

AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder

43. Jahrestagung www.aet-d.de

16. und 17. Juni 2016 in Neustadt an der Aisch



Hans-Peter Nohner
Andrea Lucas-Hahn

Besamungsverein 
Neustadt a.d. Aisch e.V.

AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder

www.aet-d.de

**43. Jahrestagung in Neustadt an der Aisch
16. und 17. Juni 2016**

**Wir bedanken uns bei unseren Sponsoren
für die finanzielle Unterstützung unserer Tagung**

Goldspensoren 2016



Silbersponsor 2016



Bronzesponsoren 2016



Weiterer Sponsor 2016

[Pharmanovo](#)

Sponsorenadressen

Goldspensoren

BVN

Besamungsverein Neustadt a.d.Aisch e.V.
Karl-Eibl-Straße 17 - 27
91413 Neustadt an der Aisch

Vetoquinol GmbH

Parkstraße 10
88212 Ravensburg

Silbersponsor

IMV Technologies

Rue Clemenceau, Postfach 61302
L'Aigle-Cedex, France

Bronzesponsoren

Bodinco B.V.

Hofdijkstraat 2
1814 EC Alkmaar
Niederlande

MOFA Global

Oude Ruurloseweg 28
7136 KG Zieuwent
Niederlande

Calier Deutschland GmbH

Balsenstraße 2
27472 Cuxhaven

MSD Tiergesundheit Intervet Deutschland GmbH

Feldstraße 1a
85716 Unterschleißheim

Consarctic GmbH

Postfach 1133
63821 Schöllkrippen

RMP Medizinische Produkte

Eyber Straße 74
91522 Ansbach-Eyb

Fertikult Gück

Zietenstraße 25a
10783 Berlin

Veyx-Pharma

Söhreweg 6
34639 Schwarzenborn

Labotect GmbH

Labor-Technik-Göttingen
Kampweg 12
37124 Rosdorf

Zoetis Deutschland GmbH

Schellingstr. 1
10785 Berlin

MINITÜB GmbH

Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach

Weiterer Sponsor

Pharmanovo GmbH

Sudetenstr. 19
30559 Hannover

Programm

Donnerstag, 16. Juni 2016

- 9:00 – 11:30 Praktikerseminar**
Leitung: H.-P. Nohner, A. Woehl-Wenigerkind
Qualitätsbeurteilung von Rinderembryonen
- 12:00 Registrierung und Willkommen – kleiner Imbiss**
- 13:00 Begrüßung**
H.-P. Nohner, 1. Sprecher AET-d
C. Leiding, Direktor, Geschäftsführung (FT) des BVN
J. Aumann, Direktor, Geschäftsführung (Z) des BVN
-
- 13:30-15:00 Sektion I -** 11
In vitro Produktion und Kryokonservierung
Leitung: A. Lucas-Hahn
-
- 13:30-14:00 Geschichte der und neue Entwicklungen in der Humanen** 12
Assistierten Reproduktionsmedizin
R. Dittrich – Erlangen
- 14:00-14:15 Prä-in-vitro-Reifung mit Koffein erhöht die** 13
Überlebensraten nach Vitrifikation boviner Embryonen
S.M. Bernal, A. Lucas-Hahn, P. Aldag, U. Baulain, K.G. Hädeler,
D. Herrmann, H. Niemann – Mariensee, Bogotá, Kolumbien
- 14:15-14:30 Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die frühe embryonale** 14
Entwicklung des Rindes in vitro
J. Stöhr, H. Grothmann, C. Wrenzycki – Gießen
- 14:30-14:45 Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative** 16
zur Kryokonservierung
N. Blad-Stahl, F. Kotarski, C. Wrenzycki – Gießen
- 14:45-15:00 Deutsche Genbank für landwirtschaftliche Nutztiere** 18
eröffnet
C. Ehling, M. Henning – Mariensee
-
- 15:00-15:45 Kaffeepause und Industrieausstellung**

Donnerstag, 16. Juni 2016

- 15:45-17:15 Sektion II** 20
Berichte aus der Praxis
Leitung: U. Küchenmeister
-
- 15:45-16:00 Vorstellung der neuen ADR-Richtlinie ET** 21
J. Detterer, H. Cramer - Georgsheil, Bonn
- 16:00-16:15 Haben polymorphkernige neutrophile Granulozyten im** 22
Endometriumabstrich einen Einfluss auf die
Embryonengewinnung bei Holstein-Spenderkühen?
Erste Ergebnisse
J. Egberts, J. Detterer, A. Park, S. Meinecke-Tillmann
- Georgsheil, Hannover
- 16:15-16:30 Erfahrungswerte und Fallbeispiele von vielfach** 24
superovulierten Dauerspendern
H.-P. Nohner - Neustadt a.d. Aisch
- 16:30-16:45 Sind die Trächtigkeitsraten von Embryonen, die aus** 26
Besamung mit x-sortierten Samenportionen stammen,
reduziert?
J. Detterer, J. Egberts - Georgsheil
- 16:45-17:00 Praktikerbericht eines ET-Betriebes** 28
W. Wagner - Neustadt a.d. Aisch
-

17:00-18:30 Pause

Ab 18:30 Abendveranstaltung

Ab 21:00 Übertragung des
Fußballspiels
Deutschland - Polen



Freitag, 17. Juni 2016

- 8:30–10:15 Sektion III** 29
Superovulation und Ovartätigkeit
Leitung: C. Wrenzycki
-
- 8:30-9:00 FOLLTROPIN: a technical review** 30
P. Renaud, Vetoquinol
- 9:00-9:15 Bemerkungen zur Hierarchie der Interaktionen zwischen** 31
Uterus, Corpus luteum und dominanten Follikeln beim
Rind
J. Schneebeili – Summaprada, Schweiz
- 9:15-9:30 Erzeugung von Ovarialzysten bei Rindern durch** 32
intrafollikuläre Injektion von NSAID
A.Vernunft, T. Viergutz, V. Röttgen, J.M. Weitzel – Dummerstorf
- 9:30-9:45 Einfluss des Corpus luteum auf die** 33
In-vitro-Entwicklungscompetenz von bovinen Oozyten
aus ultraschallgestützter Follikelpunktion
P. Kordowitzki, S.M. Bernal, K.G. Hadelers, P. Aldag, A. Lucas-Hahn, H. Niemann – Mariensee
- 9:45-10:00 Vorstellung der Dissertationsarbeit zum Thema** 34
Vergleich des Einflusses spezifischer und
unspezifischer mTor-Inhibitoren auf die Reifung von
Rindereizellen und Charakterisierung der Entwicklungs-
kompetenz Torin 2-behandelter Rindereizellen
M. Kreißelmeier – Neustadt a.d. Aisch
- 10:00-10:15 Quantifizierung der Gallensäuren in boviner** 35
Follikelflüssigkeit
C. Blaschka, C. Wrenzycki – Gießen
-
- 10:15–11:00 Kaffeepause und Industrieausstellung**

Freitag, 17. Juni 2016

- 11:00-12:15 Sektion IV** 37
ET- Einflussfaktoren
Leitung: A. Vernunft
-
- 11:00-11:15 Erhöhte Ölsäurekonzentrationen verändern die Identität** 38
und Funktion von kultivierten bovinen Granulosazellen
V. Rao Yenuganti, T. Viergutz und J. Vanselow – Dummerstorf
- 11:15-11:30 Verbesserung des frühen embryonalen Metabolismus** 40
durch Supplementierung des Kulturmediums mit
L-Carnitin und gleichzeitiger Reduktion von Fettsäuren
E. Held, S.L. Klein, F. Rings, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hölker
– Bonn, Königswinter
- 11:30-11:45 Intrafollikulärer OozytenTransfer (IFOT) immaturer** 42
Rindereizellen verbessert die Entwicklungsrate und
führt zur Geburt vitaler Kälber
M. Hoelker, A. Kassens, E. Held, F. Rings, H. Sieme, D. Tesfaye, K.
Schellander – Bonn, Königswinter, Hannover
- 11:45-12:15 Embryotransfer von 1975 bis 2016 – eine spannende** 43
persönliche Reise
K. Roschlau – Nüchel
-

12:15 Verabschiedung
Einladung zur 44. Jahrestagung AET-d

Imbiss

Zusammenfassungen der Vorträge

Sektion I

In vitro Produktion und Kryokonservierung

Geschichte der und neue Entwicklungen in der Humanen Assistierten Reproduktionsmedizin

R. Dittrich

**Universitätsklinikum Erlangen, Frauenklinik, Leiter IVF- und Endokrinologisches
Labor**

Ohne Abstract – Platz für Ihre Notizen

Prä-in-vitro-Reifung mit Koffein erhöht die Überlebensraten nach Vitrifikation boviner Embryonen

S.M. Bernal^{1,2}, A. Lucas-Hahn¹, P. Aldag¹, U. Baulain¹, K.G. Hadelers¹, D. Herrmann¹, H. Niemann¹

¹*Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Nutztiergenetik (FLI), Mariensee*

31535 Neustadt

²*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales -U.D.C.A-, Bogotá, Colombia*

In vitro erzeugte Rinderembryonen zeigen, verglichen mit Embryonen, die nach Superovulation gewonnen werden, reduzierte Überlebensraten nach Kryokonservierung. Eine Supplementierung während der *in vitro* Reifung mit Koffein kann die unkontrollierte Wiederaufnahme der Meiose verhindern und somit die Qualität in vitro produzierter Embryonen erhöhen. Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss einer Prä-in-vitro-Reifung (prä-IVM) mit Koffein auf Reifungsraten, cAMP-Konzentration in den Oozyten, Entwicklungskompetenz nach in-vitro-Fertilisation und das Überleben der Blastozysten nach Vitrifikation. Bovine Ovarien wurden von einem örtlichen Schlachthof gewonnen und die Kumulus-Oozyten-Komplexe durch Slicing isoliert. Die Oozyten wurden 2 Stunden vor der *in vitro* Maturation (prä-IVM) mit oder ohne Koffein (0, 1, 5, 10, 20, 30 mM) kultiviert. Eine Standard-IVM wurde als Kontrolle durchgeführt. Nach der IVM wurden alle Eizellen *in vitro* befruchtet und die Zygoten unter Standardbedingungen bis zum Tag 8 kultiviert. Expandierte Blastozysten aus der Standardbehandlung und der 10 mM Koffein-Behandlungsgruppe wurden vitrifiziert. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt: Koffein verzögert die Meiose nach 9h IVM in einer konzentrationsabhängigen Weise. Die cAMP-Spiegel in den Oozyten waren vor und nach der IVM ähnlich. Die Anzahl an gereiften Eizellen, Teilungs- und Blastozystenraten waren in der Gruppe mit 30 mM Koffeinkonzentration reduziert und bei den anderen Behandlungsgruppen ähnlich. Anzahl und Anteil der inneren Zellmasse und Trophektoderm Zellen in Blastozysten unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. 48 Stunden nach dem Auftauen waren die Schlupfraten in der 10 mM Koffein-Gruppe (73,8%) höher im Vergleich zu den Kontrollembryonen (59,7%). Die Re-Expansionsraten und die Zellgesamtzahl nach 48 Stunden waren in beiden Behandlungen vergleichbar. Das Verhältnis von Lebend/Gesamt Zellen war in der Koffein-Behandlung höher. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Koffeinergänzung vor der IVM die Meiose verzögert und die Blastozystenqualität verbessern kann, was sich letztlich in einer höheren Kryotoleranz der *in vitro* produzierten Embryonen auswirkt.

Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die frühe embryonale Entwicklung des Rindes in vitro

Judith Stöhr, Hanna Grothmann, Christine Wrenzycki

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine amphiphile, farblose Flüssigkeit, die gut und schnell biologische Membranen penetriert. Aufgrund dieser Eigenschaften wird DMSO als Lösungsvermittler in der Zell- und Embryonenkultur und als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Der präferierte Einsatz von DMSO bei der Vitrifikation beruht auf seiner Fähigkeit zur Glasbildung.

In bisherigen Studien konnte festgestellt werden, dass Konzentrationen bis 0,40 % während der In-vitro-Maturation boviner Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) hinsichtlich der Weiterentwicklung der Embryonen als unbedenklich gelten (Avery & Greve 2000). Eine Supplementation von 0,10% DMSO während der In-vitro-Kultivierung beeinflusst die Teilungsraten nicht, erhöht aber signifikant die Entwicklungsraten (Stinshoff et al., 2013). Ebenso konnte ein Effekt auf das Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gentranskripte beobachtet werden (Stinshoff et al. 2013).

Nichtsdestotrotz scheint DMSO bei der Vitrifikation unerlässlich, da die Reexpansions- und Schlupfraten im DMSO-freien Vitrifikationsmedium signifikant niedriger sind als im DMSO-haltigen Medium. Dennoch konnte auch hier festgestellt werden, dass die molekulare Qualität der Embryonen auf mRNA-Ebene durch den Kontakt zu DMSO reduziert war (Beuing 2013).

Der erste Teil dieser Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss der unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen im Kultivierungsmedium auf die embryonale Entwicklung in vitro anhand morphologischer Kriterien. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Lebend-Tot-Ratio, der Apoptose-Index und die intraembryonale Fettakkumulation expandierter Blastozysten bei einer DMSO-Exposition mit 0,10% und 0,15% positiv beeinflusst werden (Stöhr et al. 2016).

Im zweiten Teil dieser Untersuchungen war es das Ziel, den Einfluss von DMSO auf das Differenzierungspotential der embryonalen Zellen zu überprüfen und die Qualität der Embryonen nach Kontakt mit DMSO auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Hierfür wurden mit der Slicing-Methode Kumulus-Oozyten-Komplexe aus Schlachthofovarien gewonnen und für 24h in vitro gereift, anschließend in vitro fertilisiert und für 8 Tage in vitro kultiviert. Während der In-vitro-Kultivierung wurde DMSO in folgenden Konzentrationen supplementiert: 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20% und 0,25%.

Mittels Färbung erfolgte die Analyse des Verhältnisses von Zellen der inneren Zellmasse und den Zellen des Trophektoderms in expandierten Blastozysten. Die molekulare Qualität der Embryonen wurde ebenfalls an expandierten Blastozysten via RT-qPCR hinsichtlich der Expression entwicklungsrelevanter Gentranskripte bestimmt. Die folgenden spezifischen Gentranskripte wurden analysiert: 4 Enzyme des Fettmetabolismus (Acetyl-CoenzymA-Acyltransferase 1 (ACAA1), Fettsäure-Synthase (FASN), Stearoyl-CoenzymA-Desaturase 1 (SCD1), Carnitin-O-Palmitoyltransferase 2 (CPT2)), ein Glukosetransporter Typ 3 (SCL2A3), ein Enzym des Glukosestoffwechsels (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)), ein anti-apoptotisches (BCL2-Like-Protein 1 (BCL2L1)) und ein pro-apoptotisches Gentranskript (BCL2-assoziiertes X Protein (BAX)) sowie ein Stressindikatorprotein (Hitzeschockprotein 70 (HSP1A1)).

Die Ermittlung der ICM/TE-Ratio ergab eine signifikant höhere ICM/TE-Ratio für die Embryonen aus den Gruppen mit 0,20% und 0,25% DMSO im Kultivierungsmedium im Vergleich zu den Embryonen aus der Kontrollgruppe ohne DMSO-Supplementation. Zusätzlich wiesen die Embryonen aus der Gruppe mit 0,20% DMSO-Zusatz eine signifikant höhere ICM/TE-Ratio im Vergleich zu den Embryonen, die mit 0,10% DMSO-Zusatz im Medium kultiviert wurden, auf (0% DMSO: $0,34 \pm 0,05$; 0,05% DMSO: $0,39 \pm 0,08$; 0,10% DMSO: $0,37 \pm 0,04$; 0,15% DMSO: $0,40 \pm 0,07$; 0,20% DMSO: $0,45 \pm 0,06$; 0,25% DMSO: $0,43 \pm 0,09$ [$p \leq 0,05$]).

Die Untersuchung entwicklungsrelevanter Gentranskripte mittels RT-qPCR ergab für die Expression des Stressindikatorproteins (HSP1A1) keine signifikanten Unterschiede [$p > 0,05$].

Die Transkripte, die Genen des Fettmetabolismus zu zuordnen sind, zeigten einen erhöhten relativen Gehalt für ACAA1 und FASN in Blastozysten aus der 0,10% DMSO-Gruppe in Vergleich zu den Embryonen der anderen Gruppen mit DMSO-Zugabe ($p \leq 0,05$). Die relative Transkriptmenge von CPT2 war in Embryonen aus den Gruppen mit 0,05%, 0,15% und 0,25% DMSO im Vergleich zu den Embryonen aus der Gruppe ohne DMSO-Supplementation signifikant niedriger [$p \leq 0,05$]. Bei der Expression der relativen Transkriptmenge von SCD1 konnte tendenziell eine höhere relative Transkriptmenge in den Embryonen, die einer 0,10%igen DMSO-Exposition ausgesetzt waren im Vergleich zu den Embryonen der 0,05% DMSO-Gruppe ($p = 0,07$) und den Embryonen der 0,15% DMSO-Gruppe ($p = 0,09$) festgestellt werden.

Die Gentranskripte für Apoptose wiesen für das anti-apoptotische Gen BCL2L1 eine signifikant höhere Expression in den Embryonen der 0,10% DMSO-Gruppe verglichen mit den Embryonen aus der Gruppe mit 0,15% DMSO [$p \leq 0,05$] auf. Bei der Expression der relativen Transkriptmenge des pro-apoptotischen Gens BAX wurde eine signifikant niedrigere relative Transkriptmenge in den Embryonen aus den verschiedenen DMSO-Versuchsgruppen festgestellt, mit Ausnahme der Embryonen aus der 0,10% DMSO-Gruppe im Vergleich zu den Embryonen aus der Gruppe ohne DMSO-Zusatz [$p \leq 0,05$].

Bei der Untersuchung der Gentranskripte des Glukosemetabolismus war die relative Transkriptmenge von G6PD signifikant höher in den Blastozysten aus den Gruppen mit 0,05%, 0,15% und 0,25% DMSO-Zusatz als in den Embryonen, die aus der Kontrollgruppe (0% DMSO) stammten [$p \leq 0,05$]. Zusätzlich war die relative Transkriptmenge von G6PD tendenziell höher in den Blastozysten aus der 0,10% DMSO-Gruppe verglichen mit den Embryonen aus der 0,25% DMSO-Gruppe ($p = 0,07$). Bei der Expression der relativen Transkriptmenge für SCL2A3 ergab sich eine tendenziell höhere Expression von SCL2A3 in den Embryonen aus der Kontrollgruppe und den Embryonen aus der 0,10% DMSO-Gruppe im Vergleich zu den Embryonen aus der Gruppe mit 0,15% DMSO-Supplementation ($p = 0,08$).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine DMSO-Konzentration von 0,10% die morphologische und molekulare Qualität der Embryonen nicht beeinflusst.

Wir danken dem Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative zur Kryokonservierung

Nadja Blad-Stahl, Franziska Kotarski, Christine Wrenzycki

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

Um die Rinderzucht zu verbessern und weiterzuentwickeln wird permanent nach neuen Möglichkeiten reproduktiver Technologien gesucht. Ein Fortschritt ist die genomische Zuchtwertschätzung früher Embryonen mittels der SNP-Typisierung. Für die Ermittlung des genomischen Zuchtwertes (gZW) anhand der DNA ist eine Biopsie des Embryos nötig. Der gZW liegt dann ca. sieben Tage nach der Biopsie des Embryos vor. Während dieser Zeitspanne sollte der Embryo ohne Einbuße seiner Entwicklungsfähigkeit konserviert werden können. Zurzeit stehen als Möglichkeiten der Frischtransfer der bioptierten Embryonen auf Empfängertiere oder die Kryokonservierung zur Verfügung. Die Trächtigkeitsraten nach Transfer bioptierter und kryokonservierter Embryonen liegen durchschnittlich bei 30-60%, wobei die Raten abhängig von der Herkunft der Embryonen (in vivo/in vitro), der Biopsiemethode und der verwendeten Kryokonservierungstechnologie sind (Ponsart et al. 2013). Eine Alternative zur Aufbewahrung früher Embryonalstadien für einige Tage ohne Tiefgefrieren stellt die Flüssigkonservierung bei Temperaturen um 4°C dar. Diese Methode wurde bereits vor mehr als vier Jahrzehnten entwickelt (Sreenan et al. 1970), hat sich jedoch durch die Entwicklung der Kryokonservierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff nicht durchsetzen können. Um die Trächtigkeitsraten nach Transfer eines bioptierten Embryos zu verbessern, wird nach einer effizienten Methode und einem optimalen Konservierungsmedium gesucht. Das Ziel des Projektes ist es, ein praxistaugliches Verfahren zur Flüssigkonservierung bioptierter, in vivo und in vitro produzierter boviner Embryonen zu entwickeln und zu verbessern. Die Ermittlung eines geeigneten Konservierungsmediums, welches es den Embryonen ermöglicht bei 4°C für 7 Tage zu überleben und ihre Entwicklungsfähigkeit zu behalten, wird hier in den Vordergrund gestellt.

Dafür werden Tag 6-Embryonen nach dem IETS-Standard beurteilt und die Teilungs- und Entwicklungsraten dokumentiert. Nur die zur Morulae entwickelten Embryonen werden für weitere Versuche verwendet. Mit dem Mikromanipulator wird mittels der Nadeltechnik die Zona pellucida perforiert und Zellen aus dem Embryo aspiriert. Nach der Biopsie werden die Morulae für weitere 24 Stunden in den Brutschrank verbracht. Anschließend erfolgt die Flüssigkonservierung in den unterschiedlichen Medien. Als Basismedium wird TCM air verwendet und mit unterschiedlichen Proteinquellen versetzt. Supplementiert werden FBS (25 % und 50 %) oder BSA (1mg/ml und 10mg/ml). Kontrollgruppen nicht-bioptierter Embryonen werden unter denselben Bedingungen gelagert. Nach sieben Tagen im Kühlschrank wird erneut die Embryonenqualität auf morphologischer Ebene und mittels der Lebend-Tod-Färbung bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Embryonen aus der Gruppe mit dem Zusatz von 25% FBS (ohne Biopsie vs Biopsie) ähnliche Gesamtzellzahlen ($114,9 \pm 29,6$ vs $105,6 \pm 23,0$; Lebend-Tod-Ratio: $13,9 \pm 14,1$ vs $15,3 \pm 8,7$) im Vergleich zu denen der Gruppe, der 50% FBS zugesetzt werden (ohne Biopsie vs Biopsie; Gesamtzellzahl: $98,8 \pm 29,5$ vs $103,8 \pm 19,3$; Lebend-Tod-Ratio: $10,2 \pm 6,1$ vs $14,3 \pm 11,9$), aufweisen. Embryonen aus der Gruppe mit 1mg/ml BSA (ohne Biopsie vs Biopsie; Gesamtzellzahl: $100,0 \pm 29,0$ vs $103,4 \pm 27,0$; Lebend-Tod-Ratio: $9,0 \pm 6,1$ vs $8,1 \pm 4,8$) und der Gruppe mit 10mg/ml BSA (ohne Biopsie vs Biopsie; Gesamtzellzahl: $110,5 \pm 30,5$ vs $111,9 \pm 28,5$; Lebend-Tod-Ratio: $7,8 \pm 3,9$ vs $6,5 \pm 3,2$) zeigen eine geringe Reduzierung der Lebend-Tot-Ratio im Vergleich zu Embryonen mit dem Zusatz von FBS. Die morphologische Embryonenqualität wird weder durch die Biopsie noch durch die Flüssigkonservierung beeinflusst. Weitere Versuche mit dem Antifreeze Protein Typ III als Proteinzusatz stehen noch aus. Diese vielversprechenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Flüssigkonservierung bei Temperaturen um 4°C eine Alternative zur Aufbewahrung früher Embryonalstadien für einige Tage ohne Tiefgefrieren darstellt.

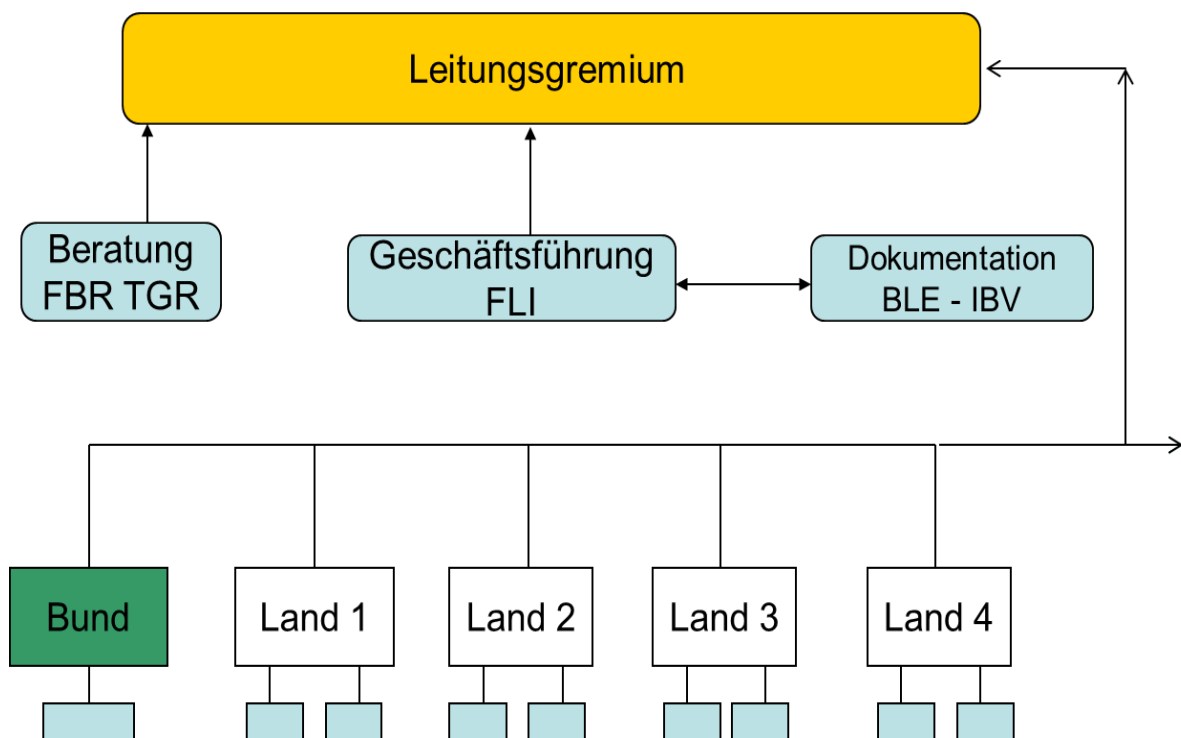
Wir danken dem Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Deutsche Genbank für landwirtschaftliche Nutztiere eröffnet

Christine Ehling, Martina Henning

Institut für Nutztiergenetik Mariensee des Friedrich-Loeffler-Instituts für Tiergesundheit

Am 24. März 2016 wurde die Deutsche Genbank für landwirtschaftliche Nutztiere offiziell im Institut für Nutztiergenetik am Standort Mariensee des Friedrich-Loeffler-Instituts eröffnet. Die Genbank soll als Netzwerk einschlägiger Einrichtungen von Bund und Ländern organisiert werden und basiert auf einer Bund-Länder-Vereinbarung, die am 1. Januar 2016 in Kraft trat. Bis auf den Freistaat Bayern und die Stadtstaaten haben alle Bundesländer diese Vereinbarung unterzeichnet. Im Anschluss an die Eröffnung fand die konstituierende Sitzung des Leitungsgremiums statt, dessen Vorsitzender Herr Dr. Polten vom BMEL Referat „Tier und Technik“ ist. Eine Geschäftsordnung liegt im Entwurf vor und muss in der nächsten Sitzung abgestimmt werden. Die Abbildung zeigt die Organisationsstruktur der Genbank.



Bund und Länder entsenden mindestens einen Vertreter in das Leitungsgremium, dessen Geschäftsführung vom ING Mariensee übernommen wird. Der Fachbeirat für tiergenetische Ressourcen (FBR TGR) berät das Gremium. Das Informationszentrum für Biologische Vielfalt (IBV) der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) soll die Dokumentation der bundesweit eingelagerten Proben durchführen.

Mit dem Aufbau der Genbank wird eine wesentliche Säule des Nationalen Fachprogramms zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung tiergenetischer Ressourcen in Deutschland, 2003 von der Agrarministerkonferenz beschlossen, in die Praxis umgesetzt. In die Deutsche Genbank können bereits kryokonservierte Proben aus den Bundesländern virtuell oder physisch übernommen werden. Die Kryoreserven werden nur mit Zustimmung des Bundeslandes, in dem die zu erhaltende Rasse betreut wird, in Abstimmung mit dem zuständigen Zuchtverband eingesetzt. Die Genbank muss auch bei den gefährdeten Spezies Unterstützung leisten, für die das Tierzuchtgesetz keine Erhaltungsmaßnahmen vorschreibt wie bei Geflügel und Kleintieren, die landwirtschaftlich genutzt werden.

Da in Mariensee seit Jahrzehnten Spermata und Embryonen lagern, deren Gewinnung unter verschiedenen gesetzlichen Rahmenbedingungen erfolgte, ist es notwendig, die Proben in verschiedene Kategorien einzuteilen, die die Freigabe für den Wiedereinsatz bestimmen. Gemeinsam mit den Überwachungsbehörden ist ein Prozedere zu entwickeln, wie ältere Samenportionen „ohne aktuellen Hygienestatus“ oder auch Nebenhodenschwanzsperma wieder in den Verkehr gebracht werden können.

Sektion II

Berichte aus der Praxis

Vorstellung der neuen ADR-Richtlinie ET

J. Detterer, H. Cramer

Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland, Arbeitsgemeinschaft
Deutscher Rinderzüchter e.V., Bonn

Ohne Abstract – Platz für Ihre Notizen

Haben polymorphkernige neutrophile Granulozyten im Endometriumabstrich einen Einfluss auf die Embryonengewinnung bei Holstein-Spenderkühen?

– Erste Ergebnisse –

J Egberts^{1,2}, J Detterer², A Park², S Meinecke-Tillmann¹

¹*Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover*

²*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland*

Auch wenn heutzutage die Embryonengewinnung bei Jungrindern mit hohen genomischen Zuchtwerten im Vordergrund steht, hat die Embryonengewinnung bei Kühen durch die Verfügbarkeit von geschlechtssortierten Samenportionen wieder stärker an Bedeutung gewonnen. Diese Portionen sind relativ teuer, daher schmerzen Fehlschläge besonders und man sucht die Ursachen oft in einer reduzierten Samenqualität.

Jedoch können auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) im Endometriumabstrich einen möglichen Hinweis auf unbefriedigende Ergebnisse bei der Embryonengewinnung bei Kühen geben.

Im Zeitraum von September 2014 bis Dezember 2015 wurden 56 Holsteinkühe (\bar{O} 4,4 \pm 1,8 Laktationen) am 229 \pm 170 Laktationstag für 62 Embryonengewinnungen herangezogen.

Im Rahmen der Voruntersuchung vor Beginn der Superovulation (Tag 6 – 13) wurden mittels einer modifizierten Cytobrush[®]-Entnahmemethode an drei verschiedenen intrauterinen Lokalisationen (Corpus uteri, linkes und rechtes cornu uteri) Abstriche des Endometriums auf das Vorhandensein von PMN untersucht. Hierfür wurden, nach Diff-Quick[®] Färbung, 300 Zellen/Objektträger in Epithelzellen und PMN differenziert. Die Tiere wurden, aufgrund der vergleichbar langen Rastzeit (190 \pm 40d p. p.) in Anlehnung an Salasel et al. (2010)¹, bei einem Anteil von 3 % PMN als risikobehaftet eingestuft. Die Embryonengewinnung erfolgte am 7. Zyklustag nach dem üblichen Verfahren. Hinsichtlich des Erfolgs wurden für jedes Gebärmutterhorn getrennt die Ausspülrate (AR), sowie die Anzahl an gewonnen, transfertauglichen, degenerierten und unbefruchteten Embryonen/Oozyten ermittelt. Weiterhin wurde die Qualität der Embryonen nach dem IETS-Schlüssel beurteilt.

¹ Salasel, B., Mokhtari, A., u. Taktaz, T. (2010): Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 74, 1271-1278

Insgesamt wurden 31 Spendertiere (50,0 %) als risikobehaftet klassifiziert (3-mal nur rechtes Horn, 5-mal nur linkes Horn, 2-mal nur Corpus, 6-mal beide Hörner, 3-mal Corpus und rechtes Horn, 3-mal Corpus und linkes Horn und 9-mal in allen drei Lokalisationen). Bei den positiv getesteten Tieren lag die AR mit 74,1 % deutlich, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,2212$ (ungepaarter *t-Test*), niedriger als bei den negativ getesteten Tieren (86,5 %). Außerdem wurden weniger Embryonen/Oozyten (7,6 zu 10,3; $p = 0,1701$, χ^2 -Test) und weniger transfertaugliche Embryonen bei betroffenen Kühen ($4,6 \pm 4,2$) gewonnen als bei nicht betroffenen Tieren ($5,4 \pm 6,4$; $p = 0,0815$, χ^2 -Test). Der Prozentsatz an Embryonen der Qualitätsstufe 1 war bei den Tieren aus der Risikogruppe mit 81,0 % höher als bei den restlichen Kühen (73,2 %; $p = 0,2691$, χ^2 -Test).

Betrachtet man die Ergebnisse der Risikotiere ($n = 31$) differenziert zwischen negativ getestetem ($n = 18$) und positiv getestetem ($n = 44$) Horn, so lassen sich die Unterschiede besser beleuchten und Signifikanzen erkennen. Der prozentuale Anteil an tauglichen Embryonen aus dem betroffenen Horn (53,9 %) ist signifikant ($p = 0,0005$, χ^2 -Test) niedriger als der von der nicht betroffenen Seite kommende Anteil (80,0 %). Sowohl der Prozentsatz an degenerierten Embryonen (14,8 % vs. 7,3 %) als auch der der unbefruchteten Oozyten (31,3 % vs. 12,7 %) ist im positiv getesteten Horn signifikant höher ($p = 0,0024$, χ^2 -Test) als in dem negativ getesteten Horn.

Zu Beginn der Studie wurde mit einem PMN-Grenzwert von 5 % gearbeitet. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch lineare Tendenzen erkennen, welche sich bei einem Schwellenwert von 4 % verstärkten. Signifikante Unterschiede werden jedoch erst bei einem PMN-Grenzwert von 3 % deutlich, was in diesem Fall auch auf die recht lange durchschnittliche Rastzeit von > 200 Tagen zurückzuführen ist. Dies führt zu der Empfehlung die Kriterien bezüglich der PMN-Konzentration im Uterus in Hinsicht auf Embryonenspende zu verschärfen. Ebenso wäre es ratsam Kühe, die zur Gewinnung herangezogen werden sollen, zytologisch zu untersuchen und bei positivem Befund zurückzustellen und zu therapieren, da hier mit verminderten Ergebnissen zu rechnen ist.

Erfahrungswerte und Fallbeispiele von vielfach superovulierten Dauerspendern

Dr. Hans-Peter Nohner

Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V.

Eine ausreichende Zahl an Nachkommen wertvoller ET-Spender ist bei genomisch hoch positiv selektierten Tieren von besonderer Wichtigkeit.

Auch in Exportprogrammen ist die Rentabilität von der Zahl der produzierten Embryonen abhängig.

Im Rahmen der Embryonenproduktion für Exportzwecke beim BVN wurden in den letzten 13 Jahren einige Erfahrungen mit Dauerspendern gemacht. So wurden bei 38 Spenderkühen 341 Spülungen durchgeführt

Erfasst wurden Spender, die 4 bis 22mal ohne Unterbrechung gespült wurden.

Die Unterbringung der Spender erfolgte stationär, bei gleicher Haltung und Fütterung:

Grassilage, Heu, Mineralfutter, β -Carotin bildeten die Futtergrundlage

Maissilage wurde nicht gefüttert

Kraftfutter nur als Lockfutter und zur besseren Energieversorgung an den

Besamungstagen

Es wurde versucht, durch diese Fütterung den Ernährungszustand der Tiere zu halten und eine Verfettung zu vermeiden.

Alle Kühe waren oder wurden trockengestellt.

Die Selektion der Kühe beim Ankauf erfolgte nach allgemeinen gynäkologischen Untersuchungskriterien.

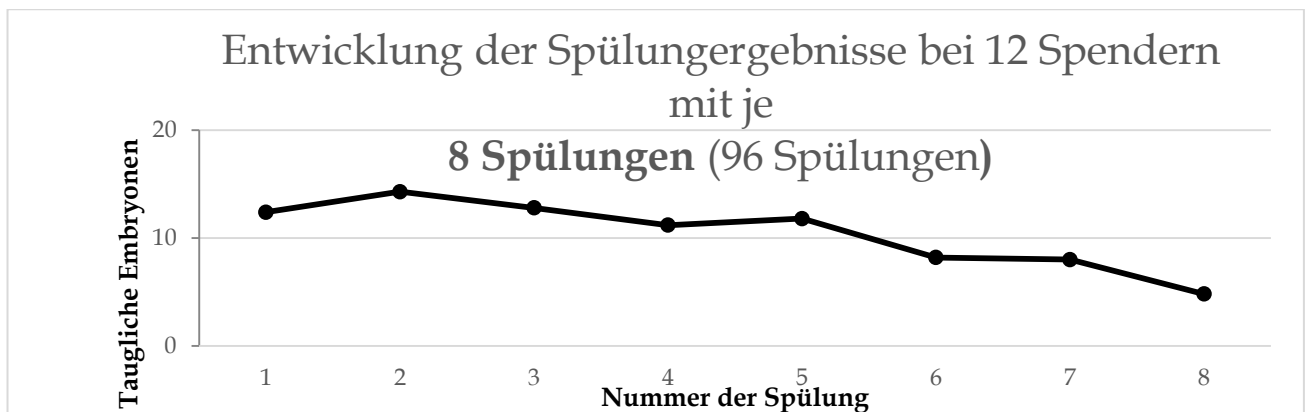
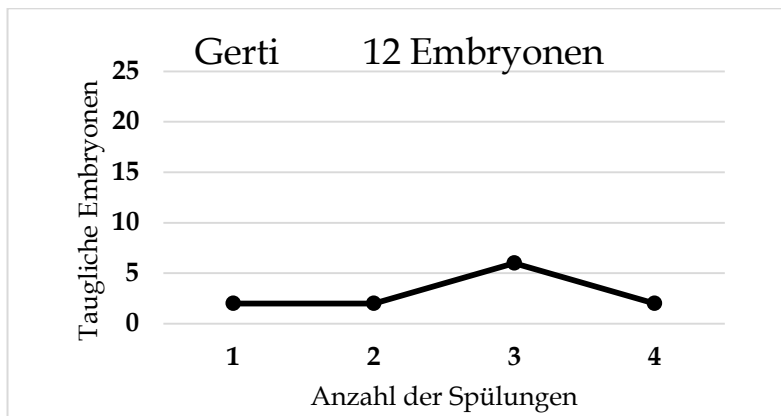
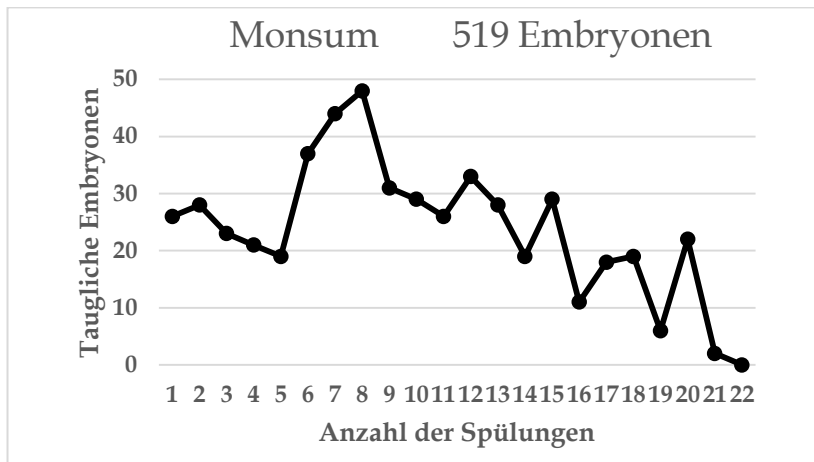
Zusätzlich dienten bei einigen Kühen die Ergebnisse von im Herkunftsbetrieb durchgeführten Superovulationen als Selektionskriterium.

Zur Stimulation wurde pluset® in einer Dosierung von 9,0 ml verwendet. Bei Bedarf erfolgte eine individuelle Anpassung der Dosierung. Die Superovulationen erfolgten meist individuell zyklusabhängig; teilweise wurde auch hormonell mit progesteronhaltigen Vaginalimplantaten CIDR, PRID delta unterstützt. Kühe, die in den ersten 3 Superovulationen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielten, wurden nicht mehr als Spender genutzt, d.h. es erfolgte eine erneute Selektion auf Basis der ersten 3 Spülungen.

Es ergaben sich folgende Feststellungen:

1. Anhand der Ergebnisse des ersten und zweiten ETs kann auf die Eignung als guter Spender geschlossen werden.
2. Mit diesen derart vorselektierten, sehr fruchtbaren Tieren kann eine gute Wiederholbarkeit der Spülergebnisse erzielt werden.
3. Rückläufige Superovulationsergebnisse mit ansteigender Spülnummer. Insbesondere bei den öfter als viermal gespülten Tieren fällt auf, dass die Tiere in ihren letzten Spülungen deutlich abfielen, was die Produktion tauglicher Embryonen anging. Die Auswertung von ambulanten Vielfachspülungen bestätigt diese Tendenz (Tab.1). Wann der Zeitpunkt des Abfalls der Resultate eintritt, ist tierindividuell sehr unterschiedlich, so dass die Frage, wie oft eine Kuh superovuliert werden kann, nicht genau zu beantworten ist.

Verlaufskurven der Spülingergebnisse bei einem guten und einem schlechten Spender



Schlussfolgerungen und Diskussion:

Gründe für den nachlassenden Ertrag mit zunehmender Anzahl Spülungen

- Ovarielle Eizellenreserve begrenzt
- Nutzbare Follikelpopulation begrenzt
- Bindegewebszubildungen in den Ovarien
- Uterus- und Eileitererkrankungen, die sich erst nach mehreren Spülungen entwickeln
- Hormonelle Entgleisungen
- Ernährungszustand kann nicht gehalten werden

Bei der Rasse Deutsches Fleckvieh besteht ein hohes Potential für die Embryonenproduktion.

Sind die Trächtigkeitsraten von Embryonen, die aus Besamung mit x-sortierten Samenportionen stammen, reduziert?

Jan Detterer und Janna Egberts

Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland

Der Einsatz von x-sortiertem Sperma bei superovulierten Spenderkühen hat sich inzwischen als Standardmethode etabliert. Durch die stetige Verbesserung der Ausspülggebnisse nahm der Einsatz von x-sortiertem Sperma in den letzten Jahren deutlich zu. So wurde im Gebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) im Zeitraum vom 01.07.2015 bis 31.05.2016 bei 50 % der Kuhspülungen x-sortiertes Sperma eingesetzt. Dabei konnten $7,0 \pm 6,3$ transfertaugliche Embryonen gewonnen werden.

Mikkola et al. aus Finnland (Theriogenology 84, 2015, 1118–1122) berichten in einer Feldstudie mit 10.697 Transfers von reduzierten Trächtigkeitsraten nach dem Transfer von Embryonen, die aus Besamung mit x-sortiertem Sperma entstanden sind. Bei Frischtransfers betrug die Differenz 8,7 %-Punkte zugunsten der aus konventioneller Besamung stammenden Embryonen und nach Tiefgefrierung und Auftauen 5,2 %-Punkte.

Im Gebiet des VOST liegen aus dem Zeitraum ab dem 01.01.2015 bis heute die Non-Return-Rate-90-Tage (NRR-90) von 1356 Transfers der Kategorien frisch konventionell (N = 218), frisch sortiert (N = 80), tiefgefroren/aufgetaut (TG) konventionell (N = 866) und TG sortiert (N = 192) vor. Die Transfers erfolgten durch 3 erfahrene Personen überwiegend auf Holstein Jungrinder in den Zuchtbetrieben des VOST-Gebiets. Die Empfängertiere für die Frischtransfers wurden in der Regel synchronisiert, während die TG-Embryonen überwiegend 7 Tage nach einer natürlichen Brunst übertragen wurden.

Die Transfers wurden mit dem Besamungsdatenerfassungsprogramm SERVIT des Rechenzentrums in Verden (VIT) erfasst. Mit dem Zusatzmodul „Auswertung Non-Return“ wird dann durch die Prüfung, ob eine weitere Besamung oder ein weiterer Transfer für das Empfängertier vorliegt, der Non-Return-Wert für die jeweilige Kategorie berechnet.

Embryokategorie	Anzahl Transfers	NRR-90-Tage	
Frisch konventionell	218	86,2 %	
Frisch sortiert	80	80,0 %	p = 0,2065
TG konventionell	866	82,1 %	
TG sortiert	192	77,6 %	p = 0,1529

Tabelle 1: NRR-90 Tage nach Embryokategorie (01.01.2015 bis 29.02.2016)

Tab. 1 zeigt, dass, wie bei der Studie von Mikkola et al., auch bei den Transfers im VOST-Gebiet die Ergebnisse für die konventionellen Embryonen höher liegen als für die Embryonen aus sortiertem Sperma. Die Differenz beträgt bei den Frischtransfers 6,2 %-Punkte und bei den TG-Embryonen 4,5 %-Punkte. Diese Unterschiede sind allerdings nicht statistisch signifikant (Frischtransfers: p = 0,2065, TG-Transfers: p = 0,1529; Fisher's Exact Test).

Erklärungen für das beobachtete Phänomen könnten sein, dass das sortierte Sperma einen negativen Einfluss auf die Blastozystenformation und die Schlüpftrate haben könnte. Weiterhin könnte die Embryonalentwicklung verzögert sein. Ebenso werden epigenetische Effekte diskutiert (Mikkola et al., 2015).

Die NRR-90 Tage für Embryonen aus sortierter Besamung liegt aber immer noch auf einem sehr hohen Niveau, so dass der Einsatz von sortierten Portionen für superovulierte Kühe weiterhin empfohlen werden kann, da sich die Zahl der geborenen Kuhkälber gegenüber den konventionellen Embryonen deutlich erhöhen lässt.

Praktikerbericht eines ET-Betriebes

W. Wagner, Vorsitzender des BVN – Neustadt a.d. Aisch

Ohne Abstract – Platz für Ihre Notizen

Sektion III

Superovulation und Ovartätigkeit

FOLLTROPIN : a technical review

Paul Renaud

Global technical manager : reproduction and pain management

VETOQUINOL

Developed in the 1980's, Folltropin-V has been used for the superovulation of cattle for more than 25 years. Folltropin-V is supported by a wide body of scientific literature spanning 25 years with extensive publications around the world. Moreover, Folltropin has been used successfully in all breeds of cattle around the world. There is a very larger body of literature which addresses the use of Folltropin, and attempting to review and read all available publications would be an undertaking of huge proportions. This presentation will attempt to deliver a comprehensive overview of sampled published results when, using Folltropin in conventional MOET procedures. The previous originating from several countries and continents, and all from peer reviewed publications.

Bemerkungen zur Hierarchie der Interaktionen zwischen Uterus, Corpus luteum und dominanten Follikeln beim Rind.

Schneebeli Jürg; Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Im ersten Abschnitt der Lutealphase kommt es beim Rind zu komplexen Interaktionen zwischen dem Uterus, dem heranwachsenden Corpus luteum (CL) und den gestaffelt auftretenden dominanten Follikeln (DF). Der vorliegende Beitrag soll darauf hinweisen, dass sich im Geflecht dieser Wechselwirkungen eine bemerkenswerte hierarchische Ordnung erkennen lässt, die den Möglichkeiten zur Manipulation der Ovatätigkeit Grenzen setzt. Die Ausführungen basieren auf einer Reihe von Studien an Braunvieh-Milchkühen und -Rindern, deren Ovaraktivität im Zeitraum zwischen Brunst und CL-Blütephase kontinuierlich überwacht wurde (Ovarpalpation im Intervall von 1-2 Tagen; tägliche Progesteronbestimmung (P4) im peripheren Blut mittels RIA). In jeder Versuchsgruppe (zyklisch [n = 194]; erfolgreich belegt [n = 172]; erfolglos belegt [n = 81]) wurde der erste DF bei einem Teil der Tiere zwischen d6 und d15 (d1 = Brunst) manuell zerstört.

Uterine Signale scheinen insgesamt eine überragende Bedeutung zu haben. Dies äussert sich in einem verzögerten Anstieg des peripher messbaren P4 nach Belegungen, in weiteren spezifischen Eigenarten des späteren Luteinisierungsverlaufes bei zyklischen, erfolgreich oder erfolglos belegten Tieren und schliesslich auch darin, dass der uterine Status Interaktionen zwischen CL und DF beeinflusst. Die Intensität der Luteinisierung (peripher messbarer Anstieg der P4-Sekretion) moduliert das Wachstum der DF bereits in den ersten Tagen nach einer Brunst sowie während der ganzen Periode der CL-Anbildung massgeblich. Dem anfänglich überragenden Einfluss des CL wirken aber schon bald direkte, hemmende Interaktionen zwischen aufeinanderfolgenden DF entgegen, ohne dass dabei die P4-Sekretion beeinträchtigt wird. Obwohl die von den DF ausgehenden Signale in der Hierarchie der Interaktionen zwischen Uterus, CL und DF insgesamt eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen, sollte ihre Bedeutung nicht unterschätzt werden. Sie sind Ausdruck einer vom uterinen Status unabhängigen und durch das CL nur unvollständig beeinflussbaren Fähigkeit der DF, das synchrone Wachstum mehrerer potentieller Graafscher Follikel autonom und effizient zu verhindern.

Es ist davon auszugehen, diese letztgenannte Eigenschaft der DF die Möglichkeiten zur Steigerung der Effizienz bisheriger ET-Verfahren entscheidend limitiert. Obwohl uterine Signale der Induktion multipler Ovulationen (MOET) kaum im Wege stehen, und obwohl sich die CL-Aktivität auf vielfältige Weise manipulieren lässt, ist die synchrone, ungestörte Endausreifung mehrerer Follikel ein aus physiologischer Sicht unrealistisches Ziel. Inwiefern OPU unter restriktiven Auflagen (keine Ovarstimulation; nur Punktion des bereits dominanten Follikels; isolierte Oozytenreifung) eine realistische Alternative sein kann, bleibt zu prüfen. Ein standardisiertes Verfahren zur Beurteilung der Oozytenqualität (Vergleich: künstlich gewonnen vs. spontan einzeln ovuliert) könnte objektive Hinweise auf die Zweckmässigkeit verschiedener ET-Verfahren liefern.

Erzeugung von Ovarialzysten bei Rindern durch intrafollikuläre Injektion von NSAID

A.Vernunft, T. Viergutz, V. Röttgen und J.M. Weitzel

Institut für Fortpflanzungsbiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Bei etwa 15-20% der Kühe von milchbetonten Rinderrassen lassen sich in Abhängigkeit von Milchleistung, Fütterung, Körperkondition und Genetik, hauptsächlich während des Puerperiums, Ovarialzysten (größtenteils Follikel-Theka-Zysten) diagnostizieren. Diese treten sekundär im Zuge anderer Grunderkrankungen oder aber als primäres Problem im Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsproblemen auf. Resultierende verlängerte Zwischenkalbezeiten und schlechte Besamungserfolge aufgrund von Zysten lassen sich medikamentös aber nur kaum beeinflussen und erfordern längerfristige Managementmaßnahmen (Diss. Hannover von Prasse 2007, Kruse 2014, Drews 2006). Erstaunlicherweise ist die Ätiologie und Pathogenese von Ovarialzysten nur wenig erforscht, aber es werden sowohl endokrine als auch lokale Faktoren vermutet (Vanholder et al, 2006, Ortega et al. 2015). Das wenige Wissen über die Zystenentstehung ist unter anderem auch durch das Fehlen entsprechender Modelle zur experimentellen Induktion von Zysten bei Rindern begründet. Mit dieser Arbeit wollen wir einen Beitrag zur besseren Erforschung der Zystenentstehung leisten.

Zur Induktion von Zysten haben wir bereits verschiedene nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) getestet, die mittels etablierter ultraschallgeleiteter Follikelinjektionstechnik in präovulatorische Follikel appliziert wurden (Vernunft et al. 2014, aet-d Proceedings, Vianden). Zur zuverlässigen Zysteninduktion leiten wir bei Rindern im Diöstrus Brunsten mit einem PGF-Analogen (PGF-Veyx-Forte) ein und nach 54 Stunden wird die Ovulation mit einem GnRH-Analogen (Gonavet Veyx) standardisiert induziert. 16 Stunden nach der GnRH-Gabe werden 0,2 ml einer 79 µM Indomethacin-Lösung in den dominanten Follikel injiziert. Da Indomethacin auf die Cyclooxygenase 1 und 2 (COX 1,2) wirkt, haben wir im Weiteren auch spezifische COX 1 (SC560) und COX2 (NS398) Inhibitoren getestet. Die Follikel- und Zystenentwicklung haben wir durch klinische, ultrasonografische Untersuchungen, endokrinologische Blut- und Follikelflüssigkeitsuntersuchungen sowie molekularbiologische Untersuchungen von Ovargeweben charakterisiert.

Die Injektion von Indomethacin in präovulatorische Follikel verhinderte zu 100% die Ovulation. Der Follikel wächst weiter bis auf eine Größe von 35mm am 5. Tag nach der erwarteten Ovulation heran. Ab dem 5. Tag lassen sich eine zunehmende Wandverdickung und Vaskularisierung als Anzeichen einer beginnenden Luteinisierung beobachten. Zwischen dem 8. und 18. Tag post injectionem stellen sich Progesteronkonzentrationen um ein Nanogramm pro Milliliter im Plasma ein und damit signifikant niedrigere Werte als in einem vorher getesteten Diöstrus der Tiere (um 1,8 ng/ml). Der Zyklus war aber nicht verlängert. Die Zystenflüssigkeit enthält am 5. Tag post injectionem hohe Progesteronkonzentrationen (um 1000 ng/ml) und niedrige Östradiolkonzentrationen (um 20 ng/ml). Das Gewebe weist zu diesem Zeitpunkt eine geringe Expression von CYP 17 und CYP 19 auf, jedoch werden der Progesteron-Rezeptor und der LH-Rezeptor hoch exprimiert. In unseren Untersuchungen konnten weder durch spezifische COX1 noch durch COX2 Inhibitoren Zysten erzeugt werden.

Die Injektion von Indomethacin in präovulatorische Follikel könnte ein Modell zur Zystenentstehung darstellen. Die Zysten entwickeln sich nach kurzem weiterem follikulärem Wachstum zu CL-Zysten. Eine alleinige Wirkung des Indomethacins über die in der Literatur beschriebene COX-Kaskade erscheint nach unseren Untersuchung unwahrscheinlich und ist Gegenstand weiterer Forschungen.

Einfluss des *Corpus luteum* auf die In-vitro-Entwicklungscompetenz von bovinen Oozyten aus ultraschallgestützter Follikelpunktion

KORDOWITZKI P, BERNAL SM, HADELER KG, ALDAG P, LUCAS-HAHN A, NIEMANN H

Institut für Nutztiergenetik, Arbeitsgruppe Biotechnologie, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Mariensee, Germany

Die ultraschallgestützte Follikelpunktion (ovum pick-up/OPU) ist eine gut etablierte Methode zur Generierung von ungereiften Rindereizellen. Seit vielen Jahren wird OPU sowohl in der biomedizinischen Forschung als auch für die Vermehrung von züchterisch wertvollen Tieren angewandt. Jedoch sind die Erfolgsraten der In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen vielfach noch unzureichend. Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, dass die Qualität der generierten Oozyten ein entscheidender Faktor für die Blastozystenrate ist. Die Eizellenqualität aus dem OPU-Aspirat ist heterogen, da je nach Spendertier der Zyklusstand sehr variabel ausfallen kann. Ebenso ist aus älterem Schrifttum bekannt, dass dem Hormon Progesteron eine nicht zu vernachlässigende Rolle für die IVP von bovinen Blastozysten zukommt. Das Ziel dieser Untersuchung war daher, den Einfluss des *Corpus luteum* (CL) auf die Entwicklungscompetenz von Eizellen zu erarbeiten. Hierfür wurden die Entwicklungsraten für Eizellen von Kühen bestimmt, die mindestens ein deutliches CL auf einem Ovar haben (CL-Gruppe) oder von Spendertieren ohne CL (Kontroll-Gruppe). Ausgewählt wurden für beide Gruppen je 12 Kühe der Rasse Holstein Friesian der ersten und zweiten Laktation ab dem 60. Tag post partum aus der institutseigenen Versuchsherde. Follikel über 5mm im Durchmesser wurden zweimal wöchentlich für den Zeitraum von einem Monat punktiert. Die generierten Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden ihrer Qualität nach klassifiziert und nach einem Standard-Protokoll *in vitro* maturiert, fertilisiert und bis Tag acht kultiviert. Insgesamt wurden 184 KOK guter Qualität für die CL-Gruppe und 204 KOK für die Kontrollgruppe ausgewählt. Die Teilungsraten beider Eizellgruppen unterscheiden sich nur tendenziell (CL-Gruppe: 74.1 ± 4.3 ; Kontroll-Gruppe: 69.6 ± 2.1), wohingegen die Raten der formierten Blastozysten einen signifikanten Unterschied aufweisen (CL-Gruppe: 38.3 ± 4.5 ; Kontroll-Gruppe: 30.4 ± 3.8 , $p \leq 0.05$). Darüber hinaus ist in der CL-Gruppe deutlich aufgefallen, dass die Anzahl punktierter Follikel auf dem ipsilateralen Ovar mit CL um durchschnittlich 63.8% geringer ist als auf dem kontralateralen Ovar und insgesamt um 18.3% geringer, als im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Zusammenfassend lassen diese ersten Ergebnisse vermuten, dass sich die Anwesenheit eines CL einerseits negativ auf das folliculäre Wachstum des dazugehörigen Ovars auswirkt, andererseits jedoch die *in vitro* Entwicklung bis zur Blastozyste positiv beeinflussen kann.

Vorstellung der Dissertationsarbeit zum Thema Vergleich des Einflusses spezifischer und unspezifischer mTor-Inhibitoren auf die Reifung von Rindereizellen und Charakterisierung der Entwicklungskompetenz Torin 2-behandelter Rindereizellen

M. Kreißelmeier

Dr. Dr h.c. Karl Eibl-Stiftung, Neustadt a.d. Aisch

Obwohl In-vitro-Maturation (IVM) von Rindereizellen und In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen in Zuchtprogrammen routinemäßig angewendet wird, sind beide immer noch Gegenstand grundlegender Forschung. Die Ursachen hierfür sind die variierende Entwicklungskompetenz der verwendeten Eizellen, suboptimale IVM-Bedingungen und die relativ niedrige Blastozystenrate (30-40%), die in Standard-IVP-Systemen erreicht wird.

Bislang sind die molekularen Mechanismen, die der Entwicklung von Eizellen und Embryonen zugrunde liegen, noch nicht vollständig aufgeklärt. Fest steht, dass für einen ungestörten Ablauf der meiotischen Endreifung (Entwicklung vom GV- zum MII-Stadium) eine genaue räumliche und zeitliche Regulierung der in der Eizelle stattfindenden Genexpression auf Ebene der Proteinsynthese (Translation) von entscheidender Bedeutung ist. Dabei spielen spezifische Translations-Initiationsfaktoren wie eIF4E, das an die Cap-Struktur der mRNA bindet, eine wichtige Rolle. Die Funktionalität dieser Faktoren wird hauptsächlich durch Phosphorylierung gesteuert. Ebenfalls an der Kontrolle der Translation beteiligt ist mTor, eine Ser/Thr Protein-Kinase, die 4E-BP1, ein Protein, das an eIF4E bindet und so die Proteinsynthese unterdrückt, reguliert.

Im Rahmen der hier kurz vorgestellten Dissertationsarbeit wurden zwei verschiedene mTor-Inhibitoren, Rapamycin und Torin 2, während der In-vitro-Maturation von Rindereizellen angewendet. Beide Substanzen haben unterschiedliche Auswirkungen auf das Voranschreiten der meiotischen Endreifung und die in diesem Zeitraum stattfindende Translationskontrolle, was Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen, die für den Ablauf der meiotischen Eizellreifung von Bedeutung sind, erlaubt. Die infolge der Inhibitor-Behandlungen erzielten Effekte wurden durch morphologische Beurteilung anhand der Chromatinkonfiguration, durch biochemische Untersuchungen mittels Western-Blot und durch immunhistochemische Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie überprüft. Außerdem wurden Torin 2-behandelte Rindereizellen zur Bestimmung ihrer Entwicklungskompetenz fertilisiert und die Blastozystenrate wurde bestimmt.

Während Torin 2 eine Arretierung von etwa 60% der Eizellen in der MI-Phase und eine spezifische Reduzierung der BP1-Phosphorylierung verursacht, inhibiert Rapamycin bei einem Teil der behandelten Eizellen die asymmetrische Zellteilung und die Ausstoßung des ersten Polkörpers. Die Torin 2-behandelten Eizellen sind fähig, sich zu Blastozysten weiterzuentwickeln und besitzen sogar eine hohe Entwicklungskompetenz. Insgesamt können die durchgeführten Untersuchungen genauere Einblicke in regulatorische Mechanismen, die bei der meiotischen Endreifung eine Rolle spielen, ermöglichen. Solche Erkenntnisse können zu einer Definition von Entwicklungskompetenz bei Eizellen und zu einer Verbesserung der IVM-Bedingungen beitragen.

Quantifizierung der Gallensäuren in boviner Follikelflüssigkeit

Carina Blaschka, Christine Wrenzycki

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,
Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland*

Im Reproduktionssystem stellt der Follikel eine extrem fragile Mikroumgebung dar. Eine Vielzahl von Prozessen beeinflusst die Maturation der Oozyte und deren Erwerb der Entwicklungsfähigkeit. Dies beinhaltet die Interaktionen zwischen den somatischen Zellen, insbesondere der Kumuluszellen, und der Oozyte. Darüber hinaus hat die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit auch einen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der resultierenden Embryonen. Die Follikelflüssigkeit setzt sich zum einen aus Blutplasmabestandteilen, die die Blut-Follikel-Barriere überqueren können, und sekretorischen Produkten der Granulosa-, Thecazellen und der Oozyte selbst zusammen. Die Flüssigkeit enthält ein fein abgestimmtes Muster an Energiemetaboliten, Proteinen, Zytokinen/Wachstumsfaktoren, Steroiden und anderen bisher unbekannt oder nicht untersuchten Substanzen.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass folliculäre Zellen die Möglichkeit haben, Gallensäuren zu synthetisieren. Bei Säugetieren sind diese in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten, wie der Galle, dem Blut und dem Urin gegenwärtig. Gallensäuren konnten bisher in der Follikelflüssigkeit von Mensch und Rind identifiziert werden. Ihr Ursprung und ihre Rolle in der Follikelflüssigkeit sind bisher noch weitestgehend ungeklärt. Sie können durch Diffusion aus dem Blut in den Follikel gelangen oder im Follikel selbst synthetisiert werden.

Um ein besseres Verständnis über die Relevanz der Gallensäuren in der Follikelentwicklung zu erhalten, wurde das Profil und die Konzentration der Gallensäuren in der Flüssigkeit boviner Follikel unterschiedlicher Größe gemessen.

Für die Analyse wurden Ovarien paarweise von frisch geschlachteten, nicht augenscheinlich erkrankten Tieren im Interöstrus, die ein Corpus luteum aufwiesen, verwendet. Vom Schlachthof bis zum Labor fand die Aufbewahrung der Ovarien im Thermobehälter statt. Aus Follikeln definierter Größe (3-5mm, 6-8mm, 9-14mm und >15mm) wurde mittels Punktion die Flüssigkeit gewonnen. Das Punktat wurde für 3 min zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C bis zur Messung.

Mittels LC-MS/MS konnte ein Profil der folgenden Gallensäuren erstellt werden:

1.	<u>primäre Gallensäuren:</u>	Cholsäure (CA), Chenodesoxycholsäure (CDCA)
2.	<u>sekundäre Gallensäure:</u>	Desoxycholsäure (DCA)
3.	<u>konjugierte Gallensäuren:</u>	Glykocholsäure (GCA), Taurocholsäure (TCA), Glykodesoxycholsäure (GDCA), Taurodesoxycholsäure (TDCA), Glykochenodesoxycholsäure (GCDCA), Taurochenodesoxycholsäure (TCDC)

Folgende Konzentrationen konnten in den unterschiedlichen Follikelklassen gemessen werden:

	3-5 mm	6-8 mm	9-14 mm	> 15 mm
CA (ng/ml)	4594,9 ± 1098,7	7480,7 ± 1774,5	5803,8 ± 1308,7	5847,5 ± 1254,6
CDCA (ng/ml)	83,8 ± 27,4	148,1 ± 22,1	105,6 ± 18,0	112,3 ± 19,0
DCA (ng/ml)	499,5 ± 210,8	756,4 ± 252,8	592,7 ± 145,8	413,0 ± 46,8
GCA (ng/ml)	2775,2 ± 292,1	2211,1 ± 491,4	2859,1 ± 345,2	3913,4 ± 846,2
TCA (ng/ml)	483,2 ± 102,1	310,9 ± 54,7	416,0 ± 52,7	1060,0 ± 459,0
GDCA (ng/ml)	1103,9 ± 146,6	1019,3 ± 204,1	1231,2 ± 145,5	1286,4 ± 196,3
TDCA (ng/ml)	414,1 ± 119,6	301,2 ± 82,0	423,8 ± 52,3	719,7 ± 219,5
GCDCA (ng/ml)	418,1 ± 41,8	395,1 ± 80,1	480,6 ± 50,0	574,9 ± 66,0
TCDCa (ng/ml)	143,3 ± 39,2	99,7 ± 27,3	135,4 ± 23,4	250,6 ± 90,1

Mit dieser Studie konnten erstmals ein Profil der Gallensäuren und deren Konzentrationen in der bovinen Follikelflüssigkeit detektiert werden. Basierend auf diesen Daten sind weitere Untersuchungen nötig, um die Rolle der Gallensäuren während der Follikelreifung eingehender zu klären.

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; FOR 1369, WR 154/3-1). In gleichem Maße möchten wir uns für die LC-MS/MS - Messung bei den Herren Prof. Dr. Wudy und A. Sánchez-Guijo (Arbeitsgruppe Steroidhormonforschung der Abteilung Kinder-Endokrinologie und –Diabetologie am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen) bedanken.

Sektion IV

ET- Einflussfaktoren

Erhöhte Ölsäurekonzentrationen verändern die Identität und Funktion von kultivierten bovinen Granulosazellen

Vengala Rao Yenuganti, Torsten Viergutz und Jens Vanselow

Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Fortpflanzungsbiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf

Nachgeburtlich kann es bei Milchkühen zu Fruchtbarkeitsstörungen infolge einer verzögerten Wiederaufnahme oder gar dem längeren Ausbleiben der Zyklustätigkeit kommen. Eine wesentliche Ursache für diese Probleme, die eine häufige Abgangsursache darstellen, ist, dass die Tiere bei hoher Milchproduktion und gleichzeitig unzureichender Futteraufnahme in die Situation einer negativen Energiebilanz geraten. Um dennoch eine ausreichende Energieversorgung des Organismus zu gewährleisten, mobilisieren die Tiere ihre Fettreserven, was wiederum zu erhöhten Fettsäurekonzentrationen im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten, wie der Follikelflüssigkeit, führt. Erhöhte Fettsäurekonzentrationen können in verschiedenen Zelltypen wiederum ganz unterschiedliche, zumeist negative Auswirkungen, wie den Anstieg der Apoptose- und Nekroseraten, zur Folge haben. Da insbesondere die Ölsäurekonzentration nach Fettmobilisierung stark ansteigt, haben wir in einem Zellkulturmodell untersucht, wie sich Ölsäure (cis-Octadec-9-ensäure, 18:1 ω -9) auf kultivierte primäre Granulosazellen auswirkt und welche intrazellulären Signalwege beeinflusst werden. Dazu wurden neben morphologischen und physiologischen Merkmalen insbesondere die Genexpressionsprofile behandelter Zellen vergleichend untersucht.

Es zeigte sich, dass bereits die Gabe physiologischer Ölsäurekonzentrationen zu einer stark erhöhten Anzahl intrazellulärer Lipidtröpfchen (lipid droplets) und zu einer stark veränderten Zellmorphologie führte. Die Zellen veränderten ihre typische gestreckte, fibroblastenähnliche Morphologie hin zu einer runden, epithelartigen Struktur. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass dabei weder Zellzyklus-, Vitalitäts- noch Proliferationsstatus der Zellen verändert waren. Auch zeigten die mesenchymalen bzw. epithelialen Markermoleküle Cadherin 1 und 2, sowie Cytokeratin und Vimentin keine signifikanten Veränderungen. Im Gegensatz dazu war die Expression der steroidogenen Markertranskripte *STAR* (steroidogenic acute regulatory protein), *CYP11A1* (side-chain cleavage enzyme), *HSD3B1* (3 beta hydroxy-steroid dehydrogenase) und *CYP19A1* (aromatase) sowie die Produktion von Östradiol und Progesteron signifikant beeinträchtigt. Ebenso zeigte sich die Konzentration von *FSHR* Transkripten nach Ölsäuregabe stark reduziert. Dies lässt auf verminderte FSH Responsivität der Zellen nach Ölsäurezusatz schließen.

Weiterhin zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor *FOXL2* (forkhead box L2), der eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Zellidentität und -funktion von Granulosazellen hat, durch Ölsäure auf Transkriptions- und Proteinebene herunterreguliert wurde. Dieser Faktor ist wesentlich an der Expressionsregulation der funktional wichtigen Gene *CYP19A1*, *ESR2* (estrogen receptor 2), *FST* (follistatin), *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), *EDNRA* (endothelin receptor type A), *PTGS2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) und *SERPINE2* (serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2), beteiligt.

Außerdem unterdrückt *FOXL2* im Follikel normalerweise die Expression des Hodendifferenzierungsmarkers *SOX9* (*sex determining region Y-box 9*). In der Konsequenz war *SOX9* deshalb unter Ölsäureeinwirkung hochreguliert, was auf einen teilweisen Verlust der Granulosazell-Identität schließen lässt. Interessanterweise waren auch die Fettsäuretransporter *CD36* (*CD36 antigen*) und *SLC27A1* (*solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1*) stark hochreguliert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass durch erhöhte Ölsäurekonzentrationen infolge erhöhter Fettmobilisierung im Falle negativer Energiebilanz, sowohl Identität als auch Funktionalität der Granulosazellen beeinträchtigt sind. Dies könnte eine wesentliche Ursache für die Fruchtbarkeitsprobleme während der nachgeburtlichen Hochlaktationsphase sein und möglicherweise auch beim Menschen eine Rolle im Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsproblemen infolge von Adipositas oder metabolischem Syndrom spielen. Eine bessere Kenntnis der betroffenen intrazellulären Signalwege könnte hier zu neuen therapeutischen Ansätzen führen.

Publikation:

Yenuganti VR, Viergutz T, Vanselow J (2016). Oleic acid induces specific alterations in the morphology, gene expression and steroid hormone production of cultured bovine granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol*, in press

Verbesserung des frühen embryonalen Metabolismus durch Supplementierung des Kulturmediums mit L-Carnitin und gleichzeitiger Reduktion von Fettsäuren.

E. Held^{1,2}, S.L. Klein¹, F. Rings^{1,2}, D. Tesfaye¹, K. Schellander¹, M. Hölker^{1,2}

¹ *Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn, Bonn*

² *Versuchsgut Frankenforst, Landwirtschaftliche Fakultät Universität Bonn, Königswinter*

Die Kryokonservierung von in vitro produzierten Embryonen stellt einen integralen Bestandteil der Reproduktionsbiotechnologie in der Rinderzucht dar. Die Trächtigkeitsraten der kryokonservierten Embryonen liegen derzeit bei 30 - 35 % gegenüber 55 % bei Frischtransfer.

In Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Lipidmetabolismus sowohl für die präimplantative Embryonalentwicklung, als auch für die Gefriertauglichkeit der Embryonen eine zentrale Rolle spielt. Ein erhöhter Lipidgehalt gilt allgemein als einer der Hauptgründe für verminderte Überlebensraten der Embryonen nach Kryokonservierung.

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, in wie weit eine Supplementierung mit L-Carnitin in Kombination mit einer Reduktion von Fettsäuren im Proteinzusatz BSA den Lipidstoffwechsel in vitro produzierter Embryonen hinsichtlich verschiedener phänotypischer und metabolischer Marker verändert (2 x 2 Design).

Hierzu wurden 4 Gruppen definiert, wobei als Basismedium für alle Embryonen SOFaa genutzt wurde. In Gruppe 1 wurde 0,6% BSA hinzugefügt wurde (BSA) und in Gruppe 2 0,6% fettsäurefreies BSA (FAF).

In den Gruppen 3 und 4 wurden jeweils 2,5 mM L-Carnitin zugesetzt (BSA + LC) und (FAF + LC). Neben den Teilungs- und Blastozystenraten wurden auch Reexpansions- und Schlupfraten nach Kryokonservierung und anschließendem Auftauen ermittelt, während auf metabolischer Ebene der Gesamtlipidgehalt sowie die freien Radikale, in Form von Reactive Oxygen Species (ROS) untersucht wurden.

Im Hinblick auf Teilungs- und Entwicklungsraten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Demnach beeinflussen weder der Zusatz von L-Carnitin noch der Zusatz von Fettsäuren die Quantität der präimplantativen Embryonalentwicklung.

Bezüglich der Reexpansions-Geschwindigkeit und Schlupfraten nach Kryokonservierung und Auftauen der Embryonen zeigten sich jedoch deutliche Effekte, sowohl der Fettsäuren als auch des L-Carnitins. Embryonen, die in BSA und Fettsäurezusatz kultiviert wurden, zeigten zunächst ähnliche Reexpansionsraten wie Embryonen die ohne Fettsäuren kultiviert wurden. Betrachtet man jedoch die Schlupfraten, so wird ein negativer Einfluss der Fettsäuren deutlich.

Weiterhin wiesen Embryonen, die mit Zusatz von L-Carnitin kultiviert wurden, in beiden Gruppen signifikant höhere Reexpansions- und Schlupfraten auf, als Embryonen, die ohne L-Carnitin kultiviert wurden (Tabelle 1).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Lipidgehalt der Embryonen signifikant sowohl durch L-Carnitin als auch Fettsäuren beeinflusst wird.

Der höchste Lipidgehalt wurde bei Embryonen gemessen, die mit BSA und Fettsäuren kultiviert wurden. Die signifikant geringsten Lipidakkumulationen zeigten die Embryonen der Gruppen BSA + LC und FAF. Es konnte also ein signifikanter Einfluss von L-Carnitin Supplementierung und Fettsäurezusatz zum Kulturmedium auf den Lipidgehalt der Embryonen nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigte sich, dass der Zusatz von L-Carnitin nicht nur den Lipidgehalt der Embryonen, sondern auch die Entstehung freier Radikale (ROS) in den Zellen positiv beeinflusst. Eine L-Carnitin Supplementierung bewirkt einen deutlichen Rückgang der freien Radikale, wohingegen eine Reduktion der Fettsäuren diesbezüglich keinen Effekt ausübte.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie einen negativen Einfluss von Fettsäuren auf der einen und einen positiven Einfluss von L-Carnitin auf der anderen Seite auf den Stoffwechsel von in vitro produzierten, präimplantativen Embryonen an.

So führt eine Reduktion der Fettsäuren und eine Supplementierung von L-Carnitin zu einem geringeren Lipidgehalt und zu einer Verminderung des oxidativen Stresses, was letztendlich mit einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate nach Kryokonservierung einhergeht.

Tabelle 1: Gefriertauglichkeit boviner Embryonen (Tag 7), kultiviert mit BSA oder BSA FAF, so wie mit und ohne Supplementierung von L-Carnitin

Gruppe	Anzahl	Gefriertauglichkeit			
		Reexpansionsrate (%)			Schlupfrate
		3 h	6 h	30 h	54 h
BSA	40	10 (25,0 %) ^a	14 (35,0 %) ^a	19 (47,5 %) ^a	10 (25,0 %) ^a
BSA FAF	46	11 (23,9 %) ^a	11 (23,9 %) ^a	28 (60,9 %) ^{ac}	20 (43,5 %) ^a
BSA + LC	32	10 (31,3 %) ^a	19 (59,4 %) ^b	25 (78,1 %) ^{bc}	13 (40,6 %) ^a
BSA FAF + LC	45	15 (33,3%) ^a	29 (64,5 %) ^b	42 (93,3 %) ^b	30 (66,6 %) ^b

Intrafollikulärer OozytenTransfer (IFOT) immaturer Rindereizellen verbessert die Entwicklungsrate und führt zur Geburt vitaler Kälber

HOELKER M.^{1,2}, KASSENS A.³, HELD E.^{1,2}, RINGS F.^{1,2}, SIEME H.³, TESFAYE D.², SCHELLANDER K.²

¹ *Institute of Animal Science, Animal Breeding and Husbandry Group, University of Bonn, Germany*

² *Researchstation Frankenforst, Faculty of Agriculture, University of Bonn, Königswinter, Germany*

³ *Reproductive Medicine Unit, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany*

Obwohl die In Vitro Produktion (IVP) von Rindereizellen eine etablierte Technik darstellt, bestehen immer noch Unterschiede zwischen In vivo und In vitro entwickelten Rinderembryonen. Um die negativen Einflüsse der In vitro Kultur zu umgehen, haben wir kürzlich eine neue Methode, den sogenannten intrafollikulären Oozyten Transfer (IFOT), etabliert, welcher die In vivo Befruchtung und die In vivo Entwicklung bis zur Geburt vitaler Kälber von In vitro maturierten Rindereizellen ermöglicht. Es war jedoch unklar, ob auch immature Eizellen in den präovulatorischen Follikel injiziert werden können, um eine vollständige In vivo Entwicklung von immaturren Eizellen, gewonnen durch Ovum Pick Up oder durch Punktion von Schlachthofovarien, zu ermöglichen.

Zur Klärung wurden Fleckviehrinder durch zwei Injektionen PGF2 α (2 ml Estrumate ®) im Abstand von 11 Tagen gefolgt von einer GnRH-Injektion (2.5 ml Receptal ®) 42 Stunden nach der 2. PGF2 α synchronisiert. Jeweils 50 immature Eizellen, gewonnen aus Schlachthofovarien, wurden 37-42 Stunden nach der zweiten PGF2 α Injektion, unter Nutzung eines modifizierten Ovum-Pick-Up-Systems, in den vermuteten dominanten Follikel injiziert. Insgesamt wurden so 800 immature Eizellen auf 16 Empfängerrinder transferiert.

Durch eine konventionelle Uterusspülung an Tag 7 konnten dann 307 Embryonen (38,6 \pm 27,2 %) zurückgewonnen werden. Dabei lieferten 13 der 16 Rezipienten mehr als den einen Embryo, welchen man aufgrund der eigenen Eizelle erwarten würde. Von allen gespülten Embryonen hatten sich 83,2 \pm 11,5 % geteilt und 48,2 \pm 11,2 % der Embryonen hatten sich zur Morula oder Blastozyste weiterentwickelt. Nach Abzug einer Blastozyste pro Empfängertier (vermutlich von der eigenen Eizelle stammend) erreichten die IFOT-Embryonen immer noch eine Morula-/Blastozystenrate von 45,5%. Diese Entwicklungsrate war signifikant höher ($p < 0,05$) verglichen mit vollständig in vitro produzierten Embryonen (Kultur in SOFaa+0,4 % BSA in 5% O₂ und 5% CO₂) obwohl diese von der gleichen Ovariencharge stammten. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Teilungsrate (83,2 % vs. 83,7 %). Diese Ergebnisse deuten somit an, dass die Entwicklungsumgebung, bzw. die Bedingungen während der Eizellreifung, maßgeblich das weitere Entwicklungspotential zur Blastozyste beeinflussen. Zur Überprüfung des weiteren Entwicklungspotentials der Blastozysten aus IFOT wurden 13 kryokonservierte Embryonen per Direkttransfer (EG) auf synchronisierte Empfängertiere (Fleckviehrinder) übertragen und resultierten in 2 Trächtigkeiten welches letztlich zur Geburt von 2 unauffälligen und vitalen Kälbern führte.

Unseres Wissens nach ist diese Studie die erste, die über eine vollständige in vivo Entwicklung von immaturren Eizellen aus Schlachthofovarien zur Blastozyste berichtet. Darüber hinaus stellen die 2 Kälber die ersten Kälber dar, die nach Transfer von immaturren Eizellen in einen präovulatorischen Follikel entstanden sind. Der intrafollikuläre Transfer immaturer Eizellen stellt somit eine neue innovative Methode zur Vermeidung der negativen Einflüsse der In vitro Umgebung dar. Diese Methode ermöglicht zudem neue und innovative wissenschaftliche Experimente auch wenn es noch weitere Verbesserungen, insbesondere zur Steigerung der Wiederfindungsrate, bedarf.

Embryotransfer von 1975 bis 2016 – eine spannende persönliche Reise

Knut Roschlau

MASTERRIND GmbH, ET-Station Nüchel 1, D-27612 Loxstedt

Neunzehnhundertfünfundsiebzig? Irgendwann im vorigen Jahrhundert... Schlagzeilen aus dem Jahr 1975: ...Auf dem Genfer Autosalon wird der neue Super-Porsche 924 vorgestellt. Er hat 125 PS, ist fast 200 km/h schnell und kostet den stolzen Preis von 23.000 DM... Gesetz über die Herabsetzung der Volljährigkeit von 21 auf 18 Jahre wird beschlossen...

Als ich im Herbst 1975 die ersten Rinderembryonen unter dem Stereomikroskop sah, hatte ich keine Ahnung, dass mich diese Objekte bis zum Ende meiner beruflichen Laufbahn begleiten würden. Dem Betrachten der Embryonen war ein aufwendiger Vorgang vorausgegangen, in dessen Verlauf die wertvolle Spenderkuh in Vollnarkose gelegt und in Rückenlage verbracht wurde. Danach wurde die Bauchhöhle vor dem Euter eröffnet, Eierstöcke und Gebärmutterhörner wurden vorverlagert und anschließend die Embryonen aus den Hörnern ausgespült. Dass dies keine Methode für die angedachte praktische Nutzung der neuen Biotechnik war, wurde selbst mir als gerade gestartetem jungem Doktoranden am damaligen Forschungszentrum für Tierproduktion in Dummerstorf/Rostock schnell klar. Die aufgefundenen, tauglichen Embryonen wurden später ebenfalls chirurgisch am stehenden Empfängertier nach Flankenschnitt ipsilateral mit einer stumpfen Kanüle durch die Wand in das Gebärmutterhorn übertragen.

Schon Ende der siebziger Jahre waren nach Entwicklung geeigneter Katheter/Transfergeräte transzervikale (unblutige) Methoden zum Ausspülen und auch zum Übertragen der Embryonen praxisreif. Obwohl im Laufe der Zeit unterschiedlichste Hormonformulierungen und -regimes zur Auslösung einer Superovulation eingesetzt wurden – am Anfang war das PMSG, auch in Kombination mit anti-PMSG, dann verschiedene FSH-Präparate – sind die durchschnittlichen Ergebnisse für schwarz-bunte Rinder/Kühe annähernd gleich geblieben: 5 – 6 transfertaugliche Embryonen werden weltweit je Spendertier gewonnen. Leider ist auch die große individuelle Varianz gleich geblieben – von 0 bis 60 Embryonen/Spülung ist alles möglich. Da also eine Vorhersage des individuellen Ergebnisses nicht möglich ist und der Besitzer des Spendertieres nicht immer eine ausreichend große Zahl an zyklussynchronen Empfängerrindern vorhalten kann, war es schon in den siebziger Jahren essentiell, Konservierungsmethoden für „überzählige“ Embryonen zu entwickeln.

Die Methode der Wahl war das langsame Einfrieren („slow freezing“) und nach Testung verschiedener Gefrierschutzmittel (z.B. auch DMSO) fiel die Entscheidung auf 10%iges Glycerin, das für die praktische Anwendung den Nachteil hatte, dass Embryonen nach dem Auftauen zunächst unter mikroskopischer Kontrolle durch eine mehrstufige Verdünnungsreihe geführt werden mussten. Die ersten Einfriergeräte sahen übrigens abenteuerlich aus – von Hand wurden die Embryonen in ihren Behältnissen langsam in Stickstoffdampf abgesenkt. Einfrierautomaten wurden erst später entwickelt. Erst Anfang der achtziger Jahre wurde nach und nach Ethylenglykol als Gefrierschutzmittel verwendet, das einen Direkttransfer unmittelbar nach dem Auftauen der Embryonen erlaubt. Seit einigen Jahren wird über die Nutzung der Vitrifikation nachgedacht, um möglicherweise höhere Trächtigkeitsraten zu erreichen – einige Aspekte („handling“ beim Auftauen; hygienische Gesichtspunkte) sprechen aber bisher gegen eine praktische Nutzung dieses Verfahrens.

Seit den neunziger Jahren steht ein zweites Verfahren zur Verfügung, um Embryonen von sehr wertvollen Spendertieren in die Hand zu bekommen – auf der ET-Station in Nüchel, wo ich seit 1991 als Laborleiter tätig bin, wurden 1995 die Methoden des „ovum pick up“ zur wiederholten Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen aus den Eierstöcken lebender, nicht stimulierter Rinder/Kühe sowie die „In vitro production“ von Embryonen etabliert. In den ersten Monaten waren wir froh, wenn wir in der Woche eine Trächtigkeit erzeugen konnten und es dauerte tatsächlich einige Jahre, bis wir bei Kühen durchschnittlich 3 – 4 taugliche Embryonen und bei jungen Rindern 2 Embryonen je OPU-Sitzung produzieren konnten und dabei auch Trächtigkeitsraten von 50% und darüber erreichten.

Im Rahmen des Embryotransfers (ET) befinden sich die Embryonen notwendigerweise für kürzere oder längere Zeit außerhalb des Tierkörpers. Das eröffnet vielfältige Möglichkeiten, um „Manipulationen“ an ihnen vorzunehmen. Ein wichtiger Aspekt schon bei der praktischen Einführung des ET bestand darin, dass der Besitzer des Spendertieres an einer Beeinflussung des Geschlechts interessiert war. Spendertiere waren damals oft ältere Kühe, die eine beeindruckende Lebensleistung hinter sich hatten (immer viel Milch, Gesundheit, gute Fruchtbarkeit...), die aber trotz allem nicht gut genug waren, um als Bullenmutter eingestuft zu werden. Von solchen Tieren wünschte sich der Besitzer mehr weibliche Nachkommen. In meiner Promotionsarbeit beschäftigte ich mich deshalb mit der Entwicklung einer Methode zur Geschlechtsdiagnose an Rinderembryonen vor deren Transplantation. Verfahren zur Spermatrennung waren in den siebziger Jahren noch nicht erfolgreich und auch an die Nutzung molekular-biologischer Techniken, um das Geschlecht direkt an der DNA zu ermitteln, war damals noch nicht zu denken. Im Jahre 1979 wurde im Ergebnis dieser Promotionsarbeit das erste Kalb geboren, bei dem schon am Embryo nach Entnahme von wenigen Zellen das Geschlecht anhand des Karyotyps bestimmt werden konnte.

Um überhaupt wenigstens eine nutzbare Zelle für die Analyse zu bekommen, musste das Biopat 24 Stunden kultiviert werden, um dann mittels Colcemid die Zellteilung in der Metaphase zu blocken – nur in diesem Teilungsstadium sind die Chromosomen einzeln zu differenzieren. Diese Methode wurde in der Praxis genutzt, allerdings konnte nur bei 75% der Embryonen das Geschlecht festgestellt werden. Erst mit dem Aufkommen der PCR (polymerase chain reaction) in den achtziger Jahren und der Ableitung Y-Chromosomen-spezifischer Primer – bei diesen Arbeiten hatte, neben anderen Kollegen, Dr. Daniela Roschlau maßgeblichen Anteil – wurde die Methode zur Geschlechtsdiagnose an Embryonen soweit praktikabel, dass das Ergebnis der Diagnose nach etwa 2 Stunden vorlag. Seit 1991 wird diese Methode routinemäßig auf der ET-Station in Nüchel angeboten.

Ende der 70iger Jahre gelang es Steen Willadsen (Kopenhagen) als erstem, durch mikrochirurgische Teilung von Embryonen eineiige Zwillinge beim Schaf und beim Rind zu erzeugen. Ungefähr zeitgleich begannen auch am Institut in Dummerstorf Experimente zum „splitting“, zunächst bei Maus und Kaninchen, dann auch beim Rind (Schwiderski, Roschlau). Die von Willadsen entwickelte Methode (Einsatz von 5 Mikrowerkzeugen, um einen Embryo zu teilen und die Halbembryonen in eine leere Zona zu verpacken) wurde dabei wesentlich vereinfacht und damit auch für die Praxis nutzbar. Im Jahre 1985 sind die ersten eineiigen Zwillinge beim Rind dann auch in Dummerstorf geboren – zur Teilung der Embryonen wurde dabei nur noch ein einziges Mikromesser benötigt.

In den achtziger Jahren konzentrierte sich meine Arbeit zunehmend auf die Erzeugung transgener Tiere. An diesem Projekt arbeiteten mehrere Dummerstorfer Forschungsbereiche sowie als Kooperationspartner das Moskauer Institut für Molekulargenetik zusammen. Zunächst galt es herauszufinden, in welchen Zeiträumen geeignete Vorkernstadien bei den Tierarten Maus, Schwein und Rind gewonnen werden können und wie die Pronuklei für die einzelnen Tierarten am besten sichtbar dargestellt werden können. Damals gab es noch keine Kulturmedien, um bei der Maus den 2-Zell-Block und beim Rind den 8-Zell-Block zu überwinden. Also musste bei der Maus der Eileitertransfer etabliert werden und Rinder wurden als „temporäre Rezipienten“ genutzt, indem in einen Eileiter bis zu 50 Zygoten transplantiert und 7 Tage später (oft) als entwickelte Blastocysten wieder ausgespült wurden. In der Mikromanipulation galt es, in ganz neue Sphären vorzudringen – durchlässige Mikropipetten mit einem Außendurchmesser von 1 μm wurden im eigenen Labor produziert, mit denen dann DNA-Lösungen im Pikoliter-Bereich ($1 \text{ pl} = 10^{-12} \text{ l}$) in den (männlichen) Pronukleus injiziert wurden.

Nachdem geeignete Vektoren entwickelt worden waren (Metallothionein-Promotor mit Wachstumshormongen), wurden diese in die Pronuklei von Zygoten der Maus, des Schweines und des Rindes injiziert. Eine Reihe von transgenen Versuchstieren wurde geboren, bis dann im Januar 1987 ein Kalb zur Welt kam, bei dem in allen somatischen Zellen die Integration des übertragenen Vektors nachgewiesen werden konnte. Das fremde Gen wurde allerdings nicht exprimiert. Die umfangreichen Methodenentwicklungen und Ergebnisse aus diesem Projekt waren später Hauptbestandteil meiner Habilitationsschrift.

Eine gravierende Veränderung für den ET brachte die Einführung der genomischen Selektion im Jahre 2010 mit sich. Der ET war von Anfang an ein wichtiges Instrument für die Rinderzucht – die überwiegende Mehrzahl der Besamungsbullen wurde schon vor 2010 unter Nutzung dieser Biotechnik erzeugt, der ET wurde schon lange genutzt, um schnell Kuhfamilien aus wertvollen Einzeltieren (meist aus teuren Embryonenimporten) aufzubauen oder um mehr weibliche Nachkommen von Spitzentieren für die eigene Herde oder den Verkauf zu produzieren. Seit 2010 ist der ET nicht nur wichtig, sondern essentiell für die Rinderzucht! Der ET ist die einzige Technik, die es ermöglicht, innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl an Nachkommen aus einer Anpaarung zu erzeugen und damit auch eine Basis für die genomische Selektion zu schaffen. Je größer die Anzahl an Vollgeschwistern, umso breiter ist die Basis für die genomische Selektion und umso höher ist die Chance, Individuen mit den höchsten Zuchtwerten (innerhalb der natürlichen Varianz in der Vollgeschwistergruppe) zu finden. Seit zweieinhalb Jahren wird auf der ET-Station in Nückel die genomische Selektion in vielen Fällen schon auf der Ebene der Embryonen vorgenommen.

Der 1991 vollzogene Wechsel aus der Forschung in die praktische Anwendung des ET mit den vielen assoziierten Techniken erforderte in mancherlei Hinsicht ein Umdenken. Zum einen setzen sich in der Praxis nur Methoden durch, die einfach handhabbar und problemlos wiederholbar sind, zum anderen spielt das Kostendenken eine weit größere Rolle – staatliche Mittel stehen nicht zur Verfügung, so dass jeder Euro, der ausgegeben wird, erst durch die Mitglieder der Zuchtorganisation verdient werden muss. Letzteres spielt gerade auch jetzt in Zeiten ruinöser Milchpreise eine große Rolle. Da ich praxisorientiertes Arbeiten von meiner Tätigkeit im Forschungszentrum Dummerstorf kannte, fiel mir dieses Umdenken nicht schwer. Und mit dem Motto „Nie so genau wie möglich, sondern nur so genau wie nötig arbeiten“ ist das Kostendenken auch in den Griff zu bekommen.