

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 Physiologische Grundlagen	3
2.1.1 Oozyten und Follikelentwicklung	3
2.1.2 Physiologie der Befruchtung	7
2.2 In-vitro-Produktion boviner Embryonen	9
2.2.1 In-vitro-Maturation	10
2.2.2 In-vitro-Fertilisation	11
2.2.3 In-vitro-Kultivierung	12
2.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion	14
2.3.1 Grundlagen und Geschichte der bovinen ICSI	14
2.3.2 Vorteile der ICSI	18
2.3.3 ICSI im Speziesvergleich	18
2.4 Vorbehandlungen der Spermien für die ICSI beim Rind	19
2.5 Parthenogenese	20
2.6 Artifizielle Aktivierung	22
2.6.1 Chemische Aktivierungssubstanzen	23
2.6.2 Kombinierte Verwendung chemischer Aktivierungssubstanzen	26
2.6.2.1 Diploide Aktivierungsprotokolle	26
2.6.2.2 Haploide Aktivierungsprotokolle	27
2.6.3 Chemische Aktivierungsprotokolle boviner Oozyten nach der ICSI	28
2.6.3.1 Parthenogenetische Aktivierungsprotokolle	29
2.6.4 Sham-Injektion	33
2.7 Erzeugung von Nachkommen mit vorbestimmtem Geschlecht	35
2.7.1 Sexen von Spermien	35
2.7.2 Einsatz gesexten Spermias in der IVF	37

2.7.3 Einsatz gesexten Spermas in der ICSI.....	38
2.8 Spezielle Problemstellung bei der ICSI beim Rind.....	38
2.8.1 Vorkernfärbung in der ICSI	39
2.8.2 Nachweis der Mitochondrien im Spermienmittelstück.....	43
2.8.3 Geschlechtsverteilung der Embryonen nach der ICSI	44
2.8.4 Expression der mRNA in präimplantatorischen Embryonen.....	44
2.8.5 Ausgewählte Transkripte im Rahmen dieser Arbeit	48
2.8.5.1 Neuronatin (NNAT)	48
2.8.5.2 Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	49
2.8.5.3 DNA-Methyltransferasen (DNMT).....	50
2.8.5.4 DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1).....	51
2.8.5.5 DNA-Methyltransferase 3a (DNMT3a).....	51
2.8.5.6 Insulin-like-growth factor Receptor (IGF2R)	53
2.8.5.7 BCL2L1 und BAX	54
2.1 Ziel dieser Arbeit.....	56
3 Material und Methoden	58
3.1 In-vitro-Produktion boviner Embryonen.....	58
3.2 Transport und Aufbereitung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	58
3.3 Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe.....	59
3.4 In-vitro-Maturation.....	61
3.5 Aufbereitung der Eizellen für die ICSI	61
3.6 Vorbereitung der Schalen für die ICSI.....	62
3.7 Vorbereitung des MitoTracker Green FM®	63
3.8 Aufbereitung der Spermien	63
3.9 Aufbereitung des Spermas mit dem MitoTracker	64
3.10 Vorbereiten des Mikromanipulators.....	64
3.11 In-vitro-Fertilisation.....	65

3.11.1 Durchführung einer ICSI.....	65
3.11.2 Sham-Injektion	67
3.11.3 Chemische Aktivierung.....	67
3.11.4 Ko- Kultivierung	67
3.11.5 Aufbereitung des Spermas für die Ko-Kultivierung	67
3.11.6 Chemische Aktivierung der Eizellen.....	68
3.12 In-vitro-Kultivierung.....	69
3.12.1 Oozyten der ICSI-, Sham-Gruppe.....	69
3.12.2 Oozyten der IVF Gruppe.....	69
3.13 Untersuchungen an den Embryonen	69
3.14 Kontrollen.....	70
3.15 Färbung der Vorkerne	70
3.15.1 Beurteilung der Befruchtung durch Färbung mit Hoechst 33343	70
3.15.1.1 Beurteilung der Befruchtung nach der Färbung mit Hoechst 33343 und MitoTracker Green FM®	73
3.16 Teilungs- und Entwicklungsraten.....	74
3.17 Messenger-RNA-Analyse zur Darstellung entwicklungsrelevanter Gentranskripte in bovinen präimplantatorischen Embryonen	74
3.18 Isolierung der mRNA	74
3.18.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion	75
3.18.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	76
3.19 Geschlechtsbestimmung der Embryonen mittels PCR.....	79
3.20 Statistische Auswertung	82
3.21 Versuchsaufbau	83
4 Ergebnisse	86
4.1 Erstellung der In-vitro-Embryonen	86
4.2 Ermittlung der Reifungs-, Teilungs- und Entwicklungsraten	86

4.2.1 Reifungs-, Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen („diploid“)	87
4.2.2 Reifungs-, Teilungs- und Entwicklungsraten „haploid“ aktivierter Embryonen	89
4.2.2.1 Vorversuch zur Medienauswahl.....	89
4.2.2.2 Vergleich der „haploid“ aktivierten Gruppen und der Laborkontrolle	91
4.2.2.3 Vergleich der „haploid“ und der „diploid“ aktivierten Gruppen inklusive der Laborkontrolle.....	94
4.2.2.4 Vergleich der Teilungs- und Entwicklungsraten der ICSI mit gesextem Sperma	95
4.2.2.5 Vergleich der Teilungs- und Entwicklungsraten mit gesextem und ungesextem Sperma	97
4.3 Ergebnisse zur Bestimmung der Vorkernentwicklung.....	98
4.3.1 Vorkernausbildung: Nachweis durch Färbung mit Hoechst 33342	98
4.3.2 Vorkernausbildung: Nachweis durch Färbung mit Hoechst 33342 und dem MitoTracker Green FM®	101
4.4 Geschlechtsverteilung in den Embryonen unterschiedlicher Herkunft.....	103
4.5 Darstellung der embryonalen mRNA-Expression der verschiedenen entwicklungsrelevanten Gentranskripte	105
4.5.1 DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1).....	105
4.5.2 DNA-Methyltransferase 3 (DNMT3).....	106
4.5.3 Insulin-like Growth Factor2-Rezeptor (IGF2R)	106
4.5.4 Neuronatin (NNAT)	109
4.5.5 G6PD (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).....	109
4.5.6 BCL-2-Like-Protein 1 (BCL2L1)	111
4.5.7 BCL-2-assoziiertes X Protein (BAX)	111
5 Diskussion	113
5.1 Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen der diploid aktivierten Gruppen	114
5.2 Teilungs- und Entwicklungsraten haploid aktivierter Gruppen	115
5.3 Teilungs- und Entwicklungsraten nach der ICSI mit gesextem Sperma.....	116
5.4 Qualitätsbeurteilung der Embryonen auf morphologischer Ebene	118

5.5 Qualitätsbeurteilung der Embryonen auf molekularer Ebene	120
5.6 Geschlechtsverteilung	123
6 Schlussfolgerung	125
7 Zusammenfassung	126
8 Summary	131
9 Verzeichnisse	135
9.1 Abkürzungsverzeichnis	135
9.2 Tabellenverzeichnis	141
9.3 Abbildungsverzeichnis	144
10 Anhang	147
10.1 Einzeldaten	147
10.2 Medien IVP	147
10.3 Medien für die chemische Aktivierung	155
10.4 Medien für die Färbung mit MitoTracker Green FM® und Hoechst 33342	156
10.5 Medien für die PCR	157
11 Literaturverzeichnis	159