

1. Einleitung

Die ersten erfolgreichen Ergebnisse zur In-vitro-Fertilisation (IVF) bei Säugetieren wurden im Rahmen von Untersuchungen an Kaninchen- und Mäuseoozyten erzielt (Chang 1959). Für die Spezies Rind wurden die ersten Versuche zur Fertilisation von In-vitro-gereiften Eizellen 1968 von SREENAN publiziert. Die erste IVF mit nachfolgender embryonaler Weiterentwicklung beim Rind konnte 1977 durch IRITANI und NIWA in Japan erzielt werden. Im Jahre 1978 wurde das erste Kind nach Anwendung der IVF und des Embryotransfers beim Menschen geboren (STEPTOE, EDWARDS 1978). Das erste Kalb nach Anwendung der In-vitro-Fertilisation wurde 1982 in den USA geboren (Brackett et al. 1982). Ein praktisch nutzbares Verfahren zur In-vitro-Reifung (IVM), -Fertilisation (IVF) und -Kultivierung (IVC) beim Rind, welches als In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen bezeichnet wurde, beschrieben BERG und BREM im Jahre 1989.

Die IVP von Rinderembryonen besitzt sowohl in der Forschung als auch in der praktischen Tierzucht eine Bedeutung. In der Forschung stellt die IVP eine wichtige Basistechnologie für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen (Eizellreifung, Klonierung, intrazytoplasmatische Spermieninjektion, Geschlechtsbestimmung, Präimplantationsdiagnostik, Fertilitätskontrolle von Spermien) dar. In der Tierproduktion hat die IVP Einzug in das Serviceangebot einiger Zuchtorganisationen gehalten. Die Anwendung der IVP in der Tierzucht zielt auf die Verkürzung des Generationsintervalls, auf die Steigerung der Nachkommenanzahl genetisch wertvoller weiblicher Tiere, auf die Erzeugung von Nachkommen von graviden Rindern sowie auf die Anlage von Genbanken bei der Erhaltung bedrohter Rassen.

Die Erfolgsraten bei der IVP von Rinderembryonen liegen deutlich unter denen von in vivo produzierten Embryonen nach Superovulation. Zwar liegt die Erfolgsrate nach IVM und IVF bei ca. 60-80% (HEYMAN 1997, GANDOLFI 1997, AVERY et al. 1998, BOUSQUET et al. 1999), aber nur ca. 30% der in vitro gereiften Oozyten erreichen das Blastozystenstadium (KRÄUSLICH et al. 1997, HAGEMANN et al. 1998, GORDON 2003).

Eine Ursache für die noch unbefriedigenden Ergebnisse der IVP ist sicher in der komplexen und noch suboptimalen Methodik zu sehen, die hinter diesem Verfahren steht. Aus diesem Grund ist die IVP immer noch Gegenstand intensiver Forschung. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen dabei vor allem grundlegende Aspekte.

Da die strukturellen Abläufe während der Kernreifung weitgehend bekannt sind, aus ihnen heraus die Unterschiede in der Entwicklungskompetenz von Oozyten jedoch nicht

ausreichend erklärt werden können, wird die Forschung vermehrt auf die Aufklärung zytoplasmatischer Reifungsprozesse fokussiert.

Während der Reifung von Oozyten stellen die Mitochondrien im Ooplasma die prominentesten Organellen dar. Über die Bereitstellung von ATP ermöglichen die Mitochondrien die unterschiedlichen energieintensiven Reifungsvorgänge. Darüber hinaus sind die Mitochondrien in die Auslösung und Regulation der Apoptose über die Aktivierung der Caspasen eingebunden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Verteilung der Mitochondrien im Ooplasma eine Beziehung zur Entwicklungskompetenz von Oozyten aufweist (GORDON 2003).

Daraus abgeleitet bestand die Zielstellung der vorliegenden Arbeit in der Analyse der Aktivität und Aggregation von Mitochondrien in Oozyten verschiedener Klassen von bovinen Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK) zu verschiedenen Zeiten einer In-vitro-Reifung. Parallel dazu wurde der Kernzustand der einzelnen Oozyten durch Beurteilung der Chromatinkonfiguration erfasst. Es sollte untersucht werden, ob sich die Mitochondrienaktivität und -aggregation als prospektiver Parameter für die Entwicklungskompetenz von Oozyten eignet. Weiterhin soll die Apoptoserate in den Cumuluszellen der verschiedenen COK-Klassen zu den definierten Maturationszeiten analysiert und der Nachweis eines für die Apoptose relevanten Caspase-moleküls (Caspase-3) im Ooplasma durchgeführt werden.

Mit der Arbeit sollten neue Kriterien für die Oozytenqualität und Indikatoren für die Entwicklungskompetenz von Oozyten erarbeitet werden.