

**Aus dem
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des
Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie, Dummerstorf
und dem
Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

Untersuchung zum Einfluss des Lipidgehaltes in Oozyten des Rindes
auf die embryonale Entwicklungsfähigkeit nach In-vitro-Maturation und In-vitro-
Fertilisation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursel Adeltraud Fucker
Tierärztin
aus Ansbach

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3461

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Wilhelm Kanitz,
Vertretung durch Univ.-Prof. Dr. Staufenbiel
Zweiter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser
Dritter Gutachter: PD Dr. Helmut Torner

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

In vitro production, in vitro, maturation, oocytes, lipids, cytoplasm, embryonic
development, fluorescence, microscopy, staining

Tag der Promotion: 14.10.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-187-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1. EINLEITUNG	11
2. SCHRIFTTUM	13
2.1. Oozytenreifung	13
2.1.1. Oozytenreifung in vivo	13
2.1.2. Oozytenreifung in vitro	16
2.2. Fertilisation	18
2.2.1. Fertilisation in vivo	18
2.2.2. Fertilisation in vitro	19
2.3. Embryonalentwicklung.....	22
2.4. Die Rolle der Lipide als eine Energiequelle während der Oozytenreifung und frühen Embryonalentwicklung	23
2.4.1. Bedeutung der Lipide in den Oozyten während der Reifung und Befruchtung	24
2.4.2. Veränderung der Lipide in Embryonen.....	28
2.5. Serum als Zusatz zum Medium.....	30
2.6. Methoden zum Nachweis von Lipiden.....	35
3. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1. Untersuchungsmaterial.....	37
3.2. Gewinnung der Ovarien.....	42
3.3. Gewinnung und Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK).....	42
3.4. In-vitro-Maturation (IVM).....	44
3.5. In-vitro-Fertilisation (IVF)	44
3.5.1. Spermienaufbereitung	44
3.5.2. Befruchtung	45
3.6. In-vitro-Kultivierung.....	45
3.7. Beurteilung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten und der Kerne in den Embryonen und Bestimmung der Verteilung und Aktivität von Lipidtropfen im Ooplasma	45
3.7.1. Entfernen des Cumulus oophorus.....	45
3.7.2. Färbung von Lipiden	46
3.7.3. Fixierung.....	46
3.7.4. Färbung des Chromatins in den Zellkernen	48
3.7.5. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	48
3.8. Statistische Auswertung.....	49

4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	Untersuchungen zur Veränderung des Chromatins in bovinen Oozyten während der IVM	50
4.2.	Untersuchungen zu den Veränderungen der Lipide in bovinen Oozyten während der IVM	53
4.2.1.	Untersuchungen zu den Lipidmustern im Ooplasma boviner Oozyten	53
4.2.2.	Untersuchungen zum Lipidgehalt, gemessen an der Intensität der Fluoreszenz	57
4.3	Untersuchungen zur Entwicklungskompetenz von Oozyten unterschiedlicher Klassen.....	61
4.4	Untersuchungen zum Lipidgehalt in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Serumsupplementierung während der in vitro Entwicklung	61
4.4.1	Einfluss verschiedener Seren während der IVM	61
4.4.2	Einfluss verschiedener Seren auf den Lipidgehalt während der Embryonalentwicklung.....	66
5	DISKUSSION	72
5.1	Untersuchungen zu nukleären Veränderungen in Oozyten der COK-Klassen I bis IV	72
5.2	Untersuchungen zum Lipidgehalt und Lipidmuster in Oozyten der COK-Klassen I bis IV	74
5.3	Entwicklungskompetenz der Oozyten der COK-Klassen I bis IV	78
5.4	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Seren	79
5.4.1	Untersuchungen zum Einfluss der Seren während der IVM	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	83
7	SUMMARY	85
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
9	ANHANG	121
9.1	Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Gewinnung der Eizellen, der In-vitro-Maturation, -Fertilisation und -Kultivierung.....	121
9.1.1	Medium zur COK-Gewinnung	121
9.1.2	Medien für die Maturation und Kultivierung	121
9.1.3	Serum.....	123
9.1.4	Kapazitations- und Befruchtungsmedium (Sperm-TALP, Fert-TALP).....	124
9.1.5	Heparin- Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium	125
9.1.6	Gentamycin-Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium.....	125
9.1.7	Hypotaurin-Epinephrin-Stamm-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium.....	125
9.2	Medien für die zellphysiologischen Untersuchungen.....	126
9.2.1	Trypsin-EDTA-Lösung zur Entfernung des Cumulus oophorus.....	126

9.2.2	PBS nach Dulbecco mit Polyvenylalkohol (PVA).....	126
9.2.3	Nilrotfärbung	127
9.2.4	Fixationslösung Paraformaldehyd (3%)	127
9.2.5	PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	127
9.2.6	Chromatinfärbung Hoechst 33258	127
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	128
11	DANKSAGUNG	129

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AI	Anaphase I
Akt. Chr.	Aktiviertes Chromatin
BME	Basal Medium
BOEC	bovine oviductal epithelial cells
Diak.	Diakinese
Dipl.	Diplotän
COK	Cumulus-Oozyten-Komplex
ECS	estrus cow serum
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie
GZ	Granulosa Zellen
gER	glattes endoplasmatisches Retikulum
GV	Germinalvesikel
GVBD	germinal vesicle breakdown
ICM	inner cell mass
IVC	In-vitro-Kultivierung
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
LD	Lipiddroplets, Lipidtröpfchen
LH	Luteinisierendes Hormon
MI	Metaphase I
MII	Metaphase II
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MEM	minimal essential medium
MPF	maturation promoting factor
PB	polar body (Polkörper)
PBS	phosphate buffered saline
PVA	Polyvenylalkohol

rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
SOF	synthetic oviductal fluid
TCM	tissue culture medium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TI	Telophase I

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1:	Versuchsabschnitt 1	39
Abb. 3-2:	Versuchsabschnitt 2	40
Abb. 3-3:	IVP	41
Abb. 3-4:	Anfärbung von Oozyten und Embryonen.....	47
Abb. 4-1:	Kernreifungsstadien	50
Abb. 4-2:	denudierte Oozyten vor und nach Maturation in vitro.....	53
Abb. 4-3:	Lipidmuster in Rinderoozyten	54
Abb. 4-4:	Prozentuale Häufigkeit der verschiedener Lipidmuster in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration	56
Abb. 4-5:	Fluoreszenzintensität der Lipide in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Klasse vor und nach IVM.....	57
Abb. 4-6:	Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den COK-Klassen und dem Verteilungsmuster vor der IVM	58
Abb. 4-7:	Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den COK-Klassen und dem Verteilungsmuster nach der IVM.....	59
Abb. 4-8:	Floureszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration	60
Abb. 4-9:	Embryo im Vierzellstadium und im Stadium der Blastozyste	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe	43
Tabelle 4-1:	Die Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der IVM unabhängig von COK-Klassen	51
Tabelle 4-2:	Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in Abhängigkeit von der Reifungsdauer und der Cumulismorphologie	52
Tabelle 4-3:	Häufigkeit der Verteilung verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM unabhängig von der COK-Klasse	55
Tabelle 4-4:	Prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Lipidmuster in Oozyten der verschiedenen COK-Klassen vor und nach der IVM.....	55
Tabelle 4-5:	Lipidintensität im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den Verteilungsmustern	58
Tabelle 4-6:	Entwicklungsrates von Oozyten nach IVM/IVF in Abhängigkeit von der COK-Klasse	61
Tabelle 4-7:	Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der IVM in Abhängigkeit vom Serumzusatz	62
Tabelle 4-8:	Häufigkeit der Verteilung verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM in Abhängigkeit vom Serumzusatz	62
Tabelle 4-9:	Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit vom Serum während der IVM	63
Tabelle 4-10:	Fluoreszenzintensität von Lipiden im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den Verteilungsmustern, der Reifungsdauer und dem Serumzusatz	64
Tabelle 4-11:	Fluoreszenzintensität von Lipiden in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinstruktur, der Reifungsdauer und dem Serumzusatz	65
Tabelle 4-12:	Embryonalentwicklung von in vitro fertilisierten Rinderoozyten in Abhängigkeit vom Serumzusatz	67
Tabelle 4-13:	Anzahl der Zellkerne in Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung	67
Tabelle 4-14:	Anteil an Embryonen mit Mitosen in Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung	68
Tabelle 4-15:	Anteil an degenerierten Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung	68
Tabelle 4-16:	Fluoreszenzintensität (μA /Embryo) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen	69

Tabelle 4-17: Prozentualer Anteil der einzelnen Verteilungsmuster in Abhängigkeit vom Serum und des Entwicklungsstadiums	69
Tabelle 4-18: Fluoreszenzintensität der Lipide in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen und dem Verteilungsmuster	71

1. EINLEITUNG

In den vergangenen vier Jahrzehnten wurde auf nationaler und internationaler Ebene das Verfahren zur Erzeugung von Rinderembryonen (IVP) erarbeitet und stetig verbessert.

Erfolgversprechende IVP-Systeme für die Reifung von Oozyten, ihre Befruchtung und die Kultivierung von Embryonen haben zu dem kommerziellen Verfahren „In-vitro-Produktion von Embryonen“ geführt.

Einige Zuchtorganisationen bieten die IVP im Rahmen ihres Serviceangebotes an. Ziel hierbei ist die Steigerung der Nachkommenanzahl genetisch wertvoller weiblicher Tiere bei gleichzeitiger Verkürzung des Generationsintervalls und die Erzeugung von Nachkommen von graviden Rindern. Im Jahr 2008 wurden etwa 32% der durch Embryotransfer übertragenen Rinderembryonen in vitro produziert. Nach IVP liegt der Prozentsatz der produzierten, transfertauglichen Blastozysten zwischen 30-45%.

Obwohl in den letzten 30 Jahren die IVM- und IVF-Protokolle verbessert werden konnten, bleibt die Methode dennoch Gegenstand der Forschung. Hier ist sie eine wichtige Basistechnologie für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen wie z.B. Eizellreifung, Kerntransfer, Geschlechtsbestimmung, Präimplantationsdiagnostik, Fertilitätskontrolle von Spermien und Spermieninjektion.

Parameter zur Charakterisierung der Oozytenqualität sind für die Vorhersage der Entwicklungskompetenz dieser Oozyten von großer Bedeutung. Ein detailliertes Wissen kann helfen, die In-vitro-Bedingungen weiter zu verbessern und eine höhere Rate transfertauglicher Embryonen nach Anwendung von In-vitro-Techniken zu erhalten.

Der Prozentsatz in vitro erzeugter Blastozysten ist ein Parameter, anhand dessen die Qualität von IVP-Systemen beurteilt wird. Die Entwicklungskompetenz der Oozyten wird zum einen von der Eizellqualität (KHURANA und NIEMANN 2000b; TAMASSIA et al. 2004) und von den Herkunftsfollikeln (LEQUARRE et al. 2005) sowie von der Qualität der verwendeten Spermien (FISCHER-BROWN et al. 2002) beeinflusst. Es scheint, dass selbst gute In-vitro-Bedingungen die Blastozystenrate nicht über das durch die Qualität der Gameten festgelegte Potential hinaus steigern können (MANRIQUE 2008). In vitro erzeugte Zygoten entwickelten sich in gleichem Maße zu Blastozysten, unabhängig davon, ob sie in vivo (34,5%) oder in vitro (34,1%) weiterentwickelt wurden (RIZOS et al. 2002).

Neben vielen anderen Komponenten ist der Lipidgehalt in Oozyten und Embryonen ein wichtiger Parameter für ihre Qualität und Kryotoleranz. Der Lipidgehalt in unreifen Oozyten korreliert mit der morphologischen Erscheinung des Zytoplasmas (LEROY et al. 2005). So enthielten Oozyten mit gleichmäßig dunklem Zytoplasma signifikant mehr

intrazelluläre Lipide in Form von Lipidtropfen als Oozyten mit granuliertem oder blassem Zytoplasma. Die visuelle Beurteilung der noch unreifen Oozyten im Hinblick auf eine gezielte Auswahl der Oozyten mit dem größtmöglichen Entwicklungspotential ist eine allgemein praktizierte Vorgehensweise (GREVE et al. 1993; ; GORDON und LU 1990; KHURANA und NIEMANN 2000b).

Es ist aber nicht unproblematisch, Urteile über funktionelle Zustände ausschließlich aus morphologischen Merkmalen abzuleiten. Deshalb werden immer wieder Anstrengungen unternommen, diagnostische Funktionsprüfungen einzuführen, die geeignet sein könnten, Zustandsbeurteilungen von Oozyten sicherer und objektiver zu machen und die etablierte morphologische Beurteilung zu ergänzen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluss des Lipidgehaltes in Oozyten von Rindern der Rasse Deutsches Fleckvieh auf ihre Entwicklungsfähigkeit nach IVF zu untersuchen und damit einen weiteren Parameter für die Entwicklungskompetenz der Oozyten zu erarbeiten. Es sollten Basisdaten des Fettgehaltes in Oozyten vor und nach der Reifung, sowie während der frühen embryonalen Entwicklung erarbeitet werden.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Seren als Zusatz zum Medium auf den Lipidgehalt in Oozyten und ihre Entwicklungsfähigkeit untersucht. Zusätzlich wurde die Qualität der mit unterschiedlichen Serumzusätzen entwickelten Blastozysten anhand der Kernzahlen beurteilt.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Oozytenreifung

Der komplexe Prozess der Oozytenreifung (Maturation) umfasst die Kernreifung, die Zytoplasmareifung und die molekulare Reifung (GORDON 2003; SIRARD et al. 2006). Hierdurch erlangt die Oozyte die Fähigkeit zur Fortführung und Vollendung der ersten meiotischen Reifeteilung, der sich anschließenden Entwicklung bis zur Metaphase II sowie der zytoplasmatischen Reifung als Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation (EPPIG et al. 1993; OTZDORFF 2006). Die Kompetenz zur Wiederaufnahme der Meiose erwirbt die Oozyte während der Wachstumsphase mit Bildung des Antrums im Verlauf der Follikelentwicklung vom Primär- zum präovulatorischen Follikel (SORENSEN und WASSARMAN 1976; SIRARD et al. 2006). Es werden maternale Transkripte produziert und akkumuliert, die für die Vollendung der Meiose, der späteren Fertilisation, der mitotischen Teilungen und schließlich für die Aktivierung des embryonalen Genoms erforderlich sind (KATZ-JAFFE 2009). Obwohl der meiotische Prozess im Diktyotänstadium unterbrochen ist, werden während dieser Phase für die Reifung und Befruchtung notwendige Protein- und RNA-Reserven angelegt. Sie sind für den Erwerb der meiotischen Kompetenz essentiell (BLEIL und WASSARMAN 1980a; SHIMIZU et al. 1983; HYTTEL et al. 1997; MARX 2002; OTZDORFF 2006).

Das Ergebnis aller Reifungsprozesse an und in der Oozyte ist eine haploide, sekundäre Oozyte, die das für die erfolgreiche Fertilisation und embryonale Entwicklung notwendige biologische Material enthält (HYTTEL et al. 1997). Die Maturation ist das Schlüsselereignis im Verlauf der IVP von Säugetierembryonen (OTZDORFF 2006).

2.1.1. Oozytenreifung in vivo

In vivo ist die Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hypophyse das Startsignal für die finale Follikelreifung und die Wiederaufnahme der Meiose (SIRARD et al. 1989; MIHM und AUSTIN 2002; SIRARD et al. 2006; RICHARD 2007).

Die komplexen Maturationsprozesse werden sowohl durch hemmende als auch fördernde Faktoren beeinflusst (HYTTEL et al. 1997). Der präovulatorische Anstieg der Gonadotropine löst zeitgleich zur Reifung des präovulatorischen Follikels die Endreifung der Oozyte aus (TSAFRIRI et al. 1982; SIRARD et al. 1992; HYTTEL et al. 1997; BEVERS et al. 1997; HAENISCH-WOEHL 2003). Für die Wirkung von LH als Auslöser des germinal vesicle breakdown (GVBD) in vivo wird eine Lockerung der gap

junctions diskutiert, wodurch der Übertritt inhibitorischer Substanzen in die Oozyte blockiert wird (LARSEN et al. 1987; OTZDORFF 2006).

Die innerhalb von 24h ablaufende Endreifung umfasst sowohl die Prozesse im Kern der Oozyte (Kernreifung) als auch die zytoplasmatischen Reifungsvorgänge.

Während der Kernreifung wird die Meiose fortgesetzt und das Germinalvesikelstadium bis zur Bildung der zweiten Metaphaseplatte (M II) weitergeführt. Im Zuge der zytoplasmatischen Reifung erhält die Oozyte aufgrund molekularer und struktureller Veränderungen die vollständige Befruchtungs- und Entwicklungskompetenz (HYTTEL et al. 1997; BEVERS et al. 1997; HEGELE-HARTUNG et al. 1999; HAENISCH-WOEHL 2003).

Es besteht allgemein die Annahme, dass sich eine entwicklungskompetente Eizelle nach erfolgter Fertilisation zur Blastozyste entwickelt. Aus diesem Verständnis heraus wird häufig die Blastozystenrate als Parameter für die Entwicklungskompetenz von Oozyten herangezogen, obwohl dies durchaus auch kritisch kommentiert wird (FULKA et al. 1998; LONERGAN und FAIR 2008).

Kernreifung

Während der meiotischen Reifung kommt es zu folgenden gut koordinierten Veränderungen im Kern: Kondensierung des Chromatins, Auflösung der Kernmembran, Aufbau des Spindelapparates, Ausstoß des ersten Polkörperchens in den perivitellinen Raum und die Bildung der zweiten Metaphaseplatte.

Die Wiederaufnahme der Kernreifung im Diktyotänstadium der ersten meiotischen Prophase ist durch den germinal vesikel breakdown (GVBD) charakterisiert (EPPIG 1993; WASSARMAN und ALBERTINI 1994; OTZDORFF 2006). In vivo zeigt sich der GVBD ca. 4-8h nach dem LH-Peak (GORDON 2003).

Ursächlich für die Auflösung der Kernmembran ist die Zerstörung des laminären Netzwerkes (EPPIG 1993; OTZDORFF 2006) aufgrund der Phosphorylierung des MPF (maturation promoting factor). Die Kinasen MPF und MAPK (mitogen-activated protein kinase) spielen während des Reifungsprozesses als Regulatoren bei der Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung eine entscheidende Rolle. (MARX 2002; FAN und SUN 2004).

Die Reifungsvorgänge im Zytoplasma und im Kern werden wesentlich durch diese Zellzyklusregulatoren gesteuert (GORDON 2003; PONEBSEK 2005). Die Aktivierung von MAPK und MPF erfolgt gleichzeitig nach Induktion der Eizellreifung (FISSORE et al. 1996; WEHREND und MEINECKE 2001). Ihre Aktivität steigt bis zur Metaphase I stetig an. Während der Anaphase und Telophase der ersten Reifeteilung lässt die MPF-Aktivität nach, während die MAPK-Aktivität bis zur Aufhebung des Meioseblocks in der Metaphase eine gleichbleibende Aktivität zeigt und erst bei der Befruchtung

wieder inaktiviert wird (PAVLOK et al. 1997; MARX 2002). Während des Überganges von der Telophase I zur Metaphase II steigt die MPF-Aktivität wieder an.

MAPK wird durch eine Enzymkaskade aktiviert (FISSORE et al. 1996). Nach Phosphorylierung einer MAPKK wird die MAPK aktiviert (KOSAKO et al. 1994; MARX 2002). Die Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase C, cAMP und Proteinphosphatase-Modulatoren reguliert. Die Hauptfunktion der MAPK liegt in der Phosphorylierung verschiedener Zielproteine, die bei der Modulation der Genexpression, der Organisation des Zytoskelettes und bei der Aktivierung anderer Kinasen und Proteine beteiligt sind.

Während der Synthesephase des Zellzyklus in der Fetalentwicklung werden neben der Verdoppelung der DNA auch Proteine hergestellt, die für die Aktivierung des MPF zuständig sind.

Prä-MPF (GAUTIER et al. 1991) ist ein Komplex aus dem phosphorylierten Protein p34cdc2 (Cell-division-Cycle 2) und Cyclin B. Durch Dephosphorylierung des p34-Proteins und Phosphorylierung des Cyclin B wird MPF aktiviert (MARX 2002; LEE et al. 1992) und kann Oozyten, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden, in die M-Phase überführen (NURSE 1990; EPPIG 1993; KUBELKA 2000; MEINECKE und KRISCHEK 2003).

Während der Metaphase I werden die Chromosomen äquatorial angeordnet. Nach der Anaphase und Telophase der ersten Reifeteilung entstehen zwei Zellen mit je einem haploiden Chromosomensatz (SIRARD et al. 1989; HYTTEL et al. 1997; HAENISCH-WOEHL 2003). Nach einer kurzen Interkinesephase arretiert der Zellzyklus mit dem Erreichen der Metaphase II erneut. Eine identische Replikation der Chromosomen findet nicht statt. Die erneute Aktivierung der Meiose erfolgt nach der Penetration des Spermiums. Erst dann werden Anaphase und Telophase II durchlaufen (DOMINKO und FIRST 1997; NEBREDA und FERBY 2000, HAENISCH-WOEHL 2003).

Zytoplasmatische Reifung

Die zytoplasmatische Reifung ist eng mit der Kernreifung abgestimmt. Als Antwort auf den LH-Peak wird von den Granulosazellen der Follikelwand epidermal growth factor (EGF)-like Peptid sezerniert. Es kommt zur Wiederaufnahme der Meiose (PARK et al. 2004; GILCHRIST und THOMPSON 2007). Neben der Kernreifung kommt es zu einer Umstrukturierung des Zytoplasmas und zu einer Änderung der biochemischen Funktionen. Kortikale Granulae lagern sich peripher an die Zytoplasmamembran an, während sich die Mitochondrien perinukleär gruppieren. Es werden kontinuierlich Lipide eingelagert und der Golgi-Apparat reduziert (GORDON 2003). Die Lipide sind essentielle Energieressourcen zur Unterstützung der Oozyte während der Maturation und der frühen Embryonalentwicklung. Die Lipidkomponente in den Oozyten des

Rindes besteht größtenteils aus Triglyceriden (FERGUSON und LEESE 1999; KIM et al. 2001; GORDON 2003).

2.1.2. Oozytenreifung in vitro

Für eine erfolgreiche IVF ist nicht nur die Kernreifung, sondern auch die zytoplasmatische Reifung erforderlich (SÜSS et al. 1988; DE LOOS et al. 1992; NIEMANN und MEINECKE 1993; FAIR et al. 1995; SOSNOWSKI J. et al. 1995; HEGELE-HARTUNG et al. 1999; MERMILLOD et al. 1999; CETICA et al. 1999a; CETICA et al. 1999b).

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die In-vitro-Maturation boviner Oozyten schlechtere Resultate bezüglich der Entwicklung zum Morula- und Blastozystenstadium liefert als die In-vivo-Maturation (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. 1987; THOMPSON et al. 1995; SIRARD und BLONDIN 1996; RIZOS et al. 2002; GILCHRIST und THOMPSON 2007; HASHIMOTO 2009).

Eine mögliche Erklärung für die geringere Entwicklungskompetenz der in vitro gereiften Oozyten ist die beeinträchtigte zytoplasmatische Reifung (HYTTEL et al. 1986; NAGANO et al. 2006; GILCHRIST und THOMPSON 2007; HASHIMOTO 2009).

Die In-vitro-Maturation unterscheidet sich von der In-vivo-Maturation in zwei entscheidenden Punkten.

Zum einen stammen die Oozyten überwiegend aus Antralfollikeln mittlerer Größe. Die Oozytenkomplexe besitzen noch nicht die volle molekulare und zelluläre Ausstattung, die für eine erfolgreiche Embryogenese erforderlich ist. Während der frühen Stadien des Wachstums der Antralfollikel in vivo synthetisieren die Oozyten aktiv RNA (FAIR et al. 1995; GILCHRIST und THOMPSON 2007). Die Oozyten können im Verlauf der Follikulogenese ihr Größenwachstum abschließen. Dann ruht die Proteinsynthese und erst in dieser auch als Kapazitation der Oozyte (HYTTEL et al. 1997) bezeichneten Phase, erlangt die Oozyte die volle Kompetenz zur weiteren Entwicklung (GILCHRIST und THOMPSON 2007). Dieser Prozess wird durch die mechanische Entfernung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) aus dem physiologischen Follikelumfeld unterbrochen. Die Meiose inhibierenden Faktoren von Seiten des Follikels fehlen und es kommt zur spontanen meiotischen Reifung über unterschiedliche intrazelluläre Enzymkaskaden.

In vivo hingegen geschieht die Maturation als Folge einer kaskadenartigen Reaktion auf die Gonadotropinausschüttung (GILCHRIST und THOMPSON 2007).

GORDON (2003) unterteilt die Oozytenmaturation in eine induktive Phase und eine Synthesephase. Die induktive Phase dauert 6-8h bis zum GVBD, die zweite Phase

dauert ca. 18h, in ihr kommt es zur Neustrukturierung der Kernsubstanz und der zytoplasmatischen Elemente.

Die zytoplasmatische Reifung ist durch Interaktionen der Oozyten mit den umgebenden somatischen Zellen beeinflusst. Cumuluszellen sind eine Subpopulation der die Oozyten umgebenden Granulosazellen und stehen mit der Eizelle funktional und physikalisch in Verbindung (SUZUKI et al. 2000; RODRIGUEZ et al. 2009). Die Kommunikation erfolgt bidirektional über gap junctions (GANDOLFI et al. 2005; RODRIGUEZ et al. 2009). Durch die Übertragung von Nährstoffen ins Innere der Oozyte unterstützen die Cumuluszellen die Erlangung der Entwicklungskompetenz der Oozyte (BOGLIOLO et al. 2007).

CHIAN und SIRARD (1995) konnten zeigen, dass sich Proteinsynthesemuster während der IVM in Oozyten mit und ohne Cumulusausstattung unterscheiden, so dass von einem positiven regulativen Effekt der Cumulusausstattung auf die Oozyte ausgegangen wird (GORDON 2003). Die Cumulusmorphologie von Oozyten wird als Parameter für die Entwicklungskompetenz bei der Selektion von COK nach der Gewinnung herangezogen. Trotz unterschiedlicher Einteilung von COK-Klassen und unterschiedlicher IVP-Systeme wurde eine Korrelation von Cumulusausstattung und Blastozystenraten festgestellt (KHURANA und NIEMANN 2000; BONI et al. 2002; YUAN et al. 2005; NAGANO et al. 2006).

Der Verbund der Oozyte mit somatischen Zellen bewirkt das zeitgerechte Auftreten des aktiven MPF, das wiederum unabdingbar für den Reifungsprozess ist.

Verschiedene Konzentrationen von FSH und LH, als Zusätze zum Maturationsmedium, verbessern die Cumulusexpansion, die anschließende Befruchtung und die embryonale Entwicklung. Der Effekt von FSH wurde unter Zugabe von 10% Serum verstärkt (CALDER 2003). Die Wirkung von FSH auf die Kernreifung wird über die Regulierung von cAMP als second messenger vermittelt (Maus: WEBB et al. 2002). Da es auch ohne hormonelle Stimulation zu einer spontanen Wiederaufnahme der Meiose kommt, wird die Auslösung des GVBD nicht alleine durch die Hormonwirkung initiiert.

Neben der unvollständigen zytoplasmatischen Maturation ist auch die mRNA-Expression nach In-vitro-Reifung gegenüber in vivo gereiften Oozyten verändert (LONERGAN et al. 2003; NAGANO et al. 2006), obwohl die Kernreifung in vitro vollendet wird (HYTTEL 1986).

2.2. Fertilisation

2.2.1. Fertilisation in vivo

Obwohl die Spermien aus dem Epididymis voll motil sind, sind sie erst nach einem durchlaufenen Reifungsprozess befruchtungsfähig. Für den erfolgreichen Reifungsprozess des Spermiums sind zwei Vorgänge von Bedeutung: die Kapazitation und die Akrosomenreaktion.

Ejakulierte Säugetierspermien gelangen eigenbeweglich durch die Cervix. Nach etwa 1-3 Stunden erreichen sie die Eileiterampulle. Beim Wiederkäuer wurde das Erreichen der Ampulle schon nach 6-8 Minuten beschrieben (SCHNORR 1996). Während der Passage durch den weiblichen Genitaltrakt werden die Reifungsprozesse der Spermien induziert (HUNTER et al. 1987; YANAGIMACHI 1994). Die Spermien werden in einem Reservoir im Isthmus des Eileiters gespeichert. Beim Rind verbleiben sie dort präovulatorisch ca. 18-20h. Es wird angenommen, dass dort ein Großteil der Kapazitation abläuft (HUNTER und WILMUT 1984; HAENISCH-WOEHL 2003).

Die Kapazitation umfasst eine Reihe noch nicht detailliert geklärt, biochemischer und biophysikalischer Vorgänge, aus denen Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen, des Metabolismus, der Membranstruktur und des Membranpotentials resultieren (TÖPFER-PETERSEN et al. 1996; MARX 2002). Das Spermium erhält eine hyperaktive Motilität, die eine aktive Bewegung hin zur Eizelle ermöglicht (SUAREZ et al. 1991; MARX 2002). Insgesamt ist die Kapazitation Voraussetzung für die Zona Pellucida (ZP) induzierte Akrosomenreaktion, die erfolgreiche Zonapenetration sowie die Fusion des Spermiums mit der Oozyte (TÖPFER-PETERSEN et al. 1996).

Die speziesspezifische Erkennung der beiden Gameten findet weitgehend an der Zona Pellucida statt (MARX 2002; LITSCHER et al. 2009). Nach der Bindung eines Spermiums an die Oozyte kommt es zur Akrosomenreaktion. Die äußere Akrosomenmembran fusioniert mit der Plasmamembran und es entstehen Poren, durch die u.a. lytische Enzyme wie Hyaluronidase und Akrosin zur Auflösung des Cumulus Oophorus freigesetzt werden. Mit Hilfe dieser Enzyme kann das hyperaktivierte Spermium die Zona Pellucida erreichen, penetrieren und mit dem Oolemm fusionieren (TÖPFER-PETERSEN et al. 1996; SCHNORR 1996; MARX 2002).

Beim Rind läuft die Akrosomenreaktion erst vollständig ab, wenn das Spermium an die ZP bindet (CROZET 1984). Die Bindung des Spermienkopfes an die Plasmamembran erfolgt rezeptorvermittelt (CRAN 1989; MARX 2002; LITSCHER et al. 2009). CROZET (1984) identifizierte Spermarezeptoren in der ZP von Säugetieren. Auf der

Plasmamembran sind speziesspezifische egg binding proteins lokalisiert, die die Bindung des Spermiums an die Zona Pellucida vermitteln. Mit der Gametenfusion verbinden sich die Mikrofortsätze der Oozyte mit dem Äquatoralsegment des Spermienkopfes und der Akrosomenbereich verschmilzt mit dem Ooplasma. Die Freisetzung des Inhaltes der kortikalen Granulae beginnt kurz vor bzw. während dieses Prozesses (HYTTEL et al. 1989; MARX 2002; LITSCHER et al. 2009). Die freigegebenen Enzyme bewirken das „zona hardening“. Bei dieser Reaktion werden die Bindungsstellen für Spermien an der Oozytenmembran zerstört. Das Eindringen weiterer Spermien ist dadurch nicht mehr möglich. Dieses Phänomen wird auch als Polyspermieblock bezeichnet (PICTON et al. 1998; SCHNORR 1996).

Die frühestmögliche Interaktion der Gameten findet zwei bis drei Stunden post inseminationem statt (HYTTEL et al. 1989).

Sofort nach der Penetration des Spermiums dekondensiert das Chromatin des männlichen Vorkernes und die Kernhülle verschwindet. Die Oozyte vollendet die zweite meiotische Teilung und schleust das zweite Polkörperchen in den perivitellinen Raum aus. Die verbliebenen Chromosomen der Oozyte bilden den weiblichen und die Chromosomen des Spermienkopfes den männlichen Vorkern. Als Syngamie wird der Vorgang bezeichnet, im Verlauf dessen sich die beiden Vorkerne aufeinander zu bewegen und im Zentrum der Oozyte verschmelzen (XU und GREVE 1988; SCHNORR 1996). Die Chromosomen vermischen sich und die Syngamie ist mit der Anordnung der Chromosomen in der Teilungsebene abgeschlossen. Es entsteht eine Zygote mit diploidem Chromosomensatz, die sich in nachfolgenden mitotischen Teilungen zum Embryo weiter entwickeln kann.

2.2.2. Fertilisation in vitro

Eine vollständig abgeschlossene Reifung der Oozyte und die Kapazitation des Spermiums sind die Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung im in vitro System. Die noch nicht vollständig geklärten Mechanismen der Kapazitation erschweren es, optimale Bedingungen für eine In-vitro-Befruchtung zu schaffen.

Um die Kapazitation der Spermien außerhalb des weiblichen Genitaltraktes zu ermöglichen, werden dem Medium zur Fertilisation Glykosaminoglycane zugegeben. Diese wurden im Reproduktionstrakt vom Rind nachgewiesen und für die Destabilisierung der Spermienmembran verantwortlich gemacht (LEE und AX 1984). Sowohl in vivo als auch in vitro wurde N-Acetylglycosamin von Eileiterepithelzellen synthetisiert (WEGNER und KILIAN 1992; GORDON 2003). Es wird angenommen, dass es die ZP modifiziert und dadurch Interaktionen mit dem Spermium beeinflusst. Aufgrund eines ähnlich günstigen Effektes wird heute oft Heparin oder eine

Kombination aus Heparin, Hypotaurin und Epinephrin als Zusatz zum Fertilisationsmedium verwendet (MILLER et al. 1994; MARX, 2002). Der Heparineffekt wird durch heparinbindende, oberflächenassoziierte Proteine vermittelt (UGUZ et al. 1994; STOREY 2008) und ist spezies- und konzentrationsabhängig (PARRISH et al. 1988; PARRISH et al. 1989; HAENISCH-WOEHL 2003). Es ist zu beachten, dass die zugesetzte Menge Heparin aufgrund der individuellen Wirkstärke für Bullen, die für die In-vitro-Befruchtung eingesetzt werden, extra getestet und bestimmt werden sollte (SCHMELL 1983).

Es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} (TÖPFER-PETERSEN et al. 1995; PARRISH et al. 1999; STOREY 2008) sowie zu einem intrazellulären pH-Anstieg (VREDENBURGH-WILBERG und PARRISH 1995; STOREY 2008).

Ein anderer Effekt ist der intrazelluläre Anstieg von cAMP durch die Proteinkinase A, der durch Antagonisten (Rp-Adenosin-3', 5'-zyklisches Monophosphorothionat) gehemmt werden kann, jedoch in keinem ursächlichen Zusammenhang mit dem intrazellulären pH-Anstieg steht (UGUZ et al. 1994; STOREY 2008).

Für die Spermien vieler Säugetierarten (WILLIAMS und FORD 2001; STOREY 2008) wird Glucose zur Energiegewinnung für verschiedene, unter dem Begriff der Kapazitation subsummierten, Vorgänge benötigt. Beim Bullen ist die erfolgreiche In-vitro-Kapazitation an den Zusatz von Heparin zum Kapazitationsmedium gebunden (PARRISH et al. 1988; STOREY 2008). Die Zugabe von 5mM Glucose zum Medium blockiert die heparinbedingte Kapazitation (PARRISH et al. 1989; STOREY 2008). Zwei mögliche Wirkungsweisen der glucoseinduzierten Hemmung der Kapazitation werden in Betracht gezogen. Zum einen wird durch die Steigerung der Aktivität der Phosphodiesterase des Spermiums intrazelluläres cAMP reduziert, zum anderen wird der Anstieg des pH-Wertes in der Zelle verhindert. GALANTINO-HOMER et al. (2004) widerlegten die erste These, indem sie zeigen konnten, dass Glukose keinen Effekt auf die Aktivität von Phosphodiesterase bei Bullenspermien hatte. Die Rate von anaerober Glykolyse in den Spermien war nach Zusatz von 5mM Glukose so hoch, dass die Produktion von Laktat den intrazellulären pH-Wert zu senken vermochte.

Die Kapazitationshemmung durch Glukose tritt in vivo im weiblichen Genitaltrakt nicht auf, da die Glukosekonzentration nur ca. 50-100 μ M (CARLSON et al. 1970; STOREY 2008) beträgt. Ungeklärt bleibt bisher, auf welche Weise Heparin den Anstieg des intrazellulären pH-Wertes bewirkt.

Die während der Kapazitation eintretenden biochemischen Veränderungen führen zu einer Erhöhung der Spermienmotilität, die als Hyperaktivierung bezeichnet wird (YANAGIMACHI 1994).

Der Eintritt in die Cumulusmasse ist für die Kapazitation des Spermiums essentiell (YANAGIMACHI, 1994; KIM et al. 2008). Nach einer Entfernung des Cumulus in vitro ist die Befruchtungsrates deutlich reduziert (YANAGIMACHI 1994; KIM et al. 2008). Obwohl die Rolle der Cumulusmatrix noch nicht aufgeklärt ist, wird eine Stimulation der Spermienmotilität, ein Beitrag zur Vorbereitung der Akrosomenreaktion oder die Immobilisierung der Oozyte durch das fibrilläre Cumulusnetzwerk in Betracht gezogen (YANAGIMACHI 1994; KIM et al. 2008).

Nach der Passage durch die Cumuluszellen erreicht ein Spermium die ZP und bindet an deren Oberfläche. Die Zona Pellucida wird aus einigen, wenigen Glykoproteinen gebildet, die über Polypeptiddomänen dreidimensional netzartig verknüpft die Oozyte umhüllen. Bei Maus und Mensch sind drei ZP-Glykoproteine bekannt. Nach der Spermienbindung an die Bindungsdomäne über speziesspezifische egg binding proteins kommt es zur ZP3-induzierten Exozytose des Akrosoms. (YANAGIMACHI 1994; KIM et al. 2008; WASSARMAN und LITSCHER 2008). HINSCH et al. (2005) beschreiben die ZP3-induzierte Akrosomenreaktion auch für das Rind. Synthetisch hergestellte ZP3 Dekapeptide binden an die Oberfläche des Akrosoms und induzieren konzentrationsabhängig die Akrosomenreaktion. Während die ZP3-induzierte Reaktion über G-Proteine in Gang gesetzt wird, wird die ebenfalls beschriebene progesteroninduzierte akrosomale Exozytose über einen anderen Reaktionsweg ausgelöst. Die Akrosomenreaktion aufgrund der Bindung des Spermiums an das ZP3 kann durch Pertussistoxin inhibiert werden. Die progesteroninduzierte Akrosomenreaktion findet dennoch statt (HINSCH et al. 2005). G-Protein aktiviert als second messenger die Phospholipase C. Diese katalysiert die Umsetzung von Phosphatidyl-Inositol in Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, was letztlich einen Ca^{2+} -Influx bewirkt (STOREY et al. 1992; MARX 2002). Auch die Adhäsion des Spermiums an ein Zonaprotein führt zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und hierdurch zu einem Influx von Ca^{2+} in das Spermium. Der Ca^{2+} -Einstrom induziert die Akrosomenreaktion. Dieser Weg der Regulierung des Ca^{2+} und der Akrosomenreaktion ist auch beim Rind von Bedeutung (BREITBART und NOAR 1999). Der Stimulus für die Aktivierung der Eizelle bei der Fertilisation ist der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} , das aus Speichern im endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird.

Die Dauer der Inkubation von Oozyte und Spermien ist zum einen durch die Alterung der Oozyte (GORDON 2003) als auch durch den toxischen Einfluss von abgestorbenen Spermien, sowie einer in vitro vermehrt auftretenden Polyspermierate begrenzt. Meist beträgt die Inkubationszeit 18 bis 24h im Fertilisationsmedium (BRACKETT und ZUELKE 1993; LAZZARI und GALLI 1993; SHAMSUDDIN et al.

1994). Eine verlängerte Inkubationszeit konnte nicht zu einer Erhöhung der Befruchtungsraten führen (WARD et al. 2002).

Bovine Eileiterepithelzellen (BOEC), Hypotaurin und Epinephrin als Zusätze zum Befruchtungsmedium verbessern die Fertilisationsrate und die Teilungsrate (MILLER et al. 1994). Die Zusätze wirken antioxidativ und ergänzen sich in ihrer Wirkung.

2.3. Embryonalentwicklung

Nach der Befruchtung der Oozyte in der Ampulle des Eileiters (GORDON 2003) beginnt die Zellteilung innerhalb von 24 Stunden. Nach 30 Stunden entwickeln sich 2-Zellstadien, nach 48 Stunden 4- und 8-Zellstadien, nach drei und vier Tagen treten 16- bis 32-Zeller auf. Während der ersten Zellteilungen wird das Zytoplasma ohne eine Veränderung des Gesamtvolumens in kleinere Kompartimente geteilt (PLANTE und KING 1994).

In vivo gelangt der Embryo vom Rind im Stadium des 8- bis 16- Zellers von der Ampulle des Eileiters über den Isthmus in die Uterushornspitze. Am 5. bis 6. Tag der Gravidität bildet sich das Morulastadium (RÜSSE und SINOWATZ 1991; GORDON 2003), zur Kompaktierung kommt es am Tag 3 im 16- bis 32-Zell-Stadium (VAN SOOM und DE KRUIF 1992; PLANTE und KING 1994) und am 7. bis 8. Tag der Trächtigkeit bildet sich die Blastozyste (RÜSSE und SINOWATZ 1991) mit 64 bis 130 Zellen (KAUFFOLD und THAMM 1985; PLANTE und KING 1994).

Sie differenziert sich in den innen liegenden Embryoblast (inner cell mass, ICM) und den außen liegenden Trophoblast (RÜSSE und SINOWATZ 1991).

Nach der Befruchtung in der Ampulle des Eileiters profitiert der frühe Embryo von dem mütterlicherseits endokrin beeinflussten Milieu im Oviduct (GORDON 2003). Hier werden vom Epithel spezifische Glycoproteine sezerniert, die eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Embryonenentwicklung inne haben (GORDON 2003).

Der Tag der Blastozystenformation korreliert signifikant mit den Kernzahlen des Embryos. Die Kernzahl war bei Blastozysten, die sich an Tag 7 gebildet hatten höher als bei Blastozysten, die sich an Tag 6 und Tag 8 der Kultur gebildet hatten (HILL et al. 1997).

In vivo und in vitro erzeugte Embryonen zeigen Unterschiede auf ultrastruktureller Ebene, die u. a. auch die Unterschiede in der Kryotoleranz beider Embryonengruppen erklären (RIZOS et al. 2002). In vitro produzierte Embryonen zeigen einen breiteren perivitellinen Spalt, Vakuolen in Zellen des Trophoblasten, eine spärliche Ausstattung mit Mikrovilli, ein deutlich reduziertes Netzwerk intrazellulärer Verbindungen und einen massiven Anstieg des Lipidgehaltes in den Zellen (ABE et al. 1999; CROSIER et al. 2000; FARIN et al. 2001; RIZOS et al. 2002). Verschiedene Kulturbedingungen,

speziell die Supplementierung mit Serum haben einen starken Einfluss. Bei genauer Betrachtung unter dem Mikroskop zeigen sich zahlreiche Granulae in den Trophektodermzellen von Blastozysten (Rind), die mit Serum kultiviert wurden (GARDNER et al. 1994; THOMPSON et al. 1995; THOMPSON 1997).

Eine allgemeine Erscheinung bei Embryonen aus IVP ist die schwächer ausgeprägte Kompaktierung des Embryos. WRENZYCKI et al. (1996) zeigten, dass die Expression des Connexin-Gens 43, welches für ein Protein zur Bildung von Gap junctions codiert, reduziert ist. Daraus resultiert die Ausbildung von weniger Gap junctions und damit eine deutlich schwächer ausgeprägte Kompaktierung des Zellverbandes im Vergleich mit in vivo entwickelten Embryonen.

Serum-supplementierte Embryonen zeigen einen losen Zellverband im Morulastadium. Innerhalb von Stunden kann sich daraus eine Blastozyste bilden (PRATHER und FIRST 1993; PLANTE und KING 1994; SHAMSUDDIN und RODRIGUEZ-MARTINEZ 1994; THOMPSON 1997).

Der Gasgehalt und die Gaszusammensetzung des umgebenden Milieus haben Einfluss auf die In-vitro-Entwicklung der Embryonen. Der Sauerstoffgehalt im Ovidukt und Uterus ist mit 3,8-8,5% niedriger als in der Atmosphäre (21%) (BAVISTER 1995; HOSHI et al. 2003). Ein Sauerstoffgehalt von 5-10% verbessert die Entwicklung der Embryonen von Schaf und Rind, (TERVIT et al. 1972; BAVISTER et al. 1995; HOSHI et al. 2003). Der geringere Sauerstoffgehalt entspricht eher den Gegebenheiten der in vivo Bedingungen in den weiblichen Reproduktionsorganen. Den positiven Effekt könnte auch ein geringeres Auftreten von Sauerstoffradikalen im Embryo erklären.

2.4. Die Rolle der Lipide als eine Energiequelle während der Oozytenreifung und frühen Embryonalentwicklung

Fettsäuren und Lipide sind entscheidend an der strukturellen, funktionellen und metabolischen Integrität von Säugetierembryonen im Präimplantationsstadium beteiligt (REIS et al. 2003). Neben der Eigenschaft als Energiespeicher (FERGUSON und LEESE 1999) spielen sie oder ihre Derivate auch als Versorger von second messengern und als Determinanten der physikalischen Eigenschaften der Zellmembranen eine Rolle (HOMA et al. 1991; DUCIBELLA 1998). Lipide sind die Bausteine für Zellproliferation (PRATT 1978) und können darüber hinaus die Zell-Zell-Interaktionen, Membrantransporter und Rezeptoren beeinflussen (KANE et al. 1992).

Hefen dienen aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes als Modell für den Lipidstoffwechsel in eukaryotischen Zellen. Die Hauptgruppe der Lipide besteht aus Phospholipiden, Sterolen, Sphingolipiden und Glycolipiden. Sie bilden die Basis für biologische Membranen, welche die Zellen vor Umwelteinflüssen schützen. Als Lipidspeicher, die

nach Bedarf mobilisiert werden können, dienen vor allem Sterole und Fettsäuren. Letztere bilden zelluläre Energiereserven oder dienen als Bausteine komplexer Membranlipide (RAJAKUMARI et al. 2008). Sowohl die Fettsäuren als auch Sterole vermögen als Signalmoleküle die Genexpression zu beeinflussen (GARBARINO und STURLEY 2005).

Um eine potentiell toxische, membranschädigende Anreicherung von Fettsäuren und Sterolen zu umgehen, werden größere Ansammlungen von Lipiden innerhalb der Zelle separiert und in eine biologisch wenig reaktive Neutralform umgewandelt. In Hefen sind dies Triacylglycerole und Stearylester. Solche neutralen Fette werden in spezifischen Kompartimenten, den sogenannten Lipidtröpfchen (LD) gespeichert. Die Neutralität der Lipide ermöglicht die Konzentration der Lipide auf kleinem Raum, ohne die polaren Zellstrukturen zu beeinflussen. Die Lipidtröpfchen enthalten spezifische Proteine, die wesentlich in den Lipidmetabolismus involviert sind (RAJAKUMARI et al. 2008).

Unter ungünstigen Umweltbedingungen und fehlender Energiezufuhr können die gespeicherten Lipide zum einen für die Energiegewinnung mittels β -Oxidation oder als Bausteine für die Membransynthese aktiviert werden (RAJAKUMARI et al. 2008).

Es wird angenommen, dass die Lipidvesikel aus den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) generiert werden. Es wurden auch die Inkorporation von Lipiden in bestehende Lipidtröpfchen sowie die Aufnahme von Proteinen und Lipiden in Lipidtröpfchen durch Vesikeltransport beobachtet. Im Moment wird von zahlreichen Laboratorien die Lipidvesikelbildung durch Abschnürung aus dem ER favorisiert (RAJAKUMARI et al. 2008). Für diese These spricht, dass Enzyme mit Beteiligung am Lipidstoffwechsel im ER lokalisiert sind. Die Lipidtröpfchen werden von einer einschichtigen Membran umgeben, in die Proteine ohne Trans-Membran-Domänen eingebettet sind. Gleiche Proteine wurden auch im ER nachgewiesen. Neu generierte Lipidtröpfchen wurden in unmittelbarer Nähe zum ER gefunden (BLANCHETTE-MACKIE et al. 1995; ROBENEK et al. 2006; RAJAKUMARI et al. 2008).

Mittels des Hefemodells war es möglich, aufgrund der leichten nutritiven Manipulation und der vereinfachten genetischen Ausstattung erste Einblicke in die enzymatischen Schritte der Biosynthese und -katalysezyklen von neutralen Lipiden zu gewinnen.

2.4.1. Bedeutung der Lipide in den Oozyten während der Reifung und Befruchtung

KANE (1979) zeigte an Kaninchenoozyten, dass eine Entwicklung zu intakten Morulae ohne extrazelluläre Nährstoffe möglich ist. Die Kultivierung in einfacher Salzlösung, die nur fettfreies bovines Serumalbumin (BSA) enthielt, zeigte ein großes

Entwicklungspotential allein aufgrund innerzellulärer Energiereserven (FERGUSON und LEESE 1999).

Anders als Oozyten von Mensch, Pferd, Nagern, Hund und Katze enthalten die Oozyten von Schwein und Rind zahlreiche intrazytoplasmatische Lipidtröpfchen.

Bereits während der Wachstumsphase der Oocyte kommt es zu zahlreichen Umstrukturierungen der einzelnen Organellen im Zytoplasma (HYTTEL et al. 1997) und es wurden vermehrt Vakuolen und Lipidtropfen nachgewiesen.

Für den Lipidmetabolismus und -katabolismus sind mehrere Zellorganellen zuständig. Das glatte endoplasmatische Retikulum (gER) kann in zwei unterschiedlichen Formen im Zytoplasma vorliegen. Es kann gleichmäßig im Ooplasma als vesikuläre Form verteilt oder in Form großer, peripher gelegener Aggregate vorhanden sein. Im Verlauf der präovulatorischen Reifung kann vermehrt gER beobachtet werden. Als Aufgabe obliegt dem gER die Synthese von Lipiden und Steroiden (Mensch: SATHANANTHAN 2003).

Das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) ist vor allem in wachsenden Oozyten nachweisbar, fehlt jedoch in reifen Oozyten. Erst in der späteren embryonalen Entwicklung im Stadium der Morula bzw. der Blastozyste wird rER erneut beobachtet (Mensch: SANTHANANTHAN 2003; TROUNSON 2001; OTZDORFF 2006). Die Mitochondrien stellen die stärkste Organellenfraktion im Ooplasma dar (SANTHANANTHAN 2003; OTZDORFF 2006). Sie zeigen in meiotisch aktiven und reifen Oozyten eine Umverteilung im Ooplasma und eine Veränderung ihrer Form. Im Tertiärfollikel nimmt die Anzahl von Mitochondrien zu und es treten vermehrt längliche anstatt runde Formen auf. Während der Reifung finden sich häufig Aggregationen von Mitochondrien mit Lipidtropfen (Hund, Katze: SARDUL und GURAYA 1964; HYTTEL et al. 1997) bzw. sind Lipidtropfen mit dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien assoziiert und bilden eine funktionelle Trias (KRUIP et al. 1983; CETICA et al. 2002; FERGUSON und LEESE 2006).

Die Umverteilung der Strukturen im Zytoplasma im Verlauf der Maturation in die Zellperipherie korreliert möglicherweise mit metabolischen Veränderungen (KRUIP et al. 1983; FERGUSON und LEESE 2006; RAJAKUMARI et al. 2008). Die Lipide werden während der Maturation zum Teil abgebaut (KRUIP et al. 1983).

Die in unreifen und gereiften Rinderoozyten vorherrschenden Lipide sind Triglyceride (MC EVOY et al. 2000; FERGUSON und LEESE 2006). Bisher wurden sie für eine Energieressource gehalten (GORDON 2003).

In Anbetracht der Analogie zu somatischen Zellen und Geweben ist es höchst wahrscheinlich, dass Lipide als endogene Energiereserve eine wichtige Rolle spielen.

Informationen aus der Literatur über den Verbrauch von Lipiden als Substrat zur Oxidation in bovinen Oozyten im Verlauf der Maturation sind jedoch begrenzt.

Studien über den Energiemetabolismus von frühen Säugetierembryonen waren meist ausschließlich auf die Bereitstellung, die Aufnahme und den Einfluss von exogen im Kulturmedium vorhandenen Nährstoffen fokussiert (FERGUSON und LEESE 1999). KIM et al. (2001) vertreten die Meinung, dass auch Lipide und Fettsäuren des mit Serum supplementierten Maturationsmediums während der IVM ins Zytoplasma der Oozyte aufgenommen werden. SARDUL und GURAYA (1964) vermuten die Aufnahme von aus Granulosazellen bereitgestellten Lipiden über die Fortsätze der Cumuluszellen in die Zona Pellucida bei Hund und Katze. Die Annahme beruht auf histochemischen Analysen, die das Vorkommen von Lipidvesikeln mit den gleichen chemischen Eigenschaften in den Oozyten, den Granulosazellen und dem umgebenden Stroma belegen. Die Autoren denken auch an mögliche neuroendokrine Einflussfaktoren, die einen Lipidtransport zur und die Lipidaufnahme in die Zelle beeinflussen könnten. Grund für diese Annahme ist der abrupte Beginn der Lipidanreicherung ab einer bestimmten Oozytengröße bei Hund und Katze.

Hauptenergieträger in Oozyten sind Glycogen, Triglyceride und Aminosäuren (FERGUSON und LEESE 1999). Diese Substrate werden vom Stadium der Zygote bis zu dem der Blastozyste aufgenommen (PARTRIDGE 1996; THOMPSON et al. 1996; FERGUSON und LEESE 1999).

Schlüsselenzyme für den katabolen Glukose- und Triglyceridstoffwechsel im Rahmen der Energiegewinnung von Oozyten sind die Phosphofruktokinase (Glykolyse), die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (Pentose-Phosphatweg) und die Lipase (Lipolyse).

Lipasen sind Enzyme, die Triglyceride in einem ersten Abbauschritt im Fettsäurekatabolismus hydrolysieren. Die resultierenden Fettsäuren können dann in den Mitochondrien der Oozyten oxidiert werden.

CETICA et al. (2002) untersuchten die Aktivitäten der o.g. Enzyme unmittelbar nach der Gewinnung der Oozyten sowie nach 22 bis 24-stündiger Reifung in vitro. Gemessen wurden die Aktivitäten in den Cumulus-Oozyten-Komplexen und gesondert in den denudierten Oozyten und den Cumuluszellen. Auch in den Cumuluszellen sind während der Wachstumsphase boviner Oozyten Lipasen aktiv. Die entstandenen Fettsäuren stehen den Oozyten als Substrat zur Verfügung. Die Lipase war sowohl in ungerreifen als auch gereiften Oozyten aktiver als andere Schlüsselenzyme des Glucosestoffwechsels.

Die höchste Aktivität in den denudierten Oozyten zeigte die Lipase, gefolgt von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Phosphofruktokinase. In den

Cumuluszellen dagegen war die Aktivität der Enzyme genau umgekehrt. Die markante Lipaseaktivität in den Oozyten ist ein Nachweis eines aktiven Lipidkatabolismus während der Maturation (CETICA et al. 2002).

Die Oozyte ist aufgrund von relativ großen Lipidreserven im Zytoplasma mit Hilfe der Lipasen in der Lage, nach der Abtrennung der Cumuluszellen, die Lipide als oxidatives Substrat zu nutzen. Dies zeigten Untersuchungen von verschiedenen Autoren, die einen reduzierten intrazytoplasmatischen Lipidgehalt in Oozyten nach der Maturation nachweisen konnten (FERGUSON und LEESE 1999; KIM et al. 2001; CETICA et al. 2002).

Während der Expansion nimmt die Enzymaktivität von Phosphofruktokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Lipase in den Cumuluszellen ab. Nach der Denudierung entfällt die Versorgung der Oozyten durch die Cumuluszellen. Dennoch ist die Oozyte in der Lage, eigene Enzymaktivitäten aufrecht zu erhalten. Da die Aufnahme von Glucose in die Gamete nur in beschränktem Maß erfolgt, scheint die Energiegewinnung über die Lipolyse und den Pentose-Phosphatweg (JAVED und WRIGHT 1991; KRISHER und BAVISTER 1998; CETICA et al. 2002) essentiell zu sein.

Glucose-6-Phosphat in den Cumuluszellen könnte NADPH für die Synthese struktureller Lipide bereitstellen oder NADPH zur Oozyte für deren reduktive Stoffwechselreaktionen transferieren. In der Oozyte ist NADPH für die Neusynthese von Lipiden sowie die Regeneration von reduziertem Glutathion erforderlich.

Glutathion wird im Verlauf der Maturation neu synthetisiert und spielt eine unerlässliche Rolle bei der Dekondensierung des Spermienkopfes (SUTOVSKY und SCHATTEN 1997; CETICA et al. 2002).

MC EVOY et al. (1997) analysierten den Lipidgehalt in Schweineoozyten. Der Gesamtlipidgehalt (Phospholipide, Cholesterolester und freie Fettsäuren) in den Oozyten betrug 156 ng. Die Hälfte davon (75 ng) waren Triglyceride. Beim Schaf wurde ein geringerer Triglyceridgehalt (25 ng) in den Oozyten beobachtet (COULL et al. 1998). Der Gesamtlipidgehalt wurde mit 89 ng angegeben.

FERGUSON und LEESE (2006) untersuchten den Triglyceridgehalt von bovinen Oozyten im Verlauf der Maturation. In unreifen Oozyten wurde ein Triglyceridgehalt von 59 ng gemessen, der dann nach der Reifung und Befruchtung abnahm (46 bzw. 34 ng). Ähnliche Ergebnisse wurden von KIM et al. (2001) beobachtet. Diese Abnahme des Triglyceridgehaltes lässt vermuten, dass die Triglyceride als Energieressource dienen. In Übereinstimmung hierzu berichten Cetica et al. (2002) über einen Anstieg der lipolytischen Aktivität in bovinen Oozyten während der Maturation und folgerten ebenfalls, dass die Triglyceride als Energiespeicher dienen.

2.4.2. Veränderung der Lipide in Embryonen

Embryonen beinhalten Energieressourcen in Form von Glycogen, Protein und Lipiden (FERGUSON und LEESE 1999). Die Rolle von Glykogen in präimplantativen Embryonen der Maus wurde (EDIRINSINGHE et al. 1984) umfangreich untersucht. Zwei Formen von Glykogen wurden beschrieben, eine in Säure lösliche Vorform und die typische, säurelösliche Polysaccharidform, die sich im 2-Zellstadium akkumuliert und sehr wahrscheinlich bei der Implantation wichtig ist (EDIRINSINGHE et al. 1984; FERGUSON und LEESE 2006). Mengemäßig ist das Glykogen nicht ausreichend, um den Metabolismus von Mausembryonen im Präimplantationsstadium länger als einige Stunden aufrecht zu erhalten (LEESE 1991; FERGUSON und LEESE 1999). FLYNN und HILLMAN (1978, 1980) untersuchten den Stoffwechsel von Mausembryonen mittels radioaktiv markierter Glukose und Fettsäuren. Die Hauptklasse der analysierten Fette war Triacylglycerol, das in adultem Gewebe hauptsächlich als Energiespeicher dient.

Der totale Lipidgehalt in Mausembryonen betrug 4 ng (50% Cholesterol und seine Ester), das sind 10% Anteil an der Trockensubstanz (LOEWENSTEIN und COHEN, 1964). Als alleinige Energiereserve konnten die enthaltenen Lipide im Embryo die Entwicklung nur für 4-5h aufrechterhalten (LEESE 1991).

In Untersuchungen der Embryonen von Rindern betrug der Triglyzeridgehalt in den Zygoten 32 ng und veränderte sich bis zum Stadium der geschlüpften Blastozyste nicht.

Nach Zusatz von 10%-igem FCS zum Kultivierungsmedium 40 Stunden nach der Fertilisation (2- bis 4-Zellstadium) konnte festgestellt werden, dass der Triglyzeridgehalt auf das Doppelte (62 ng) des vorher gemessenen Wertes anstieg (FERGUSON und LEESE 2006).

Ein Anstieg des Triglyzeridgehaltes während der Kultivierung an den Tagen 10 (113 ng) und 11 (141 ng) konnte auch bei Schweineembryonen beobachtet werden (YOUNGS et al. 1994).

FERGUSON und LEESE (2006) schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen, dass Triglyceride obligatorisch für den Reifungsvorgang sind und für die weitere Entwicklung der Zygote zur Blastozyste eine potentielle Energiequelle darstellen. In Untersuchungen zur Inhibierung der mitochondrialen Carnitinpalmitoyltransferase durch Methylpalmoxirat wurde der Transport von Fettsäuren zum Ort der Fettsäureoxidation unterbunden. Die Entwicklung der Embryonen war mit zunehmender Methylpalmoxirat-Konzentration reduziert. Die IVM unter dem Einfluss von Methylpalmoxirat hatte einen deutlichen Einfluss auf die embryonale Entwicklung. Die endogene Fettsäureoxidation zur Energiegewinnung während der Maturation scheint

essentiell für eine erfolgreiche Embryonalentwicklung zu sein (FERGUSON und LEESE 2006).

In vitro produzierte Rinderembryonen enthalten im Vergleich mit in vivo produzierten Embryonen deutlich mehr Lipide im Zytoplasma (Schaf: THOMPSON et al. 1995; Rind: SATA et al. 1999; NAGANO et al. 2006). In vitro produzierte Embryonen sind empfindlicher gegenüber unphysiologisch niedrigen Temperaturen und der Kryokonservierung als in vivo produzierte Embryonen (POLLARD und LEIBO, 1994; HASLER et al. 1995). TOMINAGA et al. (2000) und ABE et al. (2002) führen die ausgeprägte Sensitivität gegenüber Kryokonservierung auf die relativ hohen Lipidgehalte in den embryonalen Zellen zurück.

Die Lipide in der Zellmembran sind bei Temperaturveränderungen ebenso wie intrazytoplasmatische Lipideinschlüsse Phasenübergängen unterworfen, die zu irreparablen Schäden führen können. Bereits während des Kühlens treten irreversible Veränderungen der Lipidphase im Zytoplasma auf. Lipidphasenübergänge der Zellmembran treten bei Oozyten stadiumabhängig bei unterschiedlichen Temperaturen auf (GV-Stadium zwischen 13 und 20°C, M II 10°C) (WOODS et al. 2004). Gesättigte Fettsäuren verfestigen sich, ungesättigte Fettsäuren, die bei niedrigen Temperaturen noch flüssig sind, werden separiert und bilden neue hexagonale Strukturen, die mit der Membran interagieren. In der Folge kommt es zu Veränderungen des Membrangradienten, zu einer Störung des zellulären Ionengleichgewichtes und schließlich zum Zelltod (ARAV und ROTH 2008).

Signifikante Verbesserungen der Überlebensraten von kryokonservierten und wiederaufgetauten frühen Embryonalstadien konnten nach der Lipidentfernung und Lipidpolarisation erreicht werden (OTOI et al. 1997; USHIJIMA et al. 1999; TOMINAGA 2004; SEIDEL 2006).

Der intrazelluläre Lipidgehalt ist eine Variable, auf die durch unterschiedliche IVP-Regime Einfluss genommen werden kann (SEIDEL 2006). Bovine Embryonen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, akkumulieren auf noch unbekannt Art und Weise Lipidtröpfchen im Zytoplasma (SHAMSUDDIN und RODRIGUEZ-MARTINEZ 1994; ABE et al. 1999, 2002; PEREIRA et al. 2007).

Im Vergleich mit in vivo (CHARPIGNY et al. 2003) bzw. ohne Serumzusatz (SATA et al. 1999; REIS et al. 2003; PEREIRA et al. 2007) produzierten Embryonen besitzen Rinderembryonen, die serumsupplementiert kultiviert wurden, einen signifikant höheren Lipidgehalt. PRATT et al. (1980) zeigten in ihren Untersuchungen, dass Mausembryonen Fettsäuren aus dem Kulturmedium aufnahmen und als Lipidkomponente in die Zellmembran einbauten. Einzelne Fettsäuren (Stearin- und Linolsäure) haben durch stimulatorische Effekte auf die Proteinkinase C eine

apoptotische Wirkung (YU et al. 2001; EITEL et al. 2002; SHEBAB-EL-DEEN 2009). Durch die apoptotische Wirkung auf die Cumuluszellen kann die Oozyte bereits während der Maturation und in der Folge die embryonale Entwicklung negativ beeinflusst werden (SHEBAB-EL-DEEN et al. 2009). Durch eine detaillierte Kenntnis des Lipidmetabolismus in den Zellen sowie kryobiologischer Aspekte können IVP-Systeme gemäß den Anforderungen der Zellen weiter optimiert werden.

2.5. Serum als Zusatz zum Medium

Das Zellkulturmedium für die In-vitro-Maturation kann den Anteil an entwickelten Oozyten in der Metaphase II beeinflussen. Die Wahl des Mediums wirkt sich auf die anschließende Befruchtung und auf die weitere Embryonalentwicklung aus (BAVISTER et al. 1992).

Für die Maturation, Fertilisation und Kultivierung von Oozyten und Embryonen des Rindes wurden zahlreiche unterschiedliche Zellkulturmedien entwickelt und eingesetzt (EYESTONE et al. 1989; GORDON und LU 1990; ROSENKRANS et al. 1993; TROUNSON et al. 1994; HASLER et al. 1995; FARIN et al. 1997).

Bei Zellkulturmedien, die für die extrafollikuläre Maturation von Rinderoozyten verwendet werden, unterscheidet man einfache und komplexe Medien.

Einfache Medien sind mit Bicarbonat gepufferte und mit Pyruvat, Lactat und Glukose angereicherte physiologische Salzlösungen. Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen Arten einfacher Medien besteht in ihrer Ionenkonzentration und in den Konzentrationen der Energiequellen. Die Medien sind vor allem mit Serum oder Albumin supplementiert.

Komplexe Medien enthalten zusätzlich zu den Grundbestandteilen der einfachen Medien Aminosäuren, Vitamine, Purine und andere Zusatzkomponenten.

Das am häufigsten verwendete komplexe Medium für die IVM von Rinderoozyten ist Tissue Culture Medium 199 (TCM 199).

Die Konzentrationen der Komponenten der Medien basieren auf der Zusammensetzung der Follikel-, Eileiter- und Uterusflüssigkeiten. Zusätzlich werden den Medien Wachstumsfaktoren zugesetzt, die das Zellwachstum anregen (TERVIT et al. 1972; VAN WAGTENDONK DE LEEUW et al. 2000). Die befruchteten Eizellen werden bis zum Stadium der Morula und Blastozyste kultiviert.

Während der Entwicklungsphase vom 8-Zell- zum 16-Zell-Embryo erfolgt die Umstellung vom maternalen zum embryonalen Genom. Während dieser Entwicklungsphase kommt es häufig zu einer Stagnation in der Entwicklung. Man bezeichnet diese Stagnation als In-vitro-Block, der bei verschiedenen Tierarten während unterschiedlicher Entwicklungsstadien auftritt (TELFORD et al. 1990; MARX

2002; GORDON 2003). Durch die Modifikation der eingesetzten Kulturmedien konnten die *in vitro* Bedingungen verbessert werden und der Anteil an Embryonen im Stadium der Blastozyste nach IVM/ IVF erhöht werden.

Oft sind Kulturmedien mit Proteinen supplementiert und mit somatischen Zellen (Granulosazellen oder Eileiterepithelzellen) in Co-Kultur kombiniert, die embryotrophe Wachstumsfaktoren sezernieren (GANDOLFI und MOOR 1987). Mit Hilfe solcher Co-Kulturen konnten die Entwicklungsraten der Embryonen unter *in vitro* Bedingungen erhöht werden (AOYAGI et al. 1990; FUKUI et al. 1991; CAROLAN et al. 1995; DONNAY et al. 1997).

Diese komplexen Medien sind jedoch bezüglich der Konzentration einzelner Komponenten undefiniert (THOMPSON et al. 1996).

Zellkulturmedien für die IVP werden häufig mit Serum supplementiert und/ oder es werden Co-Kulturen mit somatischen Zellen eingesetzt (BAVISTER 1995).

Das maternale Blut enthält zahlreiche Stoffe, die für die Synthese vieler für die Oozytenentwicklung essentieller Moleküle wichtig sind. Um die *In-vivo*-Verhältnisse *in vitro* zu simulieren, wird bei der IVP den Reifungs- und Entwicklungsmedien häufig Serum hinzugefügt (SANBUISHO und THRELFALL 1985; HAENISCH-WOEHL 2003).

Serum enthält zahlreiche Komponenten, vor allem aber Hormone, die zusammen mit embryotropen Wachstumsfaktoren aus der Co-Kultur mit somatischen Zellen ein reichhaltiges, aber undefiniertes Milieu für die embryonale Entwicklung bilden (THOMPSON 1996; VAN WAGTENDONK DE LEEUW et al. 2000).

Für die Kultivierung von Rinderembryonen wurden Medien mit hitzeinaktiviertem Serum vom Rentier (PROKOFIEV et al. 1992), vom Stier (MATSUOKA et al. 1992), vom Menschen (MATSUYAMA et al. 1993), vom Kalb (HAMANO und KUWAYAMA 1993; TAKAHASHI und FIRST 1993) und von der Kuh (BERG und BREHM 1990; JIANG et al. 1991; CARNEGIE et al. 1997; GORDON 2003) verwendet. Die eingesetzten Serumkonzentrationen werden in der Literatur mit 1-20% angegeben, in der Regel werden aber Konzentrationen zwischen 5-10% zugesetzt (GORDON 2003). Die besten Ergebnisse wurden nach Einsatz von fetalem Kälberserum (FCS) oder östrischem Kuhserum (ECS) erzielt (FUKUI et al. 1991; MATSUOKA et al. 1992; MARX 2002).

Die dem Serum zugeschriebenen förderlichen Wirkungen werden mit den enthaltenen Nährstoffen, Vitaminen, Wachstumsfaktoren, Hormonen sowie antioxidativen Eigenschaften erklärt (HOSHI et al. 2003).

Zusammen mit der Stimulierung der COK durch FSH fördert die Serumsupplementierung die Expansion der Cumuluszellen, indem die synthetisierte

Hyaluronsäure in der COK-Matrix akkumuliert wird (SALUSTRI et al. 1989). Auch XU et al. (1988) berichteten, dass ECS im Reifungsmedium die Expansion der Cumuluszellen einschließlich der Zellen der Corona radiata fördert. LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. (1989) beobachteten, dass der Einsatz von FCS bei der IVM die Cumulusexpansion bei Rinderoozyten in Abhängigkeit von der Konzentration des Serums beeinflusst.

Die Phase des Brunstzyklus, in der das Serum gewonnen wurde, hatte ebenfalls einen Einfluss auf die In-vitro-Maturation. So konnten höhere Befruchtungsraten erzielt werden, wenn die Oozyten mit Serum aus der Östrus- und Proöstrusphase gereift wurden. Die höheren Fertilisationsraten, die bei Verwendung von proöstrischem gegenüber östrischem Serum erzielt wurden, können durch höhere Konzentrationen an LH und Prolaktin bedingt sein (YOUNIS et al. 1989; GORDON, 2003; HAENISCH-WOEHL 2003).

Im Gegensatz zu anderen Autoren (GARDNER 1994; THOMPSON et al. 1995) berichteten MEN et al. (2005) über einen stimulierenden Effekt von Serum (FCS) auf die Mitoserate in Embryonen des Schweins. Es konnte eine schnellere Zellteilung beobachtet werden, die sich in der erhöhten Anzahl an Zellkernen der Blastozysten am Tag 6 widerspiegelte. Durch die schnellere Zellteilung kam es zu einer weniger massiven Lipidansammlung, was sich positiv auf die Überlebensfähigkeit der Embryonen nach Kryokonservierung auswirkt (MEN et al. 2005).

Dagegen berichteten FUKUI und ONO (1989) sowie DURNFORD et al. (1994) über eine im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Zellzahl bei Blastozysten aus COK, die mit Zusatz von ECS gereift wurden.

In Vergleichsuntersuchungen mit einem serum- und hormonfreien Medium kam es zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Kernreifung in den Oozyten und einer Hemmung der nachfolgenden Embryonalentwicklung (LIM et al. 2003; KORHONEN et al. 2010). Der Einsatz von Serum wird zum Teil kontrovers diskutiert, da die genaue Zusammensetzung nicht definiert ist, die biologische Aktivität der einzelnen Seren von Charge zu Charge variiert und eine potentielle Übertragungsgefahr in Hinblick auf Viren und Mykoplasmen besteht.

Auch haben Studien gezeigt, dass der Zusatz von Serum zum Kulturmedium die Morphologie der Embryonen und die Entwicklungskinetik beeinflusst (GARDNER 1994; LIM et al. 1994; VAN LANGENDONCKT et al. 1997; HOSHI 2003).

Ein Zusatz von Serum zum Kulturmedium kann weiterhin die Genexpression sowohl in gereiften Oozyten (RZUCIDLO et al. 2001) als auch in Embryonen im frühen Präimplantationsstadium (WRENZYCKI et al. 1999) beeinflussen. So wurde das mRNA-Expressionsniveau verschiedener Markergene, die an der Kompaktierung [z.B.

gap junction protein connexin 43 (Cx 43)] und am Stoffwechsel [z.B. Glukose Transporter-1 (Glut-1)] beteiligt sind, durch den Einsatz von Serum im Medium bzw. durch die Kulturbedingungen beeinflusst. Die Embryonen, die sich in serumfreien Medien ohne Serumsupplementierung entwickelten, zeigten eine höhere mRNA-Expression der oben erwähnten Markergene als Embryonen, die in serumsupplementiertem Medium produziert wurden (NIEMANN und WRENZYCKI 2000; LONERGAN et al. 2003).

LIM et al. (1994) beobachteten einen hemmenden Einfluss von hitzeinaktiviertem FCS auf die Entwicklungsrate der Embryonen am Tag 2 nach der Fertilisation.

Obwohl eine hemmende Wirkung von FCS auf die ersten Furchungsteilungen beschrieben ist, beschleunigt es jedoch die folgenden Entwicklungsschritte von kultivierten Rinderembryonen (GORDON 2003). TRICOIRE et al. (1999) zeigten, dass der Serumzusatz (FCS) während der IVC die Zellproliferation verringerte, die Expansion des Blastozöls jedoch beschleunigte. Als Resultat der Untersuchungen wurden Embryonen in fortgeschrittenem Entwicklungsstadium mit geringeren Zellzahlen beobachtet.

KUZMINA et al. (1999) stellten einen höheren Anteil von Oozyten mit degenerierter Chromatinkonfiguration fest, wenn bei der IVM FCS durch BSA ersetzt wurde. Zusätzlich wird berichtet, dass die Seren die Permeabilität der Zona Pellucida verändern, was zu unterschiedlichen IVF-Ergebnissen führte (YOUNIS et al. 1989, HAENISCH-WOEHL 2003).

Untersuchungen der Oozyten und Embryonen aus serumsupplementierten Medien haben gezeigt, dass es zu einer vermehrten Ansammlung von Lipiden im Zytoplasma kommt (ABE et al. 1999; NIEMANN und WRENZYCKI 2000). Diese extreme intrazytoplasmatische Lipidanreicherung wird u. a. bei Schaf (THOMPSON et al. 1995) und Rind (SATA et al. 1999) beschrieben.

In vitro produzierte Rinderembryonen haben im Vergleich zu in vivo produzierten einen höheren Lipidgehalt im Zytoplasma. Dies hat einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit nach Kryokonservierung. Nach der Polarisierung oder der Entfernung von Lipidtropfen aus dem Zytoplasma der Embryonen durch Zentrifugation und/ oder Mikromanipulation konnte eine deutlich verbesserte Überlebensfähigkeit der Embryonen nach Kryokonservierung erreicht werden (USHIJIMA et al. 1999; TOMINAGA 2004; SEIDEL 2006).

Ein weiterer Effekt, an dem die Serumsupplementierung ursächlich beteiligt sein soll, ist das Large Offspring Syndrom bei Rind und Schaf (THOMPSON et al. 1995; HOLM et al. 1996; FARIN et al. 1997; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al. 2000; HOSHI 2003). Diese Anomalie wird bei Kälbern zu etwa einem Drittel der Nachkommen nach

IVP beobachtet. Für die Abweichungen in der Genexpression könnten veränderte Methylierungsmuster verantwortlich sein, die Gene entweder ausschalten oder die Expression von Genen induzieren (NIEMANN und WRENZYCKI 2000; PURPERA 2009).

2.6. Methoden zum Nachweis von Lipiden

Lipide können mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden.

Ziel solcher Analysen ist es, die Rolle der Lipide, ihre Aufnahme und ihren Metabolismus in Oozyten und Embryonen unterschiedlicher Spezies zu erforschen. Ein detaillierteres Verständnis des Lipidstoffwechsels könnte zu einer Verbesserung der Zellkulturbedingungen in IVP-Systemen und einer Steigerung der Überlebensraten von kryokonservierten Embryonen führen. Erfolge in diesen Bereichen der assistierten Reproduktion könnten zu höheren Trächtigkeitsraten und damit zu einer größeren Rentabilität bei der Embryonenproduktion von landwirtschaftlichen Nutztieren führen.

Fettsäurezusammensetzungen können mit Hilfe der Dünnschicht- oder Gaschromatographie analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Methode effektiv ist, jedoch wurden bis zu 1000 Oozyten oder Embryonen für die Analyse benötigt (MC EVOY et al. 2000; KIM et al. 2001; SINCLAIRE et al. 2002; REIS et al. 2003).

Kommerzielle Assays wurden entwickelt, um den Gehalt verschiedener Lipidklassen (Triglyzeride, totales Cholesterin, Phospholipide und nicht-veresterte Fettsäuren) in Pools von je 100 unreifen und in vitro gereiften Oozyten oder Embryonen zu bestimmen (KIM et al. 2001). Weiterhin ist es möglich den Triglyceridgehalt bei nur drei Embryonen mit einem Enzymassay zu messen, der an eine Fluoreszenzeinheit gekoppelt ist (FERGUSON et al. 1999; STURMEY et al. 2003). Diese Technik ist sensitiver, jedoch schwierig durchzuführen. Andere Möglichkeiten sind die Autoradiographie und die Elektronenmikroskopie. TOMINAGA et al. (2000) und CROSIER et al. (2000; 2001) beurteilten die ultrastrukturelle Morphometrie von Lipidtröpfchen in bovinen Zygoten, Morulae und Blastozysten, die in vivo und in vitro erzeugt wurden. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) konnte die Dichte und die Größe intrazellulärer Lipidtröpfchen dargestellt werden.

Alle diese Methoden sind jedoch arbeitsintensiv und/ oder nicht an einzelnen Oozyten oder Embryonen durchzuführen.

Eine größere Sensitivität bietet die semiquantitative Bestimmung des Lipidgehaltes mittels Fluoreszenztechnik. FOWLER et al. (1987) setzten den Farbstoff Nilrot ein, um verschiedene hydrophobe Substanzen und unterschiedliche Lipidklassen schnell und quantitativ zu erfassen. Neutrale Lipide, Phospholipide, Sphingolipide und Fettsäuren konnten auf diese Weise untersucht werden und zeigten unterschiedliche

Farbintensitäten. Ungesättigte Lipide färbten sich intensiver an als gesättigte Lipide. Die Nilrotfärbung wird als stabil beschrieben, die Ergebnisse waren reproduzierbar (FOWLER et al. 1987).

CARMAN et al. (1991) wendeten Nilrot im Rahmen von Untersuchungen zum Lipidspeicherverhalten in Gonaden des Ruderfußkrebses an. Intrazytoplasmatische Lipidtropfen in Eizellen stellten sich mit heller, gelb-oranger Fluoreszenz gut dar. Zusätzlich wurde Nilrot verwendet, um den Metabolismus von Fettsäuren in der Eizelle der Ruderfußkrebse zu untersuchen. So konnte eine Abnahme der Fettreserven während einer Hungerperiode nachgewiesen werden. Die Messung der Fluoreszenz aus der Nilrotfärbung wird zur Erfassung von relativen Lipidgehalten in Individualorganismen aufgrund der hohen Sensitivität als nützlich erachtet, da Lipidgehalte erfasst werden, die beinahe an oder unter der Nachweisgrenze von herkömmlichen konventionellen analytischen Methoden liegen (CARMAN et al. 1991). Durch die Anfärbung mit Nilrot und die Verwendung der Fluoreszenzmethode besteht die Möglichkeit, den Lipidgehalt einzelner Oozyten zu bestimmen. Mittels eines Photomultipliers wird die Lichtemission verstärkt und photometrisch gemessen. Über die gemessene Fluoreszenzintensität lassen sich Rückschlüsse auf den Lipidgehalt in den einzelnen Oozyten und Embryonen ziehen.

In Untersuchungen von GENICOT et al. (2005) wurden erstmals Lipidtropfen in Säugeroozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot dargestellt und der Lipidgehalt in Einzeloozyten von Schwein, Rind und Maus quantitativ beurteilt. Je mehr Lipidtropfen in einer Oozyte vorhanden waren, desto höher war die Menge an emittiertem Fluoreszenzlicht nach der Färbung. Die maximale Fluoreszenz wurde bei der Bindung des Farbstoffes an Neutralfette, hauptsächlich Triglyceride erreicht. Im Zytosol oder im Kernkompartiment der Oozyten wurde keine Fluoreszenz beobachtet. Der Lipidgehalt war in Oozyten des Schweines am größten, gefolgt von Rind und Maus. Diese Ergebnisse bestätigten Untersuchungen von MC EVOY et al. (2000), der ebenfalls Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten (Schwein, Rind, Schaf) beobachtete, jedoch für seine Untersuchungen (Gelelektrophorese) bis zu 1000 Oozyten benötigte. Auch hier war der Lipidgehalt von Oozyten vom Schwein ca. 2,4-mal höher als der Lipidgehalt der Rinderoozyten. Der Lipidgehalt in Oozyten vom Schaf war wiederum geringer als der in Oozyten von Schweinen und Rindern.

LEROY et al. (2005) stellten eine Korrelation zwischen der morphologischen Erscheinung des Zytoplasmas in Oozyten und Embryos und der Fluoreszenzintensität nach Nilrotfärbung fest. Bei Oozyten und Embryonen mit dunklerem Zytoplasma konnte eine höhere Fluoreszenzintensität und damit ein signifikant höherer Lipidgehalt als bei Zellen mit granuliertem oder blassem Zytoplasma beobachtet werden.

Außerdem wurde gezeigt, dass Morulae nach der Kultivierung in serumsupplementiertem Medium eine höhere Fluoreszenzintensität aufwiesen als Embryonen aus einem serumfreien Medium. Diese Studien belegten, dass die Nilrotfärbung empfindlich genug ist, um intrazelluläre Lipide in einzelnen Oozyten und Embryonen nachzuweisen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen dieser Arbeit gliederten sich in zwei Abschnitte.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die Lipidintensität und die morphologischen Lipidverteilungsmuster sowie die Chromatinkonfiguration in Oozyten vom Rind bestimmt. Die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) wurden abhängig vom Cumuluszustand und der Morphologie des Zytoplasmas in vier Klassen (COK-Klasse I bis IV) eingeteilt.

Die einzelnen COK wurden zu den Zeitpunkten unmittelbar nach der Eizellgewinnung (T 0) und nach 24-stündiger Reifungszeit (T 24) nach Klassen getrennt, gefärbt, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (N=389 Oozyten).

Nach den Untersuchungen zur Bestimmung der Fettintensität und der Fettverteilungsmuster wurden Untersuchungen zur Entwicklungskompetenz der Oozyten der verschiedenen COK-Klassen durchgeführt. Dazu wurden die Klassen I bis IV *in vitro* gereift, befruchtet und bis zum Tag 8 nach IVF kultiviert (N=973 Oozyten).

Die Daten zum ersten Abschnitt der Arbeit wurden an 1362 Cumulus-Oozyten-Komplexen der verschiedenen COK-Klassen erhoben.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Seren (10% ECS oder 10% FCS) während der *In-vitro*-Reifung von Oozyten der Klassen I und II auf die Lipidintensität und das Verteilungsmuster sowie auf die Entwicklungskompetenz untersucht.

Die Entwicklungskompetenz wurde nach IVM, IVF und IVC an den Tagen 2, 4 und 8 der Kultur beurteilt. Dazu wurden die Oozyten und Embryonen gefärbt, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Lipidgehalt, gemessen an der Fluoreszenzintensität, und die Lipidverteilungsmuster wurden sowohl nach der *In-vitro*-Reifung als auch nach der Kultivierung der Embryonen bestimmt und verglichen. Die Daten zum zweiten Abschnitt der Arbeit wurden an 2325 Cumulus-Oozyten-Komplexen der Klassen I und II erhoben.

Für die Experimente aller Versuchsabschnitte wurden insgesamt 3687 Cumulus-Oozyten-Komplexe verarbeitet.

Für die Durchführung der Versuche wurden ausschließlich Ovarien und Cumulus-Oozyten-Komplexe geschlachteter Rinder verwendet. Es wurden Ovarien von Kühen und Jungrindern der Rasse Deutsches Fleckvieh verwendet, wobei Alter und Gesundheitszustand der Tiere unbekannt waren.

und Jungrindern der Rasse Deutsches Fleckvieh verwendet, wobei Alter und Gesundheitszustand der Tiere unbekannt waren.

Die Vorbereitung der Medien und die anschließende Weiterverarbeitung der Proben wurde im IVF-Labor des Besamungsvereins Neustadt a. d. Aisch e.V. vorgenommen. Die Auswertungen der Präparate wurden im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf durchgeführt.

Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien ist im Anhang unter Kapitel 9 aufgeführt.

Die Abbildungen 3-1 bis 3-3 sollen die Durchführung der einzelnen Versuchsabschnitte verdeutlichen.

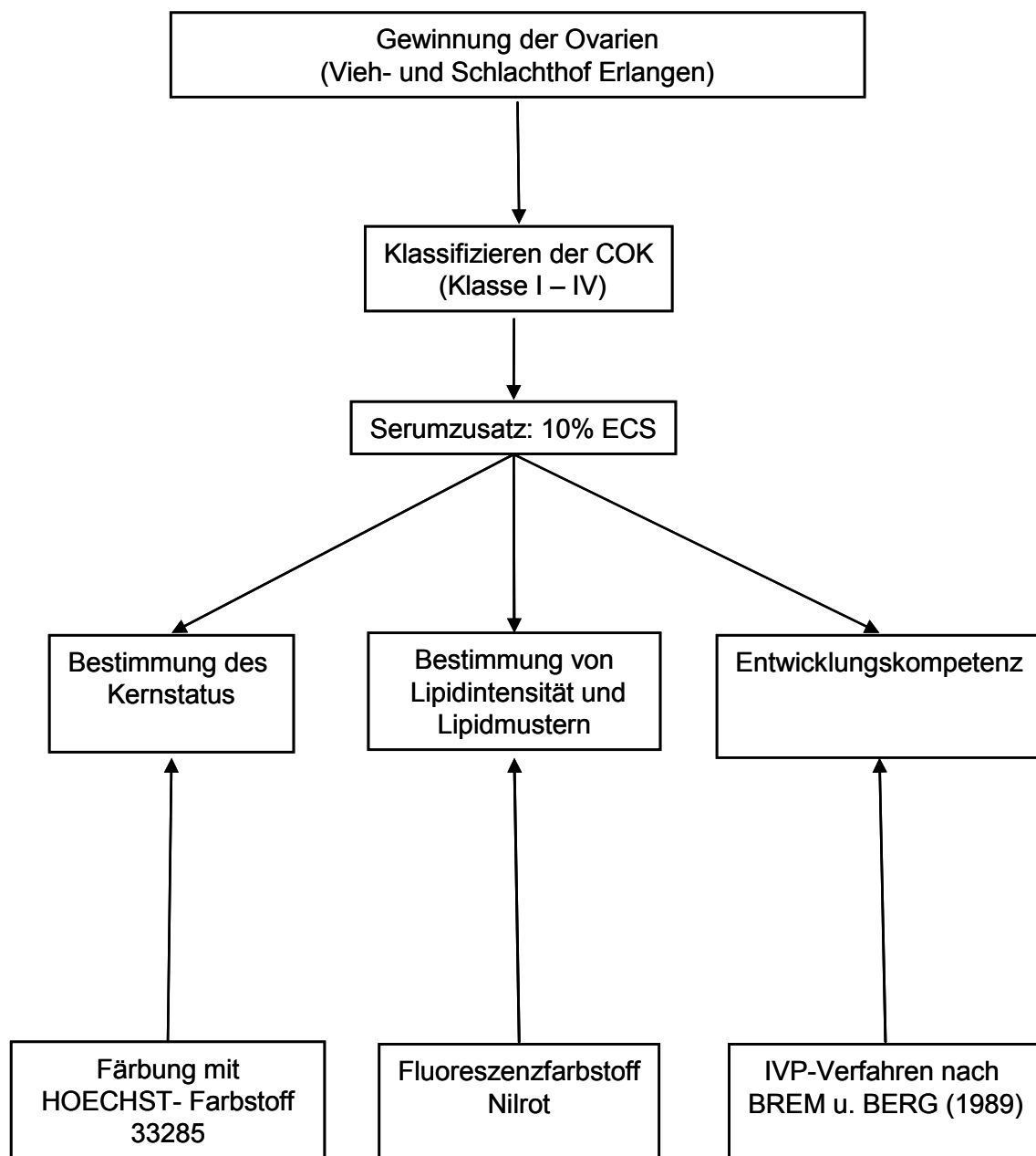


Abb. 3-1: Schema zum Versuchsabschnitt 1

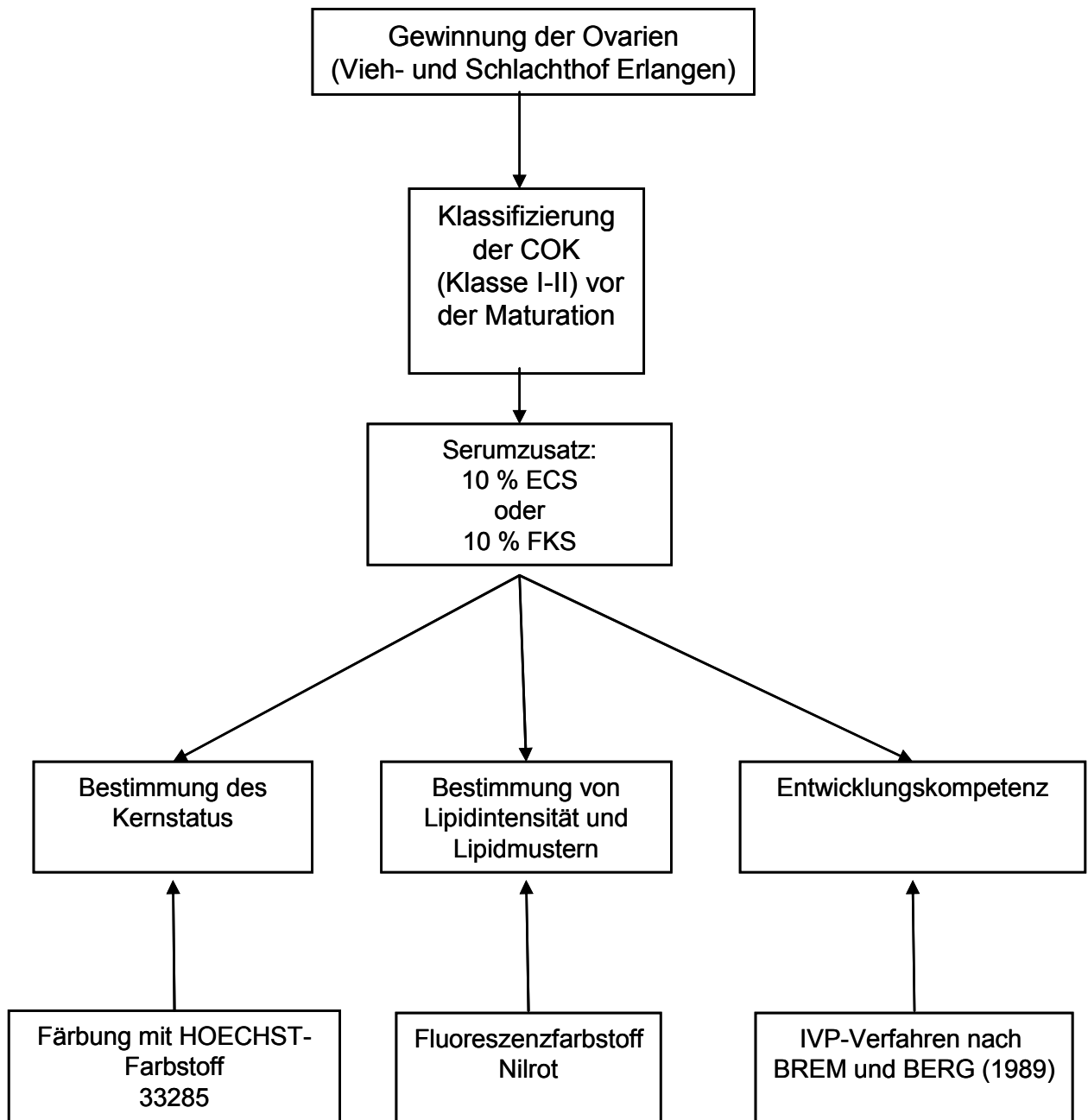


Abb. 3-2: Schema zum Versuchsabschnitt 2

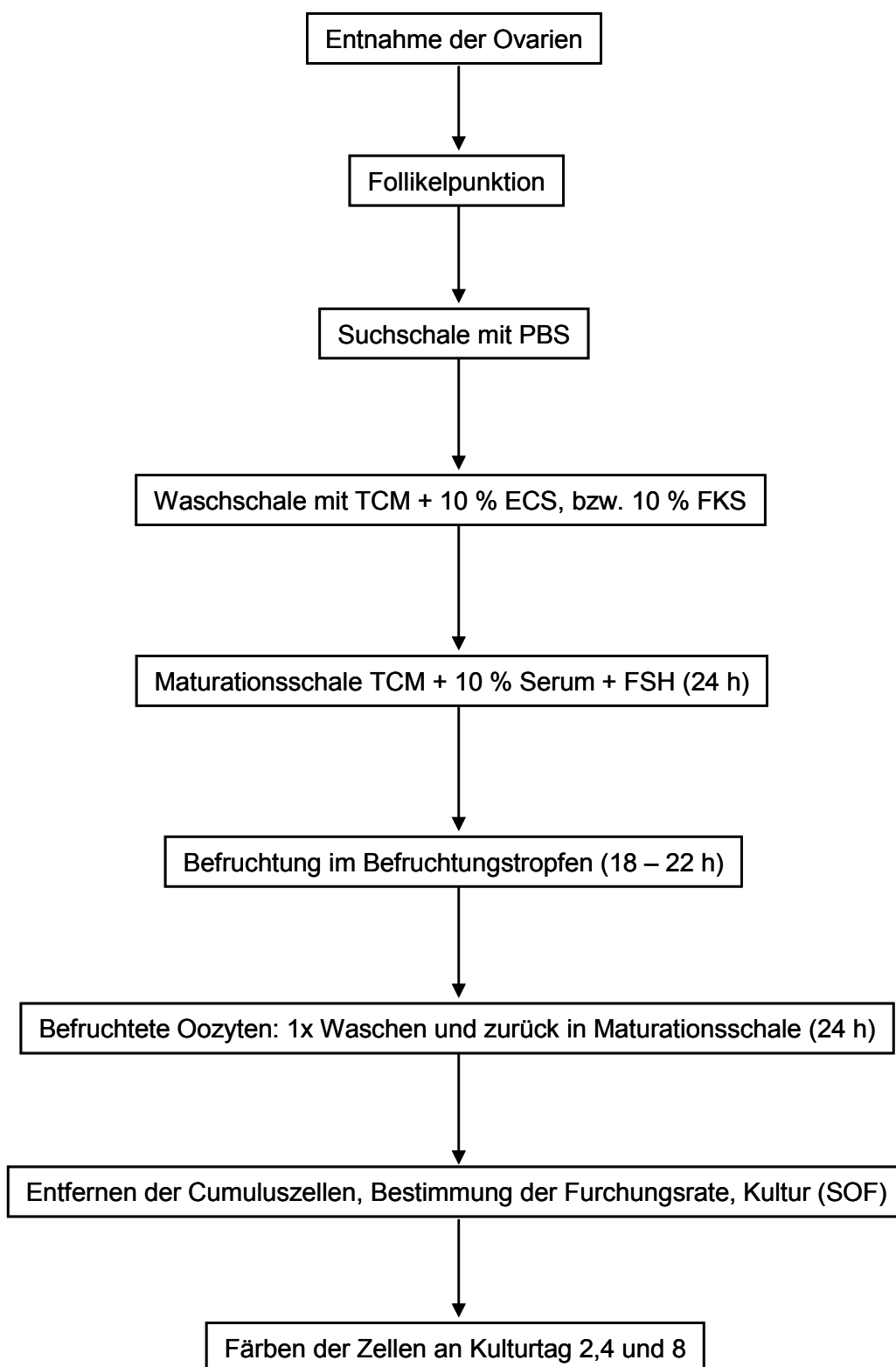


Abb. 3-3: Schema zur Durchführung der IVP

Die Ovarien wurden den geschlachteten Tieren ca. 15 Minuten nach dem Entbluten, unmittelbar nach dem Öffnen des Abdomens, mit Hilfe einer chirurgischen Schere entnommen. Die Organe wurden sofort in 30°C warme 0,9%-ige NaCl-Lösung gelegt. Innerhalb von drei Stunden wurden die Ovarien in einem Thermogefäß zum Labor verbracht und dort weiterverarbeitet.

3.2. Gewinnung der Ovarien

Es wurden nur Eierstöcke ohne makroskopisch sichtbare pathologische Veränderungen für die Versuche verwendet.

Die Schalen mit dem benötigten Sammel-, Wasch- und Reifungsmedium wurden morgens, mindestens vier Stunden vor Gebrauch vorbereitet und bei einer Temperatur von 39°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5% in der Luft äquilibriert.

3.3. Gewinnung und Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK)

Die COK wurden durch Punktion der Follikel gewonnen. Mit einer Spritze (5 ml, Gummi, Fa. Heiland, Hamburg) und einer Kanüle (18 G mit kurzer Spitze, ø 1,20 mm x L 40 mm, Fa. Heiland, Hamburg) wurden Follikel mit einem Durchmesser von 3 bis 8 mm punktiert. Die gewonnene Follikelflüssigkeit wurde in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, Fa Greiner, Frickenhausen) gesammelt.

Innerhalb von fünf Minuten sedimentierten die COK und wurden mit einer Monopette (Fa. VWR International, Darmstadt) vom Boden des Röhrchens abgesaugt. Mit vier- bis fünfmaligem Absaugen des Sediments wurden in der Regel alle COK erfasst.

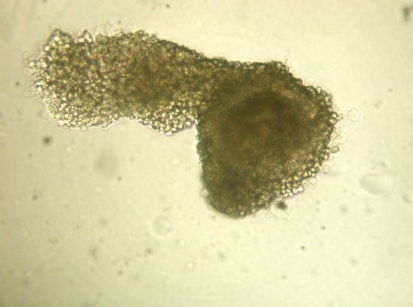
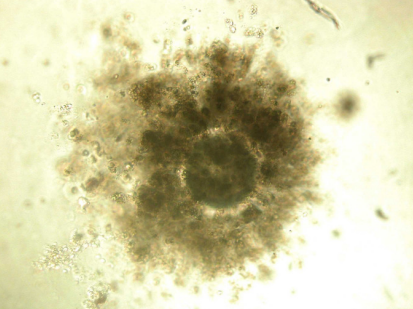
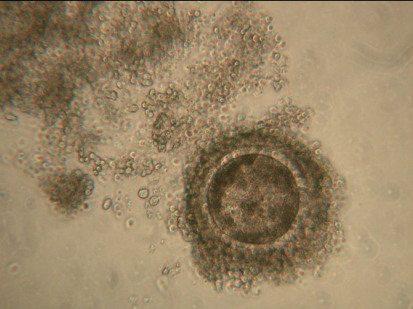
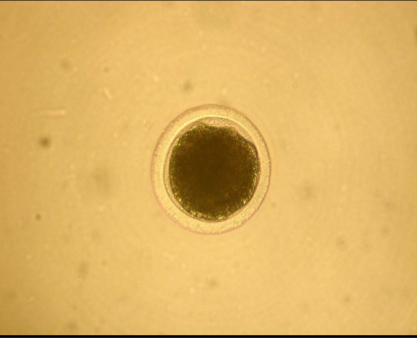
Die Follikelflüssigkeit wurde unter dem Stereomikroskop (SMZ 800; Fa. Nikon, Düsseldorf) bei 15-facher Vergrößerung durchsucht.

Die COK wurden nach dem Auffinden in eine 4-Well-Schale (Fa. Nunc, Dänemark) mit je 500 µl modifizierter PBS-Lösung überführt und auf ihre Qualität hin beurteilt. Anschließend wurden die COK nach einmaligem Waschen in die eine 4-Well-Schale zur Maturation umgesetzt.

Die Wasch- und Maturationsschalen enthielten 400µl Reifungsmedium [TCM 199 + 10% Serum + 3,5 µg FSH ovinen Ursprungs (Ovagen, Fa. Bondico, Alkmaar, Holland)].

Die Cumulus-Oozyten-Komplexe wurden in Abhängigkeit von der Cumuluszellmorphologie und vom Zytoplasma in vier Klassen (I bis IV) eingeteilt (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: Klassifizierung der Cumulus-Oozyten-Komplexe

Klasse I	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und kompaktem Cumulus oophorus	
Klasse II	Oozyten mit dunklem, homogenem Ooplasma und aufgelockertem Cumulus oophorus	
Klasse III	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und expandiertem Cumulus oophorus mit Clusterbildung	
Klasse IV	Oozyten mit dunklem, homogenem oder granuliertem Ooplasma und mit geringem oder fehlendem Cumulus oophorus	

3.4. In-vitro-Maturation (IVM)

Nach der Klassifizierung wurden die COK in eine Zellkulturschale, mit je 500 µl Reifungsmedium (siehe Anhang, Kap. 9) pro Well umgesetzt.

Die Reifungsdauer betrug 0 bzw. 24 Stunden.

Das Umsetzen der COK erfolgte mit ausgezogenen Glaskapillaren (Duran Glasröhren, Durchmesser 4 mm, Wandstärke 0,8 mm, Fa. VWR International, Darmstadt).

3.5. In-vitro-Fertilisation (IVF)

Zur Befruchtung wurde kryokonserviertes und wieder aufgetautes Spermia des Fleckviehbullen Romel (Herdbuchnummer 176100) verwendet. Der Bulle erwies sich im In-vitro-Verfahren als guter Befruchter. Es wurde ausschließlich die Charge des Ejakulats mit der Nummer 3607 verwendet.

Für die Aufbereitung der Spermien wurde das Swim-up-Verfahren nach PARRISH et al. (1986) eingesetzt.

Die Bestimmung der Spermiedichte erfolgte in einer Zählkammer nach Thoma. Pro Befruchtungstropfen wurden ca. 100000 Spermien eingesetzt.

3.5.1. Spermiaaufbereitung

Für die Befruchtung von ca. 100 Eizellen wurde eine Spermia-Paillette verwendet (0,25 ml Paillette, Fa. Minitüb, Landshut). 90 Minuten vor Ablauf der 24-stündigen Reifungszeit der COK wurde die erforderliche Spermiaportion 10s in 38°C warmem Wasser aufgetaut.

Zwei Kryoröhrchen (1,5 ml, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden im 45°-Winkel in einen Ständer gestellt und mit 1 ml Sperm-TALP (siehe Anhang, Kap. 9) befüllt.

Danach wurde das Medium im Röhrchen mit Spermiasuspension unterschichtet und für eine Stunde bei 39°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Kryoröhrchen wurden leicht bedeckt, damit ein Gasaustausch im Brutschrank möglich war. Am Ende des einstündigen Swim-up wurden 800 µl des Sperm-TALP-Mediums, in dem sich die motilen Spermien befanden, abgehoben und in ein vorgewärmtes Zentrifugationsröhrchen überführt.

Die Spermiasuspension wurde für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert.

Danach wurde der Flüssigkeitsüberstand vorsichtig entfernt, das Pellet mit der gleichen Menge Sperm-TALP resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Abziehen des Überstandes wurde das Pellet mit 40 µl Fert-TALP (siehe Anhang, Kap. 9) resuspendiert.

3.5.2. Befruchtung

Als Befruchtungsmedium wurde Fert-TALP (siehe Anhang, Kap. 9) verwendet. Die Befruchtung erfolgte in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 30 mm (Fa. Greiner, Bio-one, Frickenhausen). Dazu wurden vier Tropfen zu je 60 µl Fert-TALP in die Schale verbracht und mit Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet. Die Befruchtungstropfen wurden vor dem Einsetzen der Oozyten und Spermien für mindestens zwei Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit äquilibriert.

Nach Ablauf der Maturationszeit von 24 Stunden wurden die COK zunächst in Fert-TALP gewaschen und nach Klassen in die Befruchtungstropfen umgesetzt.

Im Anschluss daran wurde die Spermiesuspension im berechneten Volumen dazugegeben und es folgte eine Inkubation über 18-22 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5% CO₂ in der Luft.

3.6. In-vitro-Kultivierung

Nach der Co-Kultivierung von Oozyten und Spermien über 18-22 Stunden im Befruchtungstropfen wurden die Oozyten einmal in Reifungsmedium vom Vortag gewaschen und für 24h in die Reifungsschalen zurückgeführt.

Dabei wurden die expandierten Cumuluszellen und die anhaftenden Spermien durch das Umsetzen z.T. bereits entfernt.

Nach 24 Stunden wurden die COK in eine 4-Well-Schale mit SOF-Medium verbracht und durch vorsichtiges Pipettieren komplett denudiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Furchungsrate erfasst.

Alle gefurchten Embryonen wurden danach im Embryo-Kultur-Medium (SOF, siehe Anhang, Kap. 9) gewaschen und in diesem Medium 7 Tage lang bei 38,5°C und einer reduzierten Sauerstoffspannung (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) kultiviert. Am Ende der Kultivierung wurde die Anzahl der Blastozysten ermittelt.

3.7. Beurteilung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten und der Kerne in den Embryonen und Bestimmung der Verteilung und Aktivität von Lipidtropfen im Ooplasma

3.7.1. Entfernen des Cumulus oophorus

Das Denudieren erfolgte direkt nach der Klassifizierung der Oozyten zum Zeitpunkt T 0 und nach 24 Stunden Reifungsdauer (T 24).

Die Oozyten wurden in PBS gewaschen und anschließend in eine 4-Well-Schale mit je 500 µl EDTA-Trypsin (Fa. Sigma, Steinheim) umgesetzt. Durch wiederholtes

Pipettieren mit Hilfe einer 1 ml Eppendorfpipette konnten die Cumuluszellen sowie die corona radiata Zellen entfernt werden.

Die Eizellen verblieben maximal zwei Minuten in der Lösung und wurden anschließend mehrmals gewaschen (PBS+PVA, PBS, siehe Anhang, Kap. 9) bevor sie in die Nilrot-Arbeitslösung zum Anfärben der Fette im Zytoplasma umgesetzt wurden.

Am Tag 2 der Kultivierung wurden die Cumuluszellen durch vorsichtiges Pipettieren in SOF-Medium denudiert, an Tag 4 und 8 waren die Cumuluszellen somit bereits abgetrennt und dieser Arbeitsschritt entfiel.

3.7.2. Färbung von Lipiden

Für die Anfärbung der Fette im Zytoplasma wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot (Molecular Probes, Invitrogen, USA) verwendet.

Der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot (BEILSTEIN und GREEN 1952) gehört zu der Gruppe der Phenoxazine. Er wird seit den achtziger Jahren verwendet, um Lipide in Zellen zu lokalisieren (GREENSPAN 1985) und zu quantifizieren. Der Farbstoff eignet sich besonders zur Darstellung von Neutralfetten in Zellen und ist selektiv für Neutralfette wie Cholesterinester und Lipoproteine. Nilrot fluoresziert in Wasser oder anderen polaren Lösungsmitteln kaum. Fluoreszenz tritt auf, wenn der Farbstoff an unpolare Strukturen bindet. Es kommt zu einer Verstärkung im blauen Bereich.

Die hohe Sensitivität der Fluoreszenz des Farbstoffes wurde in Ligand-Bindungs-Studien an Tubulin und Tryptophansynthase gezeigt.

Durchführung der Färbung mit Nilrot

Die Nilrot-Arbeitslösung wurde täglich aus einer Stammlösung hergestellt und bis zum Gebrauch in einer 4-Well-Schale (500 µl/ Well) unter Abdunkelung mittels Alufolie im Wärmeschrank ohne Begasung bei 38,5°C inkubiert.

Nach dem Waschen in PBS wurden die Oozyten bzw. Embryonen in die 4-Well-Schale mit der Färbelösung umgesetzt und verblieben dort 30 Minuten im Wärmeschrank bei 38,5°C ohne Begasung.

3.7.3. Fixierung

Nach dem Färben in Nilrot-Gebrauchslösung wurden die Oozyten/ Embryonen zweimal in PBS gewaschen und in 3%-igem Paraformaldehyd bei 38°C im Dunkeln für 30 Minuten fixiert. Im Anschluss daran wurden die Eizellen/ Embryonen in PBS gewaschen und in eine 4-Well-Schale mit PBS umgesetzt. Von hier aus wurden die Eizellen/ Embryonen in 5-er Gruppen auf Objektträger verbracht und für die Darstellung der Chromatinkonfiguration mit HOECHST 33258 gefärbt.

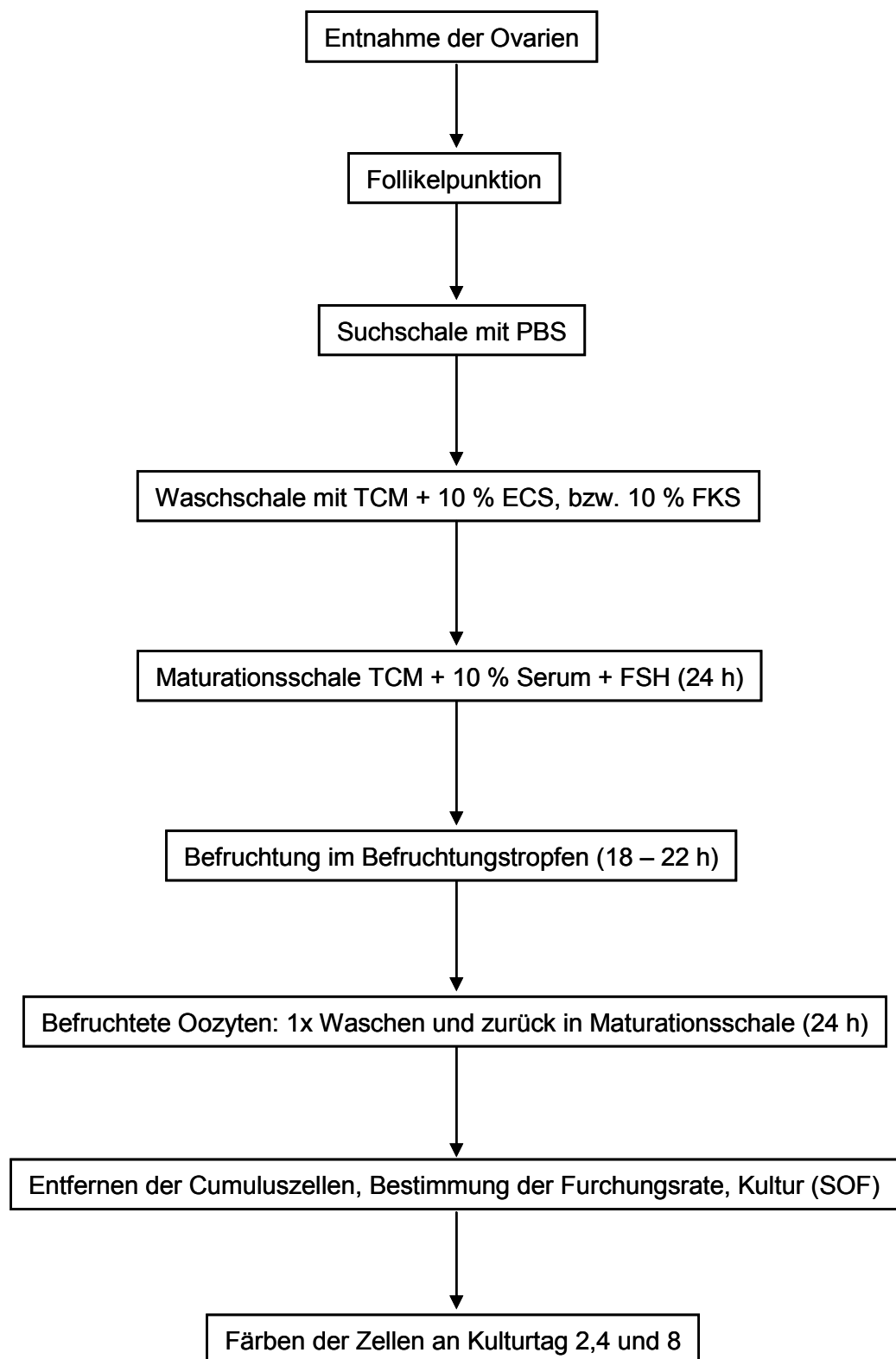


Abb. 3-4: Schema zum Ablauf der Färbung und Fixierung von Oozyten und Embryonen

3.7.4. Färbung des Chromatins in den Zellkernen

Die Chromatinfärbung wurde nach der Fixierung mit Paraformaldehyd durchgeführt.

Die Herstellung des Farbstoffes ist im Kapitel 9 beschrieben.

Der Fluoreszenzfarbstoff bis-BENZIMIDE (HOECHST 33258) ist membrangängig und wird häufig zur Färbung von DNA verwendet, RNA wird nicht angefärbt. Der Farbstoff interkaliert bevorzugt mit den A-T-reichen Sequenzen der DNA und kann zu Lesefehlern in der Mitose und vielkernigen Zellen führen.

Die Anlagerung des Farbstoffes verändert das Emissionsmaximum von 500 nm nach 460 nm. Der Farbstoff emittiert im blauen Bereich und ist geringgradig zytotoxisch mit karzinogenem Potential. Der Farbstoff kann im Zellkulturmedium gelöst werden.

Durchführung der Färbung mit HOECHST 33258

Nach der Fixierung wurden die Oozyten zweimal in PBS gewaschen und anschließend in zwei 5-er Gruppen in je einem Tropfen PBS (ca. 10 µl) auf einem entfetteten Objektträger (76x26 mm, SuperFrost®, Fa. Roth, Karlsruhe) aufgebracht. Um die beiden Tropfen wurden je 6 µl Hoechst-Farbstoff in drei Portionen verteilt (siehe Abb. 3-4).

Nach dem Auflegen des Deckgläschens (18x18 mm, Fa. Heiland, Hamburg) vermischte sich der Farbstoff mit dem PBS-Tropfen und benetzte die Zellen. Pro Objektträger wurden zwei Deckgläschen aufgelegt.

Anschließend wurde das Deckgläschen mit handelsüblichem Nagellack an allen vier Seiten versiegelt. Die Präparate wurden bis zur Analyse im Labor des FBN Dummerstorf gekühlt und dunkel aufbewahrt.

3.7.5. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Beurteilung der Chromatinkonfiguration

Die Auswertung des Kernstatus anhand der Chromatinkonfiguration erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) bei 450 nm.

Folgende Chromatinstadien wurden in den Oozyten erfasst: Diplotän, Diakinese, Metaphase I, Anaphase I, Telophase I, Methaphase II und degeneriertes Chromatin in allen Meiosestadien.

Die Kerne der Embryonen und Blastozysten wurden als Qualitätsmerkmal und für die Bestimmung der entwicklungsgerechten Stadien gezählt.

Erfassung der Lipidmuster und Messung der Lipidintensität

Für die Auswertungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop Jenalumar (Fa. Carl Zeiss, Jena) verwendet.

Die Messungen der Lipidintensität erfolgten bei 570 nm Emissionswellenlänge mit einem Photomultiplier P 100 (Fa. NIKON, Düsseldorf) bei 550 μ V und 4 - 4,5 A.

Die Verteilungsmuster der Lipide wurden unterschieden in: fein, flockig, cluster und kaum Struktur. Die Messungen erfolgten für jede Oozyte und jeden Embryo einzeln.

3.8. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit SAS Version 9.1.3 (SAS Institute Inc. 2004) durchgeführt. Statistische Maßzahlen und die prozentuale Häufigkeit wurden mit den Prozeduren MEANS und FREQ berechnet.

Relative Häufigkeiten (prozentuale Häufigkeiten der Chromatinkonfiguration und Lipidverteilungsmuster) wurden mit der Prozedur GENMOD ausgewertet. Paarweise Kontraste interessierender Häufigkeiten wurden zusätzlich getestet.

Das Merkmal Lipidintensität wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit der Prozedur GLM analysiert. Zusätzlich wurden alle LS-Mittelwerte der entsprechenden Stufen der interessierenden Effekte in den verschiedenen Modellen paarweise verglichen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen zur Veränderung des Chromatins in bovinen Oozyten während der IVM

Im ersten Versuchsabschnitt erfolgte die Auswertung zur Veränderung der Chromatinkonfiguration zum Zeitpunkt der COK-Gewinnung (T 0) und nach 24-stündiger Reifung in vitro (T 24). Die Meiosestadien des Chromatins wurden wie folgt unterschieden: Diplotän (Dipl; Abb. 4-1 A), Diakinese (Diak; Abb. 4-1 B), Metaphase I (M I), Anaphase I (A I; Abb. 4-1 C), Telophase I (T I), Metaphase II (M II; Abb. 4-1 D) und degeneriertes Chromatin (deg).

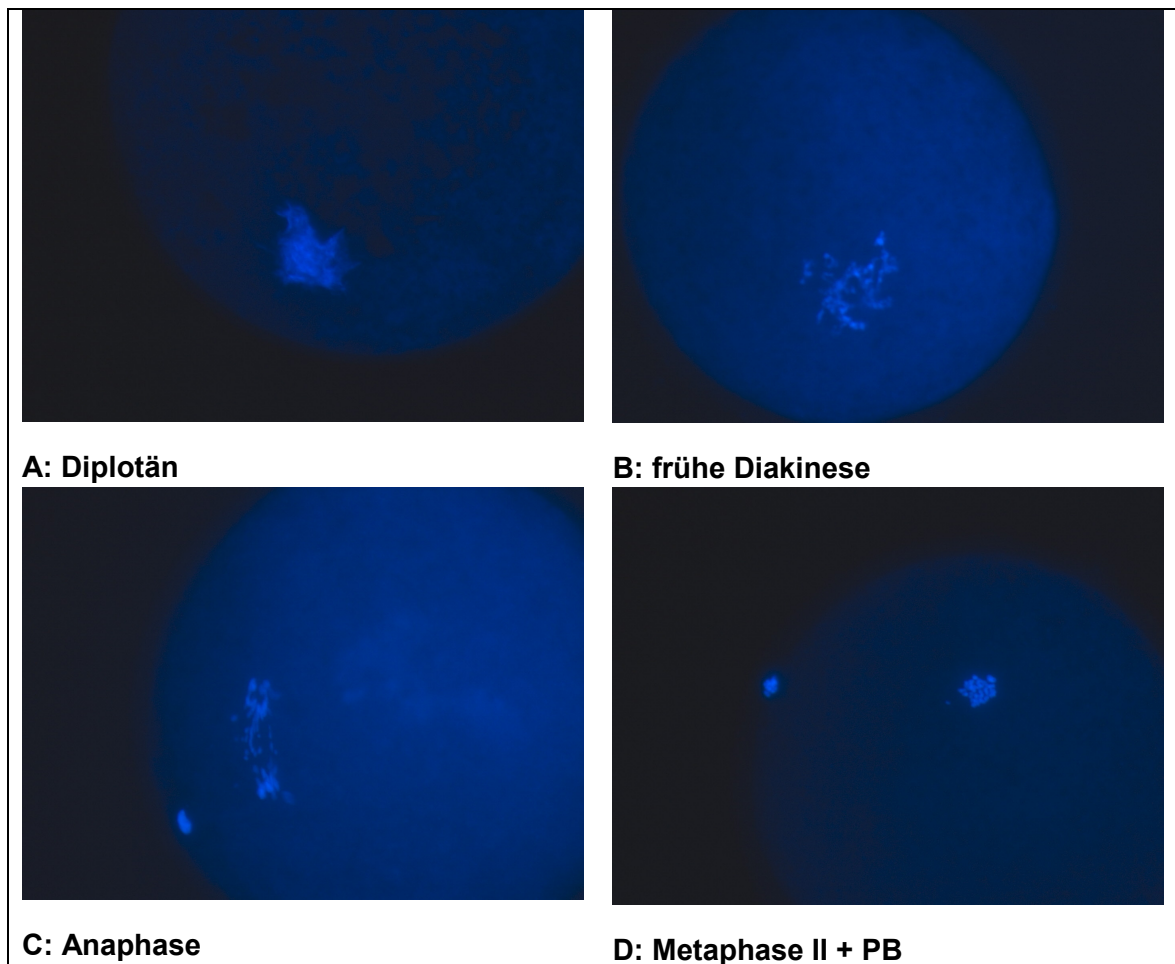


Abb. 4-1: Kernreifungsstadien

(HOECHST 33258, UV-Anregung 410, 63x)

Die Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der In-vitro-Reifung unabhängig von der COK-Klasse ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Zum Zeitpunkt der COK-Gewinnung (T 0) befand sich die Mehrzahl der Oozyten im Stadium des Diplotäns (74,7%). Etwa 10% der gewonnenen Oozyten zeigte zu diesem Zeitpunkt bereits Degenerationserscheinungen. Der Rest (14,8%) befand sich in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien der Meiose (siehe Tabelle 4-1).

Nach einer Reifungszeit von 24 Stunden (T 24) hatten 57,3% der Oozyten das Stadium der Metaphase II erreicht. Kennzeichnend für dieses Stadium ist die erfolgte Ausschleusung des Polkörperchens (PB).

Tabelle 4-1 Die Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der IVM unabhängig von COK-Klassen

Reifungs- dauer	N Oozyten	Meiosestadien N (%)						
		Dipl.	Diak.	M I	A I	T I	M II	deg.
T 0	162	121 (74,7) ^a	17 (10,5)	5 (3,1) ^a	1 (0,6)	0 (0)	1 (0,6) ^a	17 (10,5)
T 24	227	2 (0,9) ^b	0 (0)	50 (22,0) ^b	1 (0,4)	10 (4,4)	130 (57,3) ^b	34 (15,0)

^{a,b} p<0,05 in den Spalten

Die Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in den Oozyten im Verlauf der In-vitro-Reifung und in Abhängigkeit von den COK-Klassen ist in Tabelle 4-2 dargestellt.

Die prozentuale Häufigkeit der Oozyten im Stadium des Diplotäns war zum Zeitpunkt der Gewinnung in den COK-Klassen I und II höher (Klasse I: 76,5%; Klasse II: 83,6%) als in der COK-Klasse IV (68,2%) und war signifikant höher als in der COK-Klasse III (50,0%). In dieser Klasse waren bereits 36% der Oozyten in fortgeschrittenen Meiosestadien (Diakinese bis Metaphase II; siehe Tabelle 4-2). 24 Stunden nach IVM befand sich die Mehrzahl der Oozyten der COK-Klassen I bis III im Stadium der Metaphase II (67,3%, 60,0% und 55,9% für COK-Klassen I, II, III).

Der Anteil an degenerierten Oozyten war bei den Eizellen der Klasse IV zum Ende der IVM signifikant erhöht (47,2%).

Die Abb. 4-2 zeigt eine denudierte Oozyte der COK-Klasse I zum Zeitpunkt der Gewinnung (a) und nach der IVM (b).

Tabelle 4-2: Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in Abhängigkeit von der Reifungsdauer und der Cumulumorphologie

Reifungs- dauer	COK- Klasse	N Oozyten	Chromatinkonfiguration, N (%)						
			Dipl.	Diak.	M I	A I	T I	M II	deg.
T 0	I	51	39	7	0	0	0	0	5
			(76,5) ^a	(13,7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(9,8)
	II	67	56	5	1	0	0	0	5
			(83,6) ^a	(7,5)	(1,5)	(0)	(0)	(0)	(7,5)
III	22	11	3	3	1	0	1	3	
		(50,0) ^b	(13,6)	(13,6)	(4,5)	(0)	(4,5) ^A	(13,6)	
IV	22	15	2	1	0	0	0	4	
		(68,2) ^{a,b,A}	(9,1)	(4,5)	(0)	(0)	(0)	(18,2)	
T 24	I	52	0	0	13	0	1	35	3
			(0)	(0)	(35,0)	(0)	(1,9) ^a	(67,3) ^a	(5,8) ^a
	II	105	0	0	30	0	3	63	9
			(0)	(0)	(28,6)	(0)	(2,9)	(60,0) ^a	(8,6) ^a
	III	34	0	0	5	0	5	19	5
			(0)	(0)	(14,7)	(0)	(14,7) ^b	(55,9) ^{a,B}	(14,7) ^a
	IV	36	2	0	2	1	1	13	17
			(5,6) ^B	(0)	(5,6)	(2,8)	(2,8)	(36,1) ^b	(47,2) ^b

p<0.05 innerhalb der Spalten, ^{a,b} innerhalb einer Zeit, ^{A,B} zwischen den Zeiten

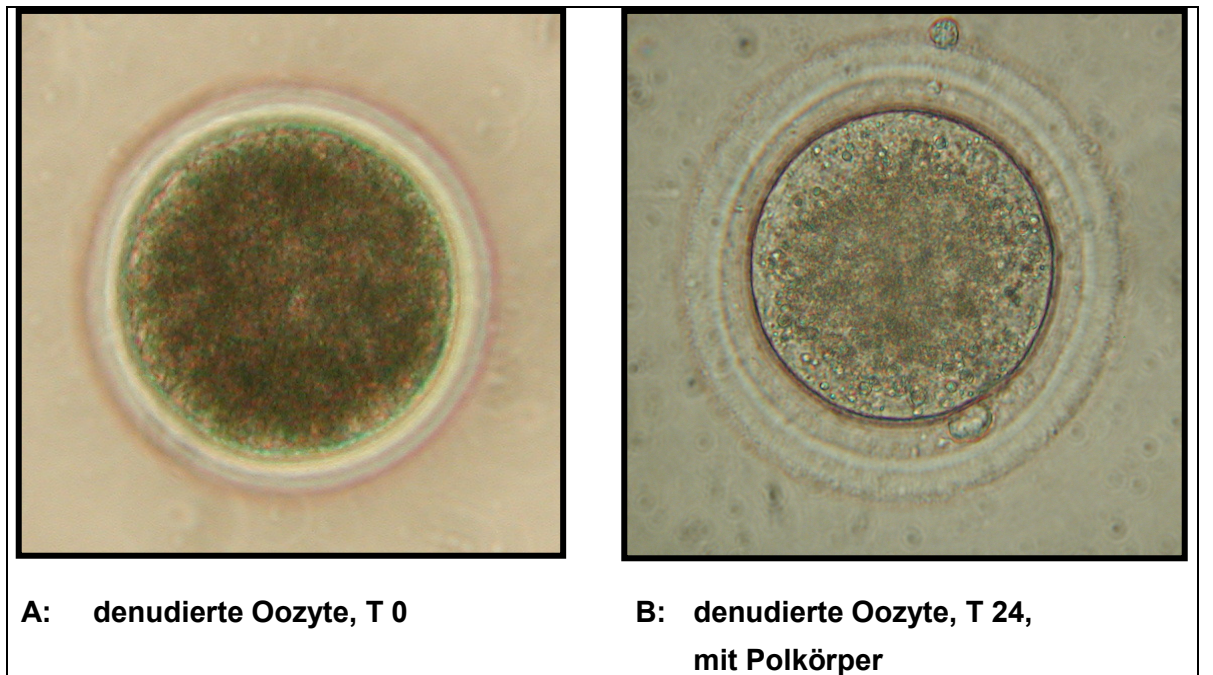


Abb. 4-2: denudierte Oozyten vor und nach Maturation in vitro, Durchmesser ca. 100µm

4.2. Untersuchungen zu den Veränderungen der Lipide in bovinen Oozyten während der IVM

4.2.1. Untersuchungen zu den Lipidmustern im Ooplasma boviner Oozyten

Im Ooplasma boviner Oozyten wurden bei der mikroskopischen Beurteilung wiederkehrende Lipidverteilungsmuster beobachtet. Diese intrazellulären Lipidstrukturen wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt:

- fein → fein und homogen im Zytoplasma dispergierte Lipide (Abb. 4-3 A),
- flockig → flockige, wolkige Lipidstruktur, gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Abb. 4-3 B)
- cluster → lipiddichte, großflächige Lipidstrukturen, inhomogen im Zytoplasma verteilt (Abb. 4-3 C)
- degeneriert → schwache Fluoreszenzintensität, keine Struktur ausgeprägt, Degeneration

Die Untersuchungen zeigten, dass sich die Verteilung verschiedener Lipidmuster in den Oozyten während der IVM verändert. Diese Veränderungen gingen einher mit Unterschieden in der Fluoreszenzintensität der Lipide.

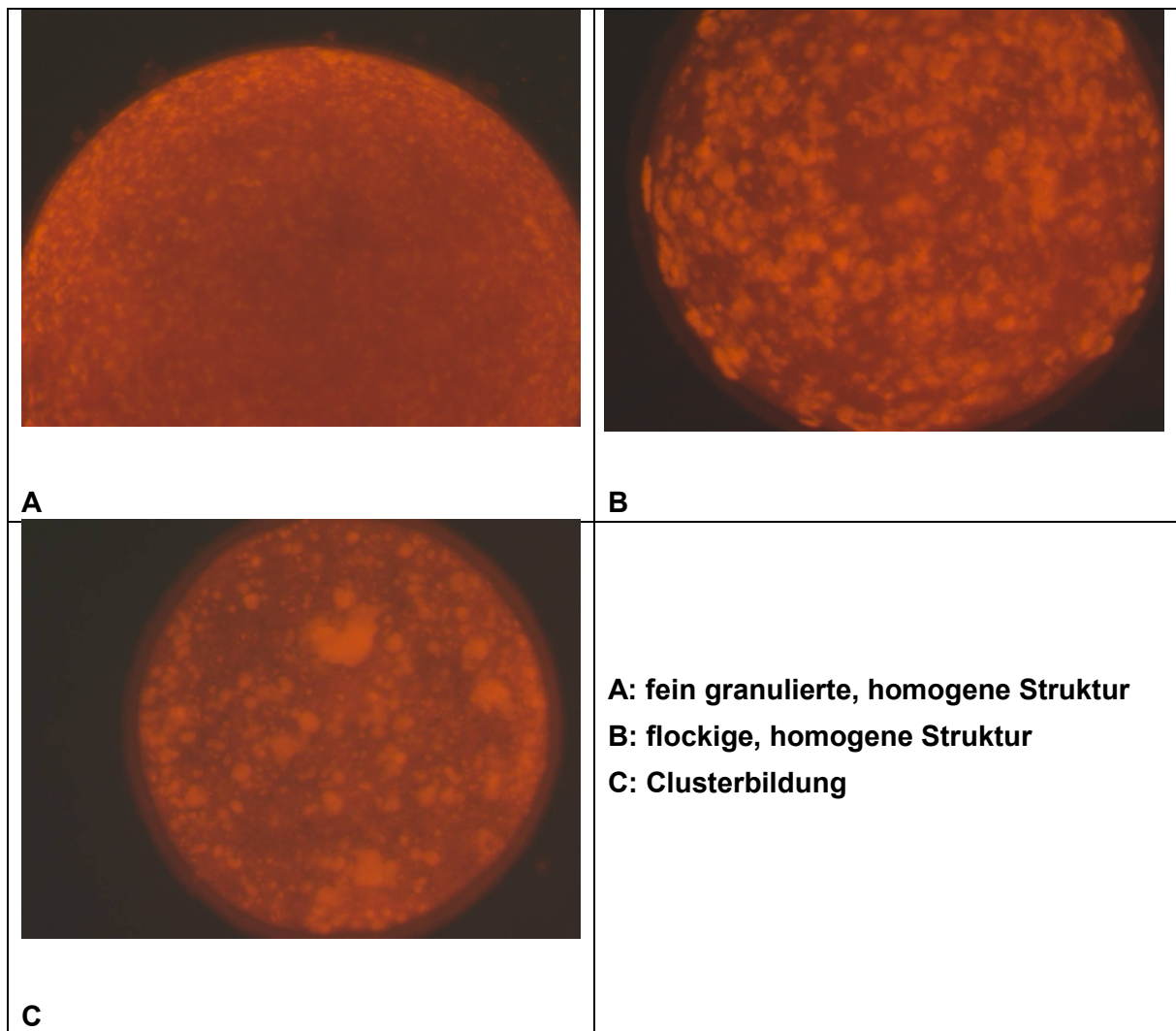


Abb. 4-3: Lipidmuster in Rinderoozyten, Nilrotfärbung, 63x, UV-Anregung 570

Tabelle 4-3 zeigt die Häufigkeit verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM, unabhängig von der COK-Klasse.

Vor der In-vitro-Maturation wurden im Zytoplasma der Oozyten häufiger feingranulierte und weniger flockige Lipidstrukturen als nach der Reifung beobachtet. Nach 24-stündiger Reifungszeit war ein signifikanter Anstieg des Anteils Oozyten mit flockiger Struktur (74,9%) zu erkennen. Der Anteil der Oozyten mit Clusterbildung sowie der Oozyten, in denen keine Struktur ausgeprägt war, blieb unverändert.

Tabelle 4-3: Häufigkeit verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM unabhängig von der COK-Klasse

Reifungs- dauer	N Oozyten	Lipidmuster N (%)			
		fein	flockig	cluster	kaum Struktur
T 0	162	24 (14,8) ^a	98 (60,5) ^a	11 (6,8)	29 (17,9)
T 24	227	14 (6,2) ^b	170 (74,9) ^b	14 (6,2)	29 (12,8)

^{a,b}p<0,05

Die Veränderungen in der Häufigkeit verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Morphologie sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung (T 0) war bei 51,0% und 61,2% der Oozyten der Klasse I und II eine flockige Lipidstruktur zu beobachten. Diese Struktur war bei Oozyten der COK-Klasse III (90,9%) signifikant erhöht. 24 Stunden nach der IVM stieg der Anteil der Oozyten mit flockiger Struktur auf 88,5% und 80,0% in den Klassen I und II und war damit im Vergleich zu T 0 signifikant erhöht.

In der COK-Klasse IV war der Anteil Oozyten, bei denen kaum eine Lipidstruktur zu erkennen war, sowohl zum Zeitpunkt der Gewinnung als auch nach IVM im Vergleich zu den COK-Klassen I, II und III signifikant erhöht.

Tabelle 4-4: Häufigkeit der verschiedener Lipidmuster in Oozyten der verschiedenen COK-Klassen vor und nach der IVM

Reifungs- dauer	COK- Klasse	N Oozyten	Lipidmuster N (%)			
			fein	flockig	cluster	kaum Struktur
T 0	I	51	12 (23,5)	26 (51,0) ^{a,A}	1 (2,1)	12 (23,5) ^A
	II	67	11 (16,4) ^A	41 (61,2) ^{a,A}	7 (10,4)	8 (11,9) ^a
	III	22	0	20 (90,9) ^b	2 (9,1)	0
	IV	22	1 (4,5)	11 (50,0) ^a	1 (4,5)	9 (40,9) ^b
T 24	I	52	4 (7,7)	46 (88,5) ^{a,B}	0	2 (3,8) ^{a,B}
	II	105	4 (3,8) ^B	84 (80,0) ^{a,B}	8 (7,6)	9 (8,6) ^a
	III	34	4 (11,4)	25 (73,5) ^a	4 (11,8)	1 (2,9) ^a
	IV	36	2 (5,6)	15 (41,7) ^b	2 (5,6)	17 (47,2) ^b

p<0,05 innerhalb der Spalten, ^{a,b} innerhalb einer Zeit, ^{A,B} zwischen den Zeiten

Um das Auftreten bestimmter Lipidmuster vor und nach der IVM beurteilen zu können, wurden die verschiedenen Strukturen in Abhängigkeit vom Chromatinstatus beurteilt (siehe Abb. 4-4). Ein Anstieg der flockigen Struktur wurde beim Übergang von der Diakinese zur Metaphase I beobachtet und ein weiteres Mal zur Metaphase II. In allen Chromatinstadien war das flockige Lipidmuster am häufigsten vertreten. Das Vorkommen der feinen Lipidstruktur stieg zum Stadium der Diakinese an und nahm danach wieder ab. In Oozyten mit degeneriertem Chromatin war bei fast 80% keine erkennbare Lipidstruktur nachweisbar.

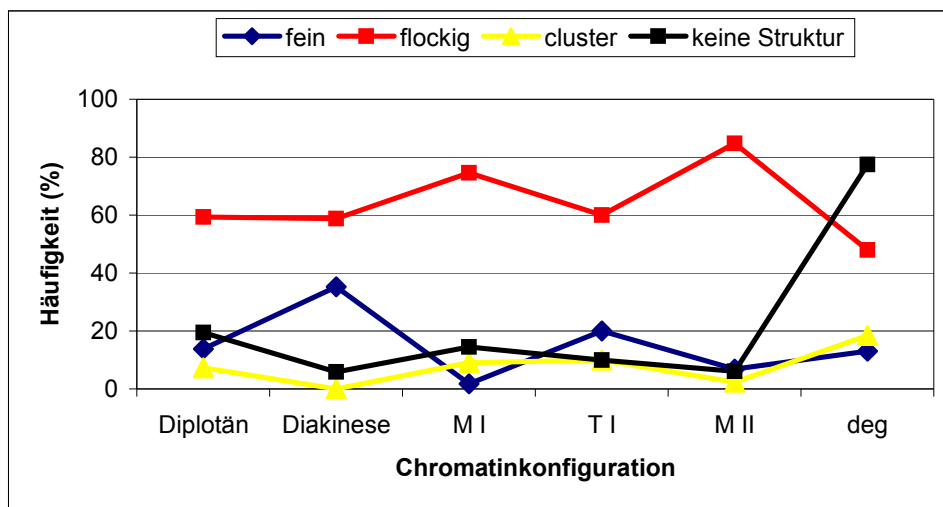


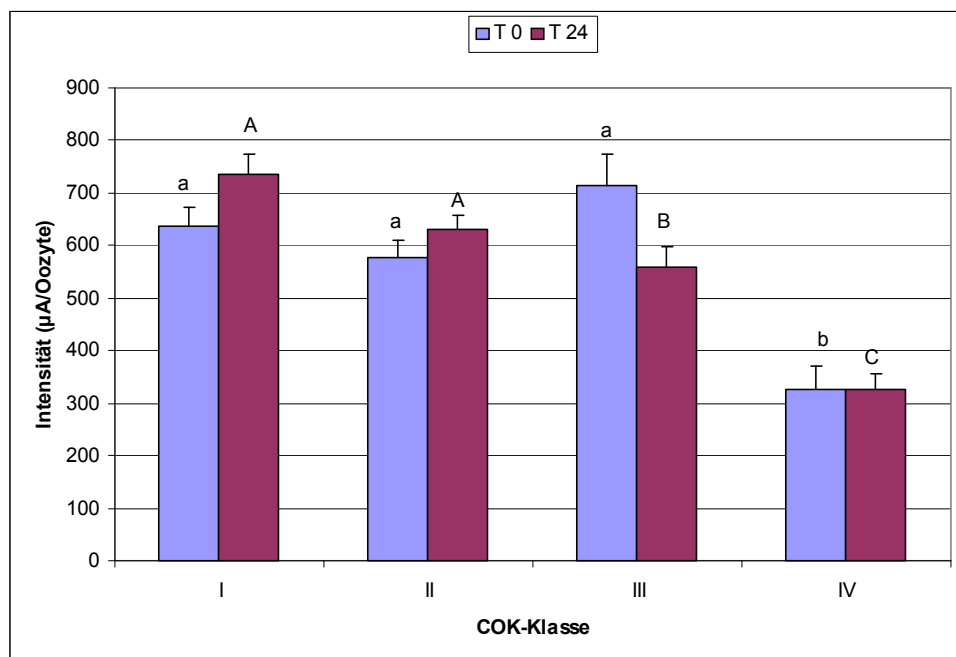
Abb. 4-4: Häufigkeit verschiedener Lipidmuster in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration

4.2.2. Untersuchungen zum Lipidgehalt, gemessen an der Intensität der Fluoreszenz

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, die etwaigen Veränderungen im Lipidgehalt während der Oozytenreifung durch Messung der Fluoreszenzintensität nach der Anfärbung der Oozyten zu beurteilen.

Die Abb. 4-5 zeigt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Lipide in Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Klasse vor und nach einer Reifungszeit von 24 Stunden.

Die Fluoreszenzintensität ($\mu A / \text{Oozyte}$) war zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung in den Oozyten der Klasse IV im Vergleich zu den anderen Klassen signifikant verringert. Nach der Reifung wurde sowohl in der COK-Klasse I als auch in der COK-Klasse II eine höhere Fluoreszenzintensität beobachtet. Dagegen war in der COK-Klasse III die Fluoreszenzintensität nach der IVM geringer als zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung. Die Fluoreszenzintensität der Lipide in Oozyten der Klasse IV war vor und nach der In-vitro-Reifung gleich.



A:B:C; a:b; a:B $p < 0.05$

Abb. 4-5: Fluoreszenzintensität der Lipide in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Klasse vor (T 0) und nach IVM (T 24)

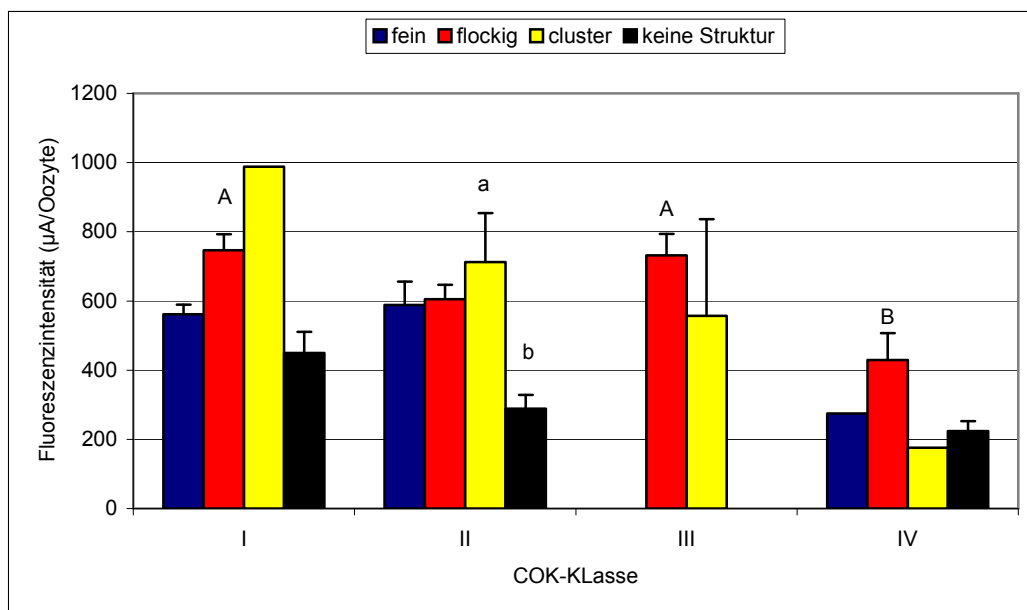
Betrachtet man die verschiedenen Lipidmuster unabhängig von der COK-Klasse, so konnten signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität nur bei den Oozyten beobachtet werden, die kaum eine Struktur erkennen ließen (siehe Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Fluoreszenzintensität im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den Verteilungsmustern

Lipidverteilungsmuster	N	Intensität in $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ (mean \pm SEM)
fein	38	568,9 \pm 34,4 ^a
flockig	268	649,6 \pm 17,1 ^a
cluster	25	578,2 \pm 60,9 ^a
kaum Struktur	58	330,8 \pm 24,3 ^b

^{a,b} $p < 0,05$

Bei der Unterscheidung der COK-Klassen zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität der Lipide in Abhängigkeit vom Verteilungsmuster zwar unterschiedlich war. Diese Unterschiede waren aber nur zwischen den Verteilungsmustern „cluster“ und „kaum Struktur“ in der Klasse II zu sichern. Zwischen den COK der Klassen I und IV und der Klassen III und IV wurden signifikante Unterschiede nur im Verteilungsmuster „flockig“ beobachtet (siehe Abb. 4-6)



$p < 0,05$ ^{a,b} innerhalb der Klassen, ^{A:B} zwischen den Klassen

Abb. 4-6: Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den COK-Klassen und dem Verteilungsmuster vor der IVM

Auch nach der 24-stündigen IVM war die Fluoreszenzintensität in den einzelnen COK-Klassen unterschiedlich. Eine Signifikanz war jedoch nur im Verteilungsmuster „flockig“ zwischen den Klassen I und IV und den Klassen II und IV zu beobachten (Abb. 4-7).

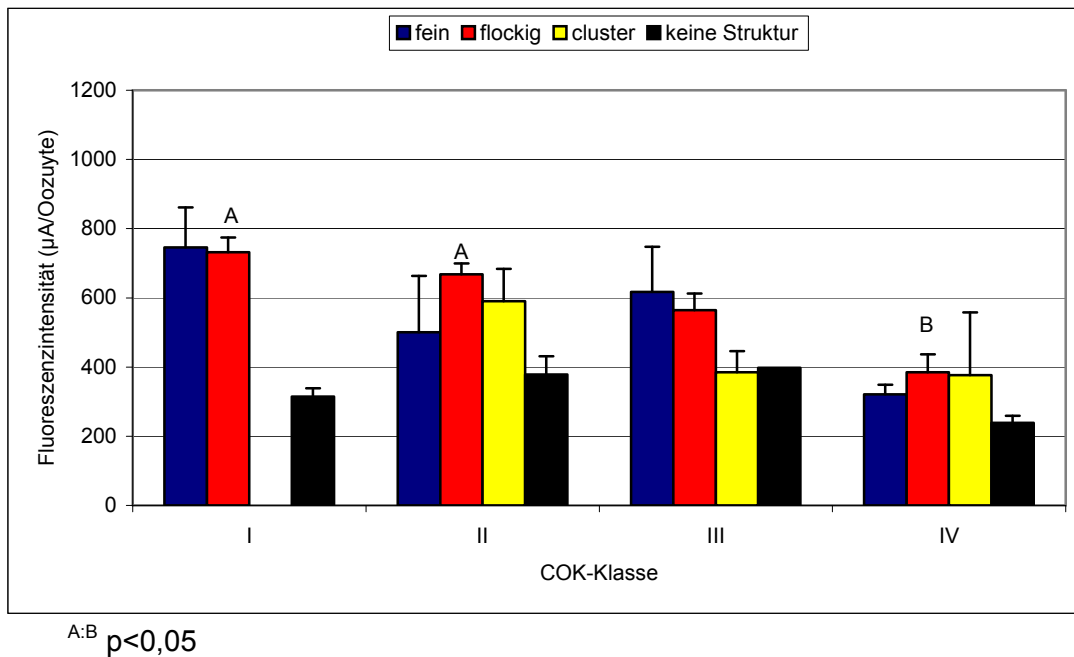
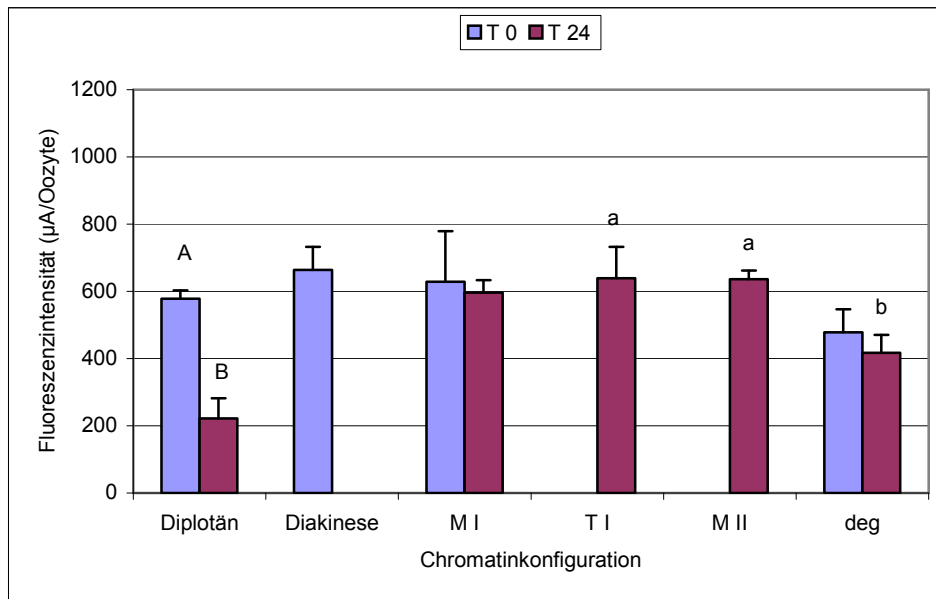


Abb. 4-7: Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den COK-Klassen und dem Verteilungsmuster nach der IVM

In der Abb. 4-8 wurde die Fluoreszenzintensität der Lipide in Oozyten, die sich in einem definierten Kernstadium befinden, unabhängig von der COK-Klasse dargestellt. Die zum Zeitpunkt T 0 und T 24 gemessenen Intensitäten der Lipide unterschieden sich nur im Stadium des Diplotän signifikant. Oozyten, die sich 24 Stunden nach IVM noch im Diplotänstadium befanden, zeigten einen starken Abfall der Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzintensität in degenerierten Oozyten nach der IVM war im Vergleich zu den intakten Stadien wie Telophase I und Metaphase II signifikant reduziert.



$p < 0.05$ ^{A:B} innerhalb des Diplotänstadium; ^{a:b} T 24

Abb. 4-8: Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration

4.3 Untersuchungen zur Entwicklungskompetenz von Oozyten unterschiedlicher Klassen

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, die Entwicklungskompetenz der Oozyten aus verschiedenen COK-Klassen zu untersuchen. Als Parameter dienten hierbei die Furchungsrate am Tag 2 sowie die Blastozystenrate am Tag 8 nach IVF.

Tabelle 4-6: Entwicklungsrate von Oozyten nach IVM/IVF in Abhängigkeit von der COK-Klasse

COK-Klassen	N COK	Furchungsrate N (% mean ± SE)	Blastozystenrate N Embryonen (% mean ± SE)
I	329	173 (58,7 ± 5,8) ^a	56 (32,7 ± 6,9) ^a
II	346	212 (60,0 ± 4,1) ^a	65 (30,0 ± 2,9) ^a
III	140	45 (34,8 ± 3,5) ^b	3 (5,5 ± 3,9) ^b
IV	158	20 (12,8 ± 2,0) ^c	0 ^b

^{a:b:c} p<0,05

Die Oozyten der Klassen I und II zeigten eine signifikant höhere Furchungs- und Blastozystenrate als die Oozyten der Klassen III und IV.

Nach Reifung und Befruchtung in vitro konnten bei den Oozyten der COK-Klasse IV einige Embryonen im Stadium des Zwei- und Vierzellers beobachtet werden. Es konnten jedoch keine Blastozysten erzeugt werden (Tabelle 4-6).

4.4 Untersuchungen zum Lipidgehalt in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Serumsupplementierung während der in vitro Entwicklung

4.4.1 Einfluss verschiedener Seren während der IVM

Im diesem Abschnitt wurde untersucht, ob der Zusatz verschiedener Seren zum Medium (FCS vs. ECS) einen Einfluss auf die Reifung und die Embryonenentwicklung ausübt. Dazu wurden die Chromatinkonfigurationen in den Oozyten, die Embryonenentwicklung und der Lipidgehalt in Oozyten und Embryonen untersucht. Nachdem in den ersten beiden Abschnitten gezeigt wurde, dass die Oozyten der COK-Klassen I und II für eine erfolgreiche Reifung und Befruchtung am besten geeignet

sind, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nur COK der Klassen I und II verwendet.

Die Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der In-vitro-Reifung ist in Tabelle 4-7 dargestellt. Wie in den anderen Untersuchungen waren zum Zeitpunkt der Gewinnung mehr als 70% der Oozyten unreif (Diplotänstadium).

Nach einer Reifungszeit von 24h erreichten rund 70% der Oozyten das Stadium der Metaphase II unabhängig von der Serumsupplementierung und der COK-Klasse.

Tabelle 4-7: Häufigkeit der verschiedene Kernstadien im Verlauf der IVM in Abhängigkeit vom Serumzusatz

Reifungs- Dauer	N Oozyten	Meiosestadien N (%)						
		Dipl.	Diak.	M I	A I	T I	M II	deg.
T 0	150	116 (77,3) a	6 (4,0)	1 (0,6) ^a	0	0	0	27 (18,0) ^a
T 24 ECS	297	2 (0,6) ^b	0	52 (17,5) ^b	1 (0,3)	7 (2,3) ^a	203 (68,4) ^a	32 (10,8) ^b
T 24 FCS	230	1 (0,4) ^b	0	39 (17,0) ^b	0	8 (3,5) ^a	160 (69,6) ^a	22 (9,5) ^b

^{a,b} $p < 0,05$ innerhalb der Spalten

Die Häufigkeit verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM ist in Tabelle 4-8 dargestellt.

Tabelle 4-8: Häufigkeit verschiedener Lipidmuster im Ooplasma boviner Oozyten vor und nach der IVM in Abhängigkeit vom Serumzusatz

Reifungsdauer/ Serumzusatz	N Oozyten	Lipidmuster N (%)			
		fein	flockig	cluster	kaum Struktur
T 0	150	33 (22,0) ^a	90 (60,0) ^a	19 (12,7) ^a	8 (5,3)
T 24 ECS	297	10 (3,3) ^b	251 (84,5) ^b	19 (6,4) ^b	17 (5,7)
T 24 FCS	230	25 (10,9) ^c	177 (76,9) ^c	10 (4,3) ^b	18 (7,8)

^{a,b,c} $p < 0,05$ innerhalb der Spalten

Der Anteil Oozyten mit flockigem Lipidmuster war bei Verwendung von ECS 24h nach IVM signifikant erhöht. Der Anteil der feinen Struktur war nach der IVM signifikant reduziert und am niedrigsten bei Verwendung von ECS (Tabelle 4-8).

Die Fluoreszenzintensität der Lipide wurde auch hier untersucht. Zum Zeitpunkt der COK-Gewinnung war die Intensität, unabhängig von den Verteilungsmustern, am niedrigsten und stieg signifikant nach der IVM in beiden Serumsupplementierungen an (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Fluoreszenzintensität der Lipide im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit vom Serum während der IVM

Reifungsdauer/ Serumzusatz	N Oozyten	Intensität in μA / Oozyte (mean \pm SEM)
T 0	150	498,0 \pm 16,8 ^a
T 24 ECS	297	740,7 \pm 13,7 ^b
T 24 FCS	230	716,6 \pm 15,0 ^b

^{a,b} p<0,05

Nicht nur die Häufigkeit der verschiedenen Lipidmuster war nach der IVM unter Verwendung beider Serumsupplementierungen verändert, sondern auch die Intensität der Fluoreszenz der Lipide. So wurde nach der Reifung in den Gruppen mit feiner und flockiger zytoplasmatischer Lipidstruktur ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität festgestellt. Innerhalb einer Zeiteinheit (T 0 oder T 24) zeigten nur die Oozyten, in denen kaum eine Struktur nachzuweisen war, signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 4-10: Fluoreszenzintensität von Lipiden im Ooplasma boviner Oozyten in Abhängigkeit von den Verteilungsmustern, der Reifungsdauer und dem Serumzusatz

Reifungsdauer/ Serumzusatz	N Oozyten	Verteilungsmuster und Intensität (mean ± SEM) in µA/ Oocyte (N)			
		fein	flockig	cluster	kaum Struktur
T 0	150	494,9 ± 31,2 (33) ^{a, A}	544,0 ± 20,0 (90) ^{a, A}	395,9 ± 49,8 (19)	234,9 ± 59,7 (8) ^B
T 24 ECS	297	727,4 ± 54,7 (10) ^{b, A}	790,7 ± 12,4 (251) ^{b, A}	489,8 ± 54,4 (19) ^B	291,1 ± 34,3 (17) ^B
T 24 FCS	230	781,8 ± 30,2 (25) ^{b, A}	759,2 ± 14,4 (177) ^{b, A}	587,4 ± 73,1 (10) ^A	279,3 ± 35,6 (18) ^B

p<0,05, ^{a,b} innerhalb der Spalten, ^{A,B} innerhalb der Zeile

Die höchste Fluoreszenzintensität war zum Zeitpunkt der Oozytenreife, d.h. in der Telophase I und Metaphase II zu beobachten.

Tabelle 4-11: Fluoreszenzintensität von Lipiden in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinstruktur, der Reifungsdauer und dem Serumzusatz

Reifungs- dauer	N Oozyten	Intensität (mean ± SEM) in μA / Oozyte (N)					
		Dipl.	Diak.	M I	T I	M II	deg.
T 0	150	523,6 ± 17,8 (116)	577,2 ± 115,9 (6)	518,0 (1)	0	0	369,6 ± 39,3 (27)
T 24 ECS	297	367,5 ± 84,5 (2)	0	649,9 ± 35,4 ^A (52)	792,7 ± 89,7 (7)	807,6 ± 12,1 ^B (203)	466,7 ± 51,5 ^C (32)
T 24 FCS	230	312,0 (1)	0	570,3 ± 42,6 ^A (39)	896,9 ± 41,1 ^B (8)	774,8 ± 13,8 ^B (160)	505,5 ± 56,2 ^A (22)

^{A:B:C} p<0,05 innerhalb der Zeile

4.4.2 Einfluss verschiedener Seren auf den Lipidgehalt während der Embryonalentwicklung

Nachdem die Fluoreszenzintensität der Lipide vor und nach der Reifung in den Oozyten untersucht wurde und ein Unterschied zwischen den Serumzusätzen beobachtet werden konnte, erfolgte die Untersuchung in den Embryonen. Zuerst wurden die Entwicklungsraten nach der Verwendung der beiden Serumzusätze verglichen. Dazu wurden sowohl die Anzahl der Zellkerne in den Embryonen an den Tagen 2, 4 und 8 post IVF als auch die Fluoreszenzintensität der Lipide in den Embryonen bestimmt. Zudem wurden die Häufigkeiten des Auftretens von Mitosen und degenerierter Entwicklungsstadien nach unterschiedlichen Serumsupplementierungen untersucht.

Die Abbildung 4-9 zeigt verschiedene Embryonen am Tag 2 (IV-Zeller: A, B) und Tag 8 (Blastozyste: C, D) nach IVF.

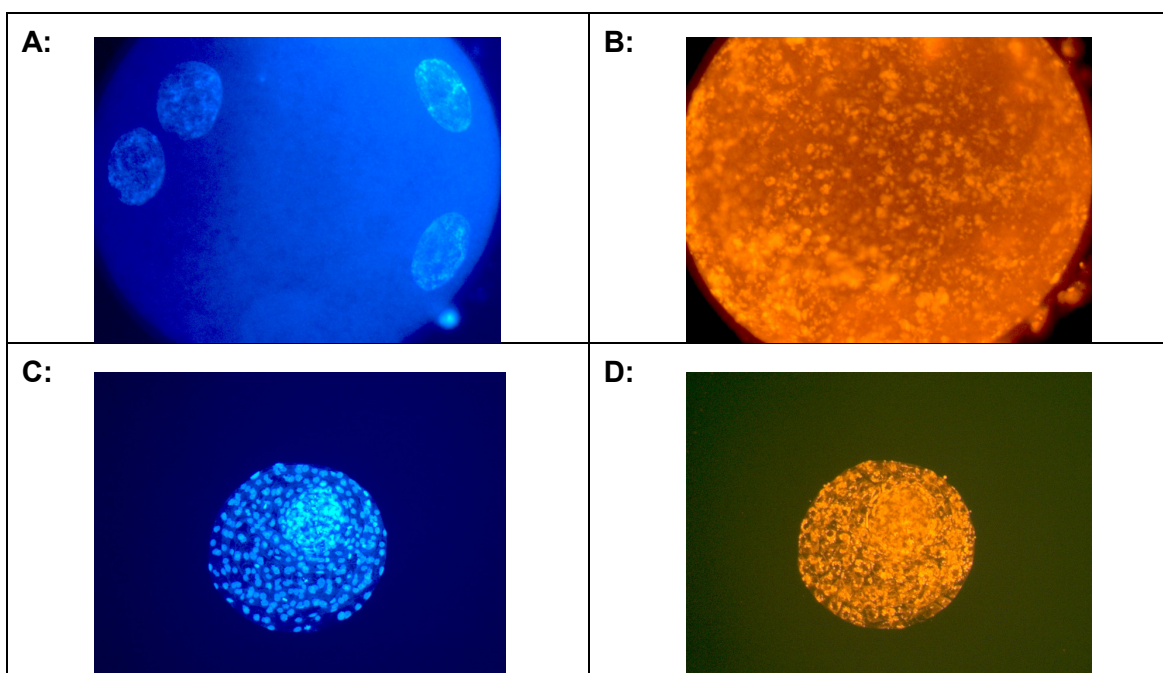


Abb. 4-9: Embryo im IV-Zellstadium und im Stadium der Blastozyste

A: vier Interphasenkerne (HOECHST-Färbung, 63x)

B: Lipidfärbung im selben Embryo (Nilrot, 63x)

C: Blastozyste Tag 8 (HOECHST-Färbung, 25x)

D: Blastozyste Tag 8, Lipidfärbung im selben Embryo (Nilrot, 25x)

Tabelle 4-12: Embryonalentwicklung von in vitro fertilisierten Rinderoozyten in Abhängigkeit vom Serumzusatz

Serum- zusatz	N COK	Furchungsrate N (% mean ± SE)	Blastozystenrate N Embryonen (% mean ± SE)
ECS	523	378 (71,2 ± 9,7)	121 (31,8 ± 3,7) ^a
FCS	521	360 (69,1 ± 2,9)	90 (24,6 ± 6,5) ^b

^{a,b} p<0,05

Tabelle 4-12 zeigt die Furchungs- und Entwicklungsraten an Tag 2 und Tag 8 nach IVF nach Verwendung von ECS bzw. FCS als Serumsupplementierung. Dabei ist zu erkennen, dass die Blastozystenrate im Medium mit ECS signifikant erhöht war. Am Tag 2 nach IVF waren die Furchungsraten in Abhängigkeit vom verwendeten Serum nicht signifikant verschieden.

Die Anzahl der Zellkerne an den verschiedenen Entwicklungstagen ist ein Hinweis auf die zeitgerechte Entwicklung der Embryonen.

Tabelle 4-13 zeigt die Anzahl der Zellkerne an den verschiedenen Entwicklungstagen in Abhängigkeit vom verwendeten Serumzusatz.

Tabelle 4-13: Anzahl der Zellkerne in Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung

Tag nach IVF	ECS		FCS	
	N Embryonen	Anzahl der Zellkerne (mean ± SEM)	N Embryonen	Anzahl der Zellkerne (mean ± SEM)
d 2	118	2,9 ± 0,1	99	3,5 ± 0,2
d 4	94	12,5 ± 1,8	89	8,7 ± 0,4
d 8	115	103,0 ± 4,5 ^a	89	88,6 ± 4,0 ^b

^{a,b} p<0,05

An Tag 4 und Tag 8 nach IVF war die mittlere Anzahl der Zellkerne bei der Verwendung von ECS höher als bei der Verwendung von FCS. Die Kernzahl war am Tag 8 nach IVF bei Verwendung von ECS als Serumzusatz zum Kulturmedium signifikant erhöht.

Das Auftreten von Mitosen ist neben den Zellkernen ein weiteres Qualitätsmerkmal während der Entwicklung der Embryonen. Werden in den Embryonen zum Zeitpunkt der Färbung Mitosen beobachtet, so kann man davon ausgehen, dass diese Embryonen vital sind und eine Weiterentwicklung wahrscheinlich ist.

Tabelle 4-14: Anteil Embryonen mit Mitosen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung

Tag nach IVF	ECS			FCS		
	N Embryonen	Embryonen mit Mitosen		N Embryonen	Embryonen mit Mitosen	
	Total	N	%	total	N	%
d 2	118	34	28,8 ^a	99	26	26,3 ^a
d 4	94	30	31,9 ^a	89	29	32,6 ^a
d 8	115	68	59,1 ^b	89	45	50,6 ^b

^{a,b} p<0,05

In mehr als der Hälfte der Embryonen wurden am Tag 8 nach IVF Mitosen nachgewiesen werden (Tabelle 4-14). Je weiter das Entwicklungsstadium fortgeschritten war, desto mehr Mitosen pro Embryo wurden beobachtet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Serumsupplementierungen war nicht vorhanden.

Der Anteil degenerierter Embryonen an den verschiedenen Entwicklungstagen nach IVF war bei den Blastozysten am Tag 8 bei Verwendung von ECS im Kulturmedium am geringsten (Tabelle 4-15). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Serumzusätzen bestand nicht.

Tabelle 4-15: Anteil degenerierter Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungstag und der Serumsupplementierung

Tag nach IVF	ECS			FCS		
	N Embryonen	Embryonen degeneriert		N Embryonen	Embryonen degeneriert	
	total	N	%	total	N	%
d 2	118	23	19,5 ^a	99	11	11,1
d 4	94	10	10,6 ^a	89	7	7,9
d 8	115	4	3,5 ^b	89	9	10,1

^{a,b} p<0,05

Nach der Bestimmung der Zellkerne in den verschiedenen Embryonen wurden die Fluoreszenzintensitäten der Lipide in den Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium gemessen. Mit dem Fortgang der Entwicklung stieg die Fluoreszenzintensität in beiden Serumgruppen signifikant an (Tabelle 4-16). Obwohl die Anzahl der Zellkerne bei Verwendung von ECS supplementiertem Medium höher war als bei der Verwendung von FCS (Tabelle 4-13) wurde keine unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Embryonen festgestellt, die mit den beiden Serumzusätzen kultiviert worden waren (Tabelle 4-16).

Tabelle 4-16: Fluoreszenzintensität (µA/ Embryo) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen

Tag nach IVF	ECS		FCS	
	N	mean ± SEM	N	Mean ± SEM
d 2	118	464,4 ± 19,6 ^a	99	408,4 ± 25,6 ^a
d 4	94	589,3 ± 22,3 ^b	89	613,2 ± 20,1 ^b
d 8	115	799,6 ± 18,3 ^c	89	760,1 ± 22,2 ^c

^{a:b:c} p<0,05 innerhalb der Spalten

Auch in den Embryonen wurden unterschiedliche Lipidverteilungsmuster beobachtet. Die Häufigkeit der verschiedenen Verteilungsmuster sowie die Fluoreszenzintensität der Lipide sind in Tabelle 4-17 und Tabelle 4-18 dargestellt.

Tabelle 4-17: Prozentualer Anteil der einzelnen Verteilungsmuster in Abhängigkeit vom Serum und des Entwicklungsstadiums

Tag nach IVF	Serumzusatz/ Embryonen total	Verteilungsmuster, N (%)			
		fein	flockig	cluster	kaum Struktur
ECS					
d 2	118	17 (14,5) ^a	91 (77,8) ^a	9 (7,7) ^a	0
d 4	94	4 (4,2) ^b	74 (89,4) ^b	5 (5,3)	1 (1,1)
d 8	115	2 (1,7) ^b	111 (96,5) ^c	2 (1,7) ^b	0
FCS					
d 2	99	22 (22,2) ^c	71 (71,7) ^a	1 (1,0)	5 (5,1)
d 4	89	9 (10,1) ^d	76 (85,4) ^b	1 (1,1)	3 (3,4)
d 8	89	0	84 (94,4) ^c	0	5 (5,6)

^{a:b:c; c:d} p<0,05 innerhalb der Spalte

Während der Embryonalentwicklung stieg der Anteil Embryonen mit einem flockigen Lipidmuster signifikant an. Zwischen den verschiedenen Serumzusätzen konnte an den gleichen Entwicklungstagen kein signifikanter Unterschied im Anteil an Embryonen mit flockigem Verteilungsmuster beobachtet werden (Tabelle 4-17).

Mit dem Anstieg des Anteils Embryonen mit flockigem Verteilungsmuster stieg auch die Fluoreszenzintensität der Lipide signifikant in dieser Gruppe an (Tabelle 4-18). Zwischen den verschiedenen Serumzusätzen wurde hinsichtlich der Lipidintensität an den gleichen Entwicklungstagen kein signifikanter Unterschied beobachtet.

Tabelle 4-18: Fluoreszenzintensität der Lipide in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen und dem Verteilungsmuster

Serumzusatz/ Tag nach IVF	N total	Intensität (mean ± SEM) in µA/ Embryo			
		fein	flockig	cluster	kaum Struktur
ECS					
d 2	118	260,9 ± 29,4 (17)	525,4 ± 19,5 (91) ^a	232,9 ± 71,3 (9)	-
d 4	94	288,3 ± 36,8 (4)	610,7 ± 22,5 (84) ^a	521,0 ± 128,2 (5)	345,0 (1)
d 8	115	628,0 ± 100,0 (2)	808,6 ± 18,3 (111) ^b	473,0 ± 5,0 (2)	-
FCS					
d 2	99	332,2 ± 26,1 (22)	456,0 ± 32,4 (71) ^a	192,0 (1)	110,6 ± 24,9 (5)
d 4	89	528,6 ± 48,3 (9)	633,7 ± 21,4 (76) ^b	708,0 (1)	317,3 ± 43,4 (3)
d 8	89	-	774,1 ± 22,6 (84) ^c	-	524,0 ± 4,2 (5)

^{a,b; a,b,c} p<0,05 innerhalb der Spalte und der Serumzusätze

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden an Oozyten von Rindern der Rasse Deutsches Fleckvieh Basisdaten zum Lipidgehalt und Lipidmustern im Zytoplasma erhoben. Zunächst wurde der Lipidgehalt, gemessen an der Fluoreszenzintensität nach Färbung mit Nilrot, vor und nach einer In-vitro-Maturation (IVM) in Abhängigkeit von der COK-Morphologie untersucht. Gleichzeitig wurde die Chromatinkonfiguration derselben Oozyten während der IVM bestimmt sowie die Entwicklungskompetenz der Oozyten der verschiedenen COK-Klassen untersucht.

Im darauffolgenden Experiment wurden Untersuchungen zum Einfluss der Serumsupplementierung im Medium auf den Lipidgehalt in Oozyten vor und nach der IVM und die nachfolgende Entwicklungskompetenz durchgeführt.

5.1 Untersuchungen zu nukleären Veränderungen in Oozyten der COK-Klassen I bis IV

Der Einfluss der Cumuluszellen (HASHIMOTO 2009; RODRIGUEZ et al. 2009) und ihre Morphologie (SÜSS et al. 1988; HYTTEL et al. 1989; CETICA et al. 1999a) sowie der Einfluss von Kultivierungsmedien auf die Entwicklung der Oozyten wurde in vielen Studien unter verschiedenen Aspekten in Hinblick auf die Vorhersage der Entwicklungskompetenz von Oozyten untersucht.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Cumuluszellen eine zentrale Rolle sowohl bei der Kernreifung als auch bei der zytoplasmatischen Reifung und der Entwicklungskompetenz besitzen (SIRARD et al. 1988). Daraus abgeleitet sind die Morphologie des Cumulus (Dichte und Menge der Zellschichten) und der Zustand des Zytoplasmas (Homogenität) wichtige Parameter für eine erfolgreiche Entwicklung.

In der Literatur werden die COK in Abhängigkeit vom Cumulus in bis zu neun Klassen eingeteilt (DE LOOS et al. 1992; SIRARD et al. 1995; DE WIT und KRUIP 2001; BILODEAU-GOESEELS und PANICH 2002).

In den eigenen Untersuchungen wurden die COK in vier Klassen (COK-Klasse I bis IV) eingeteilt (Tabelle 3-1).

Neben der Cumulusmorphologie ist die Chromatinkonfiguration in den Oozyten ein weiterer Parameter für die Beurteilung der Oozytenqualität. Anhand der Veränderungen des Chromatins im Zellkern können Fortschritte der Maturation und später der embryonalen Zellteilung beurteilt werden. Eine erfolgreiche Reifung der Oozyten in vitro weist auf die Qualität der Zellkulturbedingungen hin.

Eine erfolgreiche Kernreifung mit dem Erreichen des Metaphase II-Stadiums ist jedoch nicht ausreichend für die Beurteilung der Entwicklungskompetenz der Oozyten. Die

reifungsbedingten Veränderungen im Zytoplasma sind ebenso für die weitere Entwicklung von Bedeutung (SÜSS et al. 1988; DE LOOS et al. 1992; NIEMANN und MEINECKE 1993; FAIR et al. 1995; SOSNOWSKI J. et al. 1995; CETICA et al. 1999a; CETICA et al. 1999b; HEGELE-HARTUNG et al. 1999; MERMILLOD et al. 1999; OTZDORFF 2006).

Die Dauer einer erfolgreichen IVM beim Rind wird in der Literatur mit 18-28h angegeben (OTZDORFF 2006; 18h: KING et al. 1986; 20h: SÜSS, WÜTHRICH 1985; 24h: HUNTER 1980; SHAMSUDDIN et al. 1993; MONAGHAN et al. 1993; ENRIGHT et al. 2000; GORDON 2003; 26-28h: SHEA et al. 1976). Dazu müssen sich die Oozyten nach der Gewinnung aus dem Follikel zu Beginn der IVM im unreifen Entwicklungsstadium (Germinalvesikel, Diplotän) befinden. In den eigenen Untersuchungen befanden sich zum Zeitpunkt der COK-Gewinnung etwa 80% der Oozyten der COK-Klassen I (76,5%) und II (83,6%) im Diplotänstadium (siehe Tabelle 4-2). Ähnliche Beobachtungen machten MAYES und SIRARD (2001), die 88% der Oozyten mit kompaktem und 70% der Oozyten mit aufgelockertem Cumulus oophorus im Germinalvesikelstadium fanden.

Nach Abschluss der 24-stündigen Maturation hatten Oozyten der Klasse I zu einem geringfügig höheren Prozentsatz (67%) das Stadium der Metaphase II erreicht als die Oozyten der Klasse II (60%). Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Untersuchungen erzielt werden (OTZDORFF 2006; ALM et al. 2008).

In den Untersuchungen von OTZDORFF (2006) wurde aber auch gezeigt, dass Oozyten, die bereits bei der Gewinnung einen aufgelockerten oder expandierten Cumulus haben, die meiotische Weiterentwicklung früher fortsetzten als Oozyten mit kompaktem Cumulus. So hatten sich schon nach 20h In-vitro-Maturation 43% Oozyten der Klasse II und 71% Oozyten der Klasse III im Stadium der Metaphase II (M II) befunden; hingegen lag der M II-Anteil bei den Oozyten der Klasse I erst bei 16,2%. Nach 24h IVM waren in allen Gruppen gleiche Mengen (57%, 59% und 62%) an M II-Oozyten zu beobachten.

MAYES und SIRARD (2001) führen dies auf die Herkunft der Oozyten aus atretisch veränderten Follikeln zurück. Die Kontrolle der meiotischen Arretierung der Oozyte ist durch die Atresie von Follikelzellen gestört (MAYES und SIRARD 2001; OTZDORFF 2006). Durch die Lockerung der Cumuluszellen verlieren hemmende Faktoren ihren Einfluss auf die Oozyten. Auch bei anderen Tierarten, wie z.B. der Stute, und im Humanbereich gibt es Hinweise, dass eine bessere meiotische Kompetenz bei Oozyten mit expandiertem Cumulus zu verzeichnen war (LEFEVRE et al. 1987; HINRICHS 1997; HINRICHS und WILLIAMS 1997).

5.2 Untersuchungen zum Lipidgehalt und Lipidmuster in Oozyten der COK-Klassen I bis IV

Neben der Kernreifung spielt vor allem die zytoplasmatische Reifung eine wichtige Rolle für die Erlangung der Entwicklungskompetenz von Oozyten. Sie ist durch Veränderungen verschiedener Organellen und durch die Proteinsynthese gekennzeichnet. Neben den Mitochondrien ist der Anteil an Lipiden während der Entwicklung von der Oozyte zum Embryo von Bedeutung. Lipide spielen eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel der Oozyten während der Reifung und Befruchtung sowie bei der embryonalen Entwicklung und sind Komponenten der Zellmembran (ISACHENKO et al. 2001). Ihre Menge und Verteilung haben Auswirkungen auf die Sensitivität von Oozyten und Embryonen im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung (DOBRINSKY und JONSON 1994; VAJTA et al. 1997).

Funktionelle Untersuchungen zur physiologischen Relevanz von Lipidtropfenanhäufungen während der meiotischen Entwicklung wurden bis heute nur bei Oozyten des Schweins beschrieben, bei denen große Lipidtropfen charakteristisch sind. In den eigenen Untersuchungen wurde der intrazelluläre Lipidgehalt mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermittelt, ohne die verschiedenen Fette wie Triglyzeride, freie Fettsäuren, Phospholipide und Cholesterol zu unterscheiden. Dabei wurde versucht, die verschiedenen Erscheinungsformen in vier Muster einzuteilen: fein, flockig, cluster und kaum Struktur (siehe Abb. 4-3).

Andere Autoren beschreiben die Lipidtropfen als gleichmäßig, homogen bis einseitig peripher (halbmondförmig) verteilt (GROHNDAHL et al. 1995, STURMEY et al. 2003). Im Vergleich dazu sind die Lipidtropfen bei Oozyten von Katzen und Hunden im Zentrum der Oozyten zusammengelagert (GURAYA 1965; SZABO 1967).

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit vorhandener Literatur ist auf Grund unterschiedlicher Nachweismethoden nur bedingt möglich.

Bei Oozyten der Stute wurde eine gleichmäßige Verteilung der Fette überwiegend im GV-Stadium beobachtet, die sich bis zur Metaphase II zu einer einseitigen Verteilung veränderte (GROHNDAHL et al. 1995). In den eigenen Untersuchungen zeigten die meisten der Oozyten zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung ein flockiges Lipidmuster (siehe Tab. 4-3 und Tab. 4-4), welches ebenfalls gleichmäßig verteilt war. Während der IVM stieg der Anteil dieser Form noch an. In degenerierten Oozyten scheint sich die Struktur der Lipidtropfen aufzulösen.

ISACHENKO et al. (2001) beschreiben in einer mikroskopischen Studie, dass Lipidtröpfchen in bovinen Oozyten im GV-Stadium homogene Struktur besitzen. Die

Verstoffwechslung von Lipiden erfolgt beim Rind ohne Zwischenstufen direkt aus den Lipidtröpfchen. Beim Schwein dagegen lassen sich erst dunkle, homogene Lipidvesikel finden, die nach 12-stündiger Maturation im Transmissions-Elektronenmikroskop als graue Vesikel mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind. ISACHENKO et al. (2001) vermuten daher, dass beim Schwein die zytoplasmatische Lipolyse ausschließlich in den grauen Vesikeln stattfindet. Möglicherweise findet die Lipolyse hier in zwei Stufen statt. Die unmittelbar nach der Oozytengewinnung dunklen Lipidvesikel wandeln sich in graue Vesikel um und werden als solche nach Anlagerung an das endoplasmatische Retikulum metabolisiert (ISACHENKO et al. 2001).

Die zytoplasmatischen Lipidtröpfchen enthalten Proteine, die am Lipidmetabolismus aktiv beteiligt sind, als Membrantransporter fungieren können und im Phospholipidmetabolismus involviert sind (LIU et al. 2004; MANRIQUE 2008). Damit kommt den Lipiden neben der Rolle als Energiespeicher eine zusätzliche Bedeutung bei anderen zellulären Prozessen zu.

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen über die quantitative Bestimmung von Lipiden in Oozyten und Embryonen. Lipidgehalte wurden für die Tierarten Schwein (MC EVOY et al. 2000; STURMEY und LEESE 2003) und Rind (FERGUSON und LEESE 1999; LEROY et al. 2005) bestimmt.

Die Analysen basierten auf der Messung der Lipidmasse. Es gibt jedoch widersprüchliche Ergebnisse. So beschrieben STURMEY und LEESE (2003) den Gehalt an Triglyzeriden in einer einzelnen Oozyte des Schweines mit 135 ng vor der IVM und 122 ng nach der IVM, MC EVOY et al. (2000) dagegen nur mit der Hälfte (74 ng vor IVM).

Ein direkter Vergleich eigener Ergebnisse mit Lipidintensitäten bzw. Lipidgehalten anderer Studien ist nur eingeschränkt möglich, da die Lipidbestimmung in den einzelnen Arbeiten mit unterschiedlichen Methoden erfolgte. So wurden verschiedene Färbe- und Messtechniken angewendet bzw. wurden biochemische Methoden (Chromatographie) eingesetzt, um den Lipidgesamtgehalt und/ oder einzelne Fettsäureklassen oder Einzelfettsäuren zu analysieren. Zusätzlich wurden in früheren Untersuchungen zum Lipidgehalt in Oozyten keine oder nur zusammengefasste Oozytenklassen in Abhängigkeit der Cumuluszellmorphologie definiert. Aufgrund mangelnder Sensitivität der Methoden musste ein Mindestprobenumfang gewährleistet sein und daher wurden häufig größere, gepoolte Zellgruppen (10-1000 Oozyten) aufbereitet, deren Lipidgehalt analysiert wurde. In den eigenen Untersuchungen wurde der relative Lipidgehalt (Neutrale Lipide) in einzelnen Oozyten und Embryonen mit Hilfe

eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Der Lipidgehalt, gemessen an der Fluoreszenzintensität, stieg nach der IVM in den Oozyten der COK-Klassen I und II an. Eine Zunahme der Lipidtröpfchen im Zytoplasma von Oozyten während der Maturation wird auch von anderen Autoren (KRUIP et al. 1983; DE LOOS et al. 1992; MANRIQUE 2008) beschrieben. Eine erhöhte Lipaseaktivität in den Oozyten während der IVM konnte von CETICA et al. (2002) nachgewiesen werden.

In den Oozyten der COK-Klasse III wurde ein umgekehrtes Bild beobachtet. Hier war der Gehalt vor der IVM höher als nach IVM (siehe Abb. 4-5). Aufgrund der überreifen, degenerierten Cumuluszellen erfolgte vermutlich keine Aufnahme von Lipiden aus dem Medium ins Zytoplasma der Oozyten. Die Oozyten schienen aber noch metabolisch aktiv zu sein, so dass endogene Lipidreserven abgebaut werden konnten, was sich im reduzierten Lipidgehalt widerspiegelte.

In Oozyten der COK-Klasse IV, die zum Zeitpunkt der Gewinnung keine Cumuluszellen hatten und zum größten Teil degeneriert waren, blieb der Lipidgehalt nach der Reifungszeit unverändert. Diese Oozyten degenerierten und schienen aufgrund der fehlenden Cumulusausstattung und einem oft bereits aufgehellten Zytoplasma kaum mehr metabolische Aktivität zu besitzen. Dass Oozyten mit hellem Ooplasma weniger Lipide als Oozyten mit dunklem Ooplasma enthalten, und dies ein Hinweis auf die Entwicklungskompetenz sein kann, wird auch von anderen Autoren beschrieben (KIM et al. 2001; LEROY et al. 2005; NAGANO et al. 2006; MANRIQUE 2008).

Ein geringer Prozentsatz von Oozyten der Klasse IV erreichte dennoch die M II. Die Entwicklungskompetenz war jedoch stark reduziert (siehe Kapitel 5.3). Bereits 1988 beschrieben SÜSS et al., dass von partiell oder vollständig denudierten Oozyten nur wenige das Stadium der Metaphase II erreichten.

KRUIP et al. (1983), HYTTEL et al. (1997) und FAIR et al. (1997) beschreiben ebenfalls die Zunahme von Lipiden in Oozyten während der Follikulogenese und der Oozytenmaturation. Aktive, aber unbekannte Faktoren im Serum modulieren die deutliche Lipidakkumulation in den Oozyten. Im Umkehrschluss wäre es mit Kenntnis der Ursache für die serumbedingte Lipidanreicherung möglich, diese während der In-vitro-Maturation bis zu einem gewissen Grad zu kontrollieren.

Die Fluoreszenzintensität war kaum von den Verteilungsmustern abhängig (siehe Tab. 4-5). Geringe Fluoreszenzintensität, d. h. geringer Fettgehalt, war in Oozyten der Klasse IV und/ oder degenerierten Oozyten zu beobachten, sowie in Oozyten, die auch

kaum Struktur aufwiesen (siehe Abb. 4-6 und Abb. 4-7). In jedem Fall waren es Oozyten, die kaum oder keine Entwicklungskompetenz mehr aufwiesen.

Dass der zytoplasmatische Lipidgehalt in Oozyten mit erhöhter Entwicklungskompetenz höher ist, als in Oozyten mit geringerer Entwicklungskompetenz, zeigten Untersuchungen von MANRIQUE (2008), der die Oozyten mit Hilfe der Brillant-Cresyl-Blau-Färbung in die beiden Kategorien BCB+ (abgeschlossenes Wachstum, entwicklungskompetent) und BCB- (Wachstumsphase, mäßig entwicklungskompetent) einteilte.

Im Verlauf der zytoplasmatischen Reifung kommt es zur Umstrukturierung der intrazytoplasmatischen Organellen. Die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum in den Zellen verbinden sich mit den intrazellulären Lipidtröpfchen (ISACHENKO et al. 2001) zu einer Funktionseinheit im Hinblick auf die Energiegewinnung in der Zelle (SANTHANANTHAN et al. 1992). Diese Feststellungen sprechen für die metabolische Aktivität von Lipidvesikeln während der Maturation, da das ER die für die Lipidhydrolyse erforderlichen Enzyme enthält (FUJIMOTO und OHSAKI 2006). Die Mitochondrien nutzen die Produkte des Lipidkatabolismus zur ATP-Produktion und stellen ATP für die energieverbrauchenden Vorgänge während der Maturation, der Fertilisation und der embryonalen Entwicklung zur Verfügung (VAN BLERKOM et al. 1995; OTZDORFF 2006). Die mitochondriale Reifung, in deren Verlauf es zu einer Umverteilung der Mitochondrien im Zytoplasma kommt, findet im Zuge der zytoplasmatischen Reifungsvorgänge unter Erlangung einer zunehmenden Aktivität statt (STOJKOVIC et al. 2001; WILDING et al. 2001; VAN BLERKOM 2004). OTZDORFF (2006) beschreibt für Mitochondrien im Verlauf der Maturation unterschiedliche Aggregationsstadien, die sich ähnlich den Lipidmustern von feinkörniger Struktur ausgehend verändern. Die oben beschriebene enge Korrelation von ER, Mitochondrien und Lipidtröpfchen könnte auch ähnliche strukturelle Muster im Zytoplasma bedingen, die sich abhängig vom Energiebedarf der einzelnen Reifungsstadien der Zelle ausprägen.

Insgesamt belegen sämtliche Untersuchungen, dass auch die intrazytoplasmatischen Lipide des Oolemmas metabolisch aktive Strukturen sind, die zum einen als Energiespeicher dienen, aber auch in andere zelluläre Prozesse involviert sind.

5.3 Entwicklungskompetenz der Oozyten der COK-Klassen I bis IV

In den verschiedenen COK-Klassen wurden unterschiedliche Lipidmuster und Lipidgehalte erfasst. Nachfolgend wurde die Entwicklungskompetenz der Oozyten aus den unterschiedlichen COK-Klassen überprüft. Der Anteil an Blastozysten nach IVM/IVF gilt als Parameter für eine erfolgreiche In-vitro-Produktion von Embryonen.

Wie bereits erwähnt, wurden die Oozyten in vier COK-Klassen eingeteilt. Nach IVM/IVF/IVC wurden von den Oozyten der COK-Klassen I und II, in denen nach der IVM eine Erhöhung des Lipidgehaltes zu verzeichnen war, signifikant höhere Blastozystenraten erzielt, als von den Oozyten der COK-Klassen III und IV (32,7% und 30% vs. 5,5% und 0%) (siehe Tab. 4-6).

Andere Autoren beschrieben eine signifikant bessere Entwicklungsrate von Oozyten der COK-Klasse I gegenüber der COK-Klasse II, wobei die COK-Klassen unter Berücksichtigung der Cumulusausstattung und der Zytoplasmabeschaffenheit unterschiedlich differenziert wurden. Dementsprechend wurden unterschiedliche Ergebnisse in den Blastozystenraten erzielt.

So teilten BONI et al. (2002) die Oozyten in fünf Klassen ein. Die Oozyten, die einen kompakten Cumuluszellverband und ein dunkles Zytoplasma aufwiesen, zeigten bessere Entwicklungsraten (19-23%) als Oozyten mit hellem, durchscheinendem Zytoplasma (9-12%). Dabei war die Blastozystenrate am höchsten, wenn die Oozyten ein dunkles, heterogenes Zytoplasma aufwiesen (29%). Die dunklere Färbung des Zytoplasmas geht mit einem höheren Lipidgehalt der Eizelle einher (LEROY et al. 2005; NAGANO et al. 2006; JEONG et al. 2009) und die Oozyte ist aufgrund relativ großer Lipidreserven im Zytoplasma mit Hilfe von Lipasen in der Lage, nach der Abtrennung der Cumuluszellen, die Lipide als oxidatives Substrat zu nutzen. Die Kategorie „dunkel, heterogen“ (BONI et al. 2002) kann mit dem Lipidmuster „cluster“ aus den eigenen Untersuchungen verglichen werden, welches die höchsten Lipidwerte in den Oozyten der COK-Klassen I und II vor der IVM aufwiesen und ebenfalls die höchsten Blastozystenraten ($\geq 30\%$) zeigten (siehe Tab. 4-6).

Ähnliche Blastozystenraten wurden in den Untersuchungen von OTZDORFF (2006) erzielt, in denen die gleiche Einteilung der COK-Klassen vorgenommen wurde wie in der vorliegenden Arbeit. Während auch hier Oozyten der COK-Klassen III und IV eine geringere Entwicklungskompetenz und einen höheren Anteil an degenerierten Oozyten zeigten, war die Blastozystenrate der COK-Klassen I und II (26-37%) ähnlich denen der vorliegenden Arbeit. Diese Ergebnisse befinden sich auch in Übereinstimmung mit

anderen in der Literatur publizierten Ergebnissen (DE WIT und KRUIP 2001; BILODEAU-GOESEELS und PANICH 2002).

Die ebenfalls hohe Blastozystenrate von Oozyten der Klasse II (30%) in den vorliegenden Untersuchungen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Oozyten, die bereits bei Gewinnung einen aufgelockerten Cumulus haben, die meiotische Weiterentwicklung früher fortsetzen als Oozyten mit kompaktem Cumulus. Ähnliche Aussagen wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben (OTZDORFF 2006). MAYES und SIRARD (2001) führen dies auf die Herkunft der Oocyte aus einem bereits leicht atretisch veränderten Follikel zurück. Die Kontrolle der meiotischen Arretierung der Oocyte ist durch die Atresie von Follikelzellen gestört (MAYES und SIRARD 2001; OTZDORFF 2006). Durch die Lockerung der Cumuluszellen verlieren hemmende Faktoren ihren Einfluss auf die Oozyten.

In Untersuchungen an Oozyten von Stuten und im Humanbereich wurden Hinweise für eine bessere meiotische Kompetenz von Oozyten mit expandiertem Cumulus beschrieben (LEFEVRE et al. 1987; HINRICHS 1997; HINRICHS und WILLIAMS 1997).

5.4 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Seren

Proteine im Kulturmedium spielen eine wichtige Rolle und dienen als Quelle für Wachstumsfaktoren, welche die embryonale Entwicklung direkt und/ oder indirekt über die Cumuluszellproliferation unterstützen. Verschiedene Proteinzusätze zum Medium können einen großen Einfluss auf die in vitro Entwicklung von Embryonen haben, der sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken kann (PINYOPUMMINTR und BAVISTER 1991; BAVISTER 1995).

Die besten Ergebnisse bei der Durchführung der IVP wurden nach Einsatz von fetalem Kälberserum (FCS) oder östrischem Kuhserum (ECS) erzielt (FUKUI et al. 1991; MATSUOKA et al. 1992; MARX 2002). Trotz zahlreicher Untersuchungen, die belegen, dass serumfrei produzierte Embryonen den in vivo gewonnenen Embryonen ähnlicher sind, wird Serum routinemäßig aufgrund seiner günstigen Effekte auf die Embryonalentwicklung (siehe Kapitel 2.5) im Verfahren der IVP eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Maturations- und Kulturmedien mit jeweils 10% ECS oder 10% FCS supplementiert. Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss der Seren auf die Veränderung des Lipidgehaltes und eine möglicherweise beeinflusste Entwicklungskompetenz der Oozyten unter Laborbedingungen festzustellen und zu vergleichen.

Bisher ist keine Arbeit bekannt, welche die Ergebnisse nach Verwendung von FCS und ECS im Kulturmedium bezüglich des Lipidgehaltes von Oozyten und Embryonen vergleicht. Da die beiden verwendeten Seren in praxi häufig eingesetzt werden, und ein Einfluss des Lipidgehaltes in Oozyten und Embryonen nachweislich Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit nach Kryokonservierung hat, sollten Basisdaten über Lipidgehalte von Oozyten und Embryonen erfasst und bewertet werden.

5.4.1 Untersuchungen zum Einfluss der Seren während der IVM

Wie bereits beschrieben, werden in der Literatur unterschiedliche Seren als Medienzusatz verwendet. In den meisten Arbeiten wurde der Einfluss der Seren jedoch nur auf die Embryonenentwicklung untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss auf die Reifung und den Lipidgehalt untersucht. Unabhängig von der Art des Serums wurden gleiche Reifungsraten (70%) beobachtet (siehe Tab. 4-7). Auch konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Lipide in den Oozyten nach der IVM in den verschiedenen Seren gemessen werden. Der Lipidgehalt in beiden Gruppen war jedoch im Vergleich zu den Oozyten vor der IVM (siehe Tab. 4-9) signifikant erhöht.

Der Anteil an Oozyten mit einem flockigen Verteilungsmuster der Lipide war unter Verwendung von ECS signifikant erhöht (siehe Tab. 4-8). Auch wurde hier ein in der Tendenz höherer Lipidgehalt pro Oozyte gemessen, als bei Verwendung von FCS (siehe Tab. 4-10).

Als Ursache für die Anreicherung der Lipide in der Oozyte nach IVM wird die Aufnahme aus dem serumsupplementierten Medium angesehen (GARDNER et al. 1994; THOMPSON et al. 1995; KIM et al. 2001).

Der genaue Mechanismus der Anreicherung von intrazytoplasmatischen Lipiden ist noch nicht aufgeklärt. Bekannt ist, dass Zellen in Kultur in der Lage sind Fettsäuren, Phospholipide sowie Triglyzeride aus dem serumsupplementierten Medium aufzunehmen.

Die Aufnahme von freien Fettsäuren in die Oozyte erfolgt direkt aus dem Medium oder indirekt über die Granulosazellen des Cumulus oophorus. Granulosazellen nutzen LDL (low density lipoproteins) und HDL (high density lipoproteins) aus dem Serum für die Progesteronsynthese (MANRIQUE 2008). In diesen Komplexen enthaltene Lipide könnten der Oozyte als Energieressource zur Verfügung stehen.

5.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Seren auf die Embryonenentwicklung

Unterschiedliche Proteinquellen und/ oder Serumkonzentrationen im Medium beeinflussen die Kinetik der Embryonalentwicklung und die Blastozystenraten. In den vorliegenden Untersuchungen konnten nach der Verwendung von ECS als Medienzusatz signifikant höhere Blastozystenraten beobachtet werden als bei Verwendung von FCS (Tabelle 4-12). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren beobachtet (ALM et al. 2008). Ebenfalls signifikant höhere Blastozystenraten wurden in Untersuchungen von DE OLIVIERA et al. (2006) beschrieben, die ECS im Vergleich zu BSA untersuchten.

Wenige Arbeiten zu qualitativen und quantitativen Analysen des Lipidgehaltes in Embryonen liegen beim Rind (MENEZO et al. 1982; SATA et al. 1999; CHARPIGNY et al. 2003) und beim Schwein (HOMA et al. 1986; YOUNGS et al. 1994) vor. Eine prozentuale Bestimmung der Triglyzeride am gesamten Lipidgehalt wurde von CHARPIGNY et al. (2003) beschrieben. Danach beträgt dieser Anteil bei in vitro produzierten Embryonen 88%, bei in vivo produzierten Embryonen bei 40-50% (CHARPIGNY et al. 2003). Über den Gesamtgehalt an Lipiden gibt es jedoch kaum Ergebnisse.

Bei in vitro gewonnenen, kompakten Morulae konnte eine Zunahme der intrazellulären Lipide beobachtet werden. Die Zunahme der Lipide war jedoch unabhängig von der Serumsupplementierung der verwendeten Medien (CROSIER et al. 2000).

In den eigenen Untersuchungen wurden der Gesamtlipidgehalt an Hand der Fluoreszenzintensität an den Entwicklungstagen 2, 4, und 8 nach IVF gemessen. Ein signifikanter Anstieg des Lipidgehaltes im Verlauf der Entwicklung konnte auch hier unter Verwendung beider Seren beobachtet werden (Tabelle 4-16). Die höhere Lipidintensität könnte mit einer gesteigerten Aufnahme von Lipiden aus dem Medium erklärt werden. Andere Untersuchungen zeigten auch, dass die Verwendung von Serum im Medium zu einer Akkumulation von Lipiden in Rinderoozyten führte (BARCELO-FIMBRES und SEIDEL 2005).

Mit Hilfe der Sudan-Schwarz-Färbung konnte ein erhöhter innerzellulärer Lipidgehalt in bovinen Morulae und Blastozysten bestimmt werden (ABE et al. 1999), nachdem die Embryonen in serumhaltigen Medien kultiviert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Medium Unterschiede in der Anzahl der Lipidtröpfchen im Zytoplasma bestanden.

Die Anzahl der Zellkerne gilt als ein Parameter für die Qualität der Embryonen (KNIJN et al. 2003). Die gesamte Zellzahl und die Aufteilung der Zellen des Trophektoderms und der inneren Zellmasse in den Blastozysten korreliert mit der Überlebensrate der Embryonen in vivo (HARDY et al. 1989). Die Anzahl der Kerne in den Embryonen nach IVF war in unseren Untersuchungen durch die Serumsupplementierung beeinflusst (Tabelle 4-13). Am Tag 8 nach IVF war die Anzahl der Zellkerne in den Blastozysten nach Maturation und Kultivierung unter Verwendung von ECS signifikant höher als bei Verwendung von FCS. Andere Autoren, die ebenfalls ECS als Zusatz zum Medium verwendeten, erzielten ähnliche Ergebnisse (FUKUI und ONO 1989; DURNFORD et al. 1994; MUCCI et al. 2006; ALM et al. 2008). Außerdem wurden in den Untersuchungen von ALM et al. (2008) bei der Verwendung von ECS nicht nur höhere Blastozystenraten erzielt, sondern bereits am Tag 7 nach IVF ein höherer Anteil an Blastozysten beobachtet (41% vs. 29%), was wiederum auf eine beschleunigte Entwicklung hinweist.

Einen Einfluss der Proteinquelle beobachteten auch FISCHER RUSSEL et al. (2006), die verschiedene Serumkonzentrationen und BSA verglichen und zeigten, dass Serum als Zusatz zum Medium signifikant höhere Kernzahlen hervorbrachte als der Zusatz von BSA. Serumfreie Medien führten aber auch zu signifikanten Beeinträchtigung der Kernreifung in den Oozyten und zu einer Hemmung der nachfolgenden Embryonalentwicklung (LIM et al. 2003; KORHONEN et al. 2010).

Obwohl die Serumsupplementierung von Medien kontrovers diskutiert wird, kommt für die IVP von Embryonen Serum aufgrund der beschriebenen Ergebnisse in der Regel zum Einsatz.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz zahlreicher Verbesserungen in den IVP-Protokollen beträgt der Prozentsatz der *in vitro* produzierten, transfertauglichen Blastozysten zwischen 30-45%. Das Ausgangsmaterial in Form der Oozyten unterschiedlicher Entwicklungs- und Reifestadien aus den Ovarien von Kühen unbekanntem Alters und Gesundheitszustandes waren heterogen, ebenso wie die Entwicklungskompetenz der gewonnenen Oozyten. Neben Eizelldurchmesser, Kernstatus, Cumulusausstattung und Beschaffenheit des Zytoplasmas ist der Lipidgehalt in Oozyten und Embryonen ein wichtiger Parameter für ihre Qualität und Kryotoleranz. Der Lipidgehalt in Oozyten korreliert mit der morphologischen Erscheinung des Zytoplasmas.

Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit war die Bestimmung des Lipidgehaltes in bovinen Einzeloozyten der Rasse Deutsches Fleckvieh hinsichtlich der Intensität und des Lipidmusters im Ooplasma sowie der parallelen Charakterisierung der Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von verschiedenen Cumulus-Oozyten-Komplex-Klassen (COK-Klassen) vor und nach der *In-vitro*-Maturation (IVM). Die Beurteilung der weiteren Entwicklungsfähigkeit erfolgte anhand von IVF und IVC.

Basierend auf der Messung der Fluoreszenzintensität des Zytoplasmas zeigten die Oozyten der Klassen I, II und III ähnliche Werte (638 ± 34 ; 575 ± 43 und $715 \pm 60 \mu\text{A}/\text{Oozyte}$), waren aber signifikant höher als in den Oozyten der COK-Klasse IV ($326 \pm 45 \mu\text{A}/\text{Oozyte}$).

Nach der IVM war die Fluoreszenzintensität und damit der Lipidgehalt in den Oozyten der Klassen I und II höher (736 ± 39 und $631 \pm 28 \mu\text{A}/\text{Oozyte}$), in der Klasse III ($558 \pm 49 \mu\text{A}/\text{Oozyte}$) hingegen war eine signifikante Abnahme zu beobachten.

Es wurden drei wiederkehrende Lipidmuster festgestellt, die abhängig von der COK-Klasse und dem Entwicklungsstadium der Oozyte auftraten. Die vor der Maturation vorherrschende feinkörnige Zytoplasmastruktur veränderte sich im Verlauf der Reifung zu einer flockigen Struktur.

Die Entwicklungsraten zur Blastozyste am Tag 8 nach IVF war in den Klassen I und II signifikant höher (32,7% und 30%) als in den Gruppen III und IV (5,5% und 0%). Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Seren als Medienzusatz untersucht. Der Lipidgehalt in den Oozyten wurde durch das verwendete Serum beeinflusst. Die höchste Fluoreszenzintensität konnte in den Oozyten nach IVM in ECS-supplementiertem Medium gemessen werden. Unterschiede im Lipidmuster waren hier ebenfalls zu beobachten. Weiterhin führte die Mediensupplementierung mit ECS oder FCS zu Unterschieden in der frühen embryonalen Entwicklung. Nach der

embryonalen Entwicklung (Tag 8 nach IVF) war der Lipidgehalt signifikant höher als an Tag 2 nach IVF. Die höchste Intensität wurde bei Verwendung von ECS am Tag 8 nach IVF ($799 \pm 18,3$ vs. $760,1 \pm 22,2$ $\mu\text{A/ Embryo}$) gemessen.

Nicht nur der Anteil Blastozysten (31,8% vs. 24,6%), sondern auch die Anzahl der Zellkerne pro Blastozyste (103 vs. 88) stieg nach ECS-Supplementierung des Mediums signifikant an.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass entwicklungs kompetente Oozyten (COK-Klassen I und II) Lipide aus dem umgebenden Milieu aufnehmen und sich dieser Anstieg auf die frühe Embryonalentwicklung positiv auswirkt.

Unterschiedliche Serumzusätze führen zu unterschiedlicher Embryonenentwicklung. Die Verwendung von ECS als Serumzusatz zum Medium führte in allen untersuchten Parametern zu höheren Werten und zu besseren Entwicklungsraten.

In weiteren Versuchen ist zu verifizieren, ob diese in vitro produzierten Embryonen einen Vorteil für die weitere Entwicklung besitzen und bessere Überlebensraten nach Übertragung in Empfängertiere zeigen.

7 SUMMARY

Research on the bovine oocyte's lipid content and its influence in embryonic developmental capacity before and after in vitro maturation and in vitro fertilization.

Despite significant improvements in the ivp-protocols, the percentage of in vitro-produced blastocysts suitable for transfer is 30-45%. The base material, being oocytes of variable development and maturity stages taken from the ovaries of cows of unknown ages and health status, as well as the developmental competence of these received oocytes are very heterogeneous: Besides oocyte diameter, nuclear status, cumulus morphology, and the composition of the cytoplasm, the lipid content of oocytes and embryos is an important parameter for their quality and cryotolerance. The lipid content of immature oocytes is correlated with the morphology of the cytoplasm.

The purpose of this research project was to indirectly determine the lipid content of bovine oocytes of the breed German Fleckvieh through measuring their fluorescence intensity. At the same time, lipid patterns in the ooplasm were categorized and the chromatin configuration of oocytes of diverse classes of cumulus-oocyte complexes (coc-classes I-IV) were characterized before and after in vitro maturation (ivm).

Evaluation of onward viability after in vitro fertilization was conducted in two parallel experimental approaches with different serum supplements.

After measurement of the cytoplasmic fluorescence intensity of oocytes before IVM, oocytes from group I, II and III had similar fluorescence intensities (638 ± 34 ; 575 ± 43 and $715 \pm 60 \mu A/$ oocyte, respectively) but these were significantly higher than those of oocytes of group IV ($326 \pm 45 \mu A/$ oocyte). After IVM the fluorescence intensities in group I- and II-oocytes were increased (736 ± 39 and $631 \pm 28 \mu A/$ oocyte) and in group III significantly decreased ($558 \pm 49 \mu A/$ oocyte).

At the time of oocyte collection class I and II oocytes were mainly in the diplotene stage (76.5% and 83.6%, respectively) while class III oocytes had already reached later stages of meiosis (diakinesis to metaphase II). At the end of ivm the proportion of degenerated oocytes was significantly higher in class IV oocytes than in other coc-classes.

Three recurring lipid patterns were detected, which occurred dependent on the coc-class and the stage of development of the oocyte. The fine-grained morphology, which prevailed before maturation, changed to a fluffy appearance after maturation.

The rate of development to the blastocyst stage after IVF was significantly higher in group I and II (32.4% and 30.7%) than in group III and IV (6.7% and 0%, respectively). In the second part of the study the effect of serum supplementation (ECS vs. FCS) was investigated.

The lipid content in oocytes was influenced by the application of serum (ECS, FCS) in media for IVM and IVC. The highest fluorescence intensity was determined in oocytes after IVM in ECS supplemented medium. There were also different lipid distribution patterns after IVM with different serum supplementation.

Furthermore, the supplementation of media with ECS or FCS led to differences in the early embryonic development. During embryonic development the lipid content increased significantly from day 2 to day 8 using both sera. The highest intensity was measured with ECS on day 8 (799.6 ± 18.3 vs. 760.1 ± 22.2 $\mu\text{A}/\text{embryo}$). Not only the proportion of blastocysts (31.8 vs. 24.6%) but also the number of nuclei per blastocyst (103 vs. 88) was significantly increased after maturation and culture with ECS.

The results show that developmental competent oocytes (COC class I and II) are able to incorporate lipids from the culture medium. This incorporation could be the reason for the increase of the lipid content and the positive effect on development of the embryos.

Different serum supplementation led to different development of embryos. ECS as serum supplementation to the medium led to higher values in all parameters and better development.

The question if the produced embryos have advantages in their further development as well as better survival rates after their transfer into the recipient must be confirmed in further studies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. (1999)

Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serumfree or in serum-supplemented medium.

Mol. Reprod. Dev. **53**: 325-335

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. (2002)

Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media.

Mol. Reprod. Dev. **61**: 57-66

ALM, H.; CHOI, Y.H.; LOVE, L.; HELEIL, B.; TORNER, H.; HINRICHS, K. (2008)

Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: Kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization.

Theriogenology **70**: 1024-1029

ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; ROSCHLAU, K. (2008)

Influence of oocyte recovery method, in vitro fertilization method and serum source on embryonic development of in vitro matured bovine oocytes.

Arch. Tierz., Dummerstorf **51**: 224-234

AOYAGI, Y.; FUKUI, Y.; IWAZUMI, Y.; URAKAWA, M.; ONO, H. (1990)

Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts.

Theriogenology **34**: 749-760

ARAV, A. und ROTH, Z. (2008)

Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes?

Molecular and Cellular Endocrinology **282**: 150-152

AWASTHI, H.; SARAVIA, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BAGE, A. (2009)

Short Communication

Do cytoplasmic lipid droplets accumulate in immature oocytes from over-conditioned repeat breeder dairy heifers?

Reprod. Dom. Anim. 10.1111/j.1439-0531.2009.01514.x ISSN 0936-6768

BALLARD, C.B. (2007)

Intracellular lipids in bos indicus and bos taurus oocytes.

B.S., Texas A&M University, Thesis

BARCELO-FIMBRES, M. und SEIDEL, G. Jr. (2005)

Effect of fetal calf serum or phenazine ethosulfate and fructose or glucose on embryonic development and lipid accumulation of bovine embryos.

Reprod. Fertil. Dev. **18**: 186 (abstr.).

BAVISTER, B.D. (1995)

Culture of preimplantation embryos: fact and artefacts.

Hum. Reprod. Update **1**: 91-148

BAVISTER, B.D.; ROSE-HELLEKANT, T.A; PINYOPUMMINTR (1992)

Development of in vitro matured/ in vitro fertilized embryos into morulae and blastocysts in defined culture media.

Theriogenology **37**: 127-146

BERG, U. und BREM, G. (1990)

In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture.

Zuchthygiene **24**: 134-139

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. (1997)

Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine.

Theriogenology **47**: 13-22

BILODEAU-GOESEELS, S. und PANICH, P. (2002)

Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos.

Anim. Reprod. Sci. **71** (3-4): 143-155

BLANCHETTE-MACKIE, E.J.; DWYER, N.K.; BARBER, T.; COXEY, R.A.; TAKEDA, T.; RONDINONE, C.M. (1995)

Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes.

J. Lipid. Res. **36**: 1211-1226

BLEIL, J. D. und WASSARMAN, P.M. (1980a)

Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro.

Proc. Nat. Acad. Sci. **77**: 1029-1033

BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; ROSATI, I.; ZEDOLA, M.T.; LEONI, G.; SUCCU, S.; PAU, S.; LEDDA, S. (2007)

Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells.

Theriogenology **68**: 1138-1149

BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. (2002)

Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores.

Biol. Reprod. **66**: 836-842

BRACKETT, B.G. und ZUELCKE, K.A. (1993)

Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos.

Theriogenology **39**: 43-64

BREITBART, H. und NOAR, Z. (1999)

Proteinkinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction.

Rev. Reprod. **4**: 151-159

CALDER, M. (2003)

Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro.

Reprod. Biol. Endocrinol. **11**: 1-14

CARLSON, D.; BLACK, D.L.; HOWE, G.R. (1970)

Oviduct secretion in the cow.

J. Reprod. Fertil. **22**: 549-552

CARMAN, K.R.; THISTLE, D.; ERTMAN, S.C.; FOY, M. (1991)

Nile red as a probe for lipid-storage products in benthic copepods.

Marine ecology progress series, Oldendorf, **74**: 307-311

CARNEGIE, J.A.; DURNFORD, R.; ALGIRE, J.; MORGAN, J. (1997)

Evaluation of mitomycin-treated Vero-cells as a co-culture system for IVM/IVF derived embryos.

Theriogenology **48**: 377-389

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. (1995)

Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro.

Theriogenology **43**: 1115-1128

CETICA, P.D.; DALVIT, G. C.; BECONI, M.T. (1999a)

Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation.

Biocell. **23**: 125-133

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. (1999b)

Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation.

Theriogenology **53**: 541-550

CETICA, P.; PINTOS, L. DALVIT, G. und BECONI, M. (2002)

Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro.

Reproduction **124**: 675–681

CHARPIGNY, G.; GUESNET, P.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; MERMILLOD, P.; HUMBLLOT, P. (2003)

Composition en acides gras des triglycérides, phosphatidylcholines et phosphatidylethanolamines de l'embryon bovin.

Les Actes du BRG **4**: 159-172

CHRISTIE, W.W.; NOBLE, R.C.; MOORE, J.H. (1970)

Determination of lipid classes by gas chromatographic procedure.

Analyst **95**: 940-944

COULL, G.D.; SPEAKE, B.K.; STAINES, M.E.; BROADBENT, P.J., McEVOY, T.G. (1998)

Lipid and fatty acid composition of zona-intact sheep oocytes.

Theriogenology **49**: 179

CRAN, D.G. (1989)

Cortical granules during oocyte maturation and fertilization.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **38**: 49-62

CROZET, N. (1984)

Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow.

Gamete Res. **10**: 241-251

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. (2000)

Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro.

Biol. Reprod. **62**: 1459-1465

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. (2001)

Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro.

Biol. Reprod. **64**: 1375-1385

DE LOOS, F.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.; KRUIP, T.A. (1992)

Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro.

Mol. Reprod. Dev. **31**: 208-214

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. (1989)

Morphology of immature bovine oocytes.

Gamete Res. **24**: 197-204

DE OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. (2006)

Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations.

Reprod. Dom. Anim. **41**: 129-136

DE WITT, A.A.C. und KRUIP, T.A.M. (2001)

Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-aminitin, oocyte diameter and developmental capacity.

Anim. Reprod. Sci. **65**: 51-65

DOBRINSKY, J.R. und JONSON, L.A. (1994)

Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development.

Theriogenology **42**: 25-35

DOMINKO, T. und FIRST, N.L. (1997)

Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development.

Mol. Reprod. Dev. **47**: 456-467

DORLAND, M.; GARDNER, D.K.; TROUNSON, A.O. (1994)

Serum in SOF causes mitochondrial degeneration in ovine embryos.

J. Reprod. Fertil. **13**: Abstract

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; ANQUIER, P.; GRISART, B.;**VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A.; DESSY, F. (1997)**

Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos.

Theriogenology **47**: 1549-1561

DUCIBELLA, T. (1998)

Biochemical and cellular insights into the temporal windows of normal fertilization.

Theriogenology **49**: 53-65

DURNFORD, R.; STUBBINGS, R.B.; AINSWORTH, L. (1994)

Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes in vitro.

Theriogenology **42**: 261-272

EDIRISINGHE, W.R.; WALES, R.G.; PIKE, I.L (1984)

Synthesis and degradation of labelled glycogen pools in preimplantation mouse embryos during short periods of in vitro culture.

Aust. J. Biol. Sci. **37**: 137-146

EITEL, K.; STAIGER, H.; MATHIAS, D.B.; DANIEL, B.; BRETZEL, R.G.; HARING, H.U.; KELLERER, M. (2002)

Different role of saturated and unsaturated fatty acid in β -cell apoptosis.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **299**: 853-856.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; WARD, F.A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. (2000)

Effect of duration of maturation, duration of gamete co-incubation and sperm concentration on cleavage and blastocyst development from cattle oocytes.

Theriogenology **53**: 419

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; CHESMEL, F. (1993)

Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis.

Dev. Biol. **158**: 400-409

EYESTONE, W.H. und FIRST, N.L. (1989)

Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium.

J. Reprod. Fertil. **85**: 715-720

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. (1997)

Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles.

Anat. Embryol. (Berl) **195**: 327-336

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. (1997)

Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles.

Mol. Reprod. Dev. **46**: 208-214

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. (1995)

Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity.

Mol. Reprod. Dev. **42**: 437-442

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. (2001)

Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryo production on blastocyst quality.

Mol. Reprod. Dev. **58**: 186-195

FAN, H.Y. und SUN, Q.J. (2004)

In vitro maturation and fertilization of pig oocytes.

Methods Mol. Biol. **253**: 227-234

FARIN, C.E.; HASLER, J.F.; MARTUS, N.S.; STOKES, J.E. (1997)

A comparison of Menezo's B2 and tissue culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts.

Theriogenology **48**: 699-709

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. (2001)

Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle.

Theriogenology **55**: 151-170

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. (2006)

Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos.

Theriogenology **65**: 178-191

FERGUSON, E.M. und LEESE, H.J. (1999)

Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos.

J. Reprod. Fertil. **116**: 373-378

FERGUSON, E.M. und LEESE, H.J. (2006)

A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development.

Mol. Reprod. and Dev. **73**: 1195-1201

FISCHER-BROWN, A.; MONSON, R.; PARRISH, J.; RUTLEDGE, J. (2002)

Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentrations.

Zygote **10**: 341-348

FISCHER RUSSELL, D.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. (2006)

The impact of oocyte maturation media on early embryonic development.

Mol. Reprod. Dev. **73**: 1255-1270

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDE WOUDE, G.F. (1996)

Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes.

Biol. Reprod. **55**: 1261-1270

FLYNN, T. und HILLMAN, N. (1978)

Lipid synthesis (¹⁴C) glucose in preimplantation mouse embryos in culture.

Biol. Reprod. **19**: 922-926

FLYNN, T. und HILLMAN, N. (1980)

The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing in vitro.

Embryol. Exp. Morph. **56**: 157-168

FOWLER, S.D.; BROWN, W.J.; WARFEL, J.; GREENSPAN, P. (1987)

Use of Nile red for the rapid in situ quantification of lipids on thin-layer chromatograms.
Journal of Lipid Research **28**: 1225-1232

FUJIMOTO, T. und OHSAKI, Y. (2006)

Cytoplasmic lipid droplets. Rediscovery of an old structure as a unique platform.
Annals of the New York Academy of Sciences **1086**: 104-115

FUKUI, Y.; MC GOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. (1991)

Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.
J. Reprod. Fertil. **92**: 125-131

FUKUI, Y. und ONO, H. (1989)

Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes.
J. Reprod. Fertil. **86**: 501-506.

FULKA, J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. (1998)

Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation.
Mol. Hum. Reprod. **4**: 41-49

GALANTINO-HOMER, H.L.; FLORMAN, H.M.; STOREY, B.T.; DOBRINSKY, I.; KOPF, G.S. (2004)

Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation.
Mol. Reprod. Dev. **67** (4): 487-500

GANDOLFI, F. und MOOR, R.M. (1987)

Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells.
J. Reprod. Fertil. **81**: 23-28

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.; CILLO, F.; ANTONINI, S. (2005)

Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for animal reproductive efficiency.
Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. **24**: 413-423

GARBARINO, J. und STURLEY, S.L. (2005)

Homoeostatic systems for sterols and other lipids.

Biochem. Soc. Trans. **33**: 1182-1185

GARDNER, D.K. (1994)

Mammalian embryo cultured in the absence of serum or somatic cell support.

Cell. Biol. Int. **18**: 1163-1178

GARDNER, D.K.; LANE, M.; SPITZER, R.; BATT, P. (1994)

Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development.

Biol. Reprod. **50**: 390-400

GAUTIER, J. und MALLER, J.L. (1991)

Cyclin B in Xenopus oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation.

EMBO J. **10**: 177-182

GENICOT, G.; LEROY, J.L.; SOOM, A.V.; DONNAY, I. (2005)

The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes.

Theriogenology **64**: 1181-1194

GILCHRIST, R.B. und THOMPSON, J.G. (2007)

Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro.

Theriogenology **67**: 6-15

GORDON, I. und LU, K.H. (1990)

Production of embryos in vitro and its impact on livestock production.

Theriogenology **33**: 77-87

GORDON, I. (2003)

Laboratory Production of Cattle Embryos.

Biotechnology in Agriculture No. **27**: CABI Publishing

GREENSPAN, P.; MAYER, E.P.; FOWLER, S.D. (1985)

Nile red a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.

JCB **100** (3): 965-973

GREVE, T.; B. AVERY; CALLESEN, H. (1993)

Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos.

Reprod. Dom. Anim. **28**: 164-169

GREVE, T.; KING, W.A.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K.J. (1983)

Chromosomes of the bovine oocyte in vitro.

J. Dairy Sci. **66**: 245

GRØNDAHL, C.; HYTTEL, P.; GRØNDAHL, M.L.; ERIKSEN, T.; GOTFREDSEN, P.;**GREVE, T. (1995)**

Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo.

Mol. Reprod. Dev. **42**: 94-105

GURAYA S.S. (1965)

A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog.

J. Exp. Zool. **160**: 123-136

HAMANO, S. und KUWAYAMA, M. (1993)

In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between cutting and aspiration method.

Theriogenology **39**: 703-712

HAENISCH-WOEHL, A. (2003)

Untersuchungen zum Einfluss von Calcium Ionophor A23187 während der In-vitro-Fertilisation boviner Eizellen auf die präimplantative Embryonalentwicklung.

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H.; WINSTON, R.M.L. (1989)

The human blastocyst: Cell number, death and allocation during late implantation development in vitro.

Development **107**: 597-604

HASHIMOTO, S. (2009)

Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology.

J. Reprod. Dev. **55**: 1-10

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MC CAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E; TRIMMER, S.A. (1995)

Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results.

Theriogenology **43**: 141-152

HEGELE-HARTUNG, C.; KUHNKE, J.; LESSL, M.; GRONDDAHL, C.; OTTESEN, J.; BEIER, H.M.; EISNER, S.; EICHENLAUB-RITTER, U. (1999)

Nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes after treatment with synthetic meiosis-activating sterol in vitro.

Biol. Reprod. **61**: 1362-1372

HILL, J.L.; WADE, M.G.; NANCAROW, C.D.; KELLEHER, D.L.; BOLAND, M.P. (1997)

Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos.

Mol. Reprod. Dev. **41**: 164-169

HINRICHS, K. (1997)

Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes: a new hypothesis.

Equine Vet. J. Suppl., 43-46

HINRICHS, K. und WILLIAMS, K.A. (1997)

Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse.

Biol. Reprod. **57**: 377-384

HINSCH, E.; AIRES, V.A.; HEDRICH, F.; OEHNINGER, S.; HINSCH, K.D. (2005)

A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa.

Theriogenology **63**: 1682-1694

HOLM, P.; WALKER, S.K.; SEAMARK, R.F. (1996)

Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo.

J. Reprod. Fertil. **107**: 173-181

HOMA, S.T.; RACOWSKY, C.; MCGAUGHEY, R.W. (1986)

Lipid analysis of immature pig oocytes.

J. Reprod. Fertil. **77**: 425-434

HOMA, S.T.; WEBSTER, S.D.; RUSSEL, R.K. (1991)

Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte: effects of a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor.

Dev. Biol. **146**: 461-472

HOSHI, H. (2003)

In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer.

Theriogenology **59**: 675-685

HUNTER, R.H. (1980)

Techniques for in vitro maturation of gametes, in vitro fertilization, embryo culture and long-term storage.

Phys. Tech. of Reprod. Fem. Dom. Anim. Academic Press, 227-230

HUNTER, R.H.; FLECHON, B.; FLECHON, J.E. (1987)

Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study.

Tissue Cell **19**: 423-436

HUNTER, R.H. und WILMUT, I. (1984)

Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct.

Reprod. Nutr. Dev. **24**: 597-608

HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. (1986)

Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle.

J. Reprod. Fertil. **78**: 615-625

HYTTEL, P.; GREVE, T. und CALLESEN (1989)

Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **38**: 35-47

HYTTEL, P.; FAIR, T., CALLESEN, H.; GREVE, T. (1997)

Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.

Theriogenology **47**: 23-32

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; MICHELMANN, H.W.; ALABART, J.L.; VASQUEZ, I.; BEZUGLY, N.; NAWROTH, F. (2001)

Lipolysis and ultrastructure changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes.

Anat. Histol. Embryol. **30**: 333-338

JAVED, M. und WRIGHT, R. Jr. (1991)

Determination of pentose phosphate and Emden–Meyerhof pathway activities in bovine embryos.

Theriogenology **35**: 1029-1037

JEONG, W.J.; CHO, S.J.; LEE, H.S.; DEB, G.K.; LEE, Y.S.; KWON, T.H.; KONG, I.K. (2009)

Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos.

Theriogenology **72**: 584-589

JIANG, H.S.; WANG, W.L.; Lu, K.H.; GORDON, I.; POLGE, C. (1991)

Rules of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos.

Theriogenology **35**: 216

KANE, M.T. (1979)

Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae.

Biology of Reprod. **20**: 323-332

KANE, M.T.; CARNEY, E.W.; ELLINGTON, J.E. (1992)

The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro.

Theriogenology **38**: 297-313

KATZ-JAFFE, M.G.; MC CALLIE, B.R.; PREIS, K.A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D.K (2009)

Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes.

Theriogenology **71**: 939-946

KAUFFOLD, P. und THAMM, I. (1985)

Zustandsbeurteilung von Rinderembryonen.

Forschungszentrum für Tierproduktion in Dummerstorf-Rostock der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR Berlin

KHURANA, N.K. und NIEMANN, H. (2000)

Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/ blastocyst formation of bovine embryos.

Theriogenology **54**: 741-756

KHURANA, N. K. und NIEMANN, H. (2000a)

Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo.

Biol. Reprod. **62**: 847-856

KHURANA, N. K. und NIEMANN, H. (2000b)

Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/ blastocyst formation of bovine embryos.

Theriogenology **54**: 741-756

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. (2001)

Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes.

Reproduction **122**: 131-138

KIM, E.; YAMASHITA, M.; KIMURA, M.; HONDA, A.; KASHIWABARA, S.I.; BABA, T. (2008)

Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida.

Int. J. Dev. Biol. **52**: 677-682

KING, W. A.; BOUSQUET, T.; GREVE, T.; GOFF, A. K. (1986)

Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo.

Acta Vet. Scand. **27**: 267-279

KNIJN, H.M.; GJORRET, J.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. (2003)

Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number and blastocyst formation in bovine embryos.

Biol. Reprod. **69**: 1371-1378

KORHONEN, K.; KANANEN, K.; KETOJA, E.; MATOMAKI, J.; HALMEKY, M; PEIPPO, J. (2010)

Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts.

Reprod. Dom. Anim. **45**: 42-49

KOSAKO, H.; GOTHO, Y.; NISHIDA, E. (1994)

Requirement for the MAP kinase kinase/ MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation.

EMBO J. **13**: 2131-2138

KRISHER, R. und BAVISTER, B. (1998)

Responses of oocytes and embryos to the culture environment.

Theriogenology **49**: 103-114

KRUIP, T.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. (1983)

Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo.

Gamete Res. **8**: 29-47

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. (2000)

Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity.

Biol. Reprod. **92**: 292-302

KUZMINA, T.I.; LEBEDEVA, I.Y.; TORNER, H.; ALM, H.; DENISENKO, V.Y. (1999)

Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro.

Theriogenology **51**: 1363-1374

LARSEN, W.J.; WERT, S.E.; BRUNNER, G.D. (1987)

Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation.

Dev. Biol. **122**: 61-71.

LAZZARI, G. und C. GALLI (1993)

In vitro embryo production from valuable cows slaughtered for reproductive failure of terminal illness.

Theriogenology **39**: 256

LEE, C.N. und AX, R.L. (1984)

Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract.

J. Dairy Sci. **67**: 2006-2009

LEESE, H.J. (1991)

Metabolism of the preimplantation mammalian embryo.

Reprod. Biol. **13**: 35-72

LEFEVRE, B.; GOUGEON, A.; TESTART, J. (1987)

In-vitro maturation: some questions concerning the initiation and prevention of this process in humans.

Hum. Reprod. **2**: 495-497

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. (1987)

Developmental potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo.

Biol. Reprod. **36**: 376-383

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. (1989)

In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes.

Theriogenology **31**: 64-74

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIES -TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. (2005)

Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine.

Theriogenology **65**: 841-859

LEROY, J. L.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOM, A. (2005)

Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach.

Reprod. Domest. Anim. **40**: 76-78

LIM, J.M.; OKITSU, O.; OKUDA, K.; NIWA, K. (1994)

Effect of fetal calf serum in culture medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.

Theriogenology **41**: 1091-1098

LIM, K.T.; LEE, B.C.; KANG, S.K.; HWANG, W.S. (2003)

Effects of protein source and energy substrates of the in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system.

J. Vet. Sci. **4**: 73-78

LITSCHER, E.S.; WILLIAMS, Z.; WASSARMAN, P.M. (2009)

Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals.

Mol. Reprod. Dev. **76** (10): 933-941

LIU, P.; YING, Y.; ZHAO, Y.; MUNDY, D.I.; ZHU, M. ; ANDERSON, R.G. (2004)

Chinese hamster ovary k2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic.

J. Biol. Chem. **279**: 3787-3792

LOEWENSTEIN, J.E. und COHEN, A.I. (1964)

Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum.

J. Embryol. Exp. Morphol. **12**: 113-121

LONERGAN, P. und Fair, T. (2008)

In vitro-produced bovine embryos – dealing with the warts.

Theriogenology **69**: 17-22

LONERGAN, P; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN A.; MOREIRA P.; PINTADO, B; BOLAND, M. (2003)

Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo.

Biol. Reprod. **69**: 1424-1431

MANRIQUE, C.A.C. (2008)

Factors that affect cytoplasmic lipids droplets and mitochondrial activity in bovine oocytes.

University of Queensland, Diss.

MARX, U. (2002)

Experimentelle Untersuchungen zur Effizienzsteigerung der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen durch Fertilisation aktivierter Oozyten sowie durch Vorbehandlung züchterisch wertvoller Schlachtkühe mit eCG

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

MATSUOKA, K.; SAKATA, S.; ICHINO, K; SHIMAYA, Y.; SUZUKI, T. (1992)

Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage.

Theriogenology **37**: 254

MATSUYAMA, K.; MIYAKOSHI, H; FUKUI, Y. (1993)

Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.

Theriogenology **40**: 595-605

MAYES, M.A. und SIRARD, M.A. (2001)

The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle.

Theriogenology **55**: 911-922

MC EVOY, T.G.; COULL, G.D.; SPEAKE, B.K.; STAINES, M.E. und BROABENT, P.J. (1997)

Estimation of lipid and fatty acid composition of zona-intact pig oocytes.

J. Reprod. Fertil. Abstract Series **20**: 10

MC EVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.; SPEAKE, B.K. (2000)

Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida.

J. Reprod. Fertil. **118**: 163-170

MEINECKE, B.; KRISCHEK, C. (2003)

MAPK/ ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes.

Zygote **11**: 7-16

MEN, H.; AGCA, Y.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. (2005)

Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification.

Theriogenology **64**: 1340-1349

MENEZO, Y.; RENARD, J.-P.; DELOBEL, B.; PAGEAUX, J.-F. (1982)

Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos.

Biol. Reprod. **26**: 787-790

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIE, Y. (1999)

Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**: 449-460

MIHM, M. und AUSTIN, E. J. (2002)

The final stages of dominant follicle selection in cattle.

Domest. Anim. Endocrinol. **23**: 155-166

MILLER, G.F.; GLIEDT, D.W.; RATES, J.M. und RORIE, W. (1994)

Addition of penicillamin, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate.

Theriogenology **41**: 689-696

MONAGHAN, P.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SHARIF, H.; WAHID, H.; GORDON, I. (1993)

The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes.

Theriogenology **39**: 270

MUCCI, N., ALLER, J., KAISER, G.G., HOZBOR, F., CABODEVILA, J., ALBERIO, R.H. (2006)

Effect of estrus cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification.

Theriogenology **65**: 1551-1562

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. (2006)

Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential.

Zygote **14**: 53-61

NEBREDA, A. R. und FERBY, I. (2000)

Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes.

Curr. Opin. Cell. Biol. **12**: 666, 675

NIEMANN, H. und MEINECKE, B. (1993)

Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

NIEMANN, H. und WRENZYCKI, C. (2000)

Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development.

Theriogenology **53**: 21-34

NURSE, P. (1990)

Universal control mechanism regulating onset of M-phase.

Nature **344**: 503-508

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. (1997)

Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence.

Theriogenology **48**: 769-774

OTZDORFF, C. (2006)

Untersuchungen zur Aggregation und Aktivität von Mitochondrien im Ooplasma von Cumulus-Oozyten-Komplexen des Rindes während der In-vitro-Reifung.

Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin 2006, Journal Nr. 3084

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. (2004)

EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle.

Science **303**: 682-684

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. (1986)

Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen

Theriogenology **25**: 591-600

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; FIRST, N.L. (1988)

Capacitation of bovine sperm by heparin.

Biol. Reprod. **38**: 1171-1180

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; FIRST, N.L. (1989)

Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory role of glucose and role of intracellular pH.

Biol. Reprod. **41**: 683-689

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; GRAHAM, J.K. (1999)

In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium.

Theriogenology **51**: 462-472

PARTRIDGE (1996)

Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos.

Reprod. Fertil. Dev. **8**: 945-953

PAVLOK, A.; KALAB, P.; BOBAK, P. (1997)

Fertilisation competence of bovine normally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and MBP kinase activity.

Zygote **5**: 235-246

PERTOFT, H. (2000)

Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll.

J. Biochem. Biophys. Methods **44**: 1-30.

**PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.;
PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS, e SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.;
MARQUES, C.C (2007)**

Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA).

Anim. Reprod. Science **98**: 293-301

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. (1998)

The molecular basis of oocyte growth and development

Moll. Cell. Endocriol. **145**: 27-37

PINYOPUMMINTR, T. und BAVISTER, B.D. (1991)

In vitro matured/ in vitro fertilized oocytes can develop into morulae/ blastocysts in chemically defined, protein-free culture media.

Biol. Reprod. **45**: 736-742

PLANTE, L. und KING, W.A. (1994)

Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization.

J. Assist. Reprod. Gen. **11**: 515-529

POLLARD, J.W. und LEIBO, S.P. (1994)

Chilling sensitivity of mammalian embryos.

Theriogenology **41**: 101-106

PONEBSEK, S. (2005)

Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der Entwicklungsfähigkeit boviner Oozyten präpuberaler Spender durch In-vitro-Reifung auf Granulosazellmonolayern adulter Tiere.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

PRATHER, R.S. und FIRST, N.L. (1993)

Cell-to-cell coupling in early stage bovine embryos.

Theriogenology **41**: 101-106

PRATT, R.M.; PASTAN, I. (1978)

Decreased binding of epidermal growth factor to BALB/ c 3T3 mutant cells defective in glycoprotein synthesis.

Nature **272**: 68-70

PRATT, H.P.; KEITH, J.; CHAKRABORTY, J. (1980)

Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo.

J. Embryol. Exp. Morphol. **60**: 303-319

PROKOFIEV, M.I.; ERNST, L.K.; SURAEVA, N.M.; LAGUTINA, I.S.; UDAVLENNIKOVA, N.N; KESYAN, A.Z.; DOLGOHATSKIY, A.I. (1992)

Bovine oocyte maturation, fertilization and further development in vitro and after transfer into recipients

Theriogenology **51**: 37-46

PURPERA, M.N.; GIRALDO, A.M.; BALLARD, C.B.; HYLAN, D.; GODKE, R.A.; BONDIOLI, K.R. (2009)

Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos.

Mol. Reprod. Dev. **76**: 783-793

RAJAKUMARI, S.; GRILLITSCH, K.; DAUM, G. (2008)

Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast.

Prog. Lipid Research **47**: 157-171

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; STAINES, M.E.; EWEN, M.; LOMAX, M.A.; McEVOY, T.G. (2003)

Consequences of exposure to serum, with or without Vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro.

Reprod. Fertil. Dev. **15**: 275-284

RICHARD, F.J. (2007)

Regulation of meiotic maturation.

J. Anim. Sci. **85**: E4-6

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN (2003)

Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression.

Biol. Reprod. **68**: 236-243

- RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. (2002)**
Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro.
Mol. Reprod. Dev. **62**: 320-327
- ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M.J.; TROYER, D.; SEVERS, N.J. (2006)**
Adipophilin-enriched domains in the endoplasmic reticulum membrane are sites of lipid droplets biogenesis.
J. Cell Sci. **119**: 4215-4224
- RODRIGUEZ, B.A.; SILVA, A.E.; RODRIGUEZ, P.; CALVACANTE, L.F.; RODRIGUEZ, J.L. (2009)**
Cumulus cell features and nuclear chromatin configuration of in vitro matured canine COCs and the influence of in vivo serum progesterone concentrations of ovary donors.
Zygote **17**: 79-91
- ROSENKRANS, C.R.; MILLER, G.F.; NASTI, K.B.; MC NAMARA, G.T.; SCHOFF, P.K.; FIRST, N.L. (1993)**
In vitro development of bovine embryos as affected by energy substrates.
Biol. Reprod. **49**: 459-462
- RÜSSE, I. und F. SINOWATZ (1991)**
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- RYUICHI, S.; TSUJJI, H.; ABE, H., YAMASHITA, S.; HOSHI, H. (1999)**
Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development.
J. Reprod. Dev. **45**: 97-103
- RZUCIDLO, S.J.; GIBBONS, J.; STICE, S.L. (2001)**
Comparison by restriction fragment differential display RT-PCR of gene expression pattern in bovine oocytes matured in the presence or absence of fetal calf serum.
Mol. Reprod. Dev. **59**: 90-96
- SANBUISHO, A. und THRELFALL, W.R. (1985)**
The effects of oestrus cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte in vitro.
Theriogenology **23**: 226

SANTHANANTHAN, A.H. (2003)

Morphology and pathology of the human oocyte

in: *Biology and Pathology of the oocyte*, S. 185-207

Trounson, A.O., Gosden, R.G. Cambridge University Press

SANTHANANTHAN, A.H.; KIRBY, C.; PEURA, A.; TROUNSON, A. (1992)

Mouse oocyte cooling.

J. Assist. Reprod. Genet. **9**: 139-148

SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. C. (1989):

Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification.

J. Biol. Chem. **264**: 13840-13847

SARDUL GURAYA, S. (1964)

A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog.

J. Exp. Zool. **160**: 123-126

SAS Institute Inc. 2004.

SAS/ STAT 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. (1999)

Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development.

J. Reprod. Dev. **45**: 97-103

SCHMELL, E.D.; GULYAS, B.J.; HEDRICK, J.L. (1983)

Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy.

In: J.F. Hartmann: *Mechanism and control of animal fertilization*. Academic Press, New York, 365-413

SCHNORR, B. (1996)

Embryologie der Haustiere

3. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

SEIDEL, G.E. (2006)

Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation

Theriogenology **65**: 228-235

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFSSON, H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1993)

In vitro development up to hatching of bovine in vitro-matured and fertilized oocytes with or without support of somatic cells.

Theriogenology **39**: 1067-1079

SHAMSUDDIN, M. und RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1994)

Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium of in conventional co-culture with oviduct epithelial cells.

J. Vet. Med. **44**: 44-55

SHEA, B.F.; LATOUR, J.P.; BEDIRIAN, K.N.; BAKER, R.D. (1976)

Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes.

J. Anim. Sci. **43**: 809-815

SHEHAB-EL-DEEN, M.A.; LEROY, J.L.; MAES, D.; VAN SOOM, A. (2009)

Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid.

Reprod. Dom. Anim. **44**: 140-142

SHIMIZU, S.; TSUJI, M.; DEAN, J. (1983)

In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture.

J. Biol. Chem. **258**: 5858-5863

SINCLAIRE, A.J.; ATTAR-BASHI, N.M.; LI, D. (2002)

What is the role of alpha-linolenic acid for mammals?

Lipids **37**: 1113-1123, Review

SIRARD, M.A. und FIRST, N.L. (1988)

In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine.

Reproduction **39**: 229-234

SIRARD, M.A.; FLORMAN, LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. (1989)

Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes.

Biol. Reprod. **40**: 1257-1263

SIRARD, M.A. und BLONDIN, P. (1996)

Oocyte maturation and IVF in cattle.

Anim. Reprod. Sci. **42**: 417-426

SIRARD, M. A. und K. COENEN (1995)

Effects if inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes in vitro.

J. Reprod. Dev. **41**: 255-261

SIRARD, M.A. und COENEN, K. (2006)

In vitro maturation and embryo production in cattle.

Methods Mol. Biol. **348**: 35-42

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. (1992)

Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes.

Theriogenology **37**: 39-57

SORENSEN, R.A. und WASSARMAN, P.M. (1976)

Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte.

Dev. Biol. **50**: 531-536

SOSNOWSKI, J.; SWITONSKI, M.; LECHNIAK, D.; MOLINSKI, K. (1995)

Cytogenetic evaluation of in vitro matured bovine oocyte collected from ovaries of individual donors.

Theriogenology **45**: 865-872

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B.; WOLF, E. (2001)

Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture.

Biol. Reprod. **64**: 904-909

STOREY B.T. (2008)

Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe.

Int. J. Dev. Biol. **53**: 427-437

STOREY, B.T.; HOURANI, C.; KIM, J.B. (1992)

A transient rise in intracellular Ca²⁺ is a precursor reaction to the zona-pellucida-induced acrosome reaction in mouse sperm and is blocked by the induced acrosome reaction inhibitor 3-quinuclidinyl benzylate.

Mol. Reprod. Dev. **32**: 41-50

STURMEY, R.G. und LEESE, H.J. (2003)

Energy metabolism in pig oocytes and early embryos.

Reproduction **126**: 197-204.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWELL, R.L. (1991)

Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm.

Biol. Reprod. **44**: 375-381

SÜSS, U. und WÜTHRICH, K. (1985)

Stages of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro.

Theriogenology **23**: 231

SÜSS, U.; WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. (1988)

Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro.

Biol. Reprod. Dev. **38**: 871-880

SUTOVSKY, P. und SCHATTEN, G. (1997)

Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization.

Biol. Reprod. **56**: 1503-1512

SUZUKI, H.; JEONG, B.S.; YANG, X. (2000)

Dynamic changes of cumulus–oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes.

Biol. Reprod. **63**: 723-729.

SZABO, P.L. (1967)

Ultrastructure of the developing dog oocyte.

Anat. Rec. **157**: 330

TAMASSIA, M.; NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P.; HEYMAN, Y.; CHARPIGNY, G.; STOJKOVIC, M.; HIENDLEDER, S.; RENARD, J. P.; CHASTANT MAILLARD, S. (2004)

In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA and mitochondrial DNA haplogroup.

Biol. Reprod. **71**: 697-704

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHUETZ, G.A. (1990)

Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species.

Mol. Reprod. Dev. **26**: 90-100

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. (1972)

Successful culture in vitro of sheep and cattle ova.

J Reprod. Fertil. **30**: 439-497

THIBIER, M. (2009)

IETS News Letter **27**: 13-19

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. (1995)

Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos.

Biol. Reprod. **53**: 1385-1395

THOMPSON, J.G.; PATRIDGE, R.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. (1996)

Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos.

J. Reprod. Fertil. **106**: 299-306

THOMPSON, J.G. (1996)

Defining the requirements for bovine embryo culture.

Theriogenology **45**: 27-40

THOMSON, J.G. (1997)

Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants.

Reprod. Fertil. Dev. **9**: 341-354

TÖPFER-PETERSEN, E.; ENBLIN, M.; WABERSKI, D. (1996)

Kapazitation: Eine kurze Übersicht.

Fertilität **12**: 183-189

TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J.; SINOWATZ, F. (1995)

Carbohydrat and heparin binding proteins in mammalian fertilization.

Andrologia **27**: 303-324

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYAMA, S.; IZAIKE, Y. (2000)

Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos.

Theriogenology **53**: 1669-1680

TOMINAGA, K. (2004)

Cryopreservation and sexing of in vivo- and in vitro-produced bovine embryos for their practical use.

J. Reprod. Dev. **50**: 29-38

TRICOIRE, H.; TOUZE, J.L.; MERMILLOD, P. (1999)

Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos.

Theriogenology **51**: 257

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. (2001)

Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence

Reproduction **58**: 51-75

TROUNSON, A.; PUSHETT, D.; MCLELLAN, L.J.; GARDNER, D. (1994)

Current status of IVM/ IVF and embryo culture in humans and farm animals.

Theriogenology **41**: 57-66

TSAFRIRI, A.; N. DEKEL, N.; BAR-AMI, S. (1982)

Regulation of meiotic maturation.

J. Reprod. Fertil. **64**: 541-551

UGUZ, C., VREDENBURG, W.L., PARRISH, J.J. (1994)

Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperms is inhibited by Rp-adenosine-3,5-cyclic monophosphorothionate.

Biol. Reprod. **51**: 1031-1039

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. (1999)

Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer.

Biol. Reprod. **60**: 534-539.

VAN BLERKOM, J. (2004)

Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence.

Reproduction **128**: 269-280

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.W.; LEE, J. (1995)

ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer.

Hum. Reprod. **10**: 415-424

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. (1997)

Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration.

J. Reprod. Fertil. **111**: 65-70

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. (1997)

Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium.

J. Reprod. Fertil. **109**: 87-93

VAN SOOM, A. und DE KRUIF, A. (1992)

A comparative study of in vivo and in vitro derived bovine embryos. Proceeding of 12th international Congress on Animal Reproduction.

The Hague, Netherlands: 1363-1365

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B. DE RUIGH, L. (2000)

Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring.

Theriogenology **53**: 575-597

VREDENBURGH-WILBERG, O.L. und PARRISH, J.J. (1995)

Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation.

Mol. Reprod. Dev. **40**: 490-502

WARD, F.; ENRIGHT, B. RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. (2002)

Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm-concentration and sire.

Theriogenology **57**, 8: 2105-2117

WASSARMAN, P.M. und ALBERTINI, D.F. (1994)

Development of the ovum.

in: Knobil, E. und Neill, J.D.: The Physiology of Reproduction

2. Aufl. Raven Press, New York S. 81-110

WASSARMAN, P.M. und LITSCHER, E.S. (2008)

Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida.

Int. J. Dev. Biol. **52**: 665-676

WEBB, R.J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. (2002)

Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in in [cAMP] kinase a in mammalian oocytes.

Dev. Biol. **246**: 441-454

WEGNER, C.C. und KILLIAN, G.J. (1992)

Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid

J. Reprod. Fertil. **95**: 841-854

WEHREND, A. und MEINECKE, B. (2001)

Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages.

Anim. Reprod. Sci **66**: 175-184

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. (2001)

Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos.

Hum. Reprod. Vol. **16**: 909-917

WILLIAMS, A.C. und FORD, W.C. (2001)

The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa.

J. Androl. **22**: 680-695

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K (2004)

Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue.

Cryobiology **48**: 146-156

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. (1996)

Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo.

J. Reprod. Fertil. **108** (1): 17-24.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. (1999)

Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA.

Mol. Reprod. Dev **53**: 8-18

XU, K.P. und GREVE, T. (1988)

A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes.

J. Reprod. Fertil. **82**: 127-134

YANAGIMACHI, R. (1994)

Mammalian fertilization.

In: The physiology of reproduction, ed. Knobil E. and Neil J.D., Raven, New York 189-317

YOUNGS, C.R.; KNIGHT, T.J.; BATT, S.M.; BEITZ, D.C. (1994)

Phospholipid, cholesterol, triacylglycerol and fatty acid composition of porcine blastocysts.

Theriogenology **41**: 343 (Abstract)

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. (1989)

Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro.
Gamete Res. **23**: 189-201

**YU, H.Y.; INOGUCHI, T.; KAKIMOTO, M.; NAKASHIMA, N.; IMAMURA, M.;
HASHIMOTO, T.; UMEDA, F.; NAWATA, H. (2001)**

Saturated non-esterified fatty acids stimulate de novo diacylglycerol synthesis and protein kinase C activity in cultured aortic smooth muscle cells.
Diabetologia **44**: 614-620

**YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J. L.; DEWULF, J.; VAN ZEVEREN, A.; DE
KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. (2005)**

Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence.
Theriogenology **63**: 2147-2163

9 ANHANG

9.1 Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Gewinnung der Eizellen, der In-vitro-Maturation, -Fertilisation und -Kultivierung

9.1.1 Medium zur COK-Gewinnung

Modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (mD-PBS)

500 ml PBS-Dulbecco mit Ca_{2+} / Mg_{2+} wurde mit folgenden Zutaten versetzt:

500 mg	Glucose	Fa. Sigma, Steinheim, G5400
18 mg	Na-Pyruvat	Fa. Serva, Heidelberg, 15220
10 mg	Penicillin	Fa. Sigma, Steinheim, P3032-25MU
20 mg	Streptomycin	Fa. Sigma, Steinheim, S1277
5,6 mg	Heparin	Fa. Sigma, Steinheim, H3149-25KU
150 mg	Albumin bovine serum (BSA)	Fa. Sigma, Steinheim, A9647

Die Lösung wurde am Abend vor dem Gebrauch hergestellt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde die Lösung drei Stunden vor Verwendung im Wasserbad auf 38°C erwärmt.

9.1.2 Medien für die Maturation und Kultivierung

Grundmedium für die Maturation: TCM-199

100 ml	WATER	Fa. Sigma, Taufkirchen, W4502
220 mg	NaHCO_3	Fa. Sigma, Steinheim, S4019
5 mg	Gentamycinsulfat	Fa. Sigma, Steinheim, G-3632
2,2 mg	Na-Pyruvat	Fa. Serva, Heidelberg, 15220
1510 mg	TCM-Hepes Modification	Fa. Sigma, Steinheim M2520

Die Zutaten wurden mit dem Magnetrührer 45 min. verrührt.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde steril filtriert (Rotrandfilter Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) und 14 Tage bei 4°C aufbewahrt.

Reifungsmedium

Für die Reifung wurde das o.g. Grundmedium für die Maturation mit 10% ECS bzw. mit FCS und 3,5 µl FSH versetzt und steril filtriert.

Kulturmedium Synthetic Oviduct Fluid (SOF)

Grundmedium

100 ml	H ₂ O	Fa. SIGMA, W4502
629,2 mg	NaCl	Fa. Roth, Karlsruhe, 9265.1
53,4 mg	KCl	Fa. Sigma, Steinheim, P5405
16,2 mg	KH ₂ PO ₄	Fa. Sigma, Steinheim, P-5379
24,8 mg	CaCl ₂ *2H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, C7902
9,6 mg	MgCl ₂ *6H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, M2393
210,6 mg	NaHCO ₃	Fa. Sigma, Steinheim, S4019
0,14 mg	Phenolrot	Fa. Roth, Karlsruhe, T127.1
5 mg	Gentamicin	Fa. Sigma, Steinheim, G-3632
470,6 µl	Na-Lactatsirup 60%	Fa. Sigma, Steinheim, L7900

Nach 45 min auf dem Magnetrührer wurde das Medium auf einen pH-Wert von 7,2-7,3 und eine Osmolarität von 260-280 mOsm eingestellt und steril filtriert (Rotrandfilter Fresenius Kabi AG, Bad Homburg).

Das Medium war im Kühlschrank vier Wochen haltbar.

Gebrauchsmedium SOF

Einige Stunden vor Gebrauch wurden 9 ml SOF Grundmedium mit folgenden Zutaten versetzt:

3,3 mg	Na-Pyruvat	Fa. Serva, Heidelberg, 15220
200 µl	BME	Fa. Sigma, Taufkirchen, B6766
100 µl	MEM	Fa. Sigma, Taufkirchen, M7145
1 ml	ECS	eigene Herstellung, siehe Kapitel 9.1.3

Mit BSA bestäuben

In einer 10 ml Petri Schale wurden das Medium bei 38,5°C, 5% N₂ und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dem Auflösen von BSA wurde die gebrauchsfertige Lösung steril filtriert und in 4-Well-Schalen zu je 400 µl pro Well pipettiert und eine Stunde inkubiert.

Die SOF-Gebrauchslösung war bei 4°C drei Tage haltbar.

9.1.3 Serum

Herstellung von östrischem Kuhserum (ECS)

- a) Blutentnahme von 4-10 brünstigen Kalbinnen oder Kühen
- b) Das Blut mindestens 1 Stunde zum Gerinnen stehen lassen
- c) Zentrifugieren des Blutes, 20 min bei 500 x g
- d) Abgießen und Poolen des Serumüberstandes
- e) Zweites Zentrifugieren: 20 min bei 500 x g
- f) Überstand in ein Becherglas abgießen
- g) Serum bei 56°C 30 min inaktivieren
- h) Abkühlen des Serums auf Raumtemperatur
- i) Abfüllen in Vaccutainer und bei -20°C tiefgefrieren
- j) Für den Gebrauch wurden die Vaccutainer im Wasserbad bei 35°C aufgetaut und in 0,5 ml bzw. 1 ml Portionen in sterile Plastikröhrchen (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und erneut bei -20°C eingefroren.

Alle Versuche wurden mit einer ECS-Charge durchgeführt.

FCS (fetal cow serum)

Fa. Biochrom, Berlin, S0215

9.1.4 Kapazitations- und Befruchtungsmedium (Sperm-TALP, Fert-TALP)

Kapazitationsmedium Sperm-TALP-Stammlösung

725 mg	NaCl	Fa. Roth, Karlsruhe, 9265.1
28,75 mg	KCl,	Fa. Sigma, Steinheim, P5405
261,25 mg	NaHCO ₃	Fa. Sigma, Steinheim, S4019
4,5 mg	NaH ₂ PO ₄	Fa. Sigma, Steinheim, P-5379
297,5 mg	TCM-199 HEPES Mod.	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim M2520
460 µl	Na-Laktatsirup 60%	Fa. Sigma, Steinheim, L7900
38,75 mg	MgCl ₂ x6 H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, M2393
1,25 mg	Phenolrot	Fa. Roth, Karlsruhe, T127.1
36 mg	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, C7902
auf 125 ml	aqua ad injectabile Ampuwa	Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und steril filtriert. Das Medium wurde im Kühlschrank bis zu zwei Wochen aufbewahrt und durfte nicht eingefroren werden.

Befruchtungsmedium Fert-TALP (TL)-Stammlösung

666 mg	NaCl	Fa. Roth, Karlsruhe, 9265.1
23,5 mg	KCl	Fa. Sigma, Steinheim, P5405
210 mg	NaHCO ₃	Fa. Sigma, Steinheim, S4019
4 mg	NaH ₂ PO ₄	Fa. Sigma, Steinheim, P-5379
186 µl	Na-Laktat-Sirup 60%	Fa. Sigma, Steinheim, L7900
10 mg	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, M2393
1 mg	Phenolrot	Fa. Roth, Karlsruhe, T127.1
30 mg	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Fa. Sigma, Steinheim, C7902

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt und steril in Aufbewahrungsfläschchen filtriert. Das Medium war im Kühlschrank bei 4 °C zwei Wochen haltbar und durfte ebenfalls nicht eingefroren werden.

Mindestens vier Stunden vor Gebrauch wurden zu jeweils 10 ml der Stammlösung von Fert-TALP und Sperm TALP je 50 mg Serumalbumin (BSA 9647, Fa. Sigma) und 2,2 mg Na-Pyruvat (Fa. Serva, Heidelberg, 15220) hinzugefügt. Die Mischungen wurden im Brutschrank äquilibriert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Lösungen nochmals steril filtriert.

Fert-TALP wurde zusätzlich vor der Herstellung der Befruchtungstropfen mit 100 µl Gentamycin-, 100 µl Heparin- und 360 µl Hypotaurin-Epinephrin-Lösung versetzt und steril filtriert.

9.1.5 Heparin- Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

5 mg	Heparin	Fa. Sigma, Steinheim, H3149-25KU
5 ml	Aqua ad injectabile Ampuwa	Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

Die Lösung wurde steril filtriert und in Cups à 100 µl abgefüllt und eingefroren.

9.1.6 Gentamycin-Stock-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

12,5 mg	Gentamycinsulfat	Fa. Sigma, Steinheim, G-3632
2,5 ml	Aqua ad injectabil Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg

Die Lösung wurde steril filtriert und in Cups a 100µl abgefüllt und eingefroren.

9.1.7 Hypotaurin-Epinephrin-Stamm-Lösung als Zusatz zum Befruchtungsmedium

Lösung 1:

20 ml	NaCl 0,9%	Fa. Roth, Karlsruhe
2,19 mg	Hypotaurin	Fa. Sigma, Steinheim, H 1384

Lösung 2:

50 ml	Aqua ad injectabile Ampuwa	Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
50 mg	Na-Meta-bi-Sulfit	Fa. Sigma, Steinheim, S-1516
113 µl	Na-Lactatsirup 60%	Fa. Sigma, Steinheim, L7900-100ML
30 µl	konz. HCl	Fa. Roth, Karlsruhe

Lösung 3:

40 ml	von Lösung 2	
1,83 mg	Epinephrin	Fa. Sigma, Steinheim, E1635

Lösung 4:

10 ml	von Lösung 1
4 ml	von Lösung 3
16 ml	NaCl 0,9%

Lösung 4 wurde steril filtriert und in Cups à 360 µl eingefroren.

9.2 Medien für die zellphysiologischen Untersuchungen

9.2.1 Trypsin-EDTA-Lösung zur Entfernung des Cumulus oophorus

Die fertige Stammlösung Trypsin EDTA (Fa. Sigma, Steinheim) wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit Hanks' Lösung verdünnt.

Hanks' Lösung:

1 l	Aqua dest.	
9,5 g	Hanks' balanced salts	Fa. Sigma; H4891-1L, Steinheim
0,35 g	NaHCO ₃	Fa. Sigma, S4019, Steinheim
0,60 g	Penicillin	Fa. Sigma; P3032-25MU, Steinheim

Die fertige Lösung wurde steril filtriert und in Portionen zu jeweils 1000 µl in sterilen Tubes abgefüllt und eingefroren.

9.2.2 PBS nach Dulbecco mit Polyvenylalkohol (PVA)

Zur Herstellung der verwendungsfähigen Lösung wurden 50 mg Polyvinylalkohol (Fa. Sigma, Steinheim) in 60 ml modifizierter PBS ohne Albumin gelöst, steril filtriert und im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

9.2.3 Nilrotfärbung

Stammlösung

1 mg Farbstoff Nilrot (Sigma-Aldrich, USA oder Molecular probes, Fa. Invitrogen, USA)
in 1 ml DMSO lösen

NaCl/ PVP-Lösung

10 mg Polyvenylpyrrolidon (PVP) (Sigma; Molekulargewicht 40000)
in 10 ml 0,9% NaCl lösen

Arbeitslösung 0,1%

1 µl der Nilrotstammlösung mit 999 µl der NaCl/ PVP-Lösung versetzen.

9.2.4 Fixationslösung Paraformaldehyd (3%)

3 g Paraformaldehyd (Fa. Sigma P-6148, Steinheim) wurden in 100 ml PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gelöst. Die Lösung wurde auf 56-60°C erwärmt. Tropfenweise wurde 1 N Natronlauge (Fa. Roth, Art.-Nr. K021.1, Karlsruhe) zugegeben bis die Lösung klar war. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

9.2.5 PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Eine Tablette PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Fa. Sigma, Steinheim) wurde nach Anweisung des Herstellers in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

9.2.6 Chromatinfärbung Hoechst 33258

Farbstoff: Hoechst 33258 (Sigma: G 7757)

Lösung: 3 Teile Glycerol + 1 Teil PBS

Färbelösung: 2,5 µg Farbstoff in 1 ml Lösung

Die Färbelösung ist dunkel bei 4°C aufzubewahren.

10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Posterpräsentation: 14th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR); Eger (Ungarn) 15.-18. September 2010.

Das Poster-Abstract erschien im Journal: *Reproduction in Domestic Animals*; Vol. 45, Supplement 3, September 2010, S. 87.

11 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. W. Kanitz für die Überlassung des interessanten Themas. Die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit übernahm auch Frau Dr. Alm. Ihr bin ich sehr dankbar für Ihre beständige Unterstützung. Sie halfen mir mit zahlreichen, wertvollen Vorschlägen bei der Versuchsdurchführung und beim Verfassen des Manuskriptes und trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Den Direktoren Herrn Dr. Leiding und Herrn Dr. Aumann vom Besamungsverein Neustadt an der Aisch möchte ich für die Möglichkeit danken, den Versuchsteil der Arbeit in den stationseigenen Einrichtungen des Besamungsvereines durchzuführen. Sie ermöglichten uns Doktoranden während der Zeit in Neustadt/Aisch über die Tätigkeiten im Rahmen der Dissertation hinaus die Teilnahme an anerkannten regionalen und nationalen Fortbildungsveranstaltungen und ermöglichten so interessante und bereichernde Kontakte mit Wissenschaftlern und Fachleuten aus aller Welt.

Auch sei an dieser Stelle für die finanzielle Zuwendung durch die Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung herzlich gedankt.

Bei Frau Dr. Adriane Woehl-Wenigerkind möchte ich mich für die Einarbeitung und - ebenso wie bei Herrn Dr. Nohner und dem ET-Team - für die fachliche und persönliche Unterstützung während der Zeit in Neustadt/Aisch bedanken. Auch allen weiteren Mitarbeitern des BVN, die mich unterstützten (u.a. Frau Staude) sei an dieser Stelle gedankt.

Die Damen vom Labor des Fachbereiches 4.0 in Dummerstorf trugen durch die Einarbeitung in die IVP, die vielen Tipps und Tricks sowie die Aufmunterung zum Gelingen der Arbeit bei. Vielen Dank, ich durfte ein eingespieltes Team erleben, das sehr angenehm, kompetent und erfolgreich zusammenarbeitete.

Bei den Mitarbeitern des Schlachthofes Erlangen bedanke ich mich für die Hilfe und Überlassung der Ovarien.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mitdotorandin Ruzanna Hovsepien für die aufmunternden Sessions und die große Unterstützung bedanken. Danken möchte ich auch Dana Danowsky, Dr. Verena Hermann mit Eltern, Dr. Tina Rebelein, Corinna Siema, Martin Heilbronner, Matthias Rummer und meiner Mutter für die vielfältige Hilfe und Motivation.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Burgoberbach, den 25.09.2010

Ursel Fucker