

# AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder

**46. Jahrestagung**

**[www.aet-d.de](http://www.aet-d.de)**

**4. und 5. Juli 2019 in Wülflingen/Schweiz**



**Andrea Lucas-Hahn**

**Andreas Kuwer**

# **AET-d**

**Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer  
deutschsprachiger Länder**

**[www.aet-d.de](http://www.aet-d.de)**

**46. Jahrestagung in Wülflingen/Schweiz**

**4. und 5. Juli 2019**

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

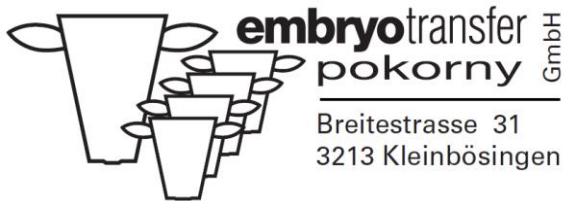
**Goldspensoren 2019**



## Silbersponsoren 2019



## Bronzesponsoren 2019



## Sponsorenadressen

### Goldsponsoren

**Calier Deutschland GmbH**  
Balsenstraße 2  
D - 27472 Cuxhaven  
<http://www.calier.de/>

**Swissgenetics**  
Meielenfeldweg 12  
CH - 3052 Zollikofen  
<https://swissgenetics.ch/>

### Silbersponsoren

**Consarctic GmbH**  
Postfach 1133  
D - 63821 Schöllkrippen  
<http://www.consarctic.de/>

**IMV Technologies**  
ZI n° 1 Est  
F - 61300 L'Aigle  
<https://www.imv-technologies.com/>

### Bronzesponsoren

**Ceva Tiergesundheit GmbH**  
Kanzlerstr. 4  
D - 40472 Düsseldorf  
<http://www.ceva.de/>

**EGG Tech**  
The Grange, Manor Farm, Chilmark  
Salisbury Wiltshire, SP3 5AF, U.K.  
<http://www.eggtech.co.uk/>

**Embryotransfer Pokorny GmbH**  
Breitestrasse 31  
CH - 3213 Kleinbödingen  
<http://www.et-pokorny.ch/>

**Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH**  
Kampweg 12  
D - 37124 Rosdorf  
<http://www.labotect.com/>

**MASTERRIND GmbH**  
Osterkrug 20  
D - 27283 Verden  
<https://www.masterrind.com/>

**One Cause Biomedical**  
Wenningerstr. 27  
D - 30459 Hannover  
<https://www.ocbiomedical.com/>

**RMP Medizinische Produkte**  
Eyber Str. 74  
D - 91522 Ansbach  
<http://www.rmp-med-produkte.de/>

**Zoetis Deutschland GmbH**  
Schellingstr. 1  
D - 10785 Berlin  
<https://www.zoetis.de/>

# Programm

## Donnerstag, 4. Juli 2019

---

- 10:00 Praktikerseminar „Smart Farming“**  
(Strickhof Eschikon)  
M. Schick und H. Bollwein
- 12:30 Registrierung und Willkommen** - kleiner Imbiss
- 13:30 Begrüßung**  
A. Lucas-Hahn, 1. Sprecherin AET-d
- 
- 13:35 Swissgenetics** - Präsentation des Goldsponsors  
R. Saner
- 
- 13:45-15:00 Sektion I**  
**Einfluss des Spermas auf die Embryonenproduktion**  
Leitung: H. Hauschulte
- 
- 13:45-14:00 Möglichkeiten zur Neuportionierung bovinen TG-Spermas und der Einfluss des Refreezings auf die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies: Erste Ergebnisse** 9  
P. Kasper, F. Kotarski, A. González, C. Wrenzycki - Gießen
- 14:00-14:15 The use of motile sperm subpopulations in revealing supplementary information on sperm function and bull fertility** 10  
I. Ibanescu, M. Siuda, H. Bollwein - Zürich (Schweiz)
- 14:15-14:30 Einfluss einer Spermien-Präinkubation auf die In-vitro-Produktion boviner Embryonen** 11  
A.-S. Fries, F. Kotarski, A. González, C. Wrenzycki - Gießen



- 14:30-14:45 Einfluss von oxidativem Stress boviner Spermien auf die epigenomische Reprogrammierung von Rinderembryonen** 12  
S. Wyck, C. Herrera, C.E. Requena, L. Bittner, P. Hajkova, H. Bollwein, R. Santoro - Zollikofen (Schweiz), Zürich (Schweiz), London (U.K.)
- 
- 14:45-15:00 Development of a flow cytometric assay to assess the bacterial count in boar semen** 13  
C. Selige, F. Janett, S. Schmitt, E. Malama, H. Bollwein - Zürich (Schweiz)
- 
- 15:00-15:30 Kaffeepause und Industrieausstellung**
- 
- 15:30-17:00 Sektion II**  
**Beiträge aus der Schweiz**  
Leitung: A. Zürcher
- 
- 15:30-15:45 Die spontane Variabilität der Progesteronsekretion boviner Corpora lutea; ein physiologisch bedeutungsvolles Merkmal** 15  
J. Schneebeili - Summaprada (Schweiz)
- 15:45-16:00 Beeinflusst die Phase der embryonalen Diapause das Oocyten-Transkriptom des Rehs?** 16  
S.M. Bernal-Ulloa, J.T. Bick, A. Rüegg, V.A. van der Weijden, S. Bauersachs, B. Drews, S.E. Ulbrich - Zürich (Schweiz)
- 16:00-16:15 Entschlüsselung der embryo-maternalen Interaktion bei der Stute** 17  
A. Rudolf Vegas, M. Tekin, G. Podico, I. Canisso, N. Borel, C. Almiñana Brines, H. Bollwein, S. Bauersachs - Zürich (Schweiz), Urbana-Champaign (USA)

- 16:15-16:30 Die Prostaglandinsekretion 8 - 14 Tage alter boviner Embryonen während einer 24-stündigen Kultur erfasst mittels einer neuen quantitativen UPLC-MS Methode** 18
- A.-K. Hankele, S.M. Bernal-Ulloa, J. Hu, R. Saner, E. Laczko, S.E. Ulbrich - Zürich (Schweiz), Zollikofen (Schweiz)
- 16:30-16:40 Reinhold Pokorny: Sein Einfluss auf den Embryotransfer in der Schweiz**
- R. Saner - Zollikofen (Schweiz)
- 16:40-17:00 Impressionen aus 40 Jahre Embryotransfer**
- R. Pokorny - Kleinböisingen (Schweiz)
- 
- 17:00-18:00 Apéro mit Vorstellung des Weinanbaus am Strickhof Wülflingen von M. Bono**
- 
- Ab 19:00 Abendveranstaltung auf dem Gelände des Strickhofs Wülflingen**
-

## Freitag, 5. Juli 2019

---

<b>09:00-10:15</b>	<b>Sektion III</b> <b>Aus der Forschung in die Praxis</b> Leitung: A. Kuwer	
<b>09:00-09:15</b>	<b>Integration von Praktikern und kommerziellen Betrieben in tierexperimentelle Versuchsvorhaben - Chancen und Hürden</b> A. Vernunft - Dummerstorf	20
<b>09:15-09:30</b>	<b>Nutzung des Ovum-Pick-Up Verfahrens zur Therapie von ovariellen Zysten bei der Milchkuh</b> R. Lapp, A. Vernunft, V. Röttgen, J.M. Weitzel - Dummerstorf	22
<b>09:30-09:45</b>	<b>Embryonenbiopsie und Kryokonservierung in vitro produzierter boviner Embryonen - Einsatz in der Routine</b> M. Diederich, S. Müller-Ziffer, P. Poppe, H. Grothmann - Nüchel	23
<b>09:45-10:00</b>	<b>Genetic testing of in vivo derived and in vitro produced bovine embryos using blastocoele fluid as a source for DNA</b> C. Herrera, I. Ibanescu, S. Wyck, F. Janett, H. Bollwein - Zürich (Schweiz)	24
<b>10:00-10:15</b>	<b>Versuche zur Flüssigkonservierung in vivo gewonnener Rinderembryonen unter Praxisbedingungen</b> E. Sosnina, H.-P. Nohner, C. Wrenzycki - Neustadt/Aisch, Gießen	25
<b>10:15-11:00</b>	<b>Kaffeepause und Industrieausstellung</b>	
<b>11:00-11:30</b>	<b>Wahl des 2. Sprechers (Wissenschaft)</b>	

---

---

<b>11:30-12:45</b>	<b>Sektion IV</b> <b>In vitro Produktion von Embryonen</b> Leitung: U. Küchenmeister	
<b>11:30-11:45</b>	<b>Genome Editing beim Rind: Generierung eines Hornlos-Phänotyps durch Einsatz von DNA-Nukleasen</b> F. Schuster, P. Aldag, A. Frenzel, P. Hassel, M. Ziegler, A. Lucas-Hahn, H. Niemann, B. Petersen - Neustadt-Mariensee	<b>27</b>
<b>11:45-12:00</b>	<b>Einfluss von Glyphosat auf die In-vitro-Maturation boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe</b> N. Blad-Stahl, J. Beranek, S. Mazurek, C. Wrenzycki - Gießen	<b>28</b>
<b>12:00-12:15</b>	<b>Effects of melatonin on allocation of inner cell mass (ICM) and trophectoderm cells (TE) in in vitro-derived bovine blastocysts</b> J.C. Gutiérrez-Añez, P. Aldag, A. Lucas-Hahn, H. Niemann - Maracaibo (Venezuela), Neustadt-Mariensee, Hannover	<b>29</b>
<b>12:15-12:30</b>	<b>Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Entwicklungskapazität boviner Eizellen und in vitro produzierter Embryonen</b> A. Gonzalez, F. Dobener, S. Chatterjee, C. Wrenzycki - Gießen	<b>30</b>
<b>12:30-12:45</b>	<b>Quantifizierung und Charakterisierung des Energiestoffwechsels bei Eizellen und Embryonen des Rindes mittels Seahorse Device</b> I. Haase, F. Rings, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hölker - Bonn	<b>31</b>
<b>12:45-13:00</b>	<b>Änderungen/Vorschläge/Diskussion</b> A. Lucas-Hahn und A. Kuwer	
<b>13:00</b>	<b>Verabschiedung - kleiner Imbiss</b>	

---

# **Zusammenfassungen der Vorträge**

# **Sektion I**

## **Einfluss des Spermas auf die Embryonenkultur**

## **Möglichkeiten zur Neupartionierung bovinen TG-Spermas und der Einfluss des Refreezings auf die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies: Erste Ergebnisse**

**Patricia Kasper, Franziska Kotarski, Andrés González, Christine Wrenzycki**

*Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin; Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere; Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen (D)*

Vor dem Hintergrund, dass von einzelnen Bullen nur noch wenige Spermaportionen vorhanden sind, sind diese, zum Beispiel für die Genreserve bei bedrohten Rassen, von großer Bedeutung. Eine verlässliche Methode zur Neupartionierung des Spermas hat demnach einen hohen Stellenwert. Eine Technologie, die die Überlebensfähigkeit der Spermien garantiert, könnte auch in der Arterhaltung anderer Spezies angewendet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, TG-Sperma einzelner Straws in kleinere Portionen aufzuteilen. Dies wird mittels zweier verschiedener Methoden getestet. In der ersten Variante werden die TG-Sperma-Straws in kleinere Stücke geschnitten (Straw-Cuts), diese bleiben dabei tiefgefroren. Die zweite Variante stellt das Refreezing dar, wobei versucht werden soll, die Aufarbeitung des aufgetauten TG-Spermas so zu optimieren, dass es in guter Qualität ein weiteres Mal eingefroren werden kann. Anschließend wird das Sperma für die In-vitro-Fertilisation verwendet werden, um damit letztlich Embryonen in vitro zu generieren. Zusätzlich soll der DFI und die Höhe der ROS in den Spermien sowohl aus den Straw-Cuts als auch aus dem Refreezing-Sperma ermittelt und eventuelle Unterschiede aufgezeigt werden. Folgende Parameter werden untersucht: Motilität und Dichte mittels des CASA-Systems, Lebend-Tot-Anteil mittels Eosin-Färbung, DNA-Fragmentations-Index (DFI) mittels der Acridinorangefärbung und Höhe der ROS mittels der DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein-Diacetat)-Färbung und des RedOXSYS-Gerätes.

Bei der Herstellung der Straw-Cuts wird ein Sperma-Straw im flüssigen Stickstoff in 6 annähernd gleich große (ca. 2 cm) Stücke geschnitten. Diese Stücke werden dann in Cryotubes gelagert. Ziel war es herauszufinden, ob verschiedene Varianten des Schneidens und die unterschiedlichen Stücke des Straws eine Auswirkung auf die Spermaqualität haben. Die Spermien wurden außerdem mit verschiedenen prozentigen Spermifilterkonzentrationen (50, 60, 90%) aufbereitet. Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden: Gruppe 50%: Motilität direkt nach Auftauen durchschnittlich ( $\bar{\emptyset}$ ) 35,9%, nach Aufbereitung  $\bar{\emptyset}$  20%; Anteil lebender Spermien direkt nach Auftauen  $\bar{\emptyset}$  40,6%, nach Aufarbeitung  $\bar{\emptyset}$  28,2%; Gruppe 60%: Motilität direkt nach Auftauen  $\bar{\emptyset}$  30,1%, nach Aufbereitung  $\bar{\emptyset}$  16,1%; Anteil lebender Spermien direkt nach Auftauen  $\bar{\emptyset}$  34,2%, nach Aufarbeitung  $\bar{\emptyset}$  22,5%; Gruppe 90%: Motilität direkt nach Auftauen  $\bar{\emptyset}$  18,4%, nach Aufbereitung  $\bar{\emptyset}$  25,8%; Anteil lebender Spermien direkt nach Auftauen  $\bar{\emptyset}$  30,1%, nach Aufarbeitung  $\bar{\emptyset}$  39,3%.

Beim Refreezing werden die TG-Sperma-Straws für 20 Sekunden in 37°C warmen Wasser aufgetaut. Das Sperma wird dann zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Spermienpellet mit neuem Eidotterverdünner versetzt, die so entstandene Suspension in 4 neue Sperma-Straws aufgezogen und nach dem Standardprotokoll eingefroren. Die Portionen zweier Bullen wurden verglichen. Das Sperma von Bulle 1 hatte vor dem Refreezing eine Motilität von  $\bar{\emptyset}$  33,4% und der Anteil der lebenden Spermien lag bei  $\bar{\emptyset}$  37,3%. Nach dem Refreezing hatte es eine Motilität von  $\bar{\emptyset}$  10,5% und der Anteil der lebenden lag bei  $\bar{\emptyset}$  9,3%. Das Sperma des 2. Bullen hatte vor dem Refreezing eine Motilität von  $\bar{\emptyset}$  53,0% und der Anteil der lebenden Spermien lag bei  $\bar{\emptyset}$  57,0%. Nach dem Refreezing hatte es eine Motilität von  $\bar{\emptyset}$  4,7% und der Anteil der lebenden lag bei  $\bar{\emptyset}$  6,7%.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Qualität des Spermas deutlich durch beide Varianten das TG-Sperma zu portionieren, beeinträchtigt wird und dass die Aufbereitung beider Varianten noch nicht optimal ist. Weitere Versuche dienen der Ermittlung des DFI und der Höhe der ROS sowohl bei den Straw-Cuts als auch beim Refreezing-Straws.

## **The use of motile sperm subpopulations in revealing supplementary information on sperm function and bull fertility**

**Iulian Ibanescu, Mathias Siuda, Heiner Bollwein**

*Clinic of Reproductive Medicine, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich (CH)*

One of the advantages of Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) is the possibility to study the heterogeneity of motile sperm within analyzed samples. Using the data offered by CASA, previous studies revealed the existence of sperm subpopulations with different kinematic characteristics within ejaculates of various species. However, identification of motile sperm subpopulations has not yet been established as a standard step in semen analysis due to lack of consensus on their physiological role. As a result, a large extent of data offered by CASA systems are in fact neglected in practice.

This study aimed to determine the correlations of motile sperm subpopulations with sperm quality and fertility of bulls. Samples of 89 ejaculates from 24 bulls was evaluated at three time points: before freezing, immediately after thawing and three hours after thawing. The analyses were performed by means of CASA in terms of kinematics parameters and by flow cytometry in terms of plasma membrane and acrosome integrity (PMAI), esterase activity and mitochondrial membrane potential (EAHMMP) and calcium level (LowCa<sup>2+</sup>). Individual values calculated by CASA for each motile spermatozoon were further used for the determination of motile sperm subpopulations (SPs) in bull ejaculates. Spearman correlation scores between each of the identified SP and flow cytometric parameters and bull Non-Return Rates at 56 days (NRR56) were calculated. Furthermore, the changes in the shares of each SP following cryopreservation were noted. Significant correlations ( $P < 0.01$ ) were revealed between SPs and quality parameters as determined by flow cytometry, but the SP showing highest correlation score was dependent on the time of examination. The results suggest that sperm quality correlates particularly with the SP of fast and linear sperm immediately after thawing ( $r = 0.52$  with PMAI,  $r = 0.49$  with EAHMMP,  $r = 0.46$  with LowCa<sup>2+</sup>) but with the SP of fast and non-linear sperm before freezing ( $r = 0.51$  with PMAI,  $r = 0.42$  with EAHMMP,  $r = 0.37$  with LowCa<sup>2+</sup>) and three hours after thawing ( $r = 0.67$  with PMAI,  $r = 0.54$  with EAHMMP,  $r = 0.71$  with LowCa<sup>2+</sup>). Moreover, there was a positive correlation ( $P < 0.05$ ) between the NRR56 of selected bulls and the proportion of sperm with fast and nonlinear movements in their ejaculates before freezing ( $r = 0.58$ ,  $n = 16$  bulls). Cryopreservation significantly decreased the shares of all SPs ( $P < 0.05$ ) except the one containing sperm with fast and linear movements ( $P > 0.05$ ). Our study indicates that different motile sperm subpopulations in bull semen have different biological implications and can offer useful information concerning sperm function and fertility.

We are grateful to Dr. Dr. h.c. Karl Eibl-Foundation for the financial support and to Swissgenetics for providing semen samples and bull field fertility data.



## **Einfluss einer Spermien-Präinkubation auf die In-vitro-Produktion boviner Embryonen**

**Ann-Selina Fries, Franziska Kotarski, Andrés González, Christine Wrenzycki**

*Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen (D)*

Die In-vitro-Produktion (IVP) ist beim Rind seit vielen Jahren eine Routinemethode, um Embryonen zu erzeugen. Sie wird im Rahmen eines Ovum Pick Up (OPU)-Programms, nach Schlachtung/Tötung oder Ovariectomie des Spendertieres angewendet. Anders als im In-vivo-Verfahren müssen die Spermien in vitro kapazitiert werden, um die Fertilisation zu gewährleisten. Die Fertilisation findet mit kapazitierten Spermien spätestens 6 h nach Beginn der Ko-Inkubation statt (Xu et al. 1988). Außerdem konnte gezeigt werden, dass männliche Embryonen sich in Abhängigkeit vom verwendeten Kultivierungsmedium schneller zur Blastozyste entwickeln als weibliche (Avery et al. 1991).

Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob eine Prä-Inkubation der Spermien zu einem höheren Anteil kapazitierter Spermien und daraus resultierend zu besseren Fertilisationsergebnissen aufgrund einer früher stattfindenden Fertilisation führt. Gleichzeitig soll das Geschlechtsverhältnis der resultierenden Embryonen untersucht werden.

In Vor-Versuchen wurden drei IVP-taugliche Bullen (A, B, C) anhand folgender Kriterien ausgewählt: Motilität und Lebend-Tot-Ratio in Halteproben über 3 Stunden; Teilungs- und Entwicklungsraten in der IVP. Von den drei Bullen wird TG-Sperma nach dem Auftauen und der Aufbereitung im HHE-haltigen Medium im Brutschrank bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter inkubiert während in regelmäßigen Zeitabständen Chlortetrazyklin (CTC) - Färbungen angefertigt und ausgewertet werden. Mit der CTC-Färbung können akrosomenintakte und akrosomenreagierte Spermien unterschieden werden. Zusätzlich ist es möglich, die akrosomenintakten Zellen in zwei weitere, funktionell unterschiedliche Kategorien einzuteilen, nämlich unkapazitierte und kapazitierte Spermien (Das Gupta, 1993). Anhand dieser Ergebnisse wurde für jeden Bullen der frühestmögliche Zeitpunkt mit dem höchsten Anteil kapazitierter Spermien bestimmt. Für Bulle A trifft dies nach 90 Minuten zu (41% kapazitierte Spermien), für die Bullen B (39,8% kapazitierte Spermien) und C (51% kapazitierte Spermien) nach 180 Minuten.

Ovarien geschlechtsgesunder Kühe werden am Schlachthof entnommen, im Labor Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus den Follikeln dieser Ovarien via der Slicing-Methode gewonnen und für 24 Stunden bei 39°C im TCM- Maturationsmedium gereift. Vor dem IVF-Schritt werden nach dem Auftauen des TG-Spermas und der folgenden Aufbereitung Beweglichkeit und Dichte bestimmt, sowie eine Lebend-Tot- mittels Eosin und eine CTC-Färbung angefertigt. In der ersten Versuchsgruppe werden die Spermien für den jeweiligen Bullen individuell vorinkubiert und nach der jeweils definierten Inkubationszeit erneut lebend-tot-gefärbt und mit CTC auf Kapazitation untersucht, bevor sie zur Fertilisation eingesetzt werden. In der zweiten Versuchsgruppe (Kontrolle) folgt auf die Spermienaufbereitung und die Färbungen direkt die Ko-Inkubation der KOK und der Spermien für 19 Stunden bei 39°C und 5% CO<sub>2</sub>. Von den vermeintlichen Zygoten wird anschließend mechanisch der Kumulus entfernt. Es folgt die In-vitro-Kultivierung in SOFaa-Medium bei 39°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. An Tag 7 und 8 (Tag 0 = IVF) werden die Teilungs- und Entwicklungsraten erhoben und die Blastozysten eingefroren. Die Geschlechtsbestimmung der Embryonen erfolgt über PCR mit bovinen Y-Chromosom-spezifischen und bovinen spezifischen Primern.

Erste vorläufige Ergebnisse zeigen ähnliche Teilungs- und Entwicklungsraten sowohl in der Versuchsgruppe 1 (mit Präinkubation; 63,6%, 12,4%, 16,4%) als auch in der Versuchsgruppe 2 (Kontrolle, ohne Präinkubation; 64,5%, 13,9%, 22,5%). Die Geschlechtsbestimmung der erzeugten Blastozysten via PCR steht noch aus.

## **Einfluss von oxidativem Stress in bovinen Spermien auf die epigenetische Reprogrammierung von Rinderembryonen**

**Sarah Wyck<sup>1</sup>, Carolina Herrera<sup>2</sup>, Cristina E. Requena<sup>4,5</sup>, Lilli Bittner<sup>2</sup>, Petra Hajkova<sup>4,5</sup>, Heinrich Bollwein<sup>2</sup>, Raffaella Santoro<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Swissgenetics, Zollikofen (CH); <sup>2</sup>Clinic of Reproductive Medicine, Department for Farm Animals, and <sup>3</sup>Department of Molecular Mechanisms of Disease, DMMD, University of Zurich, Zurich (CH); <sup>4</sup>MRC London Institute of Medical Sciences (LMS), London (UK); <sup>5</sup>Faculty of Medicine, Institute of Clinical Sciences (ICS), Imperial College London, London (UK)

Obwohl die Kryokonservierung boviner Spermien seit Jahrzehnten erfolgreich angewandt wird, ist die Fruchtbarkeit solcher Spermien im Vergleich zu flüssigkonservierten Spermien nach wie vor reduziert. Ein wichtiger Grund dafür ist der durch das Einfrieren und Auftauen induzierte oxidative Stress. Das Ziel unserer Studie war, die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Spermien und die frühe Embryonalentwicklung genauer zu untersuchen, wobei wir besonderes Augenmerk auf die epigenetische Reprogrammierung gelegt haben. Diese stellt einen zentralen Bestandteil der frühen Embryonalentwicklung dar, da sie unter anderem eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression, sowie der Zelldifferenzierung spielt. *In vitro* Versuche zeigten, dass durch reaktive Sauerstoffspezies (Inkubation mit 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) der Anteil Spermien mit einem hohen DNA-Fragmentierungsindex zunimmt (Kontrolle: 3.1%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 7.6%; P < 0.05). Dies führt zwar nicht zu einer Reduktion der Befruchtungsrate (Kontrolle: 75 $\pm$ 1.5%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 69 $\pm$ 1.9%; P  $\geq$  0.05), jedoch zu einer drastischen Reduktion in der Blastozystenrate (Kontrolle: 40.3 $\pm$ 4.4%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 9.0 $\pm$ 2.7%; P < 0.05). Quantitative Immunfluoreszenzanalysen (IF) und auf ultra-sensitiven LC-MS basierte Messungen an Rinderzygoten zeigten, dass die Induktion von oxidativem Stress bei Spermien die aktive DNA-Demethylierung (5 mC/dG) im väterlichen Vorkern hemmt (Kontrolle: 3.8%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 4.8%; P < 0.05), obwohl in den Spermien selbst keine signifikanten DNA-Methylierungsdefekte festzustellen waren (Kontrolle: 4.2%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 4.0%; P  $\geq$  0.05). Ferner wurde beobachtet, dass nach oxidativer Schädigung der paternalen DNA, maternale Faktoren des Basenexzisionsreparaturmechanismus (BER) wie das X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) vom maternalen zum paternalen Vorkern rekrutiert wurden. Dies impliziert, dass DNA-Schädigungen im paternalen Vorkern durch den BER-indizierten maternalen Signalweg repariert werden können. In weiteren Studien wurde zudem festgestellt, dass der BER Signalweg mit der aktiven DNA-Demethylierung im paternalen Vorkern in Verbindung steht, was darauf hindeutet, dass die aktive DNA-Demethylierung im paternalen Vorkern in Konkurrenz mit der DNA-Reparatur steht und somit die aktive DNA-Demethylierung hemmt. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass oxidativer Stress nicht nur einen Einfluss auf die DNA-Integrität der Spermien selbst hat, sondern auch die Dynamik der epigenetischen Reprogrammierung in der frühen Embryoentwicklung und somit die Embryonalentwicklung negativ beeinflusst. Dies ist eine mögliche Ursache für die reduzierte Fruchtbarkeit kryokonservierter Spermien.

## **Development of a flow cytometric assay to assess the bacterial count in boar semen**

**Christin Selige<sup>1</sup>, Fredi Janett<sup>1</sup>, Sarah Schmitt<sup>2</sup>, Eleni Malama<sup>1</sup>, Heinrich Bollwein<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Clinic of Reproductive Medicine, and <sup>2</sup>Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich (CH)*

The aim of the study was to develop a new flow cytometric assay for the determination of the bacterial count in commercially processed boar semen.

In total 224 fresh boar semen samples collected at an AI-station were analyzed. The number of total viable counts (TVC) was determined by using flow cytometry after staining with SYBR Green I and Propidium Iodide (PI). In the first part of the study 111 fresh boar semen samples were spiked with pure cultures of defined numbers of bacteria commonly detected in boar ejaculates and analyzed by flow cytometry. In the second part, 113 fresh semen samples were assessed on the day of collection through flow cytometry and the Most Probable Number (MPN) method, as the standard bacteriological method.

The first part of the study showed a strong correlation between the detected and expected numbers ( $r = 0.96$ ;  $P < 0.001$ ), while in the second part of the study the TVC determined by flow cytometry and by the MPN method correlated only moderately ( $r = 0.28$ ;  $P < 0.01$ ; median MPN:  $24,000 \pm \text{MAD } 21,600$  bacteria/mL; median flow cytometry:  $24,426 \pm \text{MAD } 15,610$  bacteria/mL).

In summary flow cytometry is a fast alternative to the classical culture technique to determine highly contaminated boar ejaculates. The developed flow cytometric protocol enables one to enumerate the viable bacteria within fresh boar ejaculates without requiring numerous treatment steps, and thus offering the possibility of an on-line use in AI-centers.

## **Sektion II**

### **Beiträge aus der Schweiz**

## **Die spontane Variabilität der Progesteronsekretion boviner Corpora lutea; ein physiologisch bedeutungsvolles Merkmal**

**Jürg Schneebeili**

*Summaprada (CH)*

Die Progesteronsekretion (P4) boviner Corpora lutea (CL) ist ein Fertilitätsparameter, dessen Interpretation durch die beachtliche spontane Variabilität erschwert wird. Gemäss bisherigen Erkenntnissen ist die Aktivität aufeinanderfolgender CL positiv korreliert, wobei das Luteinisierungsvermögen des schliesslich ovulierenden Follikels durch eine Reihe noch unvollständig verstandener Faktoren (absolute und relative Position des Follikels bezüglich des Vorgänger-CL; Zeitraum der Selektion zum dominanten Follikel) moduliert wird. In dieser Studie wurde geprüft, inwiefern die bisher an zyklischen unbelegten Milchkühen gemessenen Korrelationen zwischen der prä- und der postöstrischen CL-Aktivität auch bei belegten Tieren und nach Manipulationen des Follikelwachstums zu beobachten sind.

Die Daten stammen aus 128 Periöstrusphasen (d-12 bis d12), in deren Verlauf die P4-Konzentration im peripheren Blut der an d1 belegten Probandinnen (Braunvieh-Milchkühe und -Rinder) täglich mittels RIA gemessen wurde. Anlässlich der kontinuierlichen palpatorischen Überwachung der Ovaraktivität (Intervall 1-2 Tage), wurde in 60 Fällen der dominante Follikel (DF) der ersten oder zweiten Follikelwelle manuell zerstört. Die statistische Interpretation basiert auf der Berechnung von Pearson-Korrelationen (Correlation matrix plots) und auf Boxplot-Analysen.

Neben bestätigenden Feststellungen lassen sich aus der Studie wichtige zusätzliche Erkenntnisse ableiten. Wie sich erneut zeigte, ist die luteale Kapazität des späteren Brunstfollikels bereits festgelegt, wenn dieser als DF erkennbar wird. Durch die Belegung induzierte (uterine?) Effekte scheinen die an unbehandelten Tieren zu beobachtenden Beziehungen zwischen der prä- und der postöstrischen P4-Sekretion insgesamt eher zu verwischen, im brunstnahen Bereich aber zu verstärken. Die DF-Manipulationen hatten keinen feststellbaren Einfluss auf die CL-Aktivität im weiteren Zyklusverlauf bis zur Brunst, führten aber zu einer erhöhten Korrelation zwischen der P4-Sekretion im frühen Prä- und im folgenden späten Postöstrus.

Die derzeit üblichen ET-Verfahren werden den hier beobachteten physiologischen Gegebenheiten in verschiedener Hinsicht nicht gerecht. Alle Bestrebungen, beim Rind mittels Ovarstimulation synchron eine Mehrzahl qualitativ hochwertiger Brunstfollikel zu gewinnen, sind angesichts der mit der Dominanz verknüpften speziellen Eigenschaften des (normalerweise solitären) Brunstfollikels eine Illusion. Das gleiche Problem ergibt sich, wenn mittels OPU an unstimulierten Tieren mehr als nur der jeweils dominante Follikel punktiert wird. Bei der Verwendung zyklischer Rinder als Rezipienten sind die Ovarien und der Uterus insofern nicht auf die ihnen zuge dachte Aufgabe vorbereitet, als die durch eine Belegung offenbar induzierten Signale ausblieben. Die Übertragung einzelner Blastocysten aus nicht stimulierten unbehandelten Donatoren auf sham-belegte Rezipienten, könnte ein prüfenswerter Ansatz zur Umgehung dieser Probleme sein.

## **Beeinflusst die Phase der embryonalen Diapause das Oozyten-Transkriptom des Rehs?**

**Sandra M. Bernal-Ulloa<sup>1</sup>, Jochen T. Bick<sup>1</sup>, Anna Rüegg<sup>1</sup>, Vera A. van der Weijden<sup>1</sup>, Stefan Bauersachs<sup>2</sup>, Barbara Drews<sup>1</sup>, Susanne E. Ulbrich<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departement Umweltsystemwissenschaften, Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften, ETH Zürich (CH); <sup>2</sup>Genetik und Funktionelle Genomanalyse, Vetsuisse-Fakultät Zürich, Universität Zürich (CH)

Die embryonale Diapause, eine Phase der Entwicklungsruhe, die in mehr als 130 Tierarten beschrieben wurde, ist noch nicht vollständig verstanden. Beim Reh (*Capreolus capreolus*), dem einzigen bekannten Huftier, das dieses Phänomen aufweist, tritt die Brunft zwischen Mitte Juli und Anfang August auf. Die Reaktivierung der Embryonalentwicklung und Implantation erfolgen erst im darauffolgenden Dezember / Januar. Vom Status der weiblichen Gonaden ist in dieser Zeit wenig bekannt. Signalfaktoren, welche bei der Regulation der Diapause beschrieben worden sind, stehen auch im Zusammenhang mit der Wiederaufnahme der Meiose in Oozyten. Damit könnten sie auch eine Rolle bei der Kontrolle der Eizellkompetenz haben. In der vorliegenden Studie haben wir zu verschiedenen Zeitpunkten Oozyten von Rehen charakterisiert, um zu verstehen, ob Entwicklungsruhe bzw. Arretierung während der Diapause (A) einerseits und Reaktivierung (R) andererseits einen Einfluss auf das Oozyten-Transkriptom haben. Während der regulären Jagdzeit wurden unreife Oozyten aus Eierstöcken von 30 Ricken durch „Slicing“ gewonnen und nach morphologischen Merkmalen klassifiziert. Für die Analyse wurden nur Oozyten mit >2 Schichten kompakter Kumuluszellen und homogenem Cytoplasma verwendet. Unreife Oozyten wurden entweder direkt denudiert und bei -80°C schockgefroren oder für 20 bis 24 Stunden in Reifungsmedium kultiviert. Die gereiften Oozyten mit einem anwesenden Polkörper wurden schockgefroren. Je zwei Pools von 10 unreifen und reifen Oozyten für beide embryonalen Entwicklungsphasen wurden einer RNA-Seq Analyse unterzogen (mindestens vier Spender/Pool). RNA-seq libraries wurden vorbereitet und sequenziert. Sequenzen wurden gegen das Rehwild-Transkriptom (eigene unveröffentlichte Daten) verglichen und gegen menschliche, Rinder- und RefSeq-Transkripte annotiert. Differential exprimierte Transkripte (DET, korrigierter P-Wert <0,01 oder 0,05) wurden mit ABSSeq (BioConductor R-Paket) identifiziert. Zu den Vergleichen gehörten unreife (IM) und reife (M) Oozyten aus der Phase der Arretierung (A) sowie der Reaktivierung (R). Um die Auswirkungen der Reifung auf die Transkription in Oozyten zu bewerten, wurde außerdem die DET zwischen IM und M Oozyten für A und R identifiziert. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte eine Gruppierung der Proben nach Eizelltypen. Große Unterschiede traten erwartungsgemäß zwischen unreifen und reifen Oozyten auf, 1221 DET während der Zeit des Embryonalstillstands und 2534 DET während der Zeit der Reaktivierungsphase. DET in Oozyten waren zudem zwischen dem embryonalen Entwicklungsstillstand und der Reaktivierungsphase mit 68 bzw. 48 DET in unreifen bzw. reifen Oozyten ersichtlich. Hoch- und herunterregulierte Transkripte zwischen embryonalem Entwicklungsstillstand und der Reaktivierung machten in unreifen und reifen Oozyten nahezu jeweils 50% aus. Analog zu vielen anderen Spezies wurde ein selektiver Abbau von Transkripten während der Reifung der Oozyten beobachtet. Im Zuge der Reifung nahm die Expression von 86 bzw. 79% der Transkripte während der Phase der Arretierung bzw. Reaktivierung ab. Die meisten der überrepräsentierten Funktionskategorien bezogen sich auf den Zellzyklus, RNA-Prozessierung, Mitochondrien, Metabolismus und Organell-Organisation. Die vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass die Analyse der Oozyten-Transkriptome möglicherweise Mechanismen aufzeigen, die mit der Eizellkompetenz zusammenhängen.

## Entschlüsselung der embryo-maternalen Interaktion bei der Stute

Alba Rudolf Vegas<sup>1</sup>, Muhittin Tekin<sup>1</sup>, Giorgia Podico<sup>2</sup>, Igor Canisso<sup>2</sup>, Nicole Borel<sup>3</sup>, Carmen Almiñana Brines<sup>1</sup>, Heiner Bollwein<sup>1</sup>, Stefan Bauersachs<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Reproduktionsmedizin, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich (CH); <sup>2</sup>Veterinary Teaching Hospital, University of Illinois, Urbana-Champaign, IL (USA); <sup>3</sup>Institut für Veterinärpathologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich (CH)

Für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit bei vielen Säugetierarten ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Mutter die Anwesenheit eines Embryos erkennt. Bei Rindern und Schweinen beispielsweise sind die embryonalen Signale bekannt, die zur Verhinderung einer Rückkehr zur reproduktiven Zyklizität der Mutter und zur Erhaltung des Corpus luteum (CL) notwendig sind. Beim Rind und anderen Wiederkäuern wird ein spezifisches Typ I-Interferon (IFN-Tau) vom Embryotrophoblasten sezerniert. Bei der Sau hingegen ist die Östrogensekretion des Embryos wichtig, um der Mutter seine Anwesenheit zu signalisieren und die Rückbildung des CL zu verhindern. In der Stute ist die Komplexität der Kommunikation zwischen Embryo und Mutter bisher noch nicht ausreichend erforscht. Der Pferdeembryo muss die Regression des CL vor Tag 14 nach dem Eisprung (Ovulation = Tag 0) verhindern, da die zyklische Luteolyse zwischen den Tagen 14 und 16 stattfindet. Der Pferdeembryo erzeugt zwischen Tag 6 und 16 einen mechanischen Reiz, indem er sich ständig durch die Gebärmutter der Stute bewegt. Dies verhindert die endometriale Produktion und Freisetzung von Prostaglandin F<sub>2α</sub>. Während dieser Migrationsphase scheidet der Pferdeembryo verschiedene Moleküle (Östrogene, Prostaglandin E, 17α-Hydroxyprogesteron und am Ende Delta-Interferone) in das Uteruslumen aus, die ebenfalls zu den Signalen beitragen, welche die Luteolyse verhindern. Alle diese Faktoren erzeugen aufgrund des Vorhandenseins eines Embryos Veränderungen im Endometrium, einschließlich dessen Genexpression. Wir vermuten daher, dass das Vorhandensein eines Embryos im Uterus der Stute und dessen Stimuli die Genexpression des Endometriums zelltypspezifisch und auch den Inhalt der uterinen Flüssigkeit verändern, was zur maternalen Erkennung der Trächtigkeit in der Stute und zur Unterstützung der Entwicklung und des Wachstums des Embryos führt. Um die embryo-maternale Interaktion umfassend zu untersuchen, sind folgende Analysen vorgesehen: [1] Untersuchung der zelltypspezifischen Genexpression des Endometriums mittels Laser-Capture-Microdissection (LCM) und RNA-Sequenzierung von Tag 10 bis 13 von nicht trächtigen und trächtigen Stuten, sowie von Stuten, bei denen eine Kugel in den Uterus eingefügt wurde (Mechanische Simulation eines Embryos); [2] Analyse der Genexpression in Embryonen von Tag 10 bis 13; [3] Validierung der erhaltenen Daten durch Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für Zielgene in histologischen Proben, und [4] Untersuchung der extrazellulären Vesikel (EV) (small ncRNA, mRNAs, Proteine) und der Proteine in der uterinen Flüssigkeit. Bisher wurden bereits Embryonen, Endometriumproben, und uterine Flüssigkeit (Spülung des Uterus) von mindestens 5 Stuten pro Zeitpunkt gewonnen. Die Aufarbeitung der Endometriumproben mittels LCM zur Isolierung des luminalen Epithels, Drüsenepithels und von Stroma-Bereichen sowie die Optimierung der Isolierung der EV ist im Gange. Von den Ergebnissen versprechen wir uns neue Erkenntnisse zu regulatorischen Prozessen in den Kompartimenten des Endometriums, um die Mechanismen der Erkennung der Trächtigkeit bei der Stute besser verstehen zu können.

## Die Prostaglandinsekretion 8 – 14 Tage alter boviner Embryonen während einer 24-stündigen Kultur, erfasst mittels einer neuen quantitativen UPLC-MS Methode

Anna-Katharina Hankele<sup>1</sup>, Sandra M. Bernal-Ulloa<sup>1</sup>, Junmin Hu<sup>2</sup>, Rainer Saner<sup>3</sup>, Endre Laczko<sup>2</sup>, Susanne E. Ulbrich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departement Umweltsystemwissenschaften, Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften, ETH Zürich (CH); <sup>2</sup>Functional Genomics Center Zürich, ETH Zürich (CH); <sup>3</sup>Swiss Genetics, Zollikofen (CH)

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eicosanoide und sind lipidartige Moleküle, die als Lokalhormone wirken. Sie bestehen aus einem Kohlenstoffring mit 5 C-Atomen und 2 Seitenketten. Abhängig von der Anzahl an Doppelbindungen im Molekül erfolgt eine Unterteilung in Prostaglandine der 1er Serie, der 2er Serie und der 3er Serie. Am besten untersucht sind die Prostaglandine der 2er Serie. Sie spielen eine Rolle bei Entzündungsprozessen, wirken als lokale Schmerzmediatoren, sind beteiligt an der Regulation des Augeninnendrucks und sind essentiell für die Regulation der Fortpflanzung. Im Rahmen der Fortpflanzung spielen Prostaglandine bei der Ovulation, der Luteolyse des Gelbkörpers, der Trächtigkeitserkennung und der Geburt eine Rolle. Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) wirkt luteolytisch, während Prostaglandin E<sub>2</sub> eine antiluteolytische Wirkung zugeschrieben wird. Eine weit verbreitete Theorie zur Trächtigkeitserkennung nimmt an, dass es während der frühen Trächtigkeit lokal im Uterus zu einer Verschiebung des PGF<sub>2α</sub> / PGE<sub>2</sub> Verhältnisses kommt, hin zu mehr PGE<sub>2</sub> im Vergleich zum Zykluswert. Eigene Messungen von Prostaglandinen in der uterinen Spülflüssigkeit von Rindern haben jedoch gezeigt, dass es keinen Unterschied im PGF<sub>2α</sub> / PGE<sub>2</sub> Verhältnis zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Rindern gibt und dass uterines PGF<sub>2α</sub> bei weitem uterines PGE<sub>2</sub> übersteigt (Ulbrich et al., 2009, *Reproduction*, 138 371-382). Das am häufigsten vorkommende Prostaglandin in der uterinen Spülflüssigkeit wurde als 6keto-PGF<sub>1α</sub> identifiziert, welches der stabile Metabolit von Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) ist (Ulbrich et al., 2009, *Reproduction*, 138 371-382). Wir nehmen daher an, dass zusätzlich zu PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> weitere Prostaglandine bei der Trächtigkeitserkennung eine Rolle spielen. Daher haben wir eine neue UPLC-MS Methode für die Bestimmung von 32 Prostaglandinen etabliert, welche Prostaglandine der 1er -, der 2er- und der 3er Serie detektiert. Mit dieser Methode wurde die Prostaglandin-Sekretion *in vivo* gespülter früher boviner Embryonen (Tag 8, 10, 11, 12 und 14, je n=6 einzelne Embryonen pro Tag) in das Kulturmedium während 24-stündiger Kultur bestimmt. Dabei hat sich gezeigt, dass bis Tag 12 nach der Befruchtung hauptsächlich PGE<sub>2</sub> und Δ<sup>12</sup>-PGD<sub>2</sub> vom Embryo sekretiert werden. Danach werden Prostaglandine der F-Serie dominant (6keto-PGF<sub>1α</sub> > PGF<sub>2α</sub> > PGE<sub>2</sub>). Mit Hilfe der neuen sensitiven Methode konnten wir zeigen, dass sich während der Präimplantationsphase die Prostaglandinsekretion des Embryos dynamisch mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos ändert. Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass weit mehr PG Metabolite als die bisher bekannten PG der 2er Serie sekretiert werden, deren mögliche Funktion nun zu klären ist.



## **Sektion III**

Aus der Forschung in die Praxis

## **Integration von Praktikern und kommerziellen Betrieben in tierexperimentelle Versuchsvorhaben - Chancen und Hürden**

**Andreas Vernunft**

*Institut für Fortpflanzungsbiologie, Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf (D)*

Ein Ziel der tierexperimentellen Forschung ist es neue Erkenntnisse zum Wohle aller in die praktische Anwendung zu überführen. Die Durchführung von Feldversuchen bietet die Möglichkeit die Robustheit der Erkenntnisse unter Feldbedingungen zu prüfen, die Ergebnisse durch höhere Versuchszahlen verlässlicher zu machen, den Einfluss verschiedener Haltungsformen oder Genetiken auf die Ergebnisse zu beleuchten, aber auch Praktiker und ihre Ideen direkt bei der Entwicklung neuer Erkenntnissen zu beteiligen. Bei der Durchführung von Feldversuchen sind einige gesetzliche Vorgaben zu beachten, beziehungsweise mit der zuständigen Behörde die aktuelle Gesetzesauslegung abzustimmen. Im engeren Sinne sind dabei das Tierschutzgesetz (TierSchG), die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV), die Richtlinie 2010/63/EU und die Versuchstiermeldeverordnung zu beachten. Ferner können die Arzneimittel- und Impfstoffgesetze, Futtermittelgesetze, Lebensmittel-, Fleisch- und Milchhygienegesetze, Tierseuchengesetze und deren Verordnungen, sowie verschiedene Tierhalteverordnungen zu beachten sein.

Nach §1 des TierSchG darf niemand einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen. Vernünftige Gründe können tierärztliche Behandlungen, zootecnische und züchterische Eingriffe, Lebensmittelgewinnung sowie wissenschaftliche Versuche sein. Tierversuche im Sinne des §7 TierSchG sind Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken an Tieren (oder Föten im letzten Drittel ihrer Entwicklung), wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für diese Tiere verbunden sein können. Das schließt auch Schäden bei den Nachkommen und Leiden durch Eingriffe am Erbgut von Tieren ein. Als Tierversuche gelten auch Eingriffe oder Behandlungen, die nicht direkt Versuchszwecken dienen (Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen wie z. B. Plasma, oder Organismen wie z. B. transgene Mäuse) oder aber die zu Aus-, Fort- oder Weiterbildungszwecken vorgenommen werden. Europarechtlich sind in der Richtlinie 2010/63/EU Tierversuche als „jede invasive oder nicht invasive Verwendung eines Tieres zu Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken mit bekanntem oder unbekanntem Ausgang, oder zu Ausbildungszwecken, die bei dem Tier Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden in einem Ausmaß verursachen kann, das dem eines Kanüleneinstichs gemäß guter tierärztlicher Praxis gleichkommt oder darüber hinausgeht“ definiert. Der alleinige wissenschaftliche Zweck des Eingriffes ist bei der Definition eines Versuches also entscheidend und ist von anderen tierärztlichen oder züchterischen Zwecken abzugrenzen. Natürlich darf und muss ein Tierarzt oder Landwirt notwendige therapeutische oder zootecnische Eingriffe an seinen Patienten oder gehaltenen Tieren vornehmen und kann die dabei anfallenden Daten und Materialien sekundär für wissenschaftliche Auswertungen nutzen oder abgeben. Versuchszwecke müssen sich aus einem Grund nach §7a des TierSchG ergeben, wie z. B. der Grundlagenforschung oder der Prüfung der Wirksamkeit von Arzneimitteln.

Wer Versuche an Wirbeltieren oder Kopffüßern durchführen will, bedarf der Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die zuständige Behörde (§8, §8a TierSchG). Im TierSchG und in der TierSchVersV werden unterschiedlichste Anforderungen an die durchführenden Einrichtungen und Personen gestellt. Zudem wird nach genehmigungspflichtigen und anzeigepflichtigen Tierversuchen sowie meldepflichtigen Tötungen zu wissenschaftlichen Zwecken unterschieden. Insbesondere ist in einem Antragsverfahren bei der zuständigen Behörde der Zweck, die Planung, die Reduzierung von Versuchstieren und deren Schmerzen, Leiden oder Schäden und die ethische Vertretbarkeit in Formularen darzulegen. Alle beteiligten Personen (auch die Praktiker oder Praxisbetriebe) müssen der Behörde namentlich gemeldet werden und ihre Sachkunde der Behörde einzeln nachgewiesen werden. Als Sachkundenachweise können Berufsausbildungen, ein abgeschlossenes Studium der Human-

Zahn und Veterinärmedizin aber auch spezielle Kurse anerkannt werden. An die durchführenden Institutionen werden gesonderte Anforderungen gestellt. So muss unter anderem sichergestellt sein, dass notwendige Aufzeichnungen geführt und ausgewertet werden können, dass ein Tierschutzbeauftragter und ein Tierschutzausschuss eingesetzt und gemeldet wird, ein Versuchsleiter mit den notwendigen Kenntnissen bei der Institution angestellt ist. Außerdem muss die Versuchstierhaltung der Einrichtung nach §11 des TierSchG (in Verbindung mit der TierSchVersV und Richtlinie 2010/63/EU) von der zuständigen Behörde genehmigt sein. Die Zulassung zur Haltung von Versuchstieren nach §11 kann die Behörde auch im Rahmen von Feldversuchen von teilnehmenden landwirtschaftlichen Betrieben und anderen tierhaltenden Organisationen (Zuchtverbände, Zoo) einfordern. Meistens erfüllen die Betriebe die amtlichen Anforderungen für die Versuchstierhaltung (Aufzeichnungspflichten, sachkundiges Personal) aber bereits durch andere Vorschriften (QS, SchweinehaltehygV...). Dennoch müssen alle beteiligten Personen und Betriebe bereit sein, sich unter Umständen einer erneuten Prüfung und Zulassung durch eine weitere Behörde zu stellen. Zudem gibt es einige spezielle Anforderungen. Zum Beispiel dürfen Tierversuche zur Aus-, Fort- oder Weiterbildung nur an einer Hochschule, einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung oder einem Krankenhaus im Rahmen einer Aus-, Fort- oder Weiterbildung für Heil- oder Heilhilfsberufe oder naturwissenschaftliche Hilfsberufe durchgeführt werden (§7a TierSchG). Darunter können auch bestimmte Tätigkeiten im Rahmen der Ausbildung von tierärztlichen Fachangestellten, Besamungs- oder ET-Technikern fallen.

Über alle Tierversuche sind nach §29 der TierSchVersV Aufzeichnungen zu führen und nach der Versuchstiermeldeverordnung der Behörde zu übermitteln. Zu beachten ist z.B., dass die Aufzeichnungen von den Personen, die die Tierversuche durchgeführt haben (auch Praktiker, Techniker), und von dem Leiter des Versuchsvorhabens zu unterzeichnen sind. Werden die Aufzeichnungen elektronisch erstellt, sind sie unverzüglich nach Abschluss jedes Teilversuchs des Versuchsvorhabens auszudrucken und von dem Leiter des Versuchsvorhabens zu unterzeichnen. Aufzeichnungen zu einem Versuchsvorhaben sind fünf Jahre lang, beginnend mit dem Abschluss des Tierversuchs, aufzubewahren und der zuständigen Behörde auf Verlangen vorzulegen.

Diese grobe Darstellung zur Organisation von Feldversuchen in Zusammenarbeit mit Praxisbetrieben erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit oder Rechtsverbindlichkeit. Sie soll auch nicht vor der Durchführung wichtiger Feldversuche abschrecken, sie soll aber dafür sensibilisieren sich frühzeitig mit der Thematik, auch bei der Bearbeitung von innerbetrieblichen Fragestellungen, auseinander zu setzen. Es empfiehlt sich, im engen Kontakt mit der zuständigen Behörde und anderen beratenden Institutionen, Versuche zu planen und durchzuführen. Dieses ist notwendig um sich, durchführende Personen und mitwirkende Organisationen nicht angreifbar in dieser heiklen Thematik zu machen.

## **Nutzung des Ovum-Pick-Up Verfahrens zur Therapie von ovariellen Zysten bei der Milchkuh**

**Rebecca Lapp<sup>1</sup>, Andreas Vernunft<sup>1</sup>, Volker Röttgen<sup>1,2</sup>, Joachim M. Weitzel<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Reproductive Biology, and <sup>2</sup>Institute of Behavioural Physiology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf (D)*

Ovarielle Zysten treten mit einer Inzidenz von 6-30% im postpartalen Zeitraum der Milchkuh auf und werden in den meisten Fällen mit verschiedenen hormonellen Substanzen therapiert. Neben der hormonellen Therapie ist auch die Aspiration des Zysteninhalts eine altbekannte Methode, kommt in der heutigen Zeit allerdings nur noch wenig zum Einsatz. Das Ziel der vorliegenden Studie ist es den zusätzlichen therapeutischen Nutzen und die Entwicklung von aspirierten Zysten, bei denen herkömmliche hormonelle Therapien angewandt wurden zu beschreiben. Das Aspirationsverfahren wurde ähnlich dem Ovum-Pick-Up, transvaginal unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Im Folgenden sollen die vorläufigen Ergebnisse dieser noch nicht abgeschlossenen Untersuchung vorgestellt werden.

Im Rahmen einer routinemäßig durchgeführten zuchthygienischen Bestandsbetreuung (ab dem 45. Tag postpartum) werden Tiere selektiert, welche ovarielle Zysten mit einem Durchmesser von mindestens 20 mm und einer Wanddicke von unter 3 mm, sowie keinen Gelbkörper aufweisen. Neben der Dokumentation der Größe und Durchblutung der Zyste (Doppler, A-Mode) werden zudem alle weiteren am Ovar vorhanden Follikel bei der ultrasonografischen Untersuchung registriert. Eine vaginoskopische Untersuchung soll weiterhin Aufschluss über den Öffnungsgrad der Cervix und etwaige subklinische Entzündungen geben. Zudem werden Milchproben für eine Progesteronbestimmung genommen. Neben zwei herkömmlichen hormonellen Behandlungsgruppen (Injektion des GnRH Analogon Buserelin (GnRH-Kontrolle) oder Einsetzen einer PRID-Spirale für 7 Tage (PRID-Kontrolle) werden Zysten in zwei weiteren Gruppen zusätzlich transvaginal unter Ultraschallkontrolle aspiriert (GnRH-Aspiration, PRID-Aspiration). Die gewonnenen Zystenflüssigkeiten werden für weitere hormonelle Bestimmungen (Progesteron, Östradiol, Testosteron) aufbereitet. Zur Überprüfung des Therapieerfolgs werden die Ovarien eine Woche später per Ultraschall nachkontrolliert. Die bisher untersuchten 28 Tiere wiesen eine oder mehrere Zysten mit einem Durchmesser von  $30 \pm 7$  mm auf. Im Zuge der Nachkontrollen zeigte sich eine höhere Persistenzrate der Zysten, bei Tieren die mit einer PRID-Spirale behandelt wurden (80%), im Gegensatz zu denjenigen, die mit Buserelin behandelt wurden (GnRH-Kontrolle bisher 0%). Die Tiere der GnRH-Kontrolle zeigten zu gleichen Anteilen eine Luteinisierung der ehemaligen Zyste oder eine Gelbkörperentwicklung aus einem anderen Follikel. Bei den PRID-Kontroll-Tieren wurden dagegen keine lutealen Strukturen bei der Nachkontrolle beobachtet. Zwölf Tiere, bei denen bisher neben der PRID Behandlung, auch eine Aspiration der Zyste erfolgte (PRID-Aspiration), wiesen bei der Nachkontrolle zu 90% keine Zyste mehr auf. Bei ihnen zeigte sich eine Luteinisierung der aspirierten Zysten in mehr als der Hälfte der Fälle (60%). Zudem konnte bei zwei PRID-Aspirations-Tieren eine Gelbkörperbildung aus einem anderen Follikel beobachtet werden. Ähnlich scheint es sich bei den GnRH-Aspirations-Tieren zu verhalten. Für eine definitive Aussage fehlen allerdings noch ausreichend Tierzahlen. Interessant ist bisher, dass eine in der Erstuntersuchung detektierte Durchblutung der Zyste scheinbar keinen Einfluss auf deren spätere Luteinisierung hat, unabhängig der gewählten Therapieform. Die Auswertung der Fertilitätsparameter und der Hormonbestimmungen in der Milch sowie der Zystenflüssigkeit steht noch aus und soll nach Abschluss der Probennahmen durchgeführt werden.

Zusammenfassend weisen die vorläufigen Ergebnisse darauf hin, dass die Aspiration einer Zyste erfolgreich zu ihrer Elimination führt und unabhängig von einer parallel durchgeführten Progesteron- oder GnRH-Behandlung aus ihnen vorwiegend Gerbkörpergewebe entsteht.

## Embryonenbiopsie und Kryokonservierung in vitro produzierter boviner Embryonen – Einsatz in der Routine

Mike Diederich, Susanne Müller-Ziffer, Petra Poppe, Hanna Grothmann

MASTERRIND GmbH, ET-Station Nüchel, Loxstedt (D)

Der steigende Anteil in vitro produzierter Embryonen an der weltweit gesamt produzierten Anzahl an Embryonen macht eine Auswahl insbesondere der männlichen Embryonen vor dem Transfer notwendig. Andernfalls führen die, durch die große Anzahl an bereit zu haltenden Trägartieren, hohen Haltungskosten derselben, zu einer massiven betrieblichen Belastung. Diese Auswahl erfolgt in der Regel über die Bestimmung des gRZGs im Morulastadium. Problematisch bei in vitro erzeugten Embryonen ist jedoch, dass sie insbesondere ihre Kryokonservierbarkeit anbelangend, ihren in vivo erzeugten Gegenstücken unterlegen sind. Die mit der zum gRZG-Bestimmung einhergehende Eröffnung der Zona Pellucida reduziert die Kryokonservierbarkeit der in vitro erzeugten Embryonen weiterhin. Auf der ET-Station Nüchel erfolgt die Zellgewinnung zur gRZG-Ermittlung mittels etablierter Aspirationstechnik. Bei der anschließenden Kryokonservierung scheint vor allem der Äquilibrierungszeitraum im Kryoprotektivum ein maßgeblicher Einflussfaktor auf die Überlebensfähigkeit nach dem Auftauen zu sein. Ziel dieser Untersuchung war es, das optimale Zeitmanagement für die Kryokonservierung der biopsierten Embryonen zu finden, um dieses anschließend in die Routine zu integrieren. Für diesen Versuch wurden in einem Standard IVP-System (TCM-SOF) Embryonen aus Eizellen vom Schlachthof stammenden Ovarien produziert (Feb. 2018-Jul. 2018). Am Tag 6 der Kultur wurden insgesamt n=200 Embryonen zur Biopsie entnommen. Zusätzlich wurden n=52 Embryonen ausgewählt, die mit intakter Zona als Kontrollgruppe kryokonserviert wurden. Das Einfrieren der Embryonen der Versuchs- und der Kontrollgruppe erfolgte in 1,5M Ethylenglykol (EG) plus 0,1M Sucrose bei 0,5°C/min bis -32°C. Hierbei wurden n=28 Embryonen der Kontrollgruppe nach fünfminütiger und n=24 nach zehnminütiger Äquilibrierung kryokonserviert. 114 biopsierte Embryonen wurden nach fünf Minuten Äquilibrierung und 86 biopsierte Embryonen nach zehn Minuten Äquilibrierung eingefroren. Nach Beendigung des Einfrierprozesses lagerten die Embryonen mindestens 3 Wochen in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Embryonen erfolgte im Wasserbad bei 30°C in neun Durchgängen. Im Anschluss daran wurden die Embryonen für 48h in SOFaa kultiviert und die Reexpansionsrate nach 24h bzw. die Schlupfrate nach 48h ermittelt (s. Tabelle 1).

	<b>Kontroll-Embryonen (ohne Biopsie; n=52)</b>		<b>Biopsierte Embryonen (n=200)</b>	
Reexpansionsrate Gesamt	90,3%; ± 15,2% (n=47)		81,5%; ± 13,4% (n=163)	
Schlupfrate Gesamt	73,0%; ± 11,9% (n=38)		65,5%; ± 12,6% (n=131)	
Schlupfrate nach Äquilibrierungsdauer	5 min Äquilibrierung (n=28)	10 min Äquilibrierung (n=28)	5 min Äquilibrierung (n=114)	10 min Äquilibrierung (n=86)
	71,4%; ± 16,5% (n=20)	75%; ± 6,7% (n=18)	70,2%; ± 14,1% (n=80/114) <sup>a</sup>	59,3%; ± 6,8% (n=51/86) <sup>b</sup>

Tab. 1: Reexpansions – und Schlupfraten (a:b, p = 0,053, ungepaarter t-test)

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass biopsierte in vitro produzierte Embryonen nach einer 5-minütigen Äquilibrierung in EG tendenziell höhere Schlupfraten nach dem Auftauen und anschließender 48-stündiger Kultur aufweisen. Bei konsequenter Einhaltung der Äquilibrierungszeit im Kryoprotektivum von in vitro erzeugten, biopsierten Embryonen, ist dieses Verfahren in der Routine einer kommerziell arbeitenden ET-Station anwendbar, wobei die Äquilibrierung für fünf Minuten scheinbar zu bevorzugen ist.

## Genetic testing of *in vivo* derived and *in vitro* produced bovine embryos using blastocoele fluid as a source for DNA

Carolina Herrera<sup>1,2</sup>, Iulian Ibanescu<sup>1</sup>, Sarah Wyck\*, Fredi Janett<sup>1</sup>, Heiner Bollwein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Clinic of Reproductive Medicine, and* <sup>2</sup>*Center for Clinical Studies, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich (CH); \* Present affiliation: Swiss Genetics, Müllingen (CH)*

In cattle, Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) allows the selection of embryos carrying the desired gene associated with production or disease resistance and the selection of males or females (males for beef production, females for milk production). PGD involves obtaining a few cells from an embryo, which will then be used for PCR but also the blastocoele can be used as a source of DNA. Blastocoele fluid of human, equine and bovine embryos have been amplified by PCR to diagnose the sex of the embryos. Since the collection of blastocoele fluid is less invasive than the conventional aspiration of cells, the embryos undergoing blastocoele fluid collection might present an increased viability after freezing and thawing, when compared to embryos from which cells have been collected. Therefore, the aim of our work is to study the viability of bovine *in vitro* produced (IVP) and *in vivo* derived (IVD) embryos after blastocoele fluid collection. Bovine embryos were either produced *in vitro* from slaughterhouse oocytes or collected after artificial insemination and uterine flushing of donor cows. All blastocyst stage embryos were randomly assigned to one of three experimental groups: 1) Collapsed Embryos (CE): blastocoele fluid was collected from blastocysts 2) Biopsied Embryos (BE): 1 to 5 cells were collected from blastocysts by aspiration and 3) Intact Embryos (IE): blastocysts were left intact. After sample collection IVP embryos were vitrified, warmed and cultured *in vitro* for 48 h and IVD embryos were cryopreserved by conventional slow freezing, thawed and transferred into recipient heifers. IVP embryos showed no significant differences in the re-expansion rates after 48 h of IVC of embryos from intact vitrified-warmed (IE), biopsied vitrified-warmed (BE) or collapsed vitrified-warmed (CE) (87.2%, 95.2% and 95.5 % respectively; P>0.05). After vitrified-warmed embryos were cultured for 24 h, the hatching rate of CE was significantly higher when compared to IE and BE (77.7%, 18.1% and 45.2 % respectively; P<0.05). The pregnancy rates obtained after transfer of intact, collapsed or biopsied embryos are presented in the following table.

Experimental Group		n	Pregnancy rate (%)
Intact	Fresh	45	27/45 (60.0)
Intact	Frozen-thawed	0	-
Biopsied	Fresh	4	1/4 (25.0)
Biopsied	Frozen-thawed	5	3/5 (60.0)
Collapsed	Fresh	4	2/4 (50.0)
Collapsed	Frozen-thawed	9	5/9 (55.5)

In conclusion, IVP embryos undergoing blastocoele fluid collection presented an increased viability after vitrification warming and *in vitro* culture, when compared to embryos from which cells have been aspirated or even to intact embryos. Although the number of IVD embryos transferred was low, the preliminary pregnancy rates indicate that collapsing bovine blastocysts does not affect their viability.

## Versuche zur Flüssigkonservierung in vivo gewonnener Rinderembryonen unter Praxisbedingungen

Elena Sosnina<sup>1</sup>, Hans-Peter Nohner<sup>1</sup>, Christine Wrenzycki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V., Neustadt a.d. Aisch (D); <sup>2</sup>Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen (D)

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. Vorangegangene neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass in vivo produzierte, nicht-bioptierte Embryonen, für sieben Tage flüssigkonserviert, ähnliche Trächtigkeitsraten lieferten wie frischtransferierte (flüssigkonserviert: 75% vs. frischtransferiert 77%; Ideta et al. 2013). Ziel unseres Projektes ist es, eine zuverlässige mehrtägige Flüssigkonservierungsmethode für in vivo erzeugte Rinderembryonen als Alternative zur Tiefgefrierkonservierung zu entwickeln. Diese Methode würde den sowohl zeitlichen als auch instrumentellen Aufwand der Kryokonservierung drastisch reduzieren. Außerdem wäre der (internationale) Austausch von Zuchtmaterial durch den Verzicht auf flüssigen Stickstoff erleichtert.

Für die Versuche werden nach Superovulation gewonnene in vivo Embryonen verwendet. Der Start der Superovulation erfolgt mit Pluset<sup>®</sup> zwischen Tag 8 und 13 (Tag 0  $\hat{=}$  Östrus). Nach viertägiger Behandlung werden die Tiere dreimal besamt. An Tag 7 nach der ersten Besamung erfolgt die Spülung. Die gewonnenen transfertauglichen Embryonen werden zufällig drei Gruppen zugeordnet; Gruppe 1: Embryonen für den Frischtransfer; Gruppe 2: Embryonen für die konventionelle Kryokonservierung, Transfer nach Auftauen; Gruppe 3: Embryonen für die Flüssigkonservierung, Transfer nach Erwärmen. Die Flüssigkonservierung der Embryonen erfolgt in TCM-Air mit 25% FBS für 48 bis 72 Stunden in einem Kühlschrank bei 4°C. Am Tag des Transfers werden die Embryonen mit PBS plus 20% FBS ausverdünnung und bei 19 bis 23°C transportiert. Danach erfolgt die Übertragung auf die Empfängertiere. Die folgende Tabelle zeigt die Zwischenergebnisse in den verschiedenen Gruppen.

Spender-tier	Transferierte Entwicklungsstadium (Anzahl x IETS-Code)	TR nach Frisch-transfer	Transferierte Entwicklungsstadium (Anzahl x IETS-Code)	TR nach TG-Transfer	Transferierte Entwicklungsstadium (Anzahl x IETS-Code)	TR nach FK-Transfer (Transfer nach 48 h)
1	3 x 4-1 1 x 4-3	2/4	2 x 4-1 1 x 5-1	3/3	3 x 4-1	3/3
2	2 x 6-1 1 x 5-2	3/3	---	---	2 x 6-1 1 x 4-1	3/3

TR: Trächtigkeitsrate; TG: Tiefgefrierung; FK: Flüssigkonservierung;  
IETS-Code: 4,5,6 (Morula, frühe Blastozyste, Blastozyste);  
-1,-2,-3 (exzellente oder gute, mittlere, geringe Qualität)

Die ersten Trächtigkeitsergebnisse nach Transfer flüssigkonservierter Embryonen sind vielversprechend. Weitere Untersuchungen werden durchgeführt. Sollten sich die Ergebnisse bestätigen, könnte diese Kurzzeitkonservierungsmethode eine gute Ergänzung für den Embryotransfer in der Praxis darstellen.

Wir danken der Dr. Dr. Karl-Eibl-Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

## **Sektion IV**

### **In vitro Produktion von Embryonen**



## **Genome Editing beim Rind: Generierung eines Hornlos-Phänotyps durch Einsatz von DNA-Nukleasen**

**Felix Schuster<sup>1</sup>, Patrick Aldag<sup>1</sup>, Antje Frenzel<sup>1</sup>, Petra Hassel<sup>1</sup>, Maren Ziegler<sup>1</sup>, Andrea Lucas-Hahn<sup>1</sup>, Heiner Niemann<sup>2</sup>, Björn Petersen<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee (D); <sup>2</sup>TWINCORE, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover (D)

Die Haltung horntragender Rinder ist mit beträchtlichen Verletzungsrisiken für Tier und Mensch verbunden. Daher werden Kälber möglichst früh enthornt. Diese Prozedur ist bis zu einem Alter von sechs Wochen ohne Betäubung legal und mit erheblichem Stress und Schmerzen für die Kälber verbunden. Im Sinne des Tierschutzes wurde das gemeinsame Ziel zur verstärkten Zucht auf Hornlosigkeit vereinbart („Düsseldorfer Erklärung zur verstärkten Zucht auf Hornlosigkeit in der Rinderhaltung“, 2012). Die genetische Grundlage für die Hornlosigkeit bei den unterschiedlichen Rinderrassen wurde weitestgehend aufgedeckt (Medugorac, Seichter et al. 2012). Bei der in Fleischrassen verbreiteten *Keltischen Mutation* handelt es sich um eine 208 bp Insertions-Deletions-Mutation, welche autosomal dominant vererbt wird.

Mit Hilfe des CRISPR/Cas12a (Cpf1) Systems wurde die *Keltische Mutation* in das Genom von Zellen horntragender Holstein-Friesian und Braunvieh Rinder integriert (*Knock-In*) um hornlose Nachkommen mittels somatischen Kerntransfer zu generieren. In einem weiteren Versuch wurde unter Verwendung des CRISPR/Cas9 Systems eine neuartige Deletions-Mutation im *Horned-Locus* hervorgerufen (*Knock-Out*) um zu überprüfen, ob eine beliebige Mutation in diesem Genombereich ausreicht, um Hornlosigkeit zu verursachen. Positive Zellklone wurden weiter propagiert und dienten als Donorzellen für den somatischen Kerntransfer (SCNT).

Erste *in vitro* Versuche zeigten, dass Entwicklungsraten genomeditierter Embryonen (Blastozystenrate: 23,68% (9/38)) mit denen der Wildtypkontrollen (Blastozystenrate: 20,29% (14/69)) vergleichbar sind. Produzierten Embryonen werden in Trägartiere transferiert um lebende Nachkommen zu generieren. Die jeweils erste Trächtigkeit wird an Tag 90 unterbrochen um die Hornanlage der Föten histologisch zu untersuchen. Allais-Bonnet et al. (2013) zeigten, dass bereits in diesem Fötalstadium Unterschiede zwischen hornlosen und horntragenden Nachkommen festzustellen sind. Alle darauffolgenden Trächtigkeiten werden ausgetragen.

Wir danken dem Förderverein für Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die freundliche Unterstützung des Projektes.

## **Einfluss von Glyphosat auf die In-vitro-Maturation boviner Kumulus-Oozyten-Komplexe**

**Nadja Blad-Stahl<sup>1,2</sup>, Julia Beranek<sup>2</sup>, Sybille Mazurek<sup>2</sup>, Christine Wrenzycki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, und <sup>2</sup>Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen (D)

Seit über 40 Jahren wird Glyphosat (Gly) weltweit vom privaten Gartenbau bis hin zur großflächigen und intensiven Nutzung in der Landwirtschaft als nicht-selektives Totalherbizid verwendet. Eines der bekanntesten Glyphosat-Produkte ist die Formulierung Roundup<sup>®</sup> der Firma Monsanto (Creve Coeur, Missouri, USA). Das Organophosphoherbizid Glyphosat ist ein Abkömmling der Aminosäure Glycin, welches über die grünen Pflanzenteile aufgenommen wird und durch eine Enzym-Blockade zum Absterben der Pflanze führt (Mesnage et al. 2015). Es ist bis heute unklar, ob und in welchem Ausmaß der weltweit massive Einsatz von Glyphosat die Gesundheit von Mensch und Tier beeinflusst. Rückstände von Glyphosat konnten in umfangreichen Untersuchungen sowohl im Boden und Grundwasser als auch im menschlichen und tierischen Organismus nachgewiesen werden (Battaglin et al. 2014). In einer Studie konnte der Einfluss von 10 und 300 µg/ml Glyphosat aus Roundup<sup>®</sup> (R-Gly) auf bovine Granulosazellproliferation und die Steroidproduktion von Estradiol (E2) und Progesteron (P4) nachgewiesen werden (Perego et al. 2017). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gly als endokriner Disruptor agieren kann. Dennoch wird die Diskussion rund um die Umwelt- und Gesundheitsverträglichkeit von Glyphosat kontrovers geführt, so dass Ende November 2017 die EU-Kommission entschieden hat, den Einsatz von Glyphosat für weitere fünf Jahre zu genehmigen.

Der Zweck dieser Studie ist es, festzustellen, welchen Einfluss Glyphosat allein (Gly) oder in Formulierung mit Roundup<sup>®</sup> (R-Gly) auf die Maturation boviner Oozyten in vitro hat. Für die Untersuchung werden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus den Ovarien geschlachteter Kühe verwendet. Die Maturation erfolgt in einem ölfreien System in einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio one, Kremsmünster, Österreich), welche jeweils mit Maturationsmedium (MM) und 30 KOK pro Well befüllt werden. Dem Maturationsmedium werden 0 (Kontrolle), 30 und 300 µg/ml Gly oder R-Gly zugesetzt. Nach einer Reifungsdauer von 24 Stunden erfolgt mittels der Maturationsfärbung die Bestimmung der Reifungsraten. Das MM wird für die Bestimmung der Steroidhormone P4 und E2 mittels RIA eingefroren.

Die ersten vorläufigen Ergebnisse weisen keine Unterschiede in den Maturationsraten auf (Kontrolle: 93,2% vs. 30 µg/ml R-Gly: 93,6% vs. 300 µg/ml R-Gly: 94,2%). Die Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen aus der Gruppe 300 µg/ml R-Gly liegen bei 37,2% und 4,7%, während die Embryonen aus der Kontrollgruppe eine Teilungs- und Entwicklungsrate von 78,3% und 33,9% erreichen und die Embryonen aus der Gruppe 30 µg/ml R-Gly 80,3% und 29,5% erzielen. Die Messung der Steroidhormone zeigt eine signifikant höhere Produktion von P4 durch die KOK mit dem Zusatz von 300 µg/ml R-Gly im Vergleich zur Kontrolle ( $82,7 \pm 19,0$  nmol/L vs.  $44,7 \pm 21,0$  nmol/L). Die Produktion von E2 ist ebenfalls erhöht, allerdings nicht signifikant ( $541,0 \pm 165,6$  pmol/L vs.  $401,6 \pm 184,9$  pmol/L). Weitere Messungen der Steroidhormone und verschiedener Stoffwechselmetabolite im MM der verschiedenen Gruppen, sowie die Untersuchung über den Einfluss von Glyphosat allein auf die Maturation boviner KOK folgen.

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass durch eine supraphysiologische R-Gly-Konzentration die Progesteron-Synthese der bovinen KOK beeinflusst werden kann.

## Effects of melatonin on allocation of inner cell mass (ICM) and trophectoderm cells (TE) in *in vitro*-derived bovine blastocysts

Juan Carlos Gutiérrez-Añez<sup>1</sup>, Patrick Aldag<sup>2</sup>, Andrea Lucas-Hahn<sup>2</sup>, Heiner Niemann<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medical Surgical Department, College of Veterinary Medicine, University of Zulia, Maracaibo, (YV); <sup>2</sup>Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee (D);

<sup>3</sup>Hannover Medical School, Hannover (D)

*In vitro*-derived embryos are frequently less competent than their *in vivo* derived counterparts. This reduced viability might be due to an aberrant allocation of cells to one of the two emerging cell populations of the blastocyst, e.g. the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm (TE) cells. Both types of cells are essential for embryo development and survival. The ICM cells contribute to the formation of the embryo proper, while TE cells are important for attachment to the uterine endometrium, the formation of the placenta and ultimately pregnancy establishment. It has been shown that *in vitro*-derived and somatic cell nuclear transfer (SCNT) derived embryos have fewer TE cells than *in vivo*-derived embryos, which could be related to insufficient placentation and concomitantly elevated embryonic/fetal losses (Koo et al., 2002). Oxidative stress has been identified to have detrimental effects on embryo development *in vitro* (IVF). The use of melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger could improve developmental competence of *in vitro*-derived embryos. The present study investigated the effects of melatonin on allocation of ICM and TE cells of *in vitro*-derived bovine embryos. A total of 97 embryos (Day 8, 68 expanded and 29 hatching blastocysts), produced *in vitro* in the presence or absence of two concentrations of melatonin (MT) [0.01 nM: n=25 (17 expanded and 8 hatching blastocysts); and 1.0 nM: n=21 (14 expanded and 7 hatching blastocysts)], were differentially stained to determine the number of ICM and TE cells. As melatonin has to be dissolved in ethanol, a “sham” group containing ethanol (0.01% final concentration) [(ETOH; n=27 (20 expanded and 7 hatching blastocysts)] and a standard control group [(Control: without any supplements; n=24 (17 expanded and 7 hatching blastocysts)] were also included in the experimental setting. A modified differential staining technique (Thouas, 2001) was applied and cells were counted via fluorescence microscopy (470-490 nm excitation filter) (Olympus BX60F, Tokyo, Japan) at 400-fold magnifications. The chromatin in nuclei of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) cells was stained and visualized by red/pink or blue color, respectively. Data were statistically analyzed using the SAS/STAT<sup>®</sup> software (SAS, version 9.3) with the general linear model (PROC GLM). Treatment and type of embryo (expanded and hatching blastocysts) and their interactions were considered in the model. Significant differences were defined at  $p < 0.05$ . The number of TE cells was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the 0.01 nM and 1.0 nM groups compared to the control and ETOH groups ( $101.3 \pm 11.8$  and  $101.6 \pm 8.6$  vs.  $86.5 \pm 12.2$  and  $83.6 \pm 12.2$ , respectively). No differences ( $p > 0.05$ ) were observed in the number of TE cells between sham controls and controls, as well as between both melatonin groups. On the other hand, there were no differences ( $p > 0.05$ ) regarding the number of ICM cells between the different experimental groups (Control:  $43.8 \pm 6.9$ ; ETOH:  $39.0 \pm 6.9$ ; 0.01 nM:  $42.0 \pm 4.9$  and 1.0 nM:  $46.1 \pm 6.7$ ). Additionally, supplementation of the media with melatonin at 1.0 nM and 0.01 nM increased ( $p = 0.05$ ) total cell number compared with control and ethanol groups ( $147.3 \pm 14.6$  and  $143.7 \pm 10.7$  vs.  $130.3 \pm 15.1$  and  $122.5 \pm 15.1$ , respectively). No differences ( $p > 0.05$ ) were found on the total cell number between the control and the ETOH group, neither between both concentrations of melatonin. In conclusion, these data indicate that the presence of melatonin during *in vitro* embryo production stimulates allocation of cells to the trophectoderm (TE), and may increase the total number of embryonic cells. The physiological importance of this finding warrants further study and could have an important implication to reduce the early embryonic/fetal losses after *in vitro* embryo production.

## **Einfluss verschiedener Lichtquellen auf die Entwicklungskapazität boviner Eizellen und in vitro produzierter Embryonen**

**Andres Gonzalez<sup>1</sup>, Florian Dobener<sup>2</sup>, Sangam Chatterjee<sup>2</sup>, Christine Wrenzycki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin; Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, und* <sup>2</sup>*AG Spektroskopie und Optik, Physikalisches Institut I, Mathematik und Informatik, Physik und Geographie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen (D)*

Eizellen und Embryonen von Säugetiere entwickeln sich in einem geschützten Umfeld im weiblichen Genitaltrakt. Obwohl sich die Techniken für das Kultivieren in vitro erzeugter Embryonen in den vergangenen drei Jahrzehnten verbessert haben, ist es immer noch unwahrscheinlich, dass die heute angewandten Kulturbedingungen die Vorteile der Embryonalentwicklung im weiblichen Trakt ersetzen können. Suboptimale Zustände stören nicht nur die Genexpressionsmuster präimplantatorischer Embryonen, sie beeinflussen auch deren Entwicklung nach der Geburt und sogar das Wachstum und die Physiologie des Nachkommens. Während der assistierten Reproduktionstechniken wie zum Beispiel bei der In-vitro-Produktion (IVP), beim Klonen und bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion verbleiben Eizellen und Embryonen in künstlichen Medien und sind gelegentlich Licht ausgesetzt, bevor die transfertauglichen Stadien in Empfängertiere übertragen werden.

Sichtbares Licht gilt als ein Stressfaktor während der IVP (Lane und Gardner, 2005). Die Auswirkungen des sichtbaren Lichts können reduziert werden, indem Lichtfilter verschiedener Spektren Verwendung finden, wie zum Beispiel ein Filter für blaues Licht (Ottonen et al., 2007). Nicht nur die Wellenlänge, sondern auch die Intensität der Lichtstrahlung haben eine Steigung der Apoptosenindex der inneren Zellmasse bei in vitro kultivierten Hamsterembryonen hervorgerufen (Oh et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde während der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen ein grüner Lichtfilter zur Einstellung des Lichts im Stereomikroskop verwendet. Die Ergebnisse zeigten eine Schutzwirkung des Filters durch die intrazytoplasmatische Reduktion des Stressindikatorproteins Hsp 72/73 (Korhonen et al., 2008).

Ziel unserer Untersuchungen ist es, die Auswirkung verschiedener Lichtquellen auf die Entwicklungskapazität boviner Oozyten und Embryonen in vitro zu untersuchen. Dafür werden drei unterschiedliche Versuchsgruppen erstellt; Gruppe 1: weder künstliches (Lampen) noch Tageslicht, aber gefiltertes Stereomiskroskoplicht, Gruppe 2: künstliches Licht (Lampen) ohne Tageslicht und Gruppe 3: künstliches (Lampen) und Tageslicht wie es üblicherweise im Labor vorkommt.

Die vorläufigen Ergebnisse zeigen Unterschiede sowohl in den Teilungs- als auch in den Entwicklungsraten (Gruppe 1: 76%, 33%; Gruppe 2: 71%, 29%; Gruppe 3: 67%, 24%). Genexpressionsanalysen von Transkripten, die in Zusammenhang mit Zellstress stehen (*HSPA1A*, *BCL2L1*, *BAX*, *SOD1*, *SLC2A3*) und eine Differential-Färbung (innere Zellmasse/ Trophektoderm) von Tag 7-8 - Blastozysten befinden sich in Vorbereitung.

## **Quantifizierung und Charakterisierung des Energiestoffwechsels bei Eizellen und Embryonen des Rindes mittels Seahorse Device**

**Ilka Haase, Franca Rings, Dawit Tesfaye, Karl Schellander, Michael Hölker**

*Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn, Bonn (D)*

Obwohl die In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen eine etablierte Technik darstellt, bestehen immer noch Unterschiede zwischen in vivo und in vitro entwickelten Rinderembryonen. Dies spiegelt sich im Vergleich zur In-vivo-Entwicklung sowohl in den erreichten Entwicklungsraten als auch in der Qualität der in vitro produzierten Rinderblastozysten wieder. Obwohl das Auftreten des Large-Offspring-Syndroms durch Optimierung der Kulturmedien minimiert werden konnte, unterscheiden sich In vitro produzierte Rinderembryonen immer noch von In-vivo-produzierten Embryonen durch erhöhte Lipidgehalte sowie einer verringerten Tiefgefriertauglichkeit bei Verwendung konventioneller Tiefgefrierverfahren. Unterschiede hinsichtlich des Lipidgehaltes zwischen in vitro und in vivo generierter Embryonen, bzw. zwischen Embryonen welche in Gegenwart von Serum oder Bovinem Serum Albumin (BSA) kultiviert worden waren, deuten zudem auf Unterschiede im embryonalen Energiestoffwechsel hin. Zur Bestimmung der Ansäuerung des Messmediums (ECAR, extracellular acidification rate) als Maßzahl für den Umfang der Glykolyse, bzw. des Sauerstoffverbrauchs (OCR, Oxygen consumption rate) als Maßzahl für den Umfang der Oxidativen Phosphorylierung, wurde kürzlich das Seahorse XF vorgestellt, welches Messungen in Echtzeit an Zellkulturen erlaubt. Darüber hinaus erlaubt dieses Messgerät die zeitlich definierte Zugabe von Chemikalien zur Aktivierung, bzw. zur Hemmung der Zellatmung wodurch im Rahmen eines MitoStressTests zusätzlich die Messgrößen „ATP-gekoppelte Respiration“, „Maximale Respiration“ und „Reserverespiration“ bestimmt werden können.

Da es bisher keine Berichte zum Einsatz des Seahorse XF Geräts zur Quantifizierung des Energiestoffwechsels an Rinderembryonen vorliegen, war das Ziel der vorliegenden Studie die Etablierung einer Messmethode zur Bestimmung des Energiestoffwechsels von Rinderembryonen mit dem Seahorse Device.

Hierzu wurden in vitro fertilisierte Rindereizellen in SOFaa-Medium entweder unter Zusatz von 0,3% BSA (fatty acid free) oder 10% ÖCS (östrischem Rinderserum) für 7 Tage kultiviert (39°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Für jede Behandlung wurden dann 8 Pools zu je 10 Blastozysten mit dem Seahorse XF analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Zusatz von ÖCS vs. BSA sowohl zu einer signifikanten (p<0,05) Erhöhung der ECAR (2,73 vs. 0,98 mpH/min) als auch der OCR (16,3 vs. 7,8 pmol/min) führte. Darüber hinaus zeigten unsere Studien nach Anwendung des MitoStressTests, dass der Zusatz von ÖCS nicht nur zu einer Erhöhung der basalen Respiration sondern auch zu einer Erhöhung der ATP-gekoppelten Respiration (9,49 vs. 4,73 pmol/min), zu einer Erhöhung der maximalen Respiration (14,35 vs. 7,22 pmol/min) und zu einer Erhöhung der Reserverespiration (3,25 vs. 2,035) führt.

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums einen sehr großen Einfluss auf den Energiestoffwechsel von Rinderembryonen ausübt. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass das Seahorse FX geeignet ist den embryonalen Stoffwechsel anhand eines Pools von 10 Blastozysten zu analysieren. Weitere Studien in unserem Hause dienen zur Zeit der Optimierung des Messprotokolls um zukünftig den Energiestoffwechsel individueller Blastozysten und/oder Eizellen zu bestimmen. Dies könnte dann eventuell zur Qualitätsbestimmung einzelner Embryonen vor dem Transfer genutzt werden.

# Notizen