smith, et al. (1999). "Comparison of the pathogenicity in rats of rat coronaviruses of different neutralization groups." Lab Anim Sci **49**(5): 514-8.

Couronne, O., A. Poliakov, et al. (2003). "Strategies and tools for whole-genome alignments." Genome Res **13**(1): 73-80.

Cox, R. D. and S. D. Brown (2003). "Rodent models of genetic disease." Curr Opin Genet Dev **13**(3): 278-83.

Critser, J. K. and L. E. Mobraaten (2000). "Cryopreservation of murine spermatozoa." Ilar J **41**(4): 197-206.

Cummins, J. M., W. R. Edirisinghe, et al. (1989). "Ultrastructural observations on gamete interactions using micromanipulated mouse oocytes." Gamete Res **24**(4): 461-9.

Curtin, J. A., E. Quint, et al. (2003). "Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse." Curr Biol **13**(13): 1129-33.

Depypere, H. T., K. J. McLaughlin, et al. (1988). "Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse." J Reprod Fertil **84**(1): 205-11.

Dove, W. F. (1987). "Molecular genetics of Mus musculus: point mutagenesis and millimorgans." Genetics **116**(1): 5-8.

Driever, W. and M. C. Fishman (1996). "The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos." J Clin Invest **97**(8): 1788-94.

Driever, W., L. Solnica-Krezel, et al. (1996). "A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish." Development **123**: 37-46.

Dveksler, G. S., A. A. Basile, et al. (1993). "Expression of MHV-A59 receptor glycoproteins in susceptible and resistant strains of mice." Adv Exp Med Biol **342**: 267-72.

Dveksler, G. S., S. E. Gagneten, et al. (1996). "Expression of the recombinant anchorless N-terminal domain of mouse hepatitis virus (MHV) receptor makes hamster of human cells susceptible to MHV infection." J Virol **70**(6): 4142-5.

Dveksler, G. S., M. N. Pensiero, et al. (1991). "Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV." J Virol **65**(12): 6881-91.

Dveksler, G. S., M. N. Pensiero, et al. (1993). "Mouse hepatitis virus strain A59 and blocking antireceptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1716-20.

Edirisinghe, W. R., H. Y. Law, et al. (1986). "Superovulation of mice with human menopausal gonadotropin or pure follicle-stimulating hormone in combination with human chorionic gonadotropin and the effects of oocyte aging on in vitro fertilization." J In Vitro Fert Embryo Transf **3**(5): 314-8.

Edirisinghe, W. R., R. G. Wales, et al. (1991). "Assisted fertilization of mouse oocytes and preliminary results for human oocytes using zona drilling." J In Vitro Fert Embryo Transf **8**(1): 48-55.

Enginsu, M. E., K. Schutze, et al. (1995). "Micromanipulation of mouse gametes with laser microbeam and optical tweezers." Hum Reprod **10**(7): 1761-4.

Evans, M. J., M. B. Carlton, et al. (1997). "Gene trapping and functional genomics." Trends Genet **13**(9): 370-4.

Favor, J. (1990). "Multiple endpoint mutational analysis in the mouse." Prog Clin Biol Res **340C**: 115-24.

Favor, J., A. Neuhauser-Klaus, et al. (1990). "The frequency of dominant cataract and recessive specific-locus mutations and mutation mosaics in F1 mice derived from post-spermatogonial treatment with ethylnitrosourea." Mutat Res **229**(2): 105-14.

Favor, J. and W. Pretsch (1990). "Genetic localization and phenotypic expression of X-linked cataract (Xcat) in Mus musculus." Genet Res **56**(2-3): 157-62.

Favor, J., M. Sund, et al. (1990). "A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse." Mutat Res **231**(1): 47-54.

Fishel, S., S. Antinori, et al. (1991). "Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI)." Hum Reprod **6**(1): 124-30.

Fleming, J. O., M. D. Trousdale, et al. (1987). "Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease." Microb Pathog **3**(1): 9-20.

Gadella, B. M., F. M. Flesch, et al. (1999). "Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization." Vet Q **21**(4): 142-6.

Garlinghouse, L. E., Jr. and A. L. Smith (1985). "Responses of mice susceptible or resistant to lethal infection with mouse hepatitis virus, strain JHM, after exposure by a natural route." Lab Anim Sci **35**(5): 469-72.

Garlinghouse, L. E., Jr., A. L. Smith, et al. (1984). "The biological relationship of mouse hepatitis virus (MHV) strains and interferon: in vitro induction and sensitivities." Arch Virol **82**(1-2): 19-29.

Germond, M., D. Nocera, et al. (1995). "Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure." Fertil Steril **64**(3): 604-11.

Germond, M., D. Nocera, et al. (1996). "Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 microm diode laser beam." Hum Reprod **11**(5): 1043-8.

Glenister, P. H. and C. E. Thornton (2000). "Cryoconservation--archiving for the future." Mamm Genome **11**(7): 565-71.

Godfraind, C. and J. P. Coutelier (1998). "Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression." Histol Histopathol **13**(1): 181-99.

Gordon, J. W. and B. E. Talansky (1986). "Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia." J Exp Zool **239**(3): 347-54.

Gordts, S., M. Vercruyssen, et al. (1995). "Recent developments in assisted fertilization." Hum Reprod **10 Suppl 1**: 107-14.

Goto, K., K. Muguruma, et al. (2002). "Effects of cryopreservation of mouse embryos and in vitro fertilization on genotypic frequencies in colonies." Mol Reprod Dev **62**(3): 307-11.

Gwatkin, R. B. (1993). "Micromanipulation-assisted fertilization." Mol Reprod Dev **36**(2): 285-7.

Haffter, P., M. Granato, et al. (1996). "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio." Development **123**: 1-36.

Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard (1996). "Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish." Int J Dev Biol **40**(1): 221-7.

Hardisty, R. E., P. Mburu, et al. (1999). "ENU mutagenesis and the search for deafness genes." Br J Audiol **33**(5): 279-83.

Haring, J. and S. Perlman (2001). "Mouse hepatitis virus." Curr Opin Microbiol **4**(4): 462-6.

Heggie, A. D. and L. Gaddis (1979). "Effects of viral exposure of the two-cell mouse embryo on cleavage and blastocyst formation in vitro." Pediatr Res **13**(8): 937-41.

Hill, A. C. and G. P. Stalley (1991). "Mycoplasma pulmonis infection with regard to embryo freezing and hysterectomy derivation." Lab Anim Sci **41**(6): 563-6.

Ho, Y., K. Wigglesworth, et al. (1995). "Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression." Mol Reprod Dev **41**(2): 232-8.

Hollis, A., S. Rastegar, et al. (1997). "Zona pellucida microdrilling with a 1.48 microns diode laser." IEEE Eng Med Biol Mag **16**(3): 43-7.

Holmes, K. V., R. M. Welsh, et al. (1986). "Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected target cells. I. Correlation of cytotoxicity with virus binding to leukocytes." J Immunol **136**(4): 1446-53.

Holmes, K. V. and R. K. Williams (1990). "Background paper: functions of coronavirus glycoproteins." Adv Exp Med Biol **276**: 5-7.

Homberger, F. R. (1992). "Maternally-derived passive immunity to enterotropic mouse hepatitis virus." Arch Virol **122**(1-2): 133-41.

Homberger, F. R. (1996). "[Mouse hepatitis virus]." Schweiz Arch Tierheilkd **138**(4): 183-8.

Homberger, F. R. (1997). "Enterotropic mouse hepatitis virus." Lab Anim **31**(2): 97-115.

Homberger, F. R. and S. W. Barthold (1992). "Passively acquired challenge immunity to enterotropic coronavirus in mice." Arch Virol **126**(1-4): 35-43.

Homberger, F. R., S. W. Barthold, et al. (1992). "Duration and strain-specificity of immunity to enterotropic mouse hepatitis virus." Lab Anim Sci **42**(4): 347-51.

Homberger, F. R., A. L. Smith, et al. (1991). "Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **29**(12): 2789-93.

Homberger, F. R. and P. E. Thomann (1994). "Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions." Lab Anim **28**(2): 113-20.

Homberger, F. R., L. Zhang, et al. (1998). "Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies." Lab Anim Sci **48**(1): 50-4.

Hough, T. A., P. M. Nolan, et al. (2002). "Novel phenotypes identified by plasma biochemical screening in the mouse." Mamm Genome **13**(10): 595-602.

Hrabe de Angelis, M. and R. Balling (1998). "Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics." Mutat Res **400**(1-2): 25-32.

Hrabe de Angelis, M. H., H. Flaswinkel, et al. (2000). "Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis." Nat Genet **25**(4): 444-7.

Isaacs, A. M., K. E. Davies, et al. (2000). "Identification of two new Pmp22 mouse mutants using large-scale mutagenesis and a novel rapid mapping strategy." Hum Mol Genet **9**(12): 1865-71.

Ishida, T. and K. Fujiwara (1982). "Maternally derived immune resistance to fatal diarrhea in infant mice due to mouse hepatitis virus." Jpn J Exp Med **52**(5): 231-5.

Jacoby, D. R., L. B. Olding, et al. (1984). "Immunologic regulation of fetal-maternal balance." Adv Immunol **35**: 157-208.

Kanter, M., C. Yildiz, et al. (2004). "Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG." Theriogenology **61**(2-3): 393-8.

Katami, K., F. Taguchi, et al. (1978). "Vertical transmission of mouse hepatitis virus infection in mice." Jpn J Exp Med **48**(6): 481-90.

Katkov, II, N. Katkova, et al. (1998). "Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations." Cryobiology **37**(4): 325-38.

Katkov, II and P. Mazur (1998). "Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa." J Androl **19**(2): 232-41.

Kawase, Y., Y. Aoki, et al. (2004). "Comparison of fertility between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization with a partial zona pellucida incision by using a piezo-micromanipulator in cryopreserved inbred mouse spermatozoa." Contemp Top Lab Anim Sci **43**(1): 21-5.

Kawase, Y., T. Iwata, et al. (2001). "Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice." Mol Reprod Dev **60**(1): 74-8.

Kawase, Y., T. Iwata, et al. (2002). "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 **66**(2): 381-5.

Kiernan, A. E., A. Erven, et al. (2002). "ENU mutagenesis reveals a highly mutable locus on mouse Chromosome 4 that affects ear morphogenesis." Mamm Genome **13**(3): 142-8.

Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995). "Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei." Biol Reprod **53**(4): 855-62.

Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995). "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse." Biol Reprod **52**(4): 709-20.

Kimura, Y. and R. Yanagimachi (1995). "Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring." Development **121**(8): 2397-405.

Knobler, R. L., M. Dubois-Dalcq, et al. (1981). "Selective localization of wild type and mutant mouse hepatitis virus (JHM strain) antigens in CNS tissue by fluorescence, light and electron microscopy." J Neuroimmunol **1**(1): 81-92.

Knobler, R. L., M. V. Haspel, et al. (1981). "Mouse hepatitis virus type 4 (JHM strains). induced fatal central nervous system disease. I. genetic control and murine neuron as the susceptible site of disease." J Exp Med **153**(4): 832-43.

Knobler, R. L., B. A. Taylor, et al. (1984). "Host genetic control of mouse hepatitis virus type-4 (JHM strain) replication. II. The gene locus for susceptibility is linked to the Svp-2 locus on mouse chromosome 7." Exp Clin Immunogenet **1**(4): 217-22.

Kraft, V., A. A. Deeny, et al. (1994). "Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies." Lab Anim **28**: 1-12.

Kyuwa, S. (1997). "Replication of murine coronaviruses in mouse embryonic stem cell lines in vitro." Exp Anim **46**(4): 311-3.

Kyuwa, S., S. Kawamura, et al. (2003). "Differences between BALB/c and C57BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture." Exp Anim **52**(1): 81-4.

Kyuwa, S., K. Ohsawa, et al. (2000). "Replication of enterotropic and polytropic murine coronaviruses in cultured cell lines of mouse origin." Exp Anim **49**(4): 251-7.

Lai, M. M. (1990). "Coronavirus: organization, replication and expression of genome." Annu Rev Microbiol **44**: 303-33.

Lai, M. M., R. S. Baric, et al. (1985). "Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses." J Virol **56**(2): 449-56.

Lai, M. M., P. R. Brayton, et al. (1981). "Mouse hepatitis virus A59: mRNA structure and genetic localization of the sequence divergence from hepatotropic strain MHV-3." J Virol **39**(3): 823-34.

Lai, M. M., C. D. Patton, et al. (1983). "Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus." J Virol **46**(3): 1027-33.

Lai, M. M., C. D. Patton, et al. (1982). "Further characterization of mRNA's of mouse hepatitis virus: presence of common 5'-end nucleotides." J Virol **41**(2): 557-65.

Lai, M. M., C. D. Patton, et al. (1982). "Replication of mouse hepatitis virus: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length." J Virol **44**(2): 487-92.

Lai, M. M. and S. A. Stohlman (1978). "RNA of mouse hepatitis virus." J Virol **26**(2): 236-42.

Lamontagne, L., S. Lusignan, et al. (2001). "Recovery from mouse hepatitis virus infection depends on recruitment of CD8(+) cells rather than activation of intrahepatic CD4(+)alphabeta(-)TCR(inter) or NK-T cells." Clin Immunol **101**(3): 345-56.

Laurema, A., A. Heikkila, et al. (2003). "Transfection of oocytes and other types of ovarian cells in rabbits after direct injection into uterine arteries of adenoviruses and plasmid/liposomes." Gene Ther **10**(7): 580-4.

Lavelle, G. C. and F. B. Bang (1973). "Differential growth of MHV (PRI) and MHV (C3H) in genetically resistant C3H mice rendered susceptible by eperythrozoon infection." Arch Gesamte Virusforsch **41**(3): 175-84.

Lavi, E., D. H. Gilden, et al. (1984). "Detection of MHV-A59 RNA by in situ hybridization." Adv Exp Med Biol **173**: 247-57.

Lavi, E., D. H. Gilden, et al. (1984). "MHV-A59 pathogenesis in mice." Adv Exp Med Biol **173**: 237-45.

Lavi, E., D. H. Gilden, et al. (1986). "The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation." Lab Anim Sci **36**(2): 130-5.

Lavi, E., D. H. Gilden, et al. (1984). "Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus." Neurology **34**(5): 597-603.

Lavi, E., A. Suzumura, et al. (1987). "Coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 causes a persistent, productive infection in primary glial cell cultures." Microb Pathog **3**(2): 79-86.

Lavi, E., Q. Wang, et al. (1995). "Fragmentation and rearrangement of the Golgi apparatus during MHV infection of L-2 cells." Adv Exp Med Biol **380**: 103-4.

Lavi, E., Q. Wang, et al. (1996). "Syncytia formation induced by coronavirus infection is associated with fragmentation and rearrangement of the Golgi apparatus." Virology **221**(2): 325-34.

Lawitts, J. A. and J. D. Biggers (1991). "Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods." J Reprod Fertil **91**(2): 543-56.

Lawitts, J. A. and J. D. Biggers (1993). "Culture of preimplantation embryos." Methods Enzymol **225**: 153-64.

Lecomte, J., V. Cainelli-Gebara, et al. (1987). "Protection from mouse hepatitis virus type 3-induced acute disease by an anti-nucleoprotein monoclonal antibody. Brief report." Arch Virol **97**(1-2): 123-30.

Lee, H. J., C. K. Shieh, et al. (1991). "The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase." Virology **180**(2): 567-82.

Leibo, S. P. (1999). "Sperm freezing--species specific?" Fertil Steril **72**(4): 747-8.

Leibo, S. P., F. J. DeMayo, et al. (1991). "Production of transgenic mice from cryopreserved fertilized ova." Mol Reprod Dev **30**(4): 313-9.

Leibo, S. P., T. A. Giambernardi, et al. (1990). "The efficacy of cryopreserved hamster ova in the sperm penetration assay." Fertil Steril **53**(5): 906-12.

Leibo, S. P. and N. Songsasen (2002). "Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species." Theriogenology **57**(1): 303-26.

Levy, G. A., J. L. Leibowitz, et al. (1981). "Induction of monocyte procoagulant activity by murine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice." J Exp Med **154**(4): 1150-63.

Liow, S. L., A. Bongso, et al. (1996). "Fertilization, embryonic development and implantation of mouse oocytes with one or two laser-drilled holes in the zona, and inseminated at different sperm concentrations." Hum Reprod **11**(6): 1273-80.

Lipman, N. S., C. E. Newcomer, et al. (1987). "Rederivation of MHV and MEV antibody positive mice by cross-fostering and use of the microisolator caging system." Lab Anim Sci **37**(2): 195-9.

Lockett, T. J. and M. Ashburner (1989). "Temporal and spatial utilization of the alcohol dehydrogenase gene promoters during the development of Drosophila melanogaster." Dev Biol **134**(2): 430-7.

Lovelock, J. E. and C. Polge (1954). "The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol." Biochem J **58**(4): 618-22.

Ma, W., Z. Miao, et al. (1998). "Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited." Biol Reprod **59**(6): 1317-20.

Marschall, S. and M. Hrabe de Angelis (1999). "Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space." Trends Genet **15**(4): 128-31.

Marschall, S. and M. Hrabe de Angelis (2003). "In vitro fertilization/cryopreservation." Methods Mol Biol **209**: 35-50.

Marschall, S., U. Huffstadt, et al. (1999). "Reliable recovery of inbred mouse lines using cryopreserved spermatozoa." Mamm Genome **10**(8): 773-6.

Mazur, P., Katkov, II, et al. (2000). "The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration." Cryobiology **40**(3): 187-209.

Menino, A. R., Jr. and R. W. Wright, Jr. (1983). "Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres in vitro." Biol Reprod **28**(2): 433-46.

Mobraaten, L. E. (1981). The Jackson Laboratory Genetics Stocks Resource Repository. Frozen Storage and Laboratory Animals. Z. GH. Stuttgart, Gustav Fischer**:** 165-177.

Mobraaten, L. E. (1986). "Mouse embryo cryobanking." J In Vitro Fert Embryo Transf **3**(1): 28-32.

Montag, M., M. Kupka, et al. (2002). "Embryo transfer on day 3 using low versus high fluid volume." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **102**(1): 57-60.

Montag, M., K. van der Ven, et al. (1998). "Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy." Fertil Steril **69**(3): 539-42.

Morrell, J. M. (1999). "Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice." Lab Anim **33**(3): 201-6.

Mullins, M. C., M. Hammerschmidt, et al. (1994). "Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate." Curr Biol **4**(3): 189-202.

Munroe, R. J., R. A. Bergstrom, et al. (2000). "Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stem cells." Nat Genet **24**(3): 318-21.

Nadeau, J. H., R. Balling, et al. (2001). "Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences." Science **291**(5507): 1251-5.

Nagy, A., M. Gertsenstein, et al. (2003). Manipulating the Mouse Embryo. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nakagata, N. (1990). "Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing." Jikken Dobutsu **39**(2): 303-5.

Nakagata, N. (1992). "Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females." Jikken Dobutsu **41**(4): 519-22.

Nakagata, N. (1993). "Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes." J Reprod Fertil **99**(1): 77-80.

Nakagata, N. (1995). "Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice." Exp Anim **44**(1): 1-8.

Nakagata, N. (1996). "Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines." Lab Anim Sci **46**(2): 236-8.

Nakagata, N. (2000). "Cryopreservation of mouse spermatozoa." Mamm Genome **11**(7): 572-6.

Nakagata, N., K. Matsumoto, et al. (1992). "[Cryopreservation of spermatozoa of a transgenic mouse]." Jikken Dobutsu **41**(4): 537-40.

Nakagata, N., M. Okamoto, et al. (1997). "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 **57**(5): 1050-5.

Nakagata, N. and T. Takeshima (1993). "Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains." Jikken Dobutsu **42**(3): 317-20.

Nakanaga, K., T. Ishida, et al. (1983). "Differences in antibody production against mouse hepatitis virus (MHV) among mouse strains." Lab Anim **17**(2): 90-4.

Nakanaga, K., K. Yamanouchi, et al. (1986). "Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis virus infection in mice." J Virol **59**(1): 168-71.

Neighbour, P. A. (1978). "Studies on the susceptibility of the mouse preimplantation embryo to infection with cytomegalovirus." J Reprod Fertil **54**(1): 15-20.

Ng, S. C., A. Bongso, et al. (1989). "Transfer of human sperm into the perivitelline space of human oocytes after zona-drilling or zona-puncture." Fertil Steril **52**(1): 73-8.

Nichols, J. and R. L. Gardner (1989). "Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse." Hum Reprod **4**(2): 180-7.

Nicklas, W. (1999). "[Microbiological standardization of laboratory animals]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **112**(6-7): 201-10.

Nicklas, W., P. Baneux, et al. (2002). "Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units." Lab Anim **36**(1): 20-42.

Nolan, P. M., J. Peters, et al. (2000). "A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse." Nat Genet **25**(4): 440-3.

Nolan, P. M., J. Peters, et al. (2000). "Implementation of a large-scale ENU mutagenesis program: towards increasing the mouse mutant resource." Mamm Genome **11**(7): 500-6.

Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." Nature **287**(5785): 795-801.

Ohtsuka, N. and F. Taguchi (1997). "Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype." J Virol **71**(11): 8860-3.

Oikawa, K. (1979). "A scanning electron microscopic study on hepatic changes induced by mouse hepatitis virus-2." Tohoku J Exp Med **129**(4): 389-404.

Okuyama, M., S. Isogai, et al. (1990). "In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse." J Fertil Implant **7**: 116-119.

Ozgunen, K. T., S. Erdogan, et al. (2001). "Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice." Theriogenology **56**(3): 435-45.

Pachuk, C. J., P. J. Bredenbeek, et al. (1989). "Molecular cloning of the gene encoding the putative polymerase of mouse hepatitis coronavirus, strain A59." Virology **171**(1): 141-8.

Palermo, G., H. Joris, et al. (1992). "Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination." Hum Reprod **7**(2): 248-54.

Palermo, G. D., Q. V. Neri, et al. (2000). "ICSI and its outcome." Semin Reprod Med **18**(2): 161-9.

Pargent, W., S. Heffner, et al. (2000). "MouseNet database: digital management of a large-scale mutagenesis project." Mamm Genome **11**(7): 590-3.

Parkening, T. A. (1989). "Fertilizing ability of spermatozoa from aged C57BL/6NNia mice." J Reprod Fertil **87**(2): 727-33.

Parker, M. D., D. Yoo, et al. (1990). "Primary structure of the S peplomer gene of bovine coronavirus and surface expression in insect cells." J Gen Virol **71 (Pt 2)**: 263-70.

Parker, S. E., T. M. Gallagher, et al. (1989). "Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus." Virology **173**(2): 664-73.

Payne, D. (1995). "Micro-assisted fertilization." Reprod Fertil Dev **7**(4): 831-9.

Penfold, L. M. and H. D. Moore (1993). "A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa." J Reprod Fertil **99**(1): 131-4.

Polge, C. (1951). "Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79 degrees C." Nature **167**(4258): 949-50.

Polge, C. (1952). "Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C." Nature **169**(4302): 626-7.

Polge, C. (1978). "Fertilization in the pig and horse." J Reprod Fertil **54**(2): 461-70.

Polge, C. and R. LEA (1952). "Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C." Nature **169**: 626-627.

Polge, C. and J. E. Lovelock (1952). "Preservation of bull semen at -79°C." Vet Rec **64**: 396-397.

Polge, C., A. U. Smith, et al. (1949). "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures." Nature **164**: 666.

Quinn, P. (1995). "Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate." J Assist Reprod Genet **12**(2): 97-105.

Quinn, P., J. F. Kerin, et al. (1985). "Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid." Fertil Steril **44**(4): 493-8.

Rafael, J. A., Y. Nitta, et al. (2000). "Testing of SHIRPA, a mouse phenotypic assessment protocol, on Dmd(mdx) and Dmd(mdx3cv) dystrophin-deficient mice." Mamm Genome **11**(9): 725-8.

Rall, W. F. and M. J. Wood (1994). "High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin." J Reprod Fertil **101**(3): 681-8.

Ramirez-Solis, R., A. C. Davis, et al. (1993). "Gene targeting in embryonic stem cells." Methods Enzymol **225**: 855-78.

Rathkolb, B., T. Decker, et al. (2000). "The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes." Mamm Genome **11**(7): 543-6.

Reetz, I. C., M. Wullenweber-Schmidt, et al. (1988). "Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer." Lab Anim Sci **38**(6): 696-701.

Rehbinder, C., S. Alenius, et al. (2000). "FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats Report of the federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health." Lab Anim **34**(4): 329-50.

Rehbinder, C., P. Baneux, et al. (1996). "FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995." Lab Anim **30**(3): 193-208.

Rehbinder, C., P. Baneux, et al. (1998). "FELASA recommendations for the health monitoring of breeding colonies and experimental units of cats, dogs and pigs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health." Lab Anim **32**(1): 1-17.

Rehg, J. E., M. A. Blackman, et al. (2001). "Persistent transmission of mouse hepatitis virus by transgenic mice." Comp Med **51**(4): 369-74.

Renard, J. P. and C. Babinet (1984). "High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant." J Exp Zool **230**(3): 443-8.

Revel, A., N. Moshe, et al. (2004). "Mouse embryos generated from frozen-thawed oocytes can successfully survive a second cryopreservation." Hum Reprod **19**(3): 666-9.

Rinchik, E. M. (1991). "Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome." Trends Genet **7**(1): 15-21.

Rinchik, E. M., D. K. Johnson, et al. (1991). "Reverse genetics in the mouse and its application to the study of deafness." Ann N Y Acad Sci **630**: 80-92.

Rogers, D. C., E. M. Fisher, et al. (1997). "Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment." Mamm Genome **8**(10): 711-3.

Rogers, D. C., D. N. Jones, et al. (1999). "Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains." Behav Brain Res **105**(2): 207-17.

Rogers, D. C., J. Peters, et al. (2001). "SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice." Neurosci Lett **306**(1-2): 89-92.

Roudebush, W. E. and D. R. Duralia (1996). "Superovulation, fertilization, and in vitro embryo development in BALB/cByJ, BALB/cJ, B6D2F1/J, and CFW mouse strains." Lab Anim Sci **46**(2): 239-40.

Russell, L. B. and J. W. Bangham (1991). "The paternal genome in mouse zygotes is less sensitive to ENU mutagenesis than the maternal genome." Mutat Res **248**(1): 203-9.

Russell, L. B., J. W. Bangham, et al. (1988). "High frequency of mosaic mutants produced by N-ethyl-N-nitrosourea exposure of mouse zygotes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9167-70.

Russell, L. B. and C. S. Montgomery (1982). "Supermutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse spot test: comparisons with methylnitrosourea and ethylnitrosourethane." Mutat Res **92**(1-2): 193-204.

Sagoskin, A. W., T. Han, et al. (2002). "Healthy twin delivery after day 7 blastocyst transfer coupled with assisted hatching." Fertil Steril **77**(3): 615-7.

Scavizzi, F. and M. Raspa (2004). "Tissue distribution and duration of mouse hepatitis virus in naturally infected immunocompetent ICR (CD-1) and immunodeficient athymic nude-nu mouse strains used for ovarian transplantation and in vitro fertilization." Lab Anim **38**(2): 189-99.

Schenkel, J. (1995). Transgene Tiere. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.

Schutze, K. and A. Clement-Sengewald (1994). "Catch and move--cut or fuse." Nature **368**(6472): 667-9.

Schutze, K., A. Clement-Sengewald, et al. (1994). "Zona drilling and sperm insertion with combined laser microbeam and optical tweezers." Fertil Steril **61**(4): 783-6.

Schwartz, S., W. J. Kent, et al. (2003). "Human-mouse alignments with BLASTZ." Genome Res **13**(1): 103-7.

Sharp, J. and L. E. Mobraaten (1997). To save or not to save. Transgenic Animals. L. M. Houdebine. Switzerland, Harwood Academic Publishers**:** 525-532.

Sherman, J. K. (1978). "Cryobanking of human semen." Acta Med Pol **19**(1-2): 147-56.

Shif, I. and F. B. Bang (1966). "Plaque assay for mouse hepatitis virus (MHV-2) on primary macrophage cell cultures." Proc Soc Exp Biol Med **121**(3): 829-31.

Shif, I. and F. B. Bang (1970). "In vitro interaction of mouse hepatitis virus and macrophages from genetically resistant mice. II. Biological characterization of a variant virus MHV (C3H) isolated from stocks of MHV(PRI)." J Exp Med **131**(4): 851-62.

Siddell, S., H. Wege, et al. (1981). "Coronavirus JHM: intracellular protein synthesis." J Gen Virol **53**(Pt 1): 145-55.

Siddell, S., H. Wege, et al. (1981). "Intracellular protein synthesis and the in vitro translation of coronavirus JHM mRNA." Adv Exp Med Biol **142**: 193-207.

Siddell, S., H. Wege, et al. (1982). "The structure and replication of coronaviruses." Curr Top Microbiol Immunol **99**: 131-63.

Siddell, S., H. Wege, et al. (1983). "The biology of coronaviruses." J Gen Virol **64 (Pt 4)**: 761-76.

Siddell, S. G., H. Wege, et al. (1980). "Coronavirus JHM: cell-free synthesis of structural protein p60." J Virol **33**(1): 10-7.

Skarnes, W. C., H. von Melchner, et al. (2004). "A public gene trap resource for mouse functional genomics." Nat Genet **36**(6): 543-4.

Smith, A. L. (1983). "An immunofluorescence test for detection of serum antibody to rodent coronaviruses." Lab Anim Sci **33**(2): 157-60.

Smith, A. L., S. W. Barthold, et al. (1987). "Intranasally administered alpha/beta interferon prevents extension of mouse hepatitis virus, strain JHM, into the brains of BALB/cByJ mice." Antiviral Res **8**(5-6): 239-45.

Smith, A. L., S. W. Barthold, et al. (1991). "The role of gamma interferon in infection of susceptible mice with murine coronavirus, MHV-JHM." Arch Virol **121**(1-4): 89-100.

Smith, A. L., C. B. Cardellichio, et al. (1991). "Monoclonal antibody to the receptor for murine coronavirus MHV-A59 inhibits viral replication in vivo." J Infect Dis **163**(4): 879-82.

Smith, A. L., J. Casals, et al. (1983). "Antigenic characterization of Tettnang virus: complications caused by passage of the virus in mice from a colony enzootically infected with mouse hepatitis virus." Am J Trop Med Hyg **32**(5): 1172-6.

Smith, A. L., M. S. de Souza, et al. (1992). "Responses of mice to murine coronavirus immunization." Arch Virol **125**(1-4): 39-52.

Smith, A. L. and D. F. Winograd (1986). "Two enzyme immunoassays for the detection of antibody to rodent coronaviruses." J Virol Methods **14**(3-4): 335-43.

Smith, A. L., D. F. Winograd, et al. (1991). "In vitro splenic T cell responses of diverse mouse genotypes after oronasal exposure to mouse hepatitis virus, strain JHM." Lab Anim Sci **41**(2): 106-11.

Smith, A. U. and C. Polge (1950). "Survival of spermatozoa at low temperatures." Nature **166**(4225): 668-9.

Smith, M. S., R. E. Click, et al. (1984). "Control of mouse hepatitis virus replication in macrophages by a recessive gene on chromosome 7." J Immunol **133**(1): 428-32.

Soewarto, D., C. Fella, et al. (2000). "The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen." Mamm Genome **11**(7): 507-10.

Solnica-Krezel, L., A. F. Schier, et al. (1994). "Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline." Genetics **136**(4): 1401-20.

Songsasen, N., K. J. Betteridge, et al. (1997). "Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa." Biol Reprod **56**(1): 143-52.

Songsasen, N. and S. P. Leibo (1997). "Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa." Cryobiology **35**(3): 240-54.

Songsasen, N. and S. P. Leibo (1997). "Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice." Cryobiology **35**(3): 255-69.

Songsasen, N. and S. P. Leibo (1998). "Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa." Lab Anim Sci **48**(3): 275-81.

Songsasen, N., J. Tong, et al. (1998). "Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death." J Exp Zool **280**(2): 189-96.

Spaan, W., D. Cavanagh, et al. (1988). "Coronaviruses: structure and genome expression." J Gen Virol **69 (Pt 12)**: 2939-52.

Spaan, W. J., P. J. Rottier, et al. (1981). "Isolation and identification of virus-specific mRNAs in cells infected with mouse hepatitis virus (MHV-A59)." Virology **108**(2): 424-34.

Stohlman, S., C. Bergmann, et al. (1993). "JHM virus-specific cytotoxic T cells derived from the central nervous system." Adv Exp Med Biol **342**: 419-23.

Stohlman, S. A., R. S. Baric, et al. (1988). "Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein." J Virol **62**(11): 4288-95.

Stohlman, S. A., C. C. Bergmann, et al. (1995). "Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system." J Virol **69**(2): 684-94.

Stohlman, S. A. and J. A. Frelinger (1981). "Macrophages and resistance to JHM virus CNS infection." Adv Exp Med Biol **142**: 387-98.

Stohlman, S. A., J. A. Frelinger, et al. (1980). "Resistance to fatal central nervous system disease by mouse hepatitis virus, strain JHM. II. Adherent cell-mediated protection." J Immunol **124**(4): 1733-9.

Stohlman, S. A., S. Kyuwa, et al. (1992). "Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein-specific cytotoxic T lymphocytes are Ld restricted and specific for the carboxy terminus." Virology **189**(1): 217-24.

Stohlman, S. A., S. Kyuwa, et al. (1993). "Characterization of mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T cells derived from the central nervous system of mice infected with the JHM strain." J Virol **67**(12): 7050-9.

Stohlman, S. A. and L. P. Weiner (1978). "Stability of neurotropic mouse hepatitis virus (JHM strain) during chronic infection of neuroblastoma cells." Arch Virol **57**(1): 53-61.

Stohlman, S. A. and L. P. Weiner (1981). "Chronic central nervous system demyelination in mice after JHM virus infection." Neurology **31**(1): 38-44.

Stringfellow, D. A. and S. M. Seidel (1998). Manual of The International Embryo Transfer Society. Savoy, Illinois, USA, International Embryo Transfer Society (IETS).

Sturman, L. S. (1981). "The structure and behavior of coronavirus A59 glycoproteins." Adv Exp Med Biol **142**: 1-17.

Sturman, L. S., C. Eastwood, et al. (1987). "Temperature-sensitive mutants of MHV-A59." Adv Exp Med Biol **218**: 159-68.

Sturman, L. S. and K. V. Holmes (1983). "The molecular biology of coronaviruses." Adv Virus Res **28**: 35-112.

Sugiyama, K. and Y. Amano (1980). "Hemagglutination and structural polypeptides of a new coronavirus associated with diarrhea in infant mice." Arch Virol **66**(2): 95-105.

Sugiyama, K., R. Ishikawa, et al. (1986). "Structural polypeptides of the murine coronavirus DVIM." Arch Virol **89**(1-4): 245-54.

Sugiyama, K., M. Kasai, et al. (1998). "Haemagglutinin-esterase protein (HE) of murine corona virus: DVIM (diarrhea virus of infant mice)." Arch Virol **143**(8): 1523-34.

Suzuki, H., K. Yorozu, et al. (1996). "Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer." Exp Anim **45**(1): 33-8.

Szczygiel, M. A., H. Kusakabe, et al. (2002). "Intracytoplasmic sperm injection is more efficient than in vitro fertilization for generating mouse embryos from cryopreserved spermatozoa." Biol Reprod **67**(4): 1278-84.

Sztein, J. M., J. S. Farley, et al. (2000). "In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm." Biol Reprod **63**(6): 1774-80.

Sztein, J. M., J. S. Farley, et al. (1997). "Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing." Cryobiology **35**(1): 46-52.

Sztein, J. M., K. Noble, et al. (2001). "Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation." Cryobiology **42**(1): 28-39.

Tada, N., M. Sato, et al. (1990). "Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol." J Reprod Fertil **89**(2): 511-6.

Tadir, Y., J. Neev, et al. (1992). "Laser in assisted reproduction and genetics." J Assist Reprod Genet **9**(4): 303-5.

Taguchi, F. (1996). "[Structure and biological functions of the spike protein of mouse hepatitis virus]." Uirusu **46**(2): 109-17.

Taguchi, F. (2001). "[Mouse hepatitis virus (MHV) receptor and its interaction with MHV spike protein]." Uirusu **51**(2): 177-83.

Taguchi, F., M. Aiuchi, et al. (1977). "Age-dependent response of mice to a mouse hepatitis virus, MHV-S." Jpn J Exp Med **47**(2): 109-15.

Taguchi, F. and J. O. Fleming (1989). "Comparison of six different murine coronavirus JHM variants by monoclonal antibodies against the E2 glycoprotein." Virology **169**(1): 233-5.

Taguchi, F., Y. Goto, et al. (1979). "Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection. The role of nasal epithelial cells as a primary target of low-virulence virus, MHV-S." Microbiol Immunol **23**(4): 249-62.

Taguchi, F., T. Hayashi, et al. (1978). "Purification and buoyant density of a mouse hepatitis virus, MHV-S." Jpn J Exp Med **48**(4): 369-71.

Taguchi, F., N. Hirano, et al. (1976). "Difference in response to mouse hepatitis virus among susceptible mouse strains." Jpn J Microbiol **20**(4): 293-302.

Taguchi, F., H. Kubo, et al. (1995). "Localization of neutralizing epitopes and receptor-binding site in murine coronavirus spike protein." Adv Exp Med Biol **380**: 359-65.

Taguchi, F. and S. Matsuyama (2002). "Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus." J Virol **76**(3): 950-8.

Taguchi, F. and S. G. Siddell (1985). "Difference in sensitivity to interferon among mouse hepatitis viruses with high and low virulence for mice." Virology **147**(1): 41-8.

Taguchi, F., S. G. Siddell, et al. (1985). "Characterization of a variant virus selected in rat brains after infection by coronavirus mouse hepatitis virus JHM." J Virol **54**(2): 429-35.

Taguchi, F., A. Yamada, et al. (1979). "Factors involved in the age-dependent resistance of mice infected with low-virulence mouse hepatitis virus." Arch Virol **62**(4): 333-40.

Taguchi, F., A. Yamada, et al. (1980). "Resistance to highly virulent mouse hepatitis virus acquired by mice after low-virulence infection: enhanced antiviral activity of macrophages." Infect Immun **29**(1): 42-9.

Taguchi, F., R. Yamaguchi, et al. (1981). "Correlation between growth potential of mouse hepatitis viruses in macrophages and their virulence for mice." Infect Immun **34**(3): 1059-61.

Taguchi, F., S. Yoden, et al. (1990). "Expression of the spike protein of murine coronavirus JHM using a baculovirus vector." Adv Exp Med Biol **276**: 211-6.

Takeshima, T., N. Nakagata, et al. (1991). "[Cryopreservation of mouse spermatozoa]." Jikken Dobutsu **40**(4): 493-7.

Talansky, B. E. and J. W. Gordon (1988). "Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona pellucida drilling." Gamete Res **21**(3): 277-87.

Tao, J., J. Du, et al. (1993). "Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry." Hum Reprod **8**(11): 1879-85.

Tao, J., J. Du, et al. (1995). "The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa." J Reprod Fertil **104**(2): 231-6.

Taylor, K. and C. G. Copley (1994). "Detection of rodent RNA viruses by polymerase chain reaction." Lab Anim **28**(1): 31-4.

Thaung, C., K. West, et al. (2002). "Novel ENU-induced eye mutations in the mouse: models for human eye disease." Hum Mol Genet **11**(7): 755-67.

Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-12.

Thornton, C. E., S. D. Brown, et al. (1999). "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 **10**(10): 987-92.

Vajta, G., T. T. Peura, et al. (2000). "New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system." Mol Reprod Dev **55**(3): 256-64.

Van Soom, A., M. L. Boerjan, et al. (1997). "Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation." Biol Reprod **57**(5): 1041-9.

Vanroose, G., A. de Kruif, et al. (2000). "Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions." Anim Reprod Sci **60-61**: 131-43.

Vanroose, G., H. Nauwynck, et al. (2000). "Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study." Biol Reprod **62**(2): 463-9.

Vanroose, G., H. Nauwynck, et al. (1998). "Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality." Biol Reprod **58**(3): 857-66.

Wakayama, T., D. G. Whittingham, et al. (1998). "Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection." J Reprod Fertil **112**(1): 11-7.

Wakayama, T. and R. Yanagimachi (1998). "Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa." Nat Biotechnol **16**(7): 639-41.

Wang, F. I., J. O. Fleming, et al. (1992). "Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity." Virology **186**(2): 742-9.

Wang, Y. and X. Zhang (2000). "The leader RNA of coronavirus mouse hepatitis virus contains an enhancer-like element for subgenomic mRNA transcription." J Virol **74**(22): 10571-80.

Ward, M. A., T. Kaneko, et al. (2003). "Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection." Biol Reprod **69**(6): 2100-8.

Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature **420**(6915): 520-62.

Watson, P. F. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function." Reprod Fertil Dev **7**(4): 871-91.

Wege, H., H. Schluesener, et al. (1998). "Coronavirus infection and demyelination. Development of inflammatory lesions in Lewis rats." Adv Exp Med Biol **440**: 437-44.

Wege, H., S. Siddell, et al. (1981). "Characterisation of viral RNA in cells infected with the murine coronavirus JHM." Adv Exp Med Biol **142**: 91-101.

Wege, H., S. Siddell, et al. (1981). "Coronavirus JHM: characterization of intracellular viral RNA." J Gen Virol **54**(Pt 1): 213-7.

Wege, H., S. Siddell, et al. (1982). "The biology and pathogenesis of coronaviruses." Curr Top Microbiol Immunol **99**: 165-200.

Wege, H., A. Stuhler, et al. (1998). "Coronavirus infection and demyelination. Sequence conservation of the S-gene during persistent infection of Lewis-rats." Adv Exp Med Biol **440**: 767-73.

Wege, H., J. Winter, et al. (1988). "The peplomer protein E2 of coronavirus JHM as a determinant of neurovirulence: definition of critical epitopes by variant analysis." J Gen Virol **69 (Pt 1)**: 87-98.

Weir, E. C., P. N. Bhatt, et al. (1987). "Elimination of mouse hepatitis virus from a breeding colony by temporary cessation of breeding." Lab Anim Sci **37**(4): 455-8.

Wessner, D. R., P. C. Shick, et al. (1998). "Mutational analysis of the virus and monoclonal antibody binding sites in MHVR, the cellular receptor of the murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59." J Virol **72**(3): 1941-8.

Whitten, W. K. (1971). "Parthenogenesis: does it occur spontaneously in mice?" Science **171**(969): 40-7.

Whitten, W. K. and J. D. Biggers (1968). "Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium." J Reprod Fertil **17**(2): 399-401.

Whitten, W. K., F. H. Bronson, et al. (1968). "Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air." Science **161**(841): 584-5.

Whittingham, D. G. (1971). "Culture of mouse ova." J Reprod Fertil Suppl **14**: 7-21.

Whittingham, D. G. (1971). "Survival of mouse embryos after freezing and thawing." Nature **233**(5315): 125-6.

Whittingham, D. G. (1974). "Embryo banks in the future of developmental genetics." Genetics **78**(1): 395-402.

Whittingham, D. G. (1974). "The viability of frozen-thawed mouse blastocysts." J Reprod Fertil **37**(1): 159-62.

Whittingham, D. G. (1975). "Survival of rat embryos after freezing and thawing." J Reprod Fertil **43**(3): 575-8.

Whittingham, D. G. (1977). "Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at-196 degrees C for prolonged periods." Genet Res **30**(3): 287-99.

Whittingham, D. G. (1977). "Some factors affecting embryo storage in laboratory animals." Ciba Found Symp(52): 97-127.

Whittingham, D. G. (1978). "Viability assays for mammalian ova." Cryobiology **15**(2): 245-8.

Whittingham, D. G. and E. Anderson (1976). "Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos." J Reprod Fertil **48**(1): 137-40.

Whittingham, D. G., S. P. Leibo, et al. (1972). "Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C." Science **178**(59): 411-4.

Whittingham, D. G., M. F. Lyon, et al. (1977). "Long-term storage of mouse embryos at--196 degrees C: the effect of background radiation." Genet Res **29**(2): 171-81.

Whittingham, D. G. and R. G. Wales (1969). "Storage of two-cell mouse embryos in vitro." Aust J Biol Sci **22**(4): 1065-8.

Whittingham, D. G. and W. K. Whitten (1974). "Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryos." J Reprod Fertil **36**(2): 433-5.

Whittingham, D. G., M. Wood, et al. (1979). "Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C." J Reprod Fertil **56**(1): 11-21.

Wieschaus, E. (1980). "A combined genetic and mosaic approach to the study of oogenesis in Drosophila." Basic Life Sci **16**: 85-94.

Wiles, M. V., F. Vauti, et al. (2000). "Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells." Nat Genet **24**(1): 13-4.

Williams, R. K., G. S. Jiang, et al. (1991). "Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5533-6.

Williams, R. K., S. W. Snyder, et al. (1990). "MHV-resistant SJL/J mice express a non-functional homolog to the MHV receptor glycoprotein." Adv Exp Med Biol **276**: 45-50.

Wilmut, I. (1972). "The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing." Life Sci II **11**(22): 1071-9.

Wilmut, I. (1972). "The low temperature preservation of mammalian embryos." J Reprod Fertil **31**(3): 513-4.

Woyciechowska, J. L., B. D. Trapp, et al. (1984). "Acute and subacute demyelination induced by mouse hepatitis virus strain A59 in C3H mice." J Exp Pathol **1**(4): 295-306.

Yamada, Y. K., M. Yabe, et al. (1993). "Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection." Lab Anim Sci **43**(4): 285-90.

Yamaguchi, K., N. Goto, et al. (1991). "Protection of mice from a lethal coronavirus infection in the central nervous system by adoptive transfer of virus-specific T cell clones." J Neuroimmunol **32**(1): 1-9.

Yamamoto, H., H. Sato, et al. (2001). "Microbiological contamination in genetically modified animals and proposals for a microbiological test standard for national universities in Japan." Exp Anim **50**(5): 397-407.

Yanagimachi, R. (1995). "Is an animal model needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and other assisted reproduction technologies?" Hum Reprod **10**(10): 2525-6.

Yanagimachi, R. (1998). "Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 87-98.

Yanagimachi, R. and A. Bhattacharyya (1988). "Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions." J Exp Zool **248**(3): 354-60.

Yokoyama, M., H. Akiba, et al. (1990). "[Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa]." Jikken Dobutsu **39**(1): 125-8.

Yu, M. W., J. K. Scott, et al. (2000). "Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides." Virology **271**(1): 182-96.

Yu, W. and J. L. Leibowitz (1995). "A conserved motif at the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA required for host protein binding and viral RNA replication." Virology **214**(1): 128-38.

Yu, W. and J. L. Leibowitz (1995). "Specific binding of host cellular proteins to multiple sites within the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA." J Virol **69**(4): 2016-23.

Yu, X., W. Bi, et al. (1994). "Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein." Virology **202**(2): 1018-23.

9 Anhang

9.1 Verwendete Medien und Lösungen

Allgemeine Informationen:

- zur Herstellung der Medien wurde Millipore Wasser (Ampuwa/Fresenius) verwendet
- zum Abwiegen von Chemikalien: Einmalwägeschalen (NeoLab, Heidelberg)
- Chemikalien wurden ausschließlich für die IVF Medien verwendet
- Glas Gefäße wurden vor dem Benützen mit Millipore Wasser abgespült

Bezugsquellen:

Filter: *Millipore S.A., Molsheim, France*

Millex-HA; non-pyrogenic; sterile 0,45 µm; Kat. Nr. SLHA025BS
Millex-GV 0.22 µm Filter Unit; Kat. Nr. SLGVR25KS

Cryoröhrchen: *Nunc, Wiesbaden,* Cryo-Cups, 1,0 mI; Best.-Nr. 377224

Zentrifuge: Biofuge fresco Heraeus, *Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau*

Falconröhrchen: *Becton Dickinson Labware Europe, 38800 Le Pont De Claix, France*
50 ml: Blue Max, Kat. Nr. 352070; 25 ml: Blue Max Jr., Kat. Nr. 352096

Einmal-Wägeschalen: *NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg;*
Best.-Nr.1-1130 (7 ml, blau), Best.-Nr.1-1125 (100 ml, weiß)

Ampuwa Wasser: *Fresenius Kabi Deutschland GmbH,* Bad Homburg v.d.H.,
Best.-Nr.: 1080104

9.1.1 HTF-Medium - Medium für die Fertilisation

nach Quinn et al. 1985 und Quinn 1995

Chemikalien	mg/ 100ml	Endkonzentration in 100ml Medium (mM)	Katalognr. (Sigma-Aldrich Chemie) GmbH, Taufkirchen
NaCl	593,75	101,6	S-9888
KCl	34,96	4,7	P-5405
KH_2PO_4	5,04	0,37	P-5655
$MgSO_4$ x $7H_2O$	4,93	0,2	M-9397
Sodium Lactat 60%	342 µl	21,4 (0,2 %)	L-7900
Glucose	50,0	2,8	G-6152
$NaHCO_3$	210,0	25,0	S-5761
Sodium-Pyruvat	3,65	0,33	P-4562
Penicillin G	7,5	100 U/ml	P-4687
Streptomycin	5,0	50 µg/ml	S-1277
$CaCl_2$ x $2H_2O$	60,0	4,0	C-7902
BSA	400,0	0,4%	A-4378

- Chemikalien wurden in 75 ml Millipore Wasser aufgelöst (mit Ausnahme von $CaCl_2$ und BSA)
- $CaCl_2$ x 2 H_2O (60 mg) wurde vorerst in 25 ml Millipore Wasser abgewogen, nach dem Auflösen zum Medium gegeben
- Medium wurde über Nacht im Brutschrank begast (5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2)
- Anschließend wurde BSA dazugegeben und das Medium wurde filtriert *(Millex-GV 0.22 µm Filter Unit; Cat. SLGVR25KS)*
- Das Medium wurde max. eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt, vor der IVF über Nacht bei 37° C und 5% CO2 in Brutschrank gelagert (der Deckel zum Gasaustausch blieb leicht geöffnet).
- Zusätzlich wurde ein Teil des Mediums mit Mineralöl äquilibriert *(Sigma M-8410)*:

- 25 ml Medium und 25 ml Öl wurden in einem 50 ml Falconröhrchen durch leichtes Schwenken gemischt,
- über Nacht in den Brutschrank gestellt (Deckel blieb leicht geöffnet)
- äquilibriertes Öl wurde zum Überschichten der Petrischalen verwendet.

Osmolarität: 260 – 280 mOsm.

9.1.2 KSOM-Medium – Kulturmedium

Quinn 1995; Lawitts1991, Ho 1995

Chemikalien	mg/ 100ml	Endkonzentration in 100ml Medium (mM)	Katalognr. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NaCl	559,5	95,0	S-9888
KCl	18,5	2,5	P-5405
KH_2PO_4	4,75	0,35	P-5655
$MgSO_4$ x $7H_2O$	4,95	0,2	M-9397
Sodium Lactat 60%	174 µl	10,0 (0,1 %)	L-7900
Glucose	3,6	0,2	G-6152
EDTA	0,38	0,01	E-5134
$NaHCO_3$	210,0	25,0	S-5761
Glutamine	14,5	1,0	G-5763
Sodium-Pyruvat	2,2	0,2	P-4562
Penicillin G	6,3	100 U/ml	P-4687
Streptomycin	5,0	50 µg/ml	S-1277
phenol red	0,1	0,001 %	P-3532
ess.-Aminoacid (50x)	1000 µl	50 %	11130-036 Gibco/BRL
non-ess. Aminoacid (100x)	500 µl	50 %	11140-035 Gibco/BRL
$CaCl_2$ x $2H_2O$	25,0	1,71	C-7902
BSA	100,0	0,1 %	A-4378

- Chemikalien wurden in 70 ml Millipore Wasser aufgelöst (mit Ausnahme von $CaCl_2$ und BSA)
- Essentielle Aminosäuren und Nicht-Essentielle Aminosäuren wurden dazugegeben und das gesamte Medium wurde auf 75 ml aufgefüllt
- $CaCl_2$ x 2 H_2O (25 mg) wurde in 25 ml Millipore Wasser abgewogen und nach dem Auflösen zum Medium gegeben
- Medium wurde über Nacht im Brutschrank begast (5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2). Das Medium sollte anschließend eine Lachsfarbe haben.
- Anschließend wurde BSA dazugegeben und das Medium wurde filtriert *(Millex-GV 0.22µm Filter Unit; Cat.No. SLGVR25KS)*
- Das Medium wurde max. zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt, vor der IVF über Nacht bei 37° C und 5% CO2 in Brutschrank gestellt (der Deckel zum Gasaustausch blieb leicht geöffnet)
- Zusätzlich wurde ein Teil des Mediums mit Mineralöl äquilibriert *(Sigma M-8410)*:
- 25 ml Medium und 25 ml Öl wurden in einem 50 ml Falconröhrchen durch leichtes Schwenken gemischt
- über Nacht in den Brutschrank gestellt (Deckel blieb auch leicht geöffnet)
- äquilibriertes Öl wurde zum Überschichten der Petrischalen verwendet
- Osmolarität: 250 - 270 mOsm

9.1.3 PBS-BSA (Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum Albumin)

Quelle:

Course on Cryopreservation of Mouse Germplasm (Monterotondo, 9-14 November 2003) (www.jax.org\cryo)

Stock PBS: SIGMA D-5773

Chemikalien	mg/ 100ml	Endkonzentration in 100 ml Medium (mM)	Katalognr. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-Glucose	100,0	5,5	G-6152
Sodium-Pyruvat	3,6	0,3	P-4562
Penicillin G	7,5	100 U/ml	P-4687
Streptomycin	5,0	50 µg/ml	S-1277
phenol red	0,1	0,001 %	P-3532
$CaCl_2$ x $2H_2O$	10,0	0,7	C-7902
BSA	300,0	0,3 %	A-4378

Herstellung der Stocklösung:

- Chemikalien für die PBS Stocklösung wurden in 800 ml Millipore Wasser aufgelöst (mit Ausnahme von $CaCl_2$)
- $CaCl_2$ x 2 H_2O (100 mg) wurde in 200 ml Millipore Wasser aufgelöst und zur PBS-Stocklösung gegeben
- Nach einer Zugabe von 0,5 ml PhenolRed Solution (SIGMA P-0290) wurde die PBS Stocklösung filtriert (0,22 µm Filter) und in 100ml Aliquots bei –20°C eingefroren (1 Monat haltbar!)

Herstellung der PBS-BSA Gebrauchslösung:

- Nach dem Auftauen des 100 ml Aliquots der Stocklösung, wurde die Lösung um die weiteren Chemikalien aus der Tabelle ergänzt.

- Das Medium wurde filtriert (0,22 µm Filter) und die Osmolarität gemessen
- Osmolarität: 280 mOsm +/-5%
- Die PBS/BSA Lösung konnte 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

9.1.4 M2- Medium für Embryo Transfer

Fertiges Medium von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Best.-Nr. M7167
Zugabe von Penicillin G (Sigma, P-4687) 6mg/100ml (Endkonzentration: 80U/ml) und Streptomycin (Sigma, S-1277) 5 mg/100ml (Endkonzentration: 50 mg/ml).

9.1.5 CPA: Cryo - Protecting - Agents

nach der Methode von Nakagata et al. 1997 and Sztein et al. 1997

Chemikalien	**Konzentration**	**g/40 ml**	**Bezugsquelle**	**Katalognr.**
Raffinose	18 %	7,2	Sigma	R-7630
Magermilchpulver	3 %	1,2	DIFCO	0032-17-3

Herstellung der Lösung:

- Vorerst wurden ca. 50 ml Millipore Wasser auf 60° C erwärmt und die Chemikalien in ca. 30 ml des vorgewärmten Wasser aufgelöst
- Das Medium wurde auf 40 ml mit Milipore Wasser aufgefüllt und bei 13.000 rpm 60min zentrifugiert (=16060 g: Heraeus Biofuge Fresco).
- Der Überstand wurde filtriert und als Aliquots a 500 µl, 1 ml, 2 ml in Nunc Cryoröhrchen bei –20°C eingefroren (max. 3 Monate gelagert)
- Osmolarität: 480-500 mOsm

9.1.6 Hyaluronidaselösung

SIGMA Best. Nr. 3884 (Type IV-S)

Stocklösung: 10 mg/ml

Gebrauchslösung: 300 µg/ml

Vorbereitung der Stocklösung:

- *um die Konzentration der Stocklösung von 10 mg/ml zu bekommen, wurden 50 mg Hialuronidase in 5 ml M2/PBS aufgelöst und mit einem 0,22 µm Filter sterilisiert.
- **Die Stocklösung wurde als 30 µl Aliquots in sterilen 1,5 ml Eppendorf Tubes bei –20°C eingefroren (5 ml reichen für ca. 165 Aliquots!)

Vorbereitung der Gebrauchslösung:

- 30 µl Aliquots der Stocklösung wurden in 500 µl PBS aufgelöst.
- Nach ca. 2 min. wurde die Lösung in eine Petrischale gegeben (insgesamt ca. 530 µl)
- Die Kumulus-Komplexe-Zellen wurden in 500 µl PBS-BSA aufgenommen und zu der Hialuronidaselösung in die Petrischale gegeben (ca. 1030 µl Volumen mit Gebrauchslösung von 300 µg/ml)
- Nach der Trennung von den Kumulus-Zellen, wurden die Eizellen mittels einer Glaskapillare schnell ins reine PBS-BSA gegeben (Neutralisation der Hialuronidasewirkung)

*die Lösung wurde auf Eis vorbereitet!

**die Eppendorf Tubes wurden vorher auf Eis vorgekühlt!

9.1.7 Narkose

Xylazin 13 mg/kg (Rompun 2 %, 20 mg/ml)
Ketamin 65 mg/kg (Ketamin 10 %, 100 mg/ml)
Vetranquil 2 mg/kg (Vetranquil 1 %, 13,56 mg/ml)

Narkosemischung:

Mischung:		0,39 ml Rompun 2 %
	+	0,39 ml Ketamin 10 %
	+	0,12 ml Vetranquil 1 %
	+	2,1 ml NaCl

Anwendung der Narkose:

Für Mäuse mit einem Körpergewicht **bis 30 g**:		0,15 ml i.p.
	> 30 g:	0,17 ml i.p.

Aufbewahrung:

Narkose wurde 24 h vor erstmaligem Gebrauch zusammengestellt (24 h Inkubation im Kühlschrank ist nötig für eine tiefe Wirkung der Narkose)
Narkose-Mischung wurde maximal 6 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

9.1.8 PMSG (Pregnant-Mare-Serum-Gonadotropin)

Intergonan 1000

Wirkstoff: Pferdeserum- Gonadotropin Trockensubstanz und Lösungsmittel zur subkutanen oder intramuskulären Injektion.

Serumgonadotopin wurde aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen. Es handelte sich um ein Glycoprotein, das sowohl über Wirkungen des hypophysären follikelstimulierenden Hormons (FSH) als auch die des luteinisierenden Hormons (LH) verfügt. Da sowohl FSH als auch LH am Follikelwachstum und der –reifung sowie der Brunstauslösung beteiligt sind, wird Intergonan bei Fortpflanzungsstörungen des weiblichen Tieres eingesetzt.

Beim männlichen Tier wirkt Intergonan vorwiegend auf die Spermatogenese.

Zusammensetzung:

1 Fläschchen mit 6,5 mg Trockensubstanz enthält:

Pferdeserum-Gonadotropin für Tiere 1000 I.E.

Handelsform:

Schachtel zu 5x1000 I.E. Intergonan+5x5ml Lösungsmittel

Best.No. 08828OH 6.01

Intervet Deutschland GmbH

Postfach 1130

85716 Unterschleißheim

Zubereitung der Injektionslösung:

Labortiere:

Eine Flasche mit Trockensubstanz wurde in 20 ml NaCl 0,9 % aufgelöst

100 ml (5 Flaschen) wurden hergestellt und in Aliquots zu ca. 6 ml eingefroren.

Eingefrorene Proben waren (-20°C) 1-1,5 Monate haltbar.

20 ml	1000 I.E.
1 ml	50 I.E.
100 µl	5 I.E.
150 µl	7,5 I.E.
200 µl	10 I.E.

9.1.9 HcG (Human Chorionic Gonadotropin)

Ovogest 1500

Wirkstoff:

Choriongonadotropin ist ein Glycoprotein-Komplex und wurde aus dem Harn einer schwangeren Frau isoliert. Es entspricht in seiner Wirkung dem luteinisierenden Hormon LH des Hypophysen- Vorderlappens. Dieses Hormon bewirkt mit FSH zusammen die Auslösung der Brunst. Außerdem wurde durch LH die Ovulation ausgelöst, die Anbildung des Gelbkörpers induziert und die Progesteron-Sekretion steuert.

Beim männlichen Tier wirkt es auf die Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens und damit auf die Bildung von Testosteron.

Zusammensetzung:

1 Fläschchen mit 6,5 mg Trockensubstanz enthält:

Choriongonadotropin 1500 I.E.

Fläschchen zu 5ml mit wäßrigem Lösungsmittel

Handelsform:

Karton zu 5x1500 I.E. Ovogest und 5x5ml wäßriges Lösungsmittel

Best.No. 089580H 6.01

Intervet Deutschland GmbH

Postfach 1130

85716 Unterschleißheim

Zubereitung der Injektionslösung:

Labortiere:

Eine Flasche mit Trockensubstanz wurde in 30 ml NaCl 0,9 % aufgelöst

90 ml (3 Flaschen) wurden hergestellt und in Aliquots zu ca. 6ml eingefroren.

Eingefrorene Aliquots waren (-20°C) 1-1,5 Monate haltbar.

30 ml	1500 I.E.
1 ml	50 I.E.
100 µl	5 I.E.
150 µl	7,5 I.E.
200 µl	10 I.E.

9.2 IVOS Setup für Hamilton Thorne Sperm Analyzer

Hamilton Thorne Research, Beverly, MA 01915 USA

Einstellungen für Mice 4x

Analysis Setup		
Frames per sec.	60	Hz
No. of frames	30	
Minimum contrast	70	
Minimum cell size	2	pix
Cell size	5	pix
Cell intensity	85	
Progressive Cells		
Path Velocity (VAP)	60,0	µm/s
Straightness (STR)	50,0	%
Slow Cells		
Slow cells	motile	
VAP Cutoff	50,0	µ/s
VSL Cutoff	15,0	µ/s

Optics Setup		
Intensity	2650	
Magnification	0,8	
Video Source	60	Hz
Field	Dark	

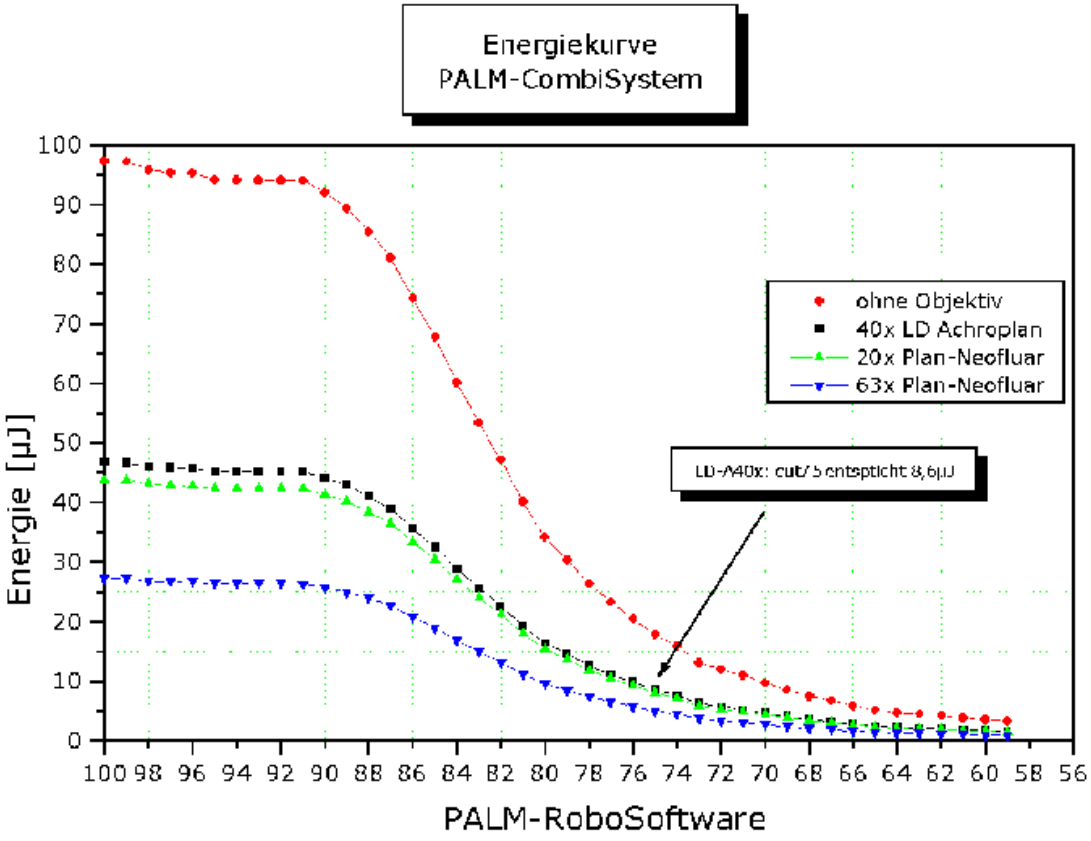
Stage Setup		
Chamber Type	2x-cell	
Chamber Depth	80,0	µm
Stage position	0,0	
Field Selection	Manual	
Set Stage Temperature	37,0	
Ident Fluorescence Options	Off	

QC Plots	
Static intensity gates min	0,43
max	1,5
Static size gates min	0,87
max	2,36
Elongation gates min	14

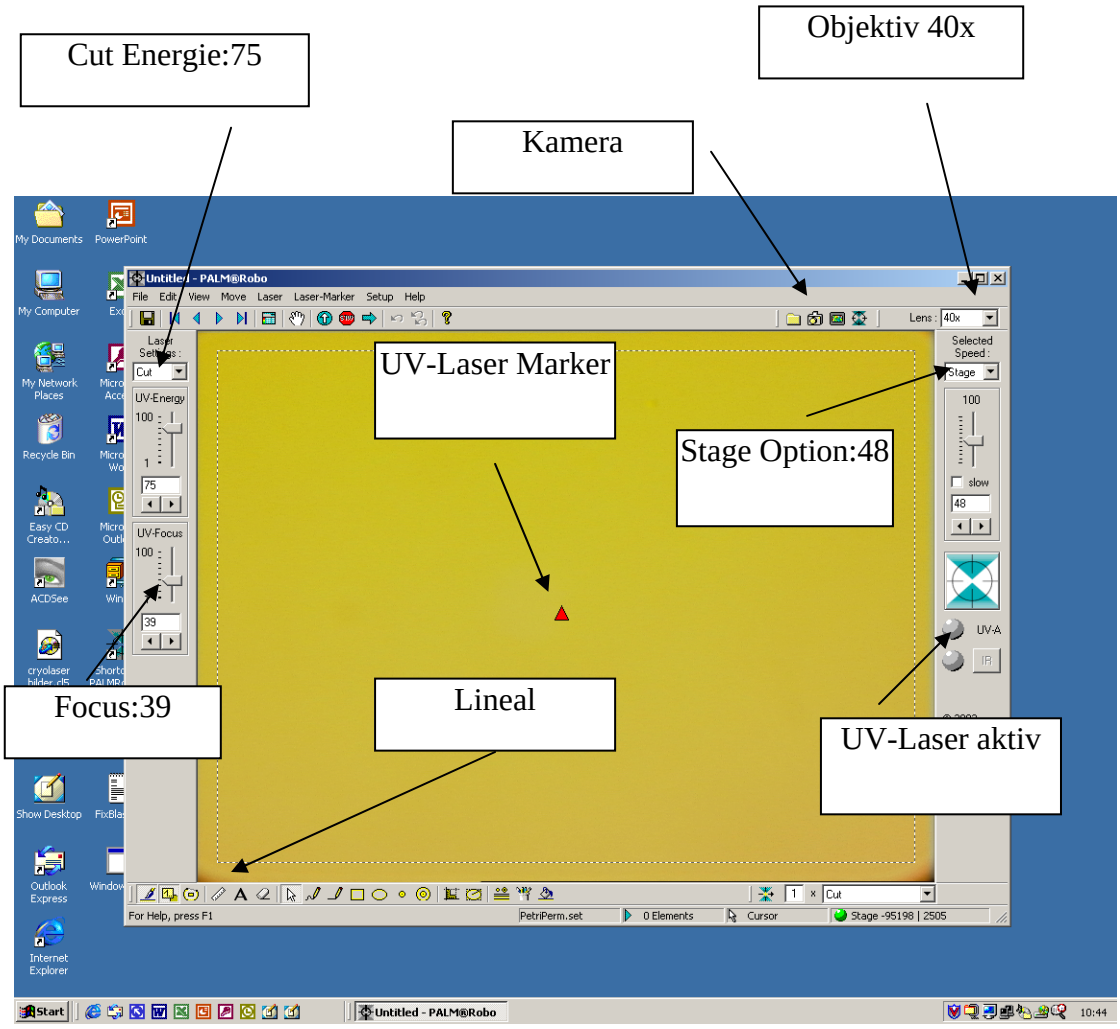
max	92	

Info		
Volume	0,1	ml
Dilution	1:49	

9.3 PALM Robo Energiekurve



9.4 PALM Setup



9.5 Bernoulli-Schema

Vergleich exp. Gruppe 1 zu 2

P= Wahrscheinlichkeit, dass bei 12 Versuchen zufällig keine positive Maus dabei ist
(unter der Bedingung p=10:14= 0,71)
n= 12 Versuche, m= keine positive Maus (0)

$P_n (m)= n !/ m ! (n-m) ! p^m (1-p)^{n-m}$

$P= 12!/ 0! (12-0)! 0,71^0 (1-0,71)^{12-0}= 12!/ 0! 12! 0,71^0 0,31^{12}= 0,31^{12}= 7,8\ 10^{-7}$

P<0,001

Vergleich exp. Gruppe 1 zu 3

P= Wahrscheinlichkeit, dass bei 6 Versuchen zufällig keine positive Maus dabei ist
(unter der Bedingung p=10:14= 0,71)
n= 6 Versuche, m= keine positive Maus (0)

$P_n (m)= n !/ m ! (n-m) ! p^m (1-p)^{n-m}$

$P= 6!/ 0! (6-0)! 0,71^0 (1-0,71)^{6-0}= 6!/ 0! 6! 0,71^0 0,31^6= 0,31^6= 8,8\ 10^{-5}$

P<0,001

Vergleich exp. Gruppe 1 zu 4

P= Wahrscheinlichkeit, dass bei 14 Versuchen zufällig keine positive Maus dabei ist
(unter der Bedingung p=10:14= 0,71)
n= 14 Versuche, m= keine positive Maus (0)

$P_n (m)= n !/ m ! (n-m) ! p^m (1-p)^{n-m}$

$P= 14!/ 0! (14-0)! 0,71^0 (1-0,71)^{14-0}= 14!/ 0! 14! 0,71^0 0,31^{14}= 0,31^{14}= 7,4\ 10^{-8}$

P<0,001

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Betreuer
Herrn Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis für die Ermöglichung dieser Arbeit
und für die freundliche Unterstützung bedanken.

Weiterhin danke ich meinem Doktorvater
Herrn Prof. Dr. Joachim Braun für die Übernahme meiner Promotion
an der LMU München.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Susan Marschall für Ihre sehr wertvollen Hinweise und für die Hilfe bei der Abfassung dieser Arbeit bedanken.

Ebenso bei Dr. Auke Boersma, der mir jederzeit zur Seite stand.

Ich danke Herrn Dr. Ulrich Heinzmann, Frau Helga Wehnes und Frau Luise Jennen für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
Weiterhin möchte ich Frau Dr. Esther Mahabir für die Unterstützung bei der Arbeit mit infektiösem Material danken.
Bei Prof. Dr. Jörg Schmidt möchte ich mich für die Ermöglichung der Arbeit im Infektionslabor und bei Frau Katrin Reindl für ihre Hilfe bei der Zellkultur bedanken.

Ich bedanke mich auch recht herzlich bei den Tierpflegern des Isotopenhauses, B-Streifens und German Mouse Clinic für die Hilfsbereitschaft und sehr gute Mitarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Arbeitskollegen für die angenehmen und freundlichen Gespräche.

Schließlich Vielen Dank an meine Mutter und Hermann für jegliche Unterstützung in diesen drei Jahren.

Lebenslauf

Name:	Peters
Vorname:	Dominika
Geburtstag:	14.10.1975
Geburtsort:	Breslau (Polen)
Vater:	Tadeusz Miszczyk
Mutter:	Wieslawa Gryczka-Miszczyk

Schulbildung:

1982-1990	Grundschule Breslau/Gniechwitz
1990-1994	Allgemeinbildendes Gymnasium Breslau

Berufsausbildung:

1994-1995	Studium der Umweltchemie an der Universität Breslau
1995-2001	Studium der Veterinärmedizin an der Landwirtschaftlichen Hochschule Breslau
März 2001	Approbation als Tierärztin
seit Oktober 2001	Dissertation an dem Institut für Experimentelle Genetik des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München.