



**Einfluss einer
Spermien-Präinkubation
vor der In-vitro-Fertilisation
auf die Entwicklung
boviner Embryonen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ann-Selina Fries

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

© 2025 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen

Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-761-7

1. Auflage 2025

Verlag:

DVG Service GmbH

An der Alten Post 2

35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0

info@dvg.de

www.dvg.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde,
Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

**Einfluss einer Spermien-Präinkubation vor der In-vitro-Fertilisation
auf die Entwicklung boviner Embryonen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Ann-Selina Fries

Tierärztin aus Bergisch-Gladbach

Gießen 2025

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

1. Gutachterin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

2. Gutachterin: Prof. Dr. Stephanie Krämer

Prüferin: PD Dr. Marlene Sickinger

Tag der Disputation: 19.12.2024

Für Hanna und Ralf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	3
2.1	In-vitro-Produktion boviner Embryonen	3
2.2	Fertilisation	4
2.2.1	Fertilisation in vivo	4
2.2.2	Fertilisation in vitro	7
2.3	Befruchtungsfähige Spermien	9
2.3.1	Kapazitation in vivo	9
2.3.2	Kapazitation in vitro	11
2.3.2.1	Einsatz Heparin	13
2.3.2.2	Prä-Inkubation Spermien	14
2.3.2.3	Nachweisverfahren der Kapazitation	15
2.4	Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses	18
3	Material und Methoden	24
3.1	In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen	24
3.1.1	Herkunft und Transport der Ovarien	24
3.1.2	Gewinnung und Selektion Kumulus-Oozyten-Komplexe	24
3.1.3	In-vitro-Maturation	25
3.1.4	In-vitro-Fertilisation	26
3.1.5	In-vitro-Kultivierung	27
3.2	Spermienfärbung	27
3.2.1	Kapazitationsfärbung (Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Assay)	28
3.2.2	Vital-Färbung (Eosin B-Färbung)	29
3.3	Vorkernfärbung der Oozyten	30
3.4	Erhebung der Teilungs- und Entwicklungsraten	31
3.5	Lebend-Tot-Färbung der Embryonen	32
3.6	Geschlechtsbestimmung via Polymerase-Kettenreaktion (Sexing-PCR)	33
3.7	Statistische Auswertung	35
3.8	Versuchsaufbau	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Erstellung der in vitro produzierten Embryonen	38
4.2	Ergebnisse der Spermienfärbungen und Nativpräparate	38
4.3	Auswertung der Vorkernfärbung	39
4.4	Ermittlung der Teilungs- und Entwicklungsraten	40
4.5	Resultate der Lebend-Tot-Färbung	42
4.6	Erhebung des Geschlechterverhältnisses der in vitro produzierten Embryonen	43

5	Diskussion	45
5.1	Vorkernfärbung	46
5.2	Teilungs- und Entwicklungsraten.....	47
5.3	Lebend-Tot-Färbung	50
5.4	Geschlechterverhältnis	51
5.5	Schlussfolgerung	54
6	Zusammenfassung	56
7	Summary	59
8	Anhang	62
8.1	Einzeldaten der In-vitro-Produktion.....	62
8.2	Einzeldaten der Lebend-Tot-Färbung.....	68
8.3	Einzeldaten der Sexing-PCR	69
8.4	Medien IVP	70
8.5	Medien Färbungen.....	76
8.6	Labormaterial und -Geräte	78
9	Verzeichnisse	80
9.1	Abkürzungsverzeichnis	80
9.2	Abbildungsverzeichnis	83
9.3	Tabellenverzeichnis.....	84
10	Literaturverzeichnis	86

1 Einleitung

Die Rinderzucht nimmt eine große Rolle in der tierhaltenden Landwirtschaft ein, vor allem um die nächsten Generationen gesunder, lebensmittelliefernder Tiere zu erbringen. Zumeist wird dabei auf die instrumentelle oder künstliche Besamung (KB) gesetzt, mit 3,64 Millionen Erstbesamungen 2022 in Deutschland (Rinder- und Schweineproduktion in Deutschland 2022, BRS, Ausgabe 2023). Davon wurden 5,8 % mit gesextem Sperma durchgeführt, um mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit Kälber mit dem jeweils erwünschten Geschlecht zu erhalten.

Um je züchterisch wertvollem Rind mehr Nachkommen als mit aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten zu erhalten und das Generationenintervall zu verkürzen, können Embryonen erzeugt werden. Entweder *in vivo* nach hormoneller Superstimulation, KB und Spülung mehrerer Embryonalstadien (multiple ovulation embryo transfer, MOET) oder durch die Verarbeitung von Eizellen des Zuchttieres und Produktion von Embryonen *in vitro* (IVP). Die Eizellen hierfür können vom lebenden Spendertier via Ovum-Pick-Up (OPU) ultraschallgestützt aus den Ovarien transvaginal punktiert oder mittels Ovariektomie gewonnen werden. Alternativ können die Eizellen aus den Ovarien geschlachteter Tiere selektiert werden, diese Methode wird häufig für Forschungszwecke genutzt, um möglichst viele Eizellen einsetzen zu können.

Die Erzeugung von Rinder-Embryonen *in vivo* wie *in vitro* wird weltweit zunehmend eingesetzt, vor 2016 überwiegend *in vivo*, seit 2017 dominieren die *in vitro* erzeugten Embryonen international. In 2022 wurden von über zwei Millionen insgesamt produzierten, transfertauglichen Embryonen 80 % *in vitro* erzeugt (PERRY, 2016; VIANA, 2018, 2023). In Europa wurden im selben Jahr zwischen 8 und 18 % der Spülungen und OPU-IVP-Durchgänge mit gesextem Sperma durchgeführt (QUINTON, 2023).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden die in der IVP eingesetzten Methoden und Protokolle stetig verbessert und weiterentwickelt, um möglichst viele vitale und transfertaugliche Embryonen in Relation zu den eingesetzten Eizellen zu erzeugen. Dennoch sind *in vitro* produzierte Embryonen weiterhin den *in vivo* erhaltenen Embryonen unterlegen, da sie sich morphologisch, in der Zellzahl und Entwicklungsrate, der Expression entwicklungsrelevanter Gentranskripte, der Tauglichkeit bezüglich Kryokonservierung und der Trächtigkeitsrate nach Transfer auf ein Empfängertier unterscheiden (WRENZYCKI et al., 1998; RIZOS et al., 2002; LONERGAN et al., 2006; WRENZYCKI et al., 2007; EALY et al., 2019).

Damit Spermien in der In-vitro-Fertilisation (IVF) befruchtungsfähig sind, müssen sie, ebenso wie *in vivo*, zunächst die Kapazitation und anschließend die Akrosom-Reaktion durchlaufen (CHANG, 1951; AUSTIN, 1952; AUSTIN & BISHOP, 1958). Neben der beim Rind *in vitro* mit Heparin-Zusatz induzierten Kapazitation (PARRISH et al., 1986) kann eine Prä-Inkubation der Spermien vor der IVF die Befruchtungsfähigkeit erhöhen (IRITANI et al., 1984; PARRISH et al., 1988).

Während der In-vitro-Kultivierung haben sich schnell teilende Embryonen die höchste Wahrscheinlichkeit, zu qualitativ besseren und weiterentwickelten Embryonalstadien zu werden (VAN SOOM et al., 1997a; ANGEL-VELEZ et al., 2023). Andererseits zeigen in vivo gewonnene Embryonen eine im Vergleich längere Phase der Kompaktierung im Morulastadium und blastulieren später (VAN SOOM et al., 1997b). Grundsätzlich werden In-vivo-Embryonen als Gold-Standard betrachtet, da sie den natürlichen Einflüssen des weiblichen Genitals während ihrer Entwicklung ausgesetzt sind, die in vitro lediglich nachgeahmt werden. Sich in vitro schnell teilende Embryonen erreichen nach Transfer höhere Trächtigkeitsraten als sich langsam teilende (REICHENBACH et al., 1992; HASLER et al., 1995). Da sich männliche Embryonen zudem schneller entwickeln, werden diese vermutlich auch häufiger für den Embryotransfer selektiert (XU et al., 1992). Andererseits besteht in vitro ein zugunsten männlicher Embryonen verschobenes Geschlechterverhältnis meist schon während der ersten Teilungen des Embryos (LONERGAN et al., 1999). Eine gut untersuchte Ursache für die Geschlechterverschiebung ist im Medium enthaltene Glukose. Da das X-Chromosom in weiblichen Embryonen zweifach vorhanden ist, werden die darauf kodierenden Gene für Enzyme im Glukose-Stoffwechsel doppelt exprimiert, dies kann zu Stoffwechselstress führen (WRENZYCKI et al., 2002). Werden Spermien vor der IVF prä-inkubiert, dann zeigen sich unterschiedliche Effekte: Mit einer 60-minütigen Prä-Inkubation wird ein ausgeglicheneres Geschlechterverhältnis erreicht, sowie eine höhere Teilungsrate (IWATA et al., 2008). Eine weitere einstündige Prä-Inkubation nimmt weder Einfluss auf die Teilungs- und Entwicklungsraten der resultierenden Embryonen nach IVC, noch auf das Geschlechterverhältnis, das ausgeglichen bleibt (KOCHHAR et al., 2003). Mit 6 und 24 Stunden Prä-Inkubation werden mehr weibliche Embryonen und teilweise eine verringerte Entwicklungsrate erzielt (LECHNIAK et al., 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Prä-Inkubation der Spermien vor der IVF in Bezug auf Fertilisations-, Teilungs- und Entwicklungsraten, die Qualität der sich entwickelnden Embryonen und deren Geschlechterverhältnis zu untersuchen. Die Inkubationsdauer der Spermien war dafür in Vorversuchen für jeden Bullen einzeln, anhand des Zeitpunktes zu dem die meisten kapazitierten Spermien vorlagen, ermittelt worden um eine optimale Befruchtung zu gewährleisten.

2 Literatur

2.1 In-vitro-Produktion boviner Embryonen

Die In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen umfasst drei Schritte: Zunächst die In-vitro-Maturation (IVM) oder –Reifung, die In-vitro-Fertilisation (IVF) oder –Befruchtung, gefolgt von der In-vitro-Kultivierung [engl. in-vitro-culture, IVC (MOORE & HASLER, 2017)].

Im Jahr 1959 wurde über die ersten Embryonen beim Kaninchen nach IVF berichtet (CHANG, 1959), 1968 gelang dies auch bei Mäusen (WHITTINGHAM, 1968). Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren folgte 1977 die erste In-vitro-Befruchtung von Eizellen beim Rind (IRITANI & NIWA, 1977) und 1988 die erste vollständige Produktion boviner Embryonen in vitro (GOTO, KAJIHARA, KOSAKA, KOBAYASHI, NAKANISHI & OGAWA, 1988; GOTO, KAJIHARA, KOSAKA, KOBAYASHI, Nakanishi Y. & OGAWA, 1988). Die erste Erstellung von Schweine-Embryonen in vitro gelang 1985 (CHENG et al., 1986).

Um die benötigten Eizellen zu erhalten, können zwei verschiedene Verfahren genutzt werden: Einerseits die Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) aus den Ovarien getöteter oder geschlachteter Kühe. Hierbei werden die Eizellen entweder aus den Follikeln aspiriert oder über die Slicing-Methode (ECKERT & NIEMANN, 1995) freigesetzt. Andererseits können über das Ovum-Pick-Up (OPU) mehrfach von lebenden Spendertieren KOK gewonnen werden (WARD et al., 2000). In der Folge werden die erhaltenen Eizellen nach morphologischen Kriterien selektiert. Die IVP-Tauglichkeit wird anhand des möglichst homogenen Ooplasma und der mindestens dreilagigen, geschlossenen Kumulus-Zellschichten beurteilt, da diese KOK bessere Teilungs- und Entwicklungsraten liefern (KHURANA & NIEMANN, 2000; NAGANO et al., 2006).

Es folgt die 24-stündige Maturation der Eizellen direkt im Anschluss an die Selektion. Während dieser wird die Arretierung der Eizelle in der Prophase überwunden und die meiotische Teilung bis zum Metaphase-II-Stadium unter Ausschleusung des ersten Polkörpers fortgeführt (HYTTEL et al., 1987). Abhängig vom verwendeten Medium erreichen 90 % der eingesetzten KOK dieses Stadium (LONERGAN et al., 2006).

Daraufhin folgt die In-vitro-Fertilisation, zumeist unter Einsatz von TG-Sperma. Dieses wird nach dem Auftauen z.B. über eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Silikaten aufbereitet, worüber sowohl die weniger motilen oder toten Spermien als auch die Verdüner-Zusätze abgeschieden werden sollen. Dem Fertilisations-Medium wird Heparin zugesetzt, da dieses beim Rind die Kapazitation der Spermien induziert (PARRISH et al., 1986), wodurch die Akrosom-Reaktion erst stattfinden kann. Beide Vorgänge bilden die Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizellen. Hierfür werden üblicherweise zwischen 1 und 2 Millionen Spermien pro ml IVF-Medium zugesetzt (WARD et al., 2002). Nach 18 bis 19 h Ko-Inkubation von KOK und Spermien sind ca. 70 bis 90 % der Eizellen befruchtet (LAURINCÍK et al., 1998; ALOMAR et al., 2008).

Es schließt sich die sechs- bis achttägige In-vitro-Kultivierung an, während derer sich die vermeintlichen Zygoten zu fortgeschrittenen Embryonalstadien (Morulae, Blastozysten, expandierte Blastozysten, schlüpfende und geschlüpfte Blastozysten) entwickeln sollen. Im Laufe dieser Zeitspanne finden stetig Zellteilungen statt, allerdings keine Größenzunahme des Embryos, da die resultierenden Blastomeren kleiner als ihre Vorgänger sind (AIKEN et al., 2004). Ist das Stadium des 8- bis 16-Zellers erreicht, wird das embryonale Genom aktiviert (FREI et al., 1989). Die Kompaktierung des Embryos, also die Ausbildung der Morula, erfolgt mit 32 bis 64 Blastomeren (VAN SOOM et al., 1997a), wobei sich bereits bestimmte Blastomere nach innen oder außen anordnen. Dieses Entwicklungsstadium zeigt sich an Tag 6 (IVF = Tag 0) in vitro, an Tag 7 das Blastozystenstadium, in dem sich der Trophoblast und die innere Zellmasse ausbilden (VAN SOOM et al., 1997b).

Je nach verwendeten IVP-Medien werden Entwicklungsraten (Morulae und Blastozysten) von 30 bis 40 % erzielt (LONERGAN et al., 2006).

2.2 Fertilisation

2.2.1 Fertilisation in vivo

Vier Stunden nach Insemination weiblicher Schafe mit Frisch-Sperma an der Basis des Uterushorns nimmt die Spermienkonzentration bis zur Spitze des Uterushorns, einschließlich der uterotubalen Verbindung, zu. Diese stellt dann eine deutliche Barriere dar, denn die Spermienkonzentration in dem folgenden Eileiter-Anteil sinkt auf knapp ein Viertel der vorangegangenen Konzentration (DRUART et al., 2009). Schleimhautfalten füllen einen großen Teil des Lumens der uterotubalen Verbindung aus, beim Rind ergänzt um einen Gefäßplexus mit Muskelschicht, der als Klappe fungiert (WROBEL et al., 1993). Hinzu kommt visköser Mukus, der bei verschiedenen Spezies an dieser Stelle nachgewiesen werden kann (JANSEN, 1978; SUAREZ et al., 1997; HUNTER, 2002). Neben diesen Barrieren wurde bei der Maus gezeigt, dass ADAM3-defiziente Spermien nicht in den Eileiter migrieren können, wenn das genannte Protein nicht, beziehungsweise abnormal, auf der Spermienmembran verteilt ist (YAMAGUCHI et al., 2009). ADAM ist die Abkürzung für „a disintegrin and a metalloproteinase domain containing protein“. Im Isthmus des Eileiters angekommen, binden Spermien vermehrt an zilienträgende Epithel-Zellen (LEFEBVRE et al., 1995). Diese Bindung wird unter anderen über verschiedene Annexine [A2 bei Schwein (TEIJEIRO et al., 2009) und Rind, A1, A4, A5 beim Rind (IGNOTZ et al., 2007)] und Heat Shock Proteine [HSP, HSPA5 (HSP family A member 5), HSPA8, HSP60/HSPD (BOILARD et al., 2004)], die auf den Zilien lokalisiert sind, vermittelt. Auf Spermien-seite tragen Bovine Seminalplasma-bindende Proteine (BSP A1, A2, A3, 30-kDa) zur Anlagerung an das Ovidukt-Epithel bei, die aus den Samenblasendrüsen sezerniert werden (GWATHMEY et al., 2006). Zusätzlich binden Glykane an die Spermien, beim Schwein (6-Sialylierte)

N-Acetyllactosamine sowie Lewis-X-Trisaccharid, beim Rind Lewis-A (MILLER, 2018). Diese Bindung wird beim Hamster sowohl prä- als auch peri-ovulatorisch aufrecht erhalten, erst die Kapazitation scheint diese Verbindung zu lösen (SMITH & YANAGIMACHI, 1990; SMITH & YANAGIMACHI, 1991). Im peri-ovulatorischen Zeitraum nimmt die sekretorische Aktivität des Epithels deutlich zu, gleichzeitig wird über einen endokrinologischen Stimulus die Freisetzung der Spermien vom Epithel initiiert (SOSTARIC et al., 2008). Weitere Details sind im Kapitel Kapazitation in vivo, 2.3.1, aufgeführt.

Die freigesetzten, kapazitierten Spermien weisen ein hyperaktives oder hypermotiles Bewegungsmuster auf, während sie die letzte Distanz zur Eizelle zurücklegen. Dabei liegt das Verhältnis Spermien zu Eizelle bei ungefähr 1:1 (SHALGI & PHILLIPS, 1988).

Die Zona pellucida, bestehend aus Glykoproteinen, wird bei den meisten Säugetier-Spezies von vier Genen kodiert (ZP1 - 4), bei Rind und Hund ist das Gen für das Protein ZP1 im Gegensatz zum Menschen jedoch nur ein Pseudogen (LITSCHER & WASSARMAN, 2014). Im Unterschied zu den Nagern werden bei den Haussäugetieren mit dickerer Zona pellucida, wie Rind und Schwein, während des Follikelwachstums Glykoproteine nicht nur in der Oozyte, sondern auch in den Follikelzellen synthetisiert (KÖLLE et al., 1996; KÖLLE et al., 1998). ZP3 und ZP4 bilden einen Hetero-Proteinkomplex, der die erste Bindung an den apikalen Teil des Spermiums initiiert (KANAI et al., 2007) und die Akrosom-Reaktion auslöst (CHIU et al., 2008). Zunächst steigt der intrazelluläre pH und Ca^{2+} strömt ein (FLORMAN et al., 1989). Der Inhalt des Akrosoms schwillt an und punktuell wölbt sich die äußere Akrosom-Membran so weit vor, dass sie in Kontakt mit der Plasma-Membran des Spermienkopfes tritt, andockt, und an anderen Punkten sich von ihr entfernt und Invaginationen bildet. Daraus folgt eine hybride Vesikelbildung, die von Plasmamembran-Anteilen und äußeren Akrosom-Membrananteilen umgeben sind. Gleichzeitig sind einige apikale Abschnitte des Spermiumkopfes nur noch von einer Membranschicht begrenzt, da Plasmamembran und äußere Akrosom-Membran stellenweise fusionieren. Anschließend setzen die hybriden Vesikel akrosomale Anteile nach extrazellulär frei (ZANETTI & MAYORGA, 2009).

Die Penetration der Zona pellucida scheint durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren ermöglicht zu werden. Lange Zeit wurde Akrosin, eine Serin-Protease mit trypsin-ähnlicher Wirkweise, als vermeintlich einziger proteolytischer Bestandteil des Akrosoms dafür verantwortlich gemacht. Jedoch zeigen Knockout-Mäuse ohne Akrosin-Aktivität keine Infertilität (BABA et al., 1994). Auch die Hypermotilität der Spermien als physikalischer Treiber spielt bei der Zona-Penetration eine Rolle (STAUSS et al., 1995).

Nach Passage der Zona pellucida, im perivitellinen Spalt, trägt das Protein IZUMO in der Spermien-Membran zur ersten Annäherung bei (INOUE et al., 2011), das auf Eizellseite JUNO, den Folsäure-Rezeptor 4, bindet (BIANCHI et al., 2014). Um diesen Adhäsionsbereich herum akkumuliert CD9, ein Tetraspanin, das in der Eizellmembran lokalisiert ist (CHALBI et al., 2014). Die Membran des postakrosomalen Bereiches des Spermiumkopfes und der Äquatorialregion fusionieren mit der

Membran der Eizelle, wohingegen der vordere Teil des Spermiumkopfes endozytiert wird (BEDFORD et al., 1979). Der Spermischwanz wird im Anschluss daran in die Eizelle aufgenommen, auch hier fusioniert die Membran des Spermiums an mehreren Stellen mit der Membran der Oozyte, Fragmente sind bis in frühe Embryonalstadien in Blastomeren nachweisbar (SIMERLY et al., 1993).

Ca²⁺ strömt danach wellenartig über Stunden ins Zytoplasma der Oozyte ein (IGUSA et al., 1983), ausgelöst durch die Phospholipase PLC ζ des Spermiums (SAUNDERS et al., 2002). Über die Calmodulin-abhängige Kinase II (MADGWICK et al., 2005) wird dieser Stimulus in der Fortführung der Meiose II, Ausschleusung des zweiten Polkörpers und Bildung des maternalen Vorkerns umgesetzt, zusätzlich werden der Maturation Promoting Faktor (MPF) als auch die mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) zeitversetzt herunterreguliert, da sie die Meiose-Fortführung blockieren (VERLHAC et al., 1994). Das paternale, hochgradig kondensierte Chromatin lockert sich auf und nimmt mehr Platz ein, rekondensiert um direkt wieder zu decondensieren. Während dieser Vorgänge werden die Protamine, die die Spermien-DNA binden, durch Histone ersetzt, der paternale Vorkern bildet sich aus (ADENOT et al., 1991). Wenige Stunden später wird die DNA der parentalen Vorkerne repliziert bevor die ersten Teilungen beginnen (LUTHARDT & DONAHUE, 1973). Das diploide, embryonale Genom wird größtenteils zwischen dem 8- und 16-Zellstadium aktiviert (FREI et al., 1989), in kleinerem Umfang bereits zwischen dem 2- und 4-Zellstadium (VIUFF et al., 1996).

JUNO ist im Anschluss an die Fusion nicht mehr auf der Eizell-Membran, sondern in extrazellulären Vesikeln nachweisbar. Dadurch wird der weiteren Fusion von Spermien vorgebeugt, als Teil des Polyspermie-Blocks der Membran (BIANCHI et al., 2014). Zu diesem trägt auch die stark angestiegene Ca²⁺-Konzentration intrazellulär nach der Fertilisation bei (GARDNER et al., 2007), allerdings ist der Mechanismus des Membran-Blocks in Gänze noch unverstanden. Die Fusion der kortikalen Granula, aus dem Golgi-Apparat der Eizelle stammende Vesikel mit proteolytischem Inhalt, mit dem Oolemm initiiert den Polyspermie-Block der Zona pellucida (AUSTIN, 1956; BARROS & YANAGIMACHI, 1971). Dabei wird die Protease Ovastacin in den perivitellinen Spalt freigesetzt und ZP2 geteilt (BURKART et al., 2012), wodurch die Bindungsfähigkeit und Penetrierbarkeit der Zona für Spermien reduziert wird (BLEIL et al., 1981). Zudem werden die O-Glykane von ZP3 modifiziert (FLORMAN & WASSARMAN, 1985), jenem Zona-Protein, das zuvor als Spermienrezeptor der Zona und Induktor der Akrosom-Reaktion fungierte. Aus den Kortikal-Granulae wird außerdem Zn²⁺ freigesetzt, das einerseits die Zink-Metalloendoprotease Ovastacin aktiviert und andererseits kurzfristig die Penetration von Spermien durch die Zona stört (TOKUHIRO & DEAN, 2018).

Zwei bis drei Stunden nach induzierter Ovulation und Besamung sind die meisten Kortikal-Granula fertilisierter Oozyten in den perivitellinen Spalt entleert, das glatte endoplasmatische Retikulum liegt weniger gedrängt vor und der Golgi-Apparat nimmt an Größe zu, insbesondere in der Region der sich ausbildenden Vorkerne. In den ersten vier Stunden nach Ovulation ist das Chromatin des Spermiums kondensiert, das dann ein bis drei Stunden später von einer Kernhülle umgeben wird, die aus dem endoplasmatischen Retikulum stammt. Parallel dazu bildet sich ein spermienkopfförmiger Vorkern aus,

der anschwellend an Größe gewinnt und eine runde Form einnimmt, mit dekondensierendem Chromatin. Das zweite Polkörperchen wird noch während der beginnenden Dekondensierung des Chromatins ausgeschleust. Ca. 19 Stunden nach Ovulation nähern sich die parental Vorkerne an, das Chromatin liegt wieder kondensiert vor. In den nächsten vier bis fünf Stunden lösen sich die Kernhüllen in unregelmäßigen Vesikeln und Tubuli auf. Die elterlichen Chromosomen werden im Rahmen der Syngamie zentral im Ooplasma angeordnet, umgeben von Teilen des Golgi-Apparates und des glatten endoplasmatischen Retikulums. Die Membranen der beiden neuen Kerne an zwei Polen der Zygote werden gebildet und die erste Zweiteilung des Zytoplasmas vollzieht sich zum embryonalen 2-Zell-Stadium (HYTTEL et al., 1988).

2.2.2 Fertilisation in vitro

Auch in vitro müssen Spermien die Akrosom-Reaktion durchlaufen, um KOK befruchten zu können, Voraussetzung hierfür wiederum ist die vorangegangene Kapazitation (siehe 2.3.2). Dabei stellt auch in vitro die Zona pellucida einen der Faktoren dar, die die Akrosom-Reaktion auslösen (FLORMAN & FIRST, 1988).

Zumeist wird für das bovine IVF kryokonserviertes Sperma genutzt, das jederzeit verfügbar ist, auch von toten Bullen oder vom IVP-Labor weit entfernt gehaltenen. Vor Zugabe zu den Eizellen muss die Aufbereitung des Spermas erfolgen, insbesondere die Abtrennung von Verdünner-Bestandteilen, Kryoprotektiva und Seminalplasma-Rückständen. Dies kann über Swim-up-Separation oder Dichtegradienten-Zentrifugation vorgenommen werden (PARRISH et al., 1995), weitere Möglichkeiten sind Sedimentation oder Migration und Filtration. Für die Swim-up-Technik (LOPATA et al., 1976; PARRISH et al., 1986) wird der Inhalt einer (aufgetauten) Besamungsportion mit Medium überschichtet, während über die Zeit die motilen, vitalen Spermien in die obere Mediumschicht auswandern, diese dann abgenommen und weiterverarbeitet werden kann. Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation, also einer Auftrennung entlang eines Dichtegradienten, wird das Sperma auf eine Säule aus kolloidaler Silikatlösung gegeben. In den Anfängen war dies Percoll® (PERTOFT et al., 1977; LESSLEY & GARNER, 1983), das inzwischen durch verschiedene kommerziell erhältliche Alternativen ersetzt wurde. Entweder fungiert als Dichtegradient eine Mischung verschiedener Konzentrationen (35 und 45 % oder 45 und 90 %) oder nur die hohe Konzentration (90 %) Silikatlösung. Danach erfolgt ein Zentrifugationsschritt, nach dem entweder der gesamte Überstand abzunehmen ist und das Spermienpellet zuunterst überbleibt oder die spermienhaltige Schicht zwischen zwei Schichten verschieden dichter Silikatlösung entsteht. Die Swim-up-Separation liefert eine höhere Gesamt-Motilität und mehr hypermotile Spermien (RUBESSA et al., 2020), ist allerdings vor allem geeignet für Portionen oder Ejakulate mit hoher Dichte und guter Motilität, und scheint aufgrund der Kompaktierung

der Spermien für eine Chromatin-Schädigung derselben via reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zu sorgen (HENKEL & SCHILL, 2003). Die Dichtegradienten-Zentrifugation liefert die meisten vorwärtsbeweglichen und akrosom-intakten Spermien im Vergleich zur Swim-up-Technik (RUBESSA et al., 2020), wobei die Technik etwas teurer und aufwändiger ist, dafür aber signifikant ROS, Leukozyten und andere Beimengungen reduziert (HENKEL & SCHILL, 2003).

Die zu den Eizellen gegebene Spermien-Konzentration beeinflusst maßgeblich die Anzahl fertilisierter Eizellen, aber auch die Rate der Polyspermie (WARD et al., 2003). Zumeist wird eine Konzentration von einer Million Spermien pro Milliliter Medium (1×10^6) genutzt, damit einerseits viele Eizellen normal und andererseits nicht polysperm befruchtet werden. Prinzipiell lassen sich Konzentrationen zwischen $0,25 \times 10^6$ und 1×10^6 pro ml (WARD et al., 2002) bzw. $0,33 \times 10^6$ Spermien/ml nutzen (BARCELÓ-FIMBRES et al., 2011). Die zweitgenannte Arbeit konnte zudem unterschiedlich gute Fertilisations-, Teilungs- und Entwicklungsraten bei verschiedenen Bullen in Abhängigkeit der verwendeten Spermiendosis nachweisen.

Tyrode's Solution oder Medium wird mindestens seit den 1920er Jahren in der Zellkultur eingesetzt (CARREL & EBELING, 1923), in der In-vitro-Fertilisation beim Hamster seit den 60ern. Damals konnte gezeigt werden, dass die Fertilisation von Hamster-Eizellen in Tyrode's Medium deutlich häufiger stattfand als in TCM-199 oder M/8 (YANAGIMACHI & CHANG, 1964). Auch in einem späteren Vergleich konnte nachgewiesen werden, dass unter den gängigen IVP-Medien das modifizierte Tyrode's Medium (mTALP) hohe Fertilisationsraten und im Anschluss eine bessere Embryonalentwicklung gewährleistet (FERRÉ et al., 2015). Die Verwendung von Laktat und Pyruvat in Tyrode's Medium (T-LP) erhöht den Anteil der akrosomreagierten Spermien während der Inkubation von Meerschweinchen-Sperma deutlich, Glukose wies dafür einen gegenteiligen Effekt auf (ROGERS & YANAGIMACHI, 1975). Zudem gewährleistet die Kombination aus Albumin, Pyruvat und Laktat (TALP) bei Hamster-Sperma einen Erhalt der Motilität über mehrere Stunden, sowie eine deutlich zunehmende Anzahl akrosomreagerter Spermien, allerdings bei dieser Spezies mit einem Glukose-Zusatz (BAVISTER & Yanagimachi, 1977). Seit den 1980er-Jahren wurde TALP dann beim Rind zur IVF mit epididymalem und ejakuliertem Sperma eingesetzt (LENZ et al., 1983; PARRISH et al., 1985). Das Medium von Brackett und Oliphant (BRACKETT & OLIPHANT, 1975) ist ein weiteres IVF-Medium, das in Arbeiten mit unterschiedlichen Spezies genutzt wurde [Kaninchen (SEIDEL et al., 1976), Rind (NIWA & OHGODA, 1988), Ziege (YOUNIS et al., 1991)]. Allerdings hat es den Nachteil, Glukose zu enthalten, welche die Kapazitation stört (PARRISH et al., 1985; SIRARD & LAMBERT, 1985; BAKER et al., 2006).

Hypotaurin (H) und Epinephrin (E) verhindern als Medien-Zusätze die Lipid-Peroxidation von Kaninchen-Sperma und damit den Motilitäts-Verlust, gleiches gilt für BSA, Pyruvat und Laktat (ALVAREZ & STOREY, 1983). Es können beim Rind mehr Zygoten mit beiden parentalen Vorkernen nachgewiesen werden, wenn die Spermien vor dem IVF mit Epinephrin und Hypotaurin behandelt wurden (BALL et al., 1983). Hypotaurin erhöht nicht nur die Spermien-Motilität beim Hamster, sondern

auch die Anzahl penetrierter Eizellen. Gleiches gilt, wenn ein Epinephrin-Zusatz erfolgt, der zudem die Akrosom-Reaktion unterstützt (LEIBFRIED & BAVISTER, 1982). Die Kombination von Penicillamin (P), Hypotaurin und Epinephrin im IVF-Medium erbringt höhere Teilungsraten und mehr Embryonen nach IVC (MILLER et al., 1994), wobei eine schnellere Penetration der Eizellen durch die behandelten Spermien erreicht wird (SUSKO-PARRISH et al., 1990). Die Kombination von Heparin und PHE verringert zwar die Spermien-Qualität im IVF, wenn Akrosom-Integrität und mitochondriale Aktivität betrachtet werden, ergeben aber mehr normal fertilisierte Eizellen und sich entwickelnde Blastozysten in der Kultivierung (GONÇALVES et al., 2014).

Neben den Inhaltsstoffen des Mediums tragen Produkte der Kumuluszellen der KOK zur Fertilisation der Eizellen bei. Der Zusatz von Kumuluszellen oder Kumulus-konditionierten Mediums zu denudierten Eizellen kann die Fertilisationsrate steigern (TANGHE et al., 2003). Dieser Effekt soll auf der Sekretion einer komplexen Mischung verschiedenster Botenstoffe durch die Kumuluszellen und damit auch Anlocken und Einfangen der Spermien beruhen. Dazu gehören Hyaluronsäure und Progesteron, die in der Lage sind, sowohl die Kapazitation als auch die Akrosom-Reaktion, Hyperaktivierung und Penetration der Zona zu fördern (KATO et al., 2022). Ganz grundsätzlich wird eine höhere Fertilisationsrate mit KOK erreicht als mit denudierten Eizellen (BALL et al., 1983; IWATA et al., 2008).

Werden die Spermien nach Aufbereitung zu den Eizellen gegeben, beginnt die Penetration der ersten Eizellen frühestens nach vier Stunden, die meisten werden nach sechs Stunden penetriert. In den nächsten zwei Stunden dekondensiert der Spermienkopf und nach weiteren vier bis sechs Stunden hat sich der paternale Vorkern ausgebildet, mit anschließender DNA-Synthese für acht bis zehn Stunden. Die ersten Zweiteilungen sind nach ca. 26 Stunden nachweisbar, nach 29 Stunden liegt die Hälfte der Zygoten als Zweizeller vor (XU & GREVE, 1988; LAURINCÍK et al., 1998).

Die ersten ausgebildeten Vorkerne können ca. acht Stunden nach Zugabe der Spermien zu den Eizellen nachgewiesen werden (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989).

Die spätere Penetration in vitro befruchteter Eizellen im Vergleich zur Situation in vivo dürfte daran liegen, dass die Kapazitation der zugegebenen Spermien noch zu großen Teilen oder vollständig ablaufen muss, wohingegen dies in vivo schon bei Verlassen des Ovidukt-Epithels passiert und die Spermien kapazitiert bei der Eizelle ankommen (LAURINCÍK et al., 1998).

2.3 Befruchtungsfähige Spermien

2.3.1 Kapazitation in vivo

Werden die Eileiter von Hamstern nach der Begattung gespült, verbleiben die epithelial gebundenen Spermien und befruchten zu hohen Anteilen nach ihrer Freisetzung die ovulierten Eizellen (SMITH &

YANAGIMACHI, 1991). Diese Spermien sind zunächst unkapazitiert, da der Zugabe kapazitierter Spermien keine Bindung an das Ovidukt-Epithel folgt.

Ovidukt-Flüssigkeit ist beim Rind in der Lage, innerhalb von vier Stunden Spermien zu kapazitieren, am stärksten während des Östrus (± 1 d), vermutlich ausgelöst durch ein Heparin-ähnliches Glykosaminoglykan (PARRISH et al., 1989a). Zusätzlich werden während des Östrus deutlich höhere Glykosaminoglykan-Konzentrationen im zervikalen Mukus nachgewiesen als während der Lutealphase (LEE & AX, 1984). Der Zusatz sulfatierter Glykosaminoglykane zu Ovidukt-Monolayern verhindert in der Ko-Kultur die Adhäsion von Spermien an die Epithel-Zellen und löst andererseits die Freisetzung der Spermien vom Epithel aus. Dabei werden Anzeichen auf Kapazitation und Hypermotilität gefunden (TALEVI & GUALTIERI, 2001).

Die sezernierten Flüssigkeiten im weiblichen Genitale enthalten einen hohen Hydrogenkarbonat-Anteil (VISHWAKARMA, 1962). Dieses ist *in vitro* in der Lage, eine veränderte Phospholipid-Verteilung in der Spermienmembran des Ebers hervorzurufen, sowie über die lösliche Adenylat-Cyclase intrazellulär die cAMP-Spiegel zu erhöhen, wodurch die Protein-Kinase A vermehrt Proteine phosphoryliert (GADELLA & HARRISON, 2000). Diesen Einfluss nimmt Hydrogenkarbonat sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (CHEN et al., 2000).

Die BSP aus den Samenblasendrüsen binden auf der Spermien-Oberfläche an Phospholipide, insbesondere an Phosphatidylcholin und Sphingomyelin (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992). Außerdem sind sie in der Lage, Bindungen mit Glykosaminoglykanen, unter anderem Heparin, einzugehen (CHANDONNET et al., 1990). Weiter sind sie am Phospholipid- und Cholesterin-Efflux während der Kapazitation beteiligt (THÉRIEN et al., 1999), potenziert wird dies durch einen Destabilisierungseffekt von BSP-A1/A2 in Cholesterin-armen Membranen (TANNERT et al., 2007). Es wird vermutet, dass die BSP *in vivo* im Ovidukt Bindungen der Spermien zu Glykosaminoglykanen vermitteln, dadurch die Kapazitation der Spermien induzieren, die BSP wiederum von den Spermien lösen und dabei der Cholesterin-Efflux stattfindet (BAILEY, 2010). Dadurch dürfte die Fluidität der Plasma-Membran zunehmen, da die Bindung von BSP eine Versteifung von Membranen verursacht (MÜLLER et al., 1998). Während der Kapazitation verändert sich beim Hamster die Fluidität der Membran des Spermiumkopfes regionspezifisch unterschiedlich stark, zudem zeigt sich diesbezüglich auch ein Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* kapazitiertem Sperma (SMITH et al., 1998).

Daran anschließend lösen sich die kapazitierten Spermien vom Ovidukt-Epithel, erreichen dank der Hypermotilität die Eizelle, durchdringen zuvor die Kumulus-Zellen, um dann die Akrosom-Reaktion zu durchlaufen (SHALGI & PHILLIPS, 1988).

2.3.2 Kapazitation in vitro

Wird zu vollständig kapazitierten Spermien bovines Seminalplasma gegeben, dann werden die folgenden Penetrationsraten der Eizellen halbiert (WHEELER & SEIDEL, 1987). Ein Hinweis darauf, dass vor der Kapazitation Bestandteile von den Spermien entfernt werden müssen, die während der Ejakulation aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen ausgeschieden werden.

Der häufig angewendete Zusatz von bovinem Serum-Albumin zu IVP-Medien zeigt während des IVF Cholesterin-akzeptierende Eigenschaften (GO & WOLF, 1985), wodurch der Cholesterin-Efflux während der Kapazitation unterstützt werden dürfte. Der gleiche Effekt wird durch die Zugabe von High-Density-Lipoproteinen (HDL) erreicht (THÉRIEN et al., 1998).

Ist dem Medium Glukose zugesetzt, dann verzögert sich das Einsetzen der Kapazitation oder tritt weniger oft auf (PARRISH et al., 1985). Dies wird mit einer benötigten intrazellulären Alkalinisierung während der Kapazitation in Verbindung gebracht, die nicht stattfinden kann, solange der intrazelluläre pH aufgrund der Produkte der Glykolyse entgegengesetzt verschoben ist (PARRISH et al., 1989b).

Die intrazelluläre Alkalinisierung während der Kapazitation (VREDENBURGH-WILBERG & PARRISH, 1995) löst eine Zunahme der cAMP-Konzentration aus (UGUZ et al., 1994), die in der Folge die Protein-Kinase A (PKA) und damit die Phosphorylierung verschiedener Proteine bewirkt (GALANTINO-HOMER et al., 1997; GALANTINO-HOMER et al., 2004). Bovines Serum-Albumin, Na-Hydrogenkarbonat und Kalzium-Chlorid als Medien-Zusätze können jeweils einen cAMP-Anstieg im Maus-Spermium verursachen, dem eine Protein-Phosphorylierung durch die Protein-Kinase A intrazellulär folgt (VISCONTI et al., 1995a; VISCONTI et al., 1995b).

Werden Spermien in vitro in der Anwesenheit von Ca^{2+} kapazitiert, erhöht sich der Anteil kapazitierter Spermien stärker als ohne diesen Zusatz. Gleichzeitig bedingt die induzierte Kapazitation auch einen höheren Anteil intrazellulären Kalziums (HANDROW et al., 1989). Die höchste intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} wird beim Hamster im Bereich des Akrosoms nach der Kapazitation festgestellt (FENG et al., 2006). Die Calmodulin-Bindung an die Ca^{2+} -ATPase der Plasma-Membran des Spermiums nimmt während der Kapazitation ab, sodass die Stimulation derselben ebenfalls entfällt, wodurch sich der Kalzium-Ausstrom aus dem Spermium verringert (ADEOYA-OSIGUWA & FRASER, 1996). Parallel dazu wird die Ca^{2+} -ATPase im Endoplasmatischen Retikulum, die dieses normalerweise mit Kalzium auffüllt, ebenfalls inhibiert, womit mehr Kalzium während der Kapazitation im Zytoplasma verbleibt und Proteine phosphoryliert werden (DORVAL et al., 2002). Diese endoplasmatisch lokalisierten Ca^{2+} -ATPasen werden bei verschiedenen Säugetierspezies im Akrosom und Mittelstück des Spermiums nachgewiesen (LAWSON et al., 2007). Die Sensitivität spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle für den intrazellulären pH-Anstieg nimmt im humanen Spermium während der Kapazitation zu, sodass hierüber wiederum vermehrt Ca^{2+} in das Spermium gelangt (NERI-VIDAURRI et al., 2006). Im Bereich des Spermischwanzes bei der Maus sind es

CATSPER-Kanäle, die für einen vermehrten Kalzium-Einstrom sorgen, der verantwortlich für die Hypermotilität kapazitierter Spermien ist (CARLSON et al., 2003; JIN et al., 2007).

Die Tyrosinkinase SRC scheint bei der Maus von der PKA im Rahmen der Kapazitation und Hyperaktivierung des Spermiums aktiviert zu werden und ist für die Phosphorylierung unter anderem von Tubulin und Heat Shock Protein (HSP) 90 verantwortlich (BAKER et al., 2006). Daneben ist auch die extrazellulär-aktivierte Rezeptor-Kinase/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK/MAPK) an der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung beteiligt und wird während der Kapazitation des humanen Spermiums aktiviert (LAMIRANDE & GAGNON, 2002). In der Maus wurde die Expression phosphorylierter Proteine an der Spermienoberfläche mit der ERK in Verbindung gebracht, die im periakrosomalen Bereich nachgewiesen und während der Kapazitation stimuliert werden kann (NIXON et al., 2010). Damit könnten sie eine Voraussetzung für die folgend stattfindende Akrosom-Reaktion darstellen.

Ein Teil der während der Kapazitation phosphorylierten Proteine ist in der fibrillären Hülle des Hauptstückes der Spermien-Geißel lokalisiert und hat die Aufgabe, die PKA zu binden (CARRERA, 1996), was eine mögliche Verbindung zur Hypermotilität kapazitierter Spermien und zwischen PKA und Tyrosin-Phosphorylierung darstellt. CABYR stellt ebenfalls ein Protein dieser fibrillären Hülle dar, dieses erlangt durch seine Phosphorylierung die Fähigkeit Kalzium zu binden (NAABY-HANSEN et al., 2002).

Weitere phosphorylierte Proteine sind im Spermiumkopf lokalisiert, beispielweise ACRBP/sp32 beim Schwein, das eine (Pro)Akrosin-bindende Funktion einnimmt (DUBÉ et al., 2005) und zudem in der Lage ist, an die Zona pellucida zu binden (VAN GESTEL et al., 2005). Bei der Maus wurden das Heat Shock Protein 60 (HSP60) und Endoplasmin (erp99) als Phosphotyrosin-Proteine identifiziert, die im Spermiumkopf als Chaperone am Membranumbau für die Zona-Bindung verantwortlich sind (ASQUITH et al., 2004).

TG-Sperma zeigt nach dem Auftauen vermehrt kapazitierte Anteile, die anfällig für die Induktion der Akrosom-Reaktion sind. Zudem weist es eine Phosphotyrosin-Protein-Verteilung im akrosomalen Bereich wie natives Sperma nach fünfständiger Heparin-Inkubation auf, hier lassen sich die Phosphotyrosin-Proteine vor der Inkubation im äquatorialen Segment nachweisen (CORMIER & BAILEY, 2003). Dies lässt sich unter dem Begriff der Kryo-Kapazitation subsumieren.

Ähnliches gilt für Sperma nach dem flowzytometrischen Sex-Sorting in X- und Y-Chromosomen tragende Spermien. Diese Spermien durchlaufen während einer Inkubation ohne Kapazitations-Induktion sehr viel schneller die Kapazitation und Akrosom-Reaktion als nicht-gesextes Sperma (MOCÉ et al., 2006).

2.3.2.1 Einsatz Heparin

Eine Inkubation boviner Spermien mit Heparin bewirkt eine Erhaltung der Motilität und eine schnellere, stärkere Akrosom-Reaktion, da Heparin zuvor die Kapazitation induziert (PARRISH et al., 1988). Dieser Effekt erreicht die stärkste Ausprägung bei frisch ejakuliertem Sperma nach vierstündiger Heparin-Inkubation und bei aufgetautem TG-Sperma nach 15 min (PARRISH et al., 1986). Zudem steigt die Rate fertilisierter Oozyten, wenn die Spermien mit Heparin vorbehandelt wurden. Die induzierte Kapazitation mit Heparin beeinflusst die Motilität der Spermien, die Geißel-Aktivität nimmt zu, ebenso wie die Amplitude der Kopfbewegung, sodass auch mit Heparin eine Hypermotilität der Spermien im Zuge der Kapazitation erreicht wird (CHAMBERLAND et al., 2001).

Bovine Seminal-Plasma bindende Proteine (BSP) sind in der Lage Heparin zu binden, sodass die Spermien im Anschluss die Kapazitation und Akrosom-Reaktion durchlaufen (MILLER et al., 1990). Diese BSP scheinen eine strikte Voraussetzung darzustellen, da ihr Zusatz zu epididymalem Sperma die Kapazitation mit Heparin ermöglicht und im Anschluss die Akrosom-Reaktion. Zudem dürfte der Zeitpunkt entscheidend sein, da die Zugabe von BSP zu Spermien, die kurz darauf mit *Zonae pellucidae* konfrontiert werden, keine Akrosom-Reaktion auslöst.

Genauso wie die Zugabe von Ovidukt-Flüssigkeit steigert die Heparin-Zugabe die cAMP-Spiegel im Spermium und löst die Kapazitation desselben aus. Dieser Anstieg kann durch Glukose bei der Heparin-Induktion blockiert werden, jedoch nicht bei der Induktion mit Ovidukt-Flüssigkeit, lediglich die Kapazitation wird nicht fortgesetzt. Damit scheint es Unterschiede in der Wirk-Kaskade der beiden Agentien zu geben (PARRISH et al., 1994). Die Kapazitation wird fortgesetzt, wenn ein cAMP-Analogon, 8-bromo-cAMP, zugesetzt wird, dies muss innerhalb der ersten zwei Stunden der vierstündigen Inkubation zur Kapazitation erfolgen. Daraus ist ein rascher cAMP-Anstieg während der Kapazitation zu folgern. Im Anschluss ist eine Phosphorylierung verschiedener Proteine nach Heparin-Kapazitation festzustellen (LANE et al., 1999; CHAMBERLAND et al., 2001).

Neben der löslichen Adenylat-Cyclase sAC scheint die Membran-ständige Adenylatcyclase mAC ebenfalls eine Rolle in der Heparin-induzierten Kapazitation zu spielen, da der Zusatz eines Inhibitors der mAC die Kapazitation von Spermien während der Heparin-Inkubation verhindert (RICART et al., 2015).

Nach fünfständiger Inkubation mit Heparin weisen Spermien einen signifikant höheren intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel auf, unabhängig davon, ob auf die Kapazitation die Akrosom-Reaktion in Kontakt mit *Zona pellucida*-Proteinen erfolgt. Jedoch besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Höhe des intrazellulären Kalzium-Spiegels und der Schnelligkeit der Akrosom-Reaktion nach Heparin-Inkubation. Zudem können nur die Spermien die Akrosom-Reaktion durchlaufen, die das Ca^{2+} im akrosomalen Bereich ansammeln und nicht im posterioren Bereich des Spermiumkopfes (PARRISH & SUSKO-PARRISH, 2001; PARRISH, 2014).

Sowohl der im IVF verwendete Bulle als auch die verwendete Heparin-Konzentration haben unterschiedlich hohe Fertilisationsraten zur Folge (NIWA & OHGODA, 1988; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990), wobei die Konzentration von 10 µg Heparin auf 1 ml Medium zumeist genutzt wird.

2.3.2.2 Prä-Inkubation Spermien

Die Prä-Inkubation von Spermien bezeichnet grundsätzlich einen Arbeitsschritt, bei dem Sperma nach dem Auftauen oder der Aufbereitung in einem Inkubator bei stabiler Temperatur und in einer definierten Gas-Atmosphäre gelagert wird. Zumeist erfolgt zuvor eine Resuspension in mehr oder weniger komplexen Medien zur Stabilisierung des pHs und gegebenenfalls zur Bereitstellung von für den Stoffwechsel benötigten Nährstoffen. Nach einer vorgegebenen Zeitdauer können die Spermien dann für Untersuchungen oder beispielsweise für die IVF eingesetzt werden. Der hierfür gebräuchliche Begriff der Ko-Kultivierung oder Ko-Inkubation meint die Zugabe der Spermien zu den maturierten Eizellen in Medientropfen, sodass innerhalb der folgenden Stunden die Befruchtung in vitro stattfinden kann.

Für die IVF beim Rind wurde eine Zeit lang auf die mehrstündige Prä-Inkubation frisch ejakulierten Spermien im definierten Medium gesetzt (IRITANI et al., 1984). Sowohl frisch ejakuliertes Sperma als auch tiefgefrorenes und aufgetautes ist nach Aufbereitung und dreistündiger Prä-Inkubation in Medium in der Lage, Eizellen zu befruchten (BONDIOLI & WRIGHT, 1983). Beim Schwein wird oft eine einstündige Prä-Inkubation der Spermien vor der IVF genutzt, allerdings scheint diese keine zwingende Voraussetzung für die Befruchtung der Eizellen zu sein (IKEDA et al., 2002).

Eine Erweiterung der reinen Prä-Inkubation sieht eine anschließende Kurzzeit-Behandlung der Spermien mit high-ionic-strength medium vor. Hierfür wird dem Medium so viel NaCl zugesetzt, bis eine Osmolalität von 380 mOsm/kg vorliegt (BRACKETT et al., 1980), tatsächlich wurde somit 1981 das erste Kalb nach IVF geboren (BRACKETT et al., 1982). Das high-ionic-strength medium hatte zuvor bei Kaninchen-Sperma bewirkt, dass Dekapazitierungsfaktoren des Seminalplasmas von der Oberfläche der Spermien entfernt wurden (BRACKETT & OLIPHANT, 1975).

Wird frisch ejakuliertes Sperma zur IVF genutzt, dann ergeben sich die besten Befruchtungsraten nach IVF, wenn die Spermien nach Aufbereitung und Zusatz von Heparin vier Stunden prä-inkubiert wurden (PARRISH et al., 1988). Nach Vergleich verschiedener Ko-Inkubationsdauern (1, 5, 18 h), bei der die besten Fertilisationsraten nach fünf Stunden erzielt wurden, hatte eine einstündige Prä-Inkubation der TG-Spermien vor der fünfständigen IVF eine Reduktion der Befruchtungsfähigkeit der Spermien zur Folge, obwohl mehr Spermien Bindungen zu den Zonae pellucidae eingingen (IWATA et al., 2008). In einer dieser Dissertation vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einstündiger Prä-

Inkubation der Spermien deutlich mehr Blastozysten festgestellt werden können, vermutlich aufgrund beschleunigter embryonaler Entwicklung, wobei hier nicht differenziert wurde, ob dieser Effekt beide Geschlechter betraf. Insgesamt wurden jedoch mehr männlichen Embryonen erzeugt (KOTARSKI et al., 2019).

Die Prä-Inkubation von Spermien für drei Stunden vor der 18-stündigen IVF erbringt gleiche Teilungs- und Entwicklungsraten in der folgenden IVC wie eine Ko-Inkubation mit Spermien ohne Prä-Inkubation (KOCHHAR et al., 2003). Eine sechsstündige Prä-Inkubation von Spermien vor dem IVF-Schritt scheint auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien keinen nachteiligen Einfluss zu nehmen, da die Teilungs- und Entwicklungsraten gleich bleiben zur nicht-prä-inkubierten Kontrolle. Eine 24-stündige Prä-Inkubation der Spermien reduziert die Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen in der Kultivierung (LECHNIAK et al., 2003).

Eine fünfständige Inkubation von Spermien in kapazitierendem Medium geht mit einem kontinuierlichen Verlust der Motilität einher, gleichzeitig nimmt die Fragmentierung der DNA zu, was die schlechteren Entwicklungsraten der Embryonen erklären dürfte (FRASER et al., 1995; GUALTIERI et al., 2014). In einer anderen Arbeit konnte die Motilität für 18 Stunden im Medium aufrechterhalten werden, in der Ko-Kultivierung mit und Bindung an Ovidukt-Zellen sogar bis zu 48 Stunden, die Befruchtungsfähigkeit für immerhin 30 Stunden (POLLARD et al., 1991).

Werden frisch-ejakulierter oder tiefgefroren-aufgetauter Samen ohne Heparin prä-inkubiert und dann für drei Stunden zu toten Eizellen gegeben, dann erbringt die Prä-Inkubation für 24 beziehungsweise für zwölf Stunden die höchsten Penetrationsraten (WHEELER & SEIDEL, 1987).

2.3.2.3 Nachweisverfahren der Kapazitation

2.3.2.3.1 Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Assay

1984 wurde von Ward & Storey der CTC-Fluoreszenz-Assay bei der Maus etabliert (WARD & STOREY, 1984). Je nach Kapazitations-Status oder erfolgter Akrosom-Reaktion bindet Chlortetracyclin unterschiedlich an die Oberfläche der Spermienköpfe, sodass sich verschiedene Färbemuster in der Fluoreszenz-Mikroskopie ergeben.

Zur Erstellung der 500 µM Färbelösung wird Chlortetracyclin entsprechend in eine gekühlte Pufferlösung gegeben. Die Pufferlösung besteht aus 20 mM TRIS-Puffer, 130 mM NaCl und 5 mM Cystein und wird auf einen pH von 7,8 eingestellt. Die frisch hergestellte Färbelösung wird bis zum Gebrauch lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Zur Immobilisation der Spermien wird 12,5 %iges Glutaraldehyd in 1 M TRIS-Puffer gelöst.

Von der CTC-Lösung werden 10 bis 15 µl auf einem angewärmten Objektträger zu einem ebenso großen Volumen Spermien-Suspension gegeben, gemischt, für 10 s inkubiert, die Glutaraldehyd-Lösung

hinzugegeben und ausgestrichen. Innerhalb der nächsten zwei Stunden kann dann die fluoreszenzmikroskopische Auswertung (Anregung bei 405 nm) vorgenommen werden. Bis dahin werden die Objektträger lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Unkapazitierte Spermien zeigen eine vollständige, grüne Fluoreszenz des Spermiumkopfes und zusätzlich ein besonders hell fluoreszierendes Band über der äquatorialen Region oder nur die vollständige Fluoreszenz des Kopfes ohne Band. Kapazitierte Spermien haben die Fluoreszenz im apikalen Bereich verloren, nur der postakrosomale Bereich ist angefärbt. Spermien, die die Akrosom-Reaktion durchlaufen haben, weisen keine fluoreszierenden Köpfe auf oder lediglich ein schmales Band in der äquatorialen Region. Abbildung 1 zeigt den Ablauf und die schematischen Färbeergebnisse der CTC-Färbung.

Der CTC-Fluoreszenz-Assay wurde 1995 erstmals für Rinder-Sperma adaptiert (FRASER et al., 1995). Statt Glutaraldehyd wird Paraformaldehyd in gleicher Konzentration in einem 0,5 molaren TRIS-HCl-Puffer verwendet (pH 7,4), und Chlortetracyclin in 750 μM . Die Anregung mit blauvioletterm Licht erfolgt bei 400 bis 440 nm. Das Färbeverhalten des Rinder-Spermas ist dem des Mäuse-Spermas gleich. Es zeigt sich über eine fünfstündige Inkubation von aufgetautem und aufbereitetem TG-Sperma eine starke Zunahme kapazitierter Spermien (bis über 60 %) und im Gegenzug eine deutliche Abnahme unkapazitierter Spermien (unter 30 %) für die ersten vier Stunden, der Anteil akrosomreagierter Spermien nimmt ebenfalls zu, allerdings weniger deutlich (über 10 %).

Der Anteil akrosom-reagierter Spermien in aufgetautem TG-Sperma scheint signifikant mit der Fruchtbarkeit des Bullen im Besamungseinsatz zu korrelieren, nicht jedoch die Anzahl kapazitierter Spermien (COLLIN et al., 2000). Der Prozess des sex-sorting von Bullenspermien induziert gleiche Anteile kapazitierter Spermien nach der Färbung mit CTC wie nach Induktion dieses Zustandes bei ungesexten Spermien (BUCCI et al., 2012). Die Aufreinigung von aufgetauten Spermien mit einem Percoll-Gradienten hingegen erhöht tendenziell die Anzahl kapazitierter und akrosom-reagierter Spermien im Vergleich mit anderen Methoden (GARCÍA-HERREROS & LEAL, 2014).

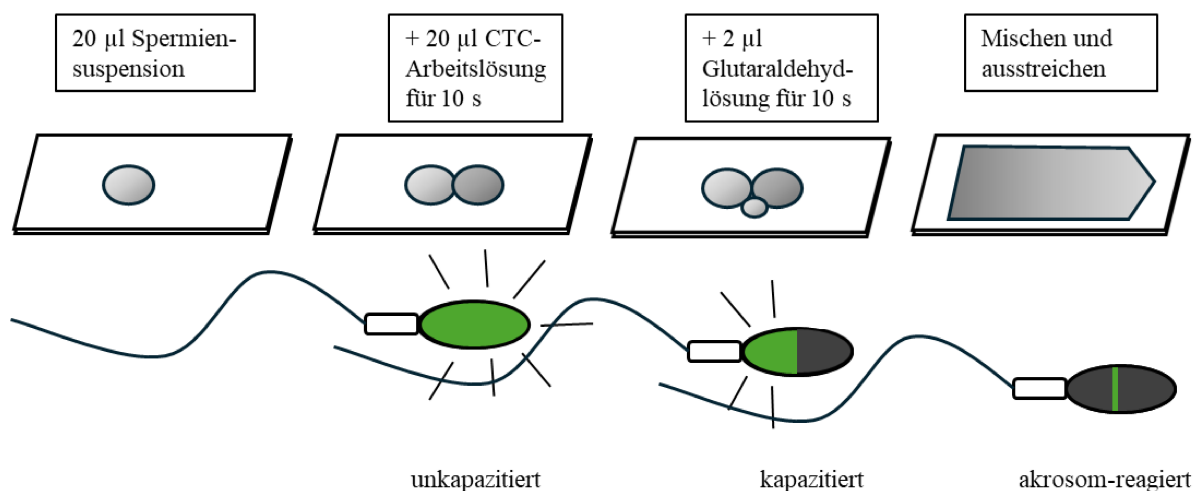


Abbildung 1: CTC-Fluoreszenz-Assay (modifiziert nach Ward & Storey, 1984)

2.3.2.3.2 Färbung mit Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertem Pisum-sativum-Agglutinin

Die FITC-PSA-Färbung ist eine oft genutzte Alternative zum CTC-Fluoreszenz-Assay. Ein großer Unterschied ist, dass mit der Lektin-Bindung die Akrosom-Reaktion nachgewiesen wird, nicht jedoch die Kapazitation. Dies geschieht indirekt darüber, dass die kapazitierten Spermien über einen Stimulus, oft ist es der Zusatz von Lysophosphatidylcholin (EHRENWALD et al., 1988) oder dem Kalzium-Ionophor A23187 (BABCOCK et al., 1976), zur Akrosom-Reaktion angeregt werden. Diese können nur die Spermien durchlaufen, die zuvor kapazitiert waren, damit kann entsprechend der Anzahl akrosom-reakter Spermien auf die Anzahl zuvor kapazitierter Spermien rückgeschlossen werden.

Die Technik wurde erstmals 1986 mit humanen Spermien angewendet (CROSS et al., 1986) und 1987 insofern modifiziert, als dass mit einem Filter gearbeitet wird, um mit geringeren Spermien-Zahlen auszukommen. Weiter wurde eine initiale, zehnmünütige Fixation mit 2 % Paraformaldehyd in Dulbeccos Phosphatgepufferter Salz-Lösung (PBS, pH 7,4) bei Raumtemperatur ergänzt (MORALES & CROSS, 1989). Die Spermien werden mit 95- bis 100%igem Ethanol bei -20 °C für zehn Minuten permeabilisiert, es erfolgt ein Waschschriff bei Raumtemperatur zunächst mit PBS zur Entfernung des Ethanols, anschließend mit einer Blocking-Solution (5% BSA und 1 mg/ml Natrium-Azid in PBS). Im Anschluss daran wird die FITC-PSA-Lösung (100 µg/ml in Blocking Solution) ergänzt und für weitere 10 Minuten, nun bei 37 °C, inkubiert. Dann wird ein dreifacher Waschschriff mit Blocking Solution, PBS und destilliertem Wasser durchgeführt, bevor die Spermien auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet werden. Abschließend wird dieser in eine Mischung aus Glycerol, PBS und 1,4 Diazabicyclo-Octan gegeben. Dies soll einem Ausbleichen bzw. Fluoreszenzverlust entgegenwirken. Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenz-Mikroskop, dabei weisen akrosomreagierte Spermien einen nicht angefärbten, apikalen Kopf oder lediglich ein schmales Band von Fluoreszenz in der äquatorialen Region auf. Alle anderen Spermien haben grün fluoreszierende, apikale Köpfe. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der Färbetechnik und die unterschiedlichen Fluoreszenzmuster der Spermien.

1997 wurde die Färbung dann beim Rind eingesetzt (GALANTINO-HOMER et al., 1997), basierend auf einem Protokoll für Hengstsperma, das sich nur geringfügig von dem initialen unterscheidet (CASEY et al., 1993). Das Färbeverhalten bei Bullensperma entspricht dem von humanem und Hengstsperma. Eine vorangehende Färbung mit Höchst 33258 als Supravital-Färbung erlaubt zusätzlich eine Unterscheidung von lebenden und toten Spermien.

Beispielweise konnten tendenziell mehr akrosomreagierte Spermien nach der Kryokonservierung festgestellt werden, die aus Ejakulaten im Winter stammten als im Sommer (ORGAL et al., 2012). Die Aufreinigung von TG-Sperma sowohl mit Percoll-Gradient als auch mit BoviPure® erhöht nicht nur den Anteil progressiv motiler Spermien, sondern verringert auch die Anzahl bereits akrosomreakter Spermien, wobei die FITC-PSA-Färbung zwischen den beiden Aufbereitungsmethoden keinen signifikanten Unterschied nachweisen konnte (SAMARDZIJA et al., 2006a).

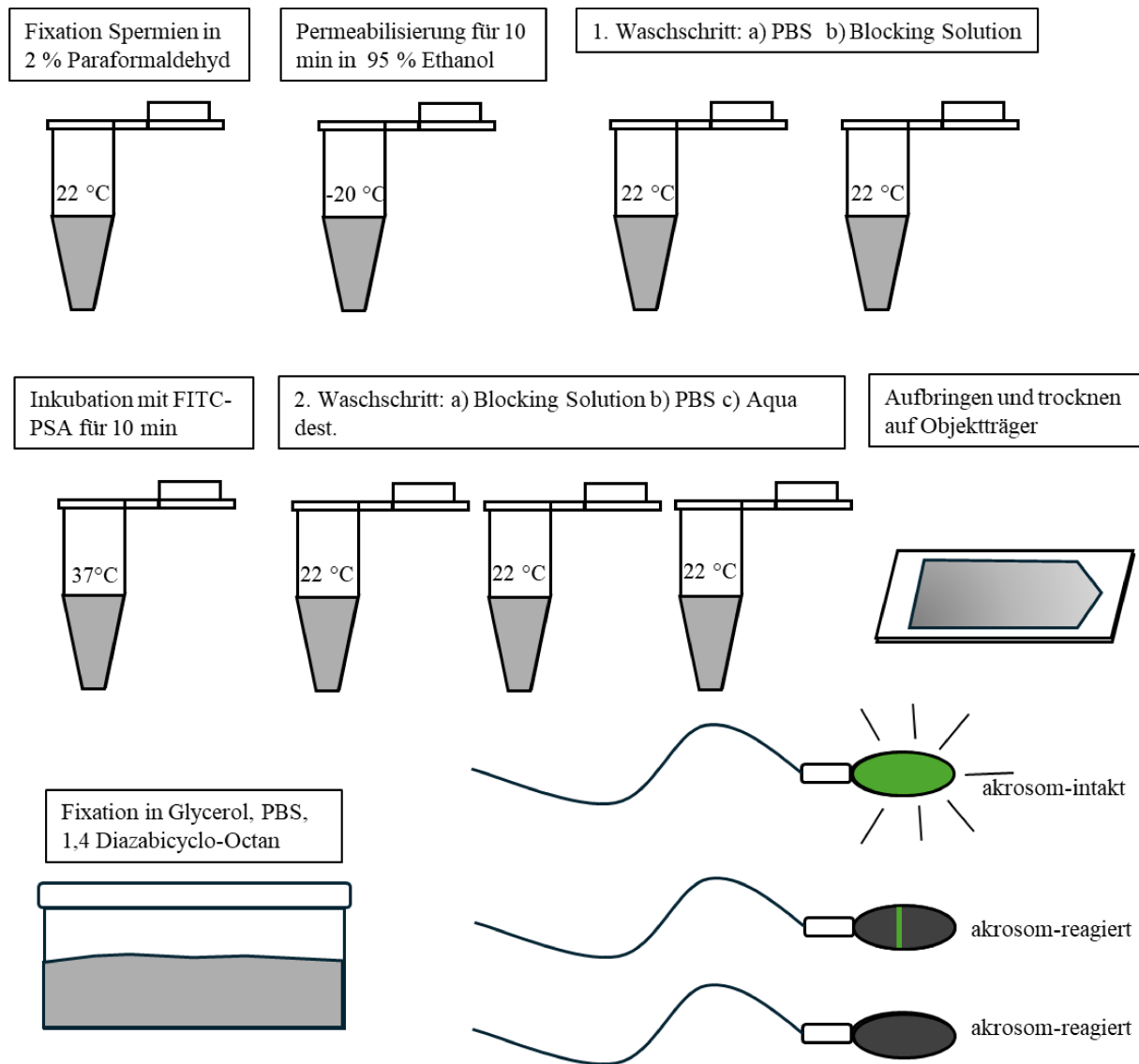


Abbildung 2: FITC-PSA-Färbung (modifiziert nach Cross et al., 1987, 1988, Morales & Cross, 1989)

2.4 Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses

Das Geschlechterverhältnis neugeborener Kälber, die aus Trächtigkeiten nach instrumenteller Besamung stammen, liegt bei 50:50 weibliche zu männlichen (FOOTE, 1977).

Nach Transfer in vitro erzeugter Embryonen werden meist mehr männliche als weibliche Kälber geboren (REICHENBACH et al., 1992; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1998; HASLER, 2000).

Andere Autoren finden, auch vor Transfer von IVP-Embryonen, ein ausgewogeneres Geschlechterverhältnis (KING et al., 1991; HASLER et al., 1995; HOLM et al., 1998; HOLM & CALLESEN, 1998).

In vivo erstellte Embryonen nach Superovulation und Spülung der Donorentiere können ebenfalls eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zeigen (BONDIOLI et al., 1989), andere Arbeiten weisen aber auch hier ein ausgeglicheneres Bild nach (LEIBO & RALL, 1990; KING et al., 1991; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001). Eine Verschiebung hin zu mehr weiblichen Embryonen in vivo konnte als bullenspezifisch nachgewiesen werden (TOMINAGA, 2004).

Da gezeigt wurde, dass sich schneller erstmals teilende Embryonen eine höhere Qualität aufweisen und öfter zu Blastozysten entwickeln (SAHA et al., 1996; LONERGAN et al., 1999) und entsprechend öfter für Transfers selektiert werden, kann sich hierüber eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses der geborenen Kälber nach IVP erklären. Zudem scheinen sich schnell blastulierende Embryonen mit einer höheren Trächtigkeitsrate assoziiert zu sein (HASLER et al., 1995).

In vitro besteht eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses oft bereits bei den Embryonen, zumeist zur männlichen Seite (WRENZYCKI et al., 2002; ABELE et al., 2012). In mehreren Arbeiten wiesen männliche Embryonen eine deutlich schnellere Entwicklung in vitro auf bzw. entwickelten sich häufiger zu weiter entwickelten Stadien (XU et al., 1992; YADAV et al., 1993; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1996), aber auch in vivo lässt sich eine Tendenz feststellen (AVERY et al., 1989; TOMINAGA, 2004). Eine zunehmende IVM-Dauer scheint in einigen Arbeiten mehr männliche Embryonen an Tag 7 zu generieren (DOMINKO & FIRST, 1997; AGUNG et al., 2006), andere wiederum können nur einen Einfluss auf den Zeitpunkt der ersten Teilung, nicht jedoch auf das Geschlechterverhältnis feststellen (RIZOS et al., 2008a).

Der Einsatz von X-/Y-chromosomal sortiertem bzw. sex-sorted Sperma im IVF reduziert die Teilungs- und Entwicklungsraten der produzierten Embryonen, dafür werden die erwünschten Geschlechter bei mindestens 88 % der Embryonen erreicht (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008b; MORTON et al., 2007; TRAVNICKOVA et al., 2021). Auch die Motilität nach dem Auftauen des geschlechtersortierten Spermias ist verringert, zudem zeigen sich Spermien verschiedener Bullen unterschiedlich empfindlich für den Sorting-Prozess, bezüglich der Motilität und Akrosom-Integrität (SCHENK et al., 1999). Werden Rinder superovuliert und mit gesextem Sperma inseminiert, dann ergeben sich auch hier geringere Befruchtungsraten und weniger Embryonen als mit ungesextem Sperma, hier wurden 95 % der Kälber mit dem gewünschten Geschlecht geboren (SCHENK et al., 2006)

Grundsätzlich scheinen einzelne Bullen ein verschobenes Geschlechterverhältnis in der IVP zu verursachen (LEME et al., 2020). Der in der IVF verwendete Bulle kann bereits in der Geschwindigkeit der Vorkern-Ausbildung Einfluss nehmen, dies setzt sich bei der ersten Teilung des Embryos und dem Anteil von Blastozysten an Tag 7 fort. Oder der bullenspezifische Effekt kann sich im Geschlechterverhältnis ab dem Zweizell-Stadium zeigen, das dann für einzelne Bullen Richtung männlich verschoben ist (ALOMAR et al., 2008).

Eine einstündige Prä-Inkubation der Spermien vor einer fünfstündigen IVF resultiert in einem ausgewogenen Geschlechterverhältnis (IWATA et al., 2008). In der gleichen Arbeit zeigte sich im Vergleich einer ein-, fünf- und 18-stündigen Ko-Inkubation von Eizellen und Spermien eine Abnahme

des Überhangs männlicher Embryonen. Unter anderem wird davon ausgegangen, dass die Induktion der Kapazitation und die Bindung der Spermien an die Kumulus-Zellen der Oozyten bei Y-Chromosom-tragenden Spermien schneller stattfindet. Auch eine dreistündige Prä-Inkubation nimmt keinen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis (KOCHHAR et al., 2003).

Werden die Spermien vor der IVF sechs h im Brutschrank prä-inkubiert, dann entwickeln sich in der anschließenden IVC deutlich mehr weibliche Embryonen, bei einer 24-stündigen Prä-Inkubation gilt gleiches nur für das Geschlechterverhältnis der geschlüpften Blastozysten (LECHNIAK et al., 2003). Hier ist jedoch zu erwähnen, dass im Gegensatz zu vielen anderen Studien die Embryonen an Tag neun analysiert wurden, nicht an Tag sieben oder acht. Es wird unterstellt, dass die Y-Chromosom-tragenden Spermien nach Prä-Inkubation ihr Entwicklungspotenzial stärker verlieren als die X-Chromosomen-tragenden.

Mit einer bestimmten Dichtegradienten-Zentrifugation des Spermas vor IVF kann eine bullenabhängige Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu mehr männlichen Embryonen erzielt werden (MACHADO et al., 2009), dies konnte jedoch nicht reproduziert werden (WOLF et al., 2008). Werden die Penetrationszeiten mehrerer Bullen in der IVF betrachtet und die Zeit der Ko-Inkubation von Eizellen und Spermien daran angepasst, dann zeigen sich deutlich höhere Entwicklungsraten, aber keine Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses (SATTAR et al., 2011). Im Vergleich verschiedener IVF-Dauern (6, 9, 12, 18 h) zeigt die kürzeste Ko-Inkubationsdauer von Eizellen und Spermien eine deutliche Verschiebung zugunsten der männlichen Seite, sowohl bei 2- bis 8-Zellstadien als auch bei den Blastozysten. Weiter beinhalten die männlichen Embryonen deutlich mehr Zellen nach neun- und zwölfstündiger IVF, allerdings ist die Ratio innere Zellmasse zu Gesamtzellzahl nicht unterschiedlich (KOCHHAR et al., 2003). Daraus wird ein Vorteil Y-Chromosomen tragender Spermien während den ersten IVF-Stunden abgeleitet, der mit länger dauernder Ko-Inkubation nachlässt, oder sogar die X-Chromosomen tragenden Spermien bevorteilt.

Wird das Geschlechterverhältnis der Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten während der IVC bestimmt, wird in einer Arbeit eine Verschiebung in Richtung männlich erst ab dem siebten Tag sichtbar, beziehungsweise für Embryonalstadien nach der frühen Blastozyste. Auch hier wird also eine, allerdings ab einem späteren Zeitpunkt, schnellere Entwicklung der männlichen Embryonen gezeigt (LARSON et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Arbeitsgruppe schon im 2- bis 4-Zellstadium mehr männliche Embryonen nachweisen (LONERGAN et al., 1999).

Werden verschiedene IVC-Medien betrachtet, zeigt sich insgesamt, und im speziellen mit fetalem Kälberserum als Medienzusatz, eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu mehr männlichen Embryonen, insbesondere an Tag 6 und 7 der Kultivierung, an Tag 8 und 9 kehrt sich das Verhältnis um, hin zu mehr weiblichen Embryonen (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001). Wird die Kultivierung der Embryonen in einem Medium durchgeführt, das zuvor mit Oviduktzellen konditioniert wurde, sind weibliche und männliche Embryonen hingegen gleich verteilt (GRISART et al., 1995). Gleiches gilt für die In-vitro-Kultivierung boviner Embryonen im Schaf-Ovidukt (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1996).

Der Zusatz von Glukose zum Medium in den ersten 24 h der IVC fördert die Entwicklung der männlichen Embryonen, die mehr Zellen pro Embryo aufweisen, also mehr bzw. schnellere Teilungen durchliefen (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996). Vermutet wird, dass die anfallenden Sauerstoffradikale bei der Verstoffwechslung des Mediums männliche Embryonen in der Entwicklung antreiben, wohingegen die weiblichen Embryonen aufgrund der X-chromosomal bedingt noch doppelt exprimierten Enzyme (WRENZYCKI et al., 2002; MORTON et al., 2007) vermehrt toxischen Effekten der Glukose ausgesetzt sind. Für das Gen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) konnte eine geschlechtsspezifische Expressionsrate bei Rinder-Embryonen nachgewiesen werden (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; WRENZYCKI et al., 2002). G6PD wird in weiblichen Embryonen doppelt so stark exprimiert wie in männlichen Embryonen, sowohl in Morulae als auch in Blastozysten. G6PD ist das limitierende Enzym im Pentose-Phosphat-Weg, der NADPH abwirft, welches wiederum die Gluthation-Funktion und damit die Bekämpfung von ROS und oxidativem Stress stützt. Für die Phosphoglyceratkinase (PGK), ein weiteres X-chromosomal kodiertes Enzym im Kohlenhydratstoffwechsel, gilt gleiches bei den Morulae. Der Unterschied in der Genexpression zwischen den Geschlechtern ist in vitro zudem deutlich stärker ausgeprägt als in vivo (WRENZYCKI et al., 2002). Dadurch wird erneut ein Einfluss des IVP-Systems auf die Gen-Expression und das Geschlechterverhältnis deutlich.

Werden Embryonen während der IVC einer reduzierten Glukose-Konzentration ausgesetzt, dann ist das Verhältnis ausgeglichen, ohne Glukose werden mehr weibliche Embryonen erzeugt (RUBESSA et al., 2011; ABELE et al., 2012). In einer anderen Arbeit werden im Glukose-freien Medium gleiche Anteile der Geschlechter nachgewiesen, mit Glukose allerdings ebenfalls mehr männliche Embryonen ab dem Stadium der frühen Blastozyste (LARSON et al., 2001). Eine Kultivierung von Maus-Embryonen in einem Glukose-angereicherten Medium ergab eine reduzierte Gesamt-Zellzahl, sowie kleinere Würfe nach Transfer der Embryonen. Möglich wird dies, über eine höhere ROS-Produktion im Glukose-haltigen Medium, wodurch mehr Blastomere in die Apoptose gehen und damit die Zellzahl und Embryoqualität reduziert wird. Dies kann sich dann in der geringeren Anzahl geborener Welpen widerspiegeln. Das Geschlechterverhältnis der Embryonen und geborenen Welpen wurde durch die Glukose-Anreicherung nicht beeinflusst (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2012).

Weibliche Embryonen zeigen während der IVC eine stärkere Beeinträchtigung durch zugesetzte chemische Stressoren als männliche Embryonen, der Effekt variiert allerdings zwischen den verwendeten Medien (DALLEMAGNE et al., 2018). Die sich schneller entwickelnden männlichen Embryonen scheinen die Vitrifikation als möglichen Stressor ebenfalls besser zu verkraften und schlüpfen nach dem Erwärmen deutlich häufiger als weibliche (NEDAMBALE et al., 2004).

Bei der Maus werden nach In-vitro-Kultivierung der Embryonen unter Hitzestress-Bedingungen und Transfer deutlich weniger männliche Welpen geboren. Die männlichen Embryonen enthielten signifikant mehr H_2O_2 , jedoch wird die G6PD inhibiert, dann weisen beide Geschlechter ähnlich hohe H_2O_2 -Konzentrationen auf. In den männlichen Embryonen werden im Vergleich zu den weiblichen

verstärkt Gene in Zusammenhang mit Zellstress-Regulation und Apoptose exprimiert [SOX und BAX, (PÉREZ-CRESPO et al., 2005)].

In einer Studie mit Einsatz von gesextem Sperma in der IVF wiesen die Blastozysten in der Gruppe mit Y-chromosomal gesextem Sperma qualitativ bessere und weiter entwickelte Embryonalstadien auf als die Gruppe mit X-chromosomal gesextem (BARCELÓ-FIMBRES et al., 2011). Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Arbeit, die zwischen den IVF-Gruppen mit X- und Y-chromosomalem Sperma nur bezüglich dreier Gentranskripte Unterschiede feststellen konnte, und bei lediglich einem Bullen mehr Blastozysten produziert wurden, wenn Y- statt X-chromosomal gesextes Sperma verwendet wurde. Im Vergleich zu ungesextem Sperma der gleichen Bullen waren die Teilungs- und Entwicklungsraten reduziert für die IVF mit gesextem Sperma, die Teilungsraten wiesen eine bullenabhängige Streuung auf (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010a; MORTON et al., 2007).

Männliche Embryonen verfügen über mehr mitochondriale DNA, ein Hinweis darauf, dass sie mehr dieser Organellen besitzen oder diese seltener abgebaut werden als bei weiblichen Embryonen. Gleichzeitig sind die Telomere signifikant länger in weiblichen Embryonen, und die beiden Geschlechter unterscheiden sich im Methylierungsgrad einiger Gene. Genauso ist die Gen-Expression von einzelnen Methyltransferasen, die für die DNA-Methylierung zuständig sind, unterschiedlich zwischen weiblichen und männlichen Embryonen. Die de-novo-Methyltransferasen Dnmt3a und 3b sind in weiblichen Embryonen weniger stark exprimiert (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008a). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Effekte verschiedener Einflussfaktoren auf das Geschlechterverhältnis der erzeugten Embryonen.

Tabelle 1: Einflussfaktoren und ihre Auswirkungen auf das Geschlechterverhältnis

Einflussfaktor	Effekt auf Geschlechterverhältnis	Autoren
Bulle für KB vor MOET	Mehr ♀	Tominaga et al., 2004
Bulle in IVF	Mehr ♂	Alomar et al., 2008
Verlängerte IVM-Dauer	Mehr ♂	Dominko & First 1997 Agung et al., 2006
Prä-Inkubation Spermien vor IVF	<ul style="list-style-type: none"> • 1 h: kein Einfluss • 1 h: mehr ♂ • 3 h: kein Einfluss • 6 h: mehr ♀ 	Iwata et al., 2008 Kotarski et al., 2019 Kochhar et al., 2003 Lechniak et al., 2003
Ko-Kultivierungs-Dauer Gameten während IVF	<ul style="list-style-type: none"> • 1, 5, 18 h: zunehmend weniger ♂, ausgeglicheneres Geschlechterverhältnis • 6 vs. 9, 12, 18 h: mehr ♂ 	Iwata et al., 2008 Kochhar et al., 2003
IVC mit Serumzusatz	Mehr ♂	Gutierrez-Adan, et al., 2001
IVC mit BOEC / im Schaf-Ovidukt	Ausgeglichenes Geschlechterverhältnis	Grisart et al., 1995 Gutierrez-Adan, 1996
IVC mit Glukose-Zusatz	Mehr ♂	Bredbacka & Bredbacka, 1996 Larson et al., 2001
IVC mit reduzierter Glukose	Ausgeglichenes Geschlechterverhältnis	Rubessa et al., 2011 Abele et al., 2012
IVC ohne Glukose	Ausgeglichenes Geschlechterverhältnis Mehr ♀	Larson et al., 2001 Rubessa et al., 2011 Abele et al., 2012

3 Material und Methoden

Eine Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Medien befindet sich im Anhang. Wenn nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland).

3.1 In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen

Die In-vitro-Produktion boviner Embryonen setzt sich aus drei Schritten zusammen: die In-vitro-Maturation (IVM) über 24 Stunden, die In-vitro-Fertilisation (IVF) über 19 Stunden und abschließend die In-vitro-Kultivierung (engl. in-vitro-culture, IVC) für sieben bis acht Tage.

3.1.1 Herkunft und Transport der Ovarien

Einmal in der Woche wurden von geschlechtsgesunden, nicht trächtigen Kühen an einem nahe gelegenen Schlachthof (Fleischmarkt Olpe, Deutschland) unmittelbar post mortem Ovarien entnommen. Der Transport zum Labor erfolgte in einem Thermobehälter mit Phosphat-gepufferter Salz-Lösung (engl. Phosphate Buffered Saline complete, PBS) bei ca. 33 °C. Das PBS setzte sich aus 9,65 mg Dulbecco's Phosphate Buffered Saline auf 1000 ml Aqua dest., 10 ml PBS-Stocklösung, 11,2 mg Heparin (entspricht 4 I.E.) sowie 1 g bovinen Serumalbumin (Fraktion V) zusammen und wurde am selben Tag frisch angesetzt.

3.1.2 Gewinnung und Selektion Kumulus-Oozyten-Komplexe

Die erhaltenen Ovarien wurden im Labor dreimal mit auf 38 °C vorgewärmter, 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) gewaschen. Der NaCl-Lösung waren 0,1 g Streptomycin und 0,06 g Penicillin zugesetzt. Anschließend erfolgte die Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) via Slicing-Methode (ECKERT & NIEMANN, 1995): Das Ovar wurde in eine Petrischale mit 100 ml vorgewärmtem PBS complete gelegt und mit einer Arterienklemme am Mesovar fixiert. Mit zehn Kürschnerklingen (Fa. Martor, Solingen, Deutschland), die parallel im Abstand von 2 bis 3 mm angeordnet sind, erfolgte das Eröffnen der oberflächlichen und tiefen Follikel. Dadurch gelangten die KOK mit der Follikelflüssigkeit in das PBS complete.

Das PBS-Follikelflüssigkeitsgemisch wurde durch ein herkömmliches Grobsieb in ein vorgewärmtes Becherglas gegossen, um größere Gewebestücke zu entfernen, und anschließend auf ein weiteres Sieb (Fa. Retsch, Haan, Deutschland) mit einer Maschenweite von 75 µm gegeben. Hier erfolgte das Zurückhalten der KOK und kleineren Gewebestücke und Spülung derselben mit warmem PBS complete in 90 mm Plastikpetrischalen (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Die darin enthaltenen KOK wurden unter einem Stereo-Mikroskop (Olympus SZX7, Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 24-facher Vergrößerung auf einer 38 °C warmen Arbeitsplatte (Fa. IVFtech, Stenløse, Dänemark) selektiert. Die Selektion erfolgte über die Anzahl und Vollständigkeit der Kumuluszelllagen um die Oozyte herum sowie anhand der Homogenität und Farbe des Zytoplasmas der Oozyte. Aufgrund dieser Merkmale ist eine Einteilung in fünf Klassen möglich. Die ersten drei Klassen umfassen IVP-taugliche Oozyten, die Klassen 4 und 5 eignen sich nicht für die weitere Verwendung (s. Tabelle 2). In dieser Arbeit wurden lediglich Oozyten der Klassen 1 und 2 eingesetzt. Die Sammlung der KOK erfolgte mithilfe einer 25 µl-Glaskapillare (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) und eines Pipettierhelfers (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml 37 °C warmem Tissue-Culture-Medium 199 (TCM-Air, stabil in Umgebungsluft).

Tabelle 2: Merkmale zur Qualitätsbeurteilung der KOK

Kategorie	Merkmale	IVP-Tauglichkeit
1	Homogenes dunkles Ooplasma; kompakter, durchgehend drei- bis vierlagiger Kumulus	Ja
2	Homogenes, dunkles Ooplasma; mindestens eine durchgehende Lage an Kumuluszellen	Ja
3	Homogenes oder heterogenes Ooplasma; vereinzelt anhaftende Kumuluszellen	Ja
4	Heterogenes oder homogenes Ooplasma; keine anhaftenden Kumuluszellen; leere Zona	Nein
5	Heterogenes oder homogenes Ooplasma; Expandierter Cumulus oophorus	Nein

3.1.3 In-vitro-Maturation

Die erhaltenen KOK wurden in 20er-Gruppen aufgeteilt und dreimal durch mit Silikonöl (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) überschichtete 100 µl-TCM-BSA-Tropfen gewaschen. Die Reifung erfolgte in ebenfalls ölüberschichteten 100 µl-TCM-BSA-Tropfen in einem Brutschrank (Fa. Thermo-Fisher

Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre, 5 % CO₂ und 39 °C für 24 Stunden. Den Reifungstropfen waren equines Choriongonadotropin (eCG, 80 I.E.) und humanes Choriongonadotropin (hCG, 40 I.E.; Präparat Suigonan, Fa. MSD Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) in einer Endkonzentration von 10 und 5 I.E. zugesetzt. Sowohl die TCM-BSA-Waschtropfen als auch die TCM-BSA-Reifungstropfen wurden vor Gebrauch bei oben genannten Bedingungen im Brutschrank äquilibriert.

3.1.4 In-vitro-Fertilisation

Unter stereomikroskopischer Sichtkontrolle wurden die KOK dreimal in 100 µl-Fertilisations-Tropfen, bestehend aus Tyrodes's Albumin Lactat Pyruvat (Fert-TALP; mit Silikonöl überschichtet), auf einem warmen Arbeitstisch gewaschen. Anschließend erfolgte das Überführen der KOK in 100 µl große Tropfen aus Fert-TALP mit Heparin-Hypotaurin-Epinephrin (HHE) in einer 35 mm Petrischale. Hierzu wurde in 2 ml des Fert-TALP-Mediums ein 120 µl-Aliquot der HHE-Lösung gelöst (Fert-TALP-Gebrauchslösung; 0,1 I.E./ml Heparin, 10 µM Hypotaurin und 1 µM Epinephrin).

Die Äquilibration sowohl der Wasch- als auch der Fertilisierungstropfen erfolgte mindestens 60 Minuten vorher im Brutschrank.

Tiefgefrier-Sperma eines IVP-getesteten Bullen wurde in 37 °C warmen Wasser zehn Sekunden aufgetaut und in ein äquilibriertes 1,5 ml-Reagiergefäß (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 675 µl 90%igen Sperm-Filter (Fa. Gynotec, B.V., Malden, Niederlande) und 75 µl Fert-TALP gegeben. Zuvor erfolgte das Aufbringen von 10 µl aufgetautem Sperma auf einen vorgewärmten Objektträger und Überdeckung mit einem Deckgläschen. In diesem Nativpräparat wurde der Anteil progressiv motiler Spermien erhoben. Die Zentrifugation (MiniSpin, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) des Reagiergefäßes erfolgte bei 380 g über 16 Minuten. Der entstandene Überstand wurde verworfen, 750 µl Fert-TALP hinzugefügt und mit dem Spermienpellet vorsichtig vermischt. Die folgende Zentrifugation umfasste drei Minuten und ein erneutes Verwerfen des Überstandes. Die dritte und letzte Zentrifugation der Spermien erfolgte mit 750 µl Fert-TALP-Gebrauchslösung. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen und das Spermienpellet durchmischt. Es folgte die Entnahme von 10 µl und Überführung in ein Reagiergefäß mit 490 µl Wasser. Aus diesem Gemisch wurden ca. 20 µl in eine Thoma-Zählkammer (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verbracht und unter einem Lichtmikroskop (Leica DM 750, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) die Dichte bestimmt sowie in einem weiteren Nativpräparat erneut die Motilität beurteilt.

Die dichteabhängige Zugabe weniger Mikroliter Spermien suspension zu den Fert-TALP-Gebrauchslösungs-Tropfen erfolgte 23 bis 24 Stunden nach Maturationsbeginn. Ziel war es, eine Anzahl

von 100 000 Spermien pro Tropfen zu erreichen, beziehungsweise eine Dichte von 1 Million Spermien pro ml Gebrauchslösung.

Die Ko-Kultivierung von Spermien und KOK erfolgte für 18 - 19 Stunden bei 39 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank unter feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

3.1.5 In-vitro-Kultivierung

Die KOK wurden in Gruppen zu 20 - 40 nach ca. 19 Stunden in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml 37 °C warmen TCM-Air verbracht. Die Entfernung des Kumulus erfolgte mechanisch unter einem Stereomikroskop: durch wiederholtes Aufziehen und Ausstoßen der KOK in einer 135 µm durchmessenden Pipetten-Spitze (Fa. Gynemed GmbH, Sierksdorf, Deutschland) einer Mikro-Pipette (Fa. Research Instruments Ltd., Falmouth, Großbritannien) so lange, bis die umhüllenden Kumuluszellen gänzlich abgestreift waren. Anschließend wurden die vermeintlichen Zygoten durch einen TCM-Air-Tropfen und dreimal durch 80 µl-Synthetic Oviductal Fluid-Tropfen (mit Aminosäuren, engl. amino acids, aa; SOFaa; mit Silikonöl überschichtet) gewaschen. Es folgte die Kultivierung der denudierten, vermeintlichen Zygoten in Sechser-Gruppen in SOF-aa-Tropfen à 30 µl im Brutschrank bei 5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂ und 39 °C unter feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre für acht Tage. Die Wasch- und Kultivierungstropfen wurden vor Gebrauch mindestens eine Stunde bei vorgenannten Bedingungen äquilibriert.

3.2 Spermienfärbung

Die Färbungen der Spermien wurden nach der Aufbereitung des TG-Spermas im Rahmen der IVF durchgeführt. Abbildung 3 verdeutlicht den zeitlichen Ablauf.

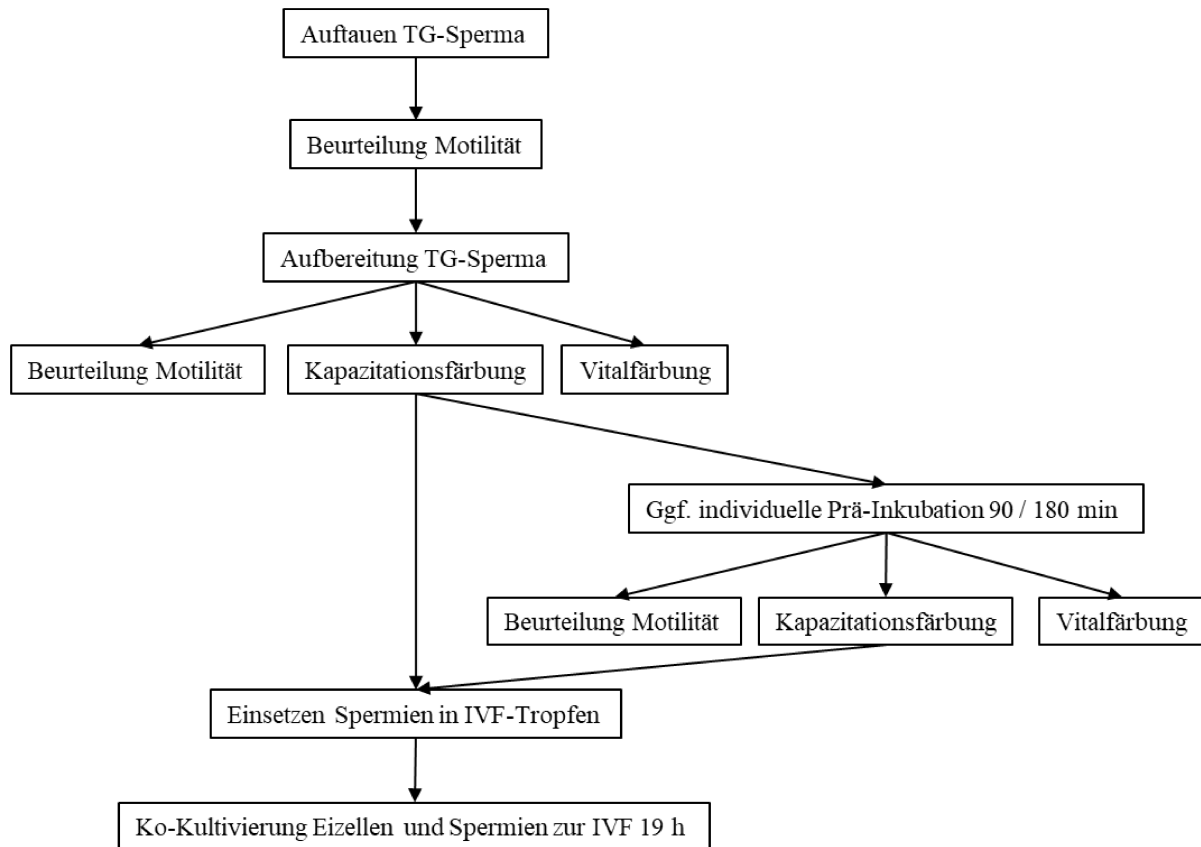


Abbildung 3: Abfolge der Arbeitsschritte zur Behandlung der Spermien

3.2.1 Kapazitationsfärbung (Chlortetracyclin-Fluoreszenz-Assay)

Diese Kapazitationsfärbung (WARD & STOREY, 1984) nutzt das Antibiotikum Chlortetracyclin, welches un-, kapazitierte und akrosom-reagierte Spermien unterscheidbar unter dem Fluoreszenzmikroskop anfärbt.

Die Chlortetracyclin-Arbeitslösung setzte sich aus mehreren Stammlösungen zusammen: je 5 ml einer 500 μ M Chlortetracyclin-Lösung, 200 mM Tris-Lösung, 5 mM L-Cystein-Lösung und 130 mM NaCl-Lösung. Die Arbeitslösung wurde auf pH 7,8 eingestellt und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Die Überführung von 20 μ l der aufbereiteten Spermien-Suspension erfolgte in ein 1,5 ml-Reagiergefäß mit 500 μ l 38 °C warmen und BSA-freien TCM-Air. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 380 g und die Abnahme von 400 μ l Überstand. Zwanzig μ l des Spermienpellets wurden mit 20 μ l der Chlortetracyclin-Arbeitslösung auf einem Objektträger für 10 Sekunden gemischt und 2 μ l 1%iges Glutaraldehyd hinzugegeben. Daraufhin erfolgte der Ausstrich des Gemischs auf einem Objektträger, eine kurze Lufttrocknung und anschließend lichtgeschützte Aufbewahrung bis zur Auswertung. Unter dem Durchlichtmikroskop (Olympus IX73, Fa. Olympus, Hamburg Deutschland) mit zugehöriger

Fluoreszenz-Lampe (Olympus U-HGLGPS, Fa. Olympus, Hamburg Deutschland) wurden bei einer Wellenlänge von 365 - 470 nm in der 20er-Vergrößerung 150 Spermien ausgewertet.

Bei unkapazitierten Spermien fluoreszierte der ganze Kopf, kapazitierte Spermien zeigten in der postakrosomalen Region Fluoreszenzverluste und akrosom-reagierte Spermienköpfe wiesen bis auf ein dünnes Band in der Äquatorialregion nahezu keine Fluoreszenz auf. Abbildung 4 zeigt zwei gänzlich fluoreszierende, unkapazitierte Spermien und ein kapazitiertes Spermium mit Fluoreszenzverlust.



Abbildung 4: Beispielbild der Kapazitationsfärbung mit CTC

3.2.2 Vital-Färbung (Eosin B-Färbung)

Eosin färbt basische beziehungsweise acidophile Zellstrukturen an, insbesondere Anteile des Zytoplasmas. Dies geschieht nur bei toten Zellen, da deren Zellmembran für Eosin permeabel ist.

Zur Herstellung der Eosin-Färbelösung erfolgte die Zugabe von 2 g Eosin B (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 3 g Natriumcitrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zu 100 ml Aqua dest. mit einem anschließenden Filtrationsvorgang und einer Lagerung bei 4 °C.

Für den Ausstrich wurden 10 µl Spermien suspension und 10 µl Eosin-Färbelösung auf einen entfetteten Objektträger aufgebracht, vermischt und sofort ausgestrichen.

Unter dem Lichtmikroskop folgte die Auswertung von 200 Spermien bei 40-facher Vergrößerung, hierbei wurden rot angefärbte Spermien-Köpfe als tot und nicht angefärbte, helle Spermien-Köpfe als lebend angenommen. In Abbildung 5 ist ein lebendes, ungefärbtes, Spermium zu sehen sowie zwei rot gefärbte, tote Spermien.



Abbildung 5: Beispielbild Vital-Färbung Spermien mit Eosin B

3.3 Vorkernfärbung der Oozyten

Zur Verlaufskontrolle der Fertilisation, also dem Nachweis eines eingedrungenen Spermiums in der Oozyte und erfolgter Vorkern-Bildung, wurde eine Fluoreszenz-Färbung mit einem Bisbenzimid, Hoechst 33342, eingesetzt. Es diffundiert aufgrund lipophiler Eigenschaften durch die Zellmembran und bindet an AT-reiche Anteile doppelsträngiger DNA; mit ultraviolettem Licht in einem Wellenlängenbereich um 350 nm angeregt, fluoresziert es blau.

Für die Erstellung einer Stock-Lösung wurden 2 mg Hoechst 33342 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 1 ml Aqua bidest gelöst, dies ergab eine Konzentration von 0,2 %. Es folgte das Aliquotieren der Lösung zu je 10 µl in 0,5 ml-Reagiergefäße und Lagerung bei -20 °C. Vor dem Färbeschritt wurde ein Aliquot aufgetaut und 198 µl PBS-PVA hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 0,002 % zu erreichen.

Für die Vorkernfärbung erfolgte die Entnahme der KOK 19 Stunden nach Zugabe der Spermien. Es schlossen sich drei Waschschrte in 38 °C warmen 100 µl-TCM-Air-Tropfen und drei in 100 µl PBS-Polyvinylalkohol (PVA)-Tropfen (0,1 %) an. Die PBS-PVA-Lösung diente als Wasch- und Stabilisierungslösung, hergestellt aus 10 mg PVA, gelöst in 100 ml PBS.

Die Eizellen wurden mechanisch entkumuliert und für drei Minuten in 100 µl-Tropfen 0,002 %igen Bisbenzimid bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Anschließend folgten drei weitere Waschschrte in PBS-PVA, die Eizellen wurden auf einen entfetteten Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop, mittels des DAPI-Filters leuchteten die Vorkerne, Polkörperchen und eventuell vorhandene intrazytoplasmatische Spermienköpfe blau. Abbildung 6 stellt eine befruchtete Zygote mit zwei zentral fluoreszierenden

Vorkernen und zwei peripher ausgeschleusten Polkörperchen dar. Die Fertilisationsrate ergab sich aus der Anzahl befruchteter Zygoten im Verhältnis zu den gesamt gefärbten Zygoten.

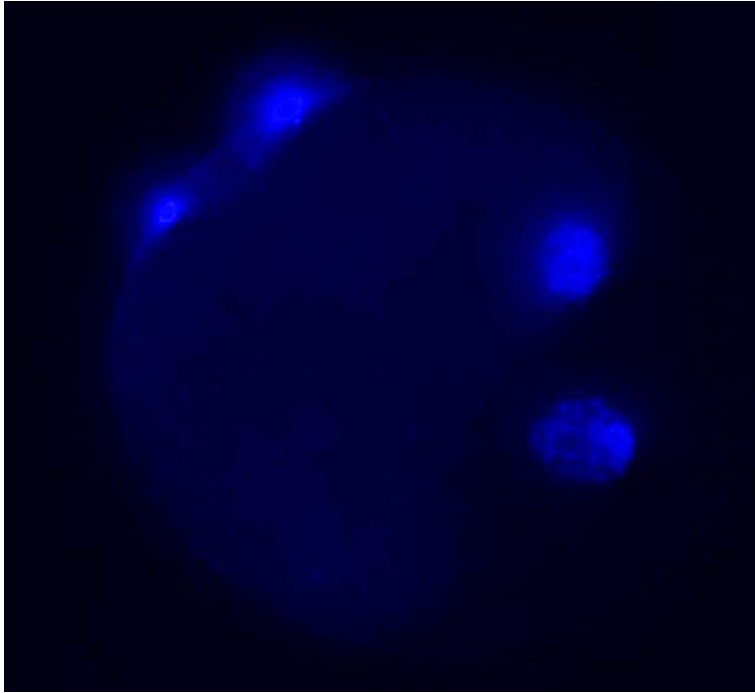


Abbildung 6: Beispielbild der Vorkernfärbung

3.4 Erhebung der Teilungs- und Entwicklungsraten

Die Teilungs- und Entwicklungsraten wurden sieben und acht Tage nach IVF stereomikroskopisch auf einer Wärmeplatte erhoben (Tag der IVF entspricht Tag 0). Die Anzahl mindestens einmal geteilter Embryonen wird den in die Kultivierung eingesetzten Zygoten gegenübergestellt und ergibt die Teilungsrate. Für die Entwicklungsrate wurden alle Embryonen berücksichtigt, die mindestens das Stadium der Morula erreicht haben und ebenfalls zu der Zahl eingesetzter Zygoten in Relation gesetzt. Hierzu zählen also auch frühe Blastozysten, Blastozysten, expandierte Blastozysten, schlüpfende und geschlüpfte Blastozysten. Für die einzelnen Embryonalstadien wurden dann außerdem separate Raten in Bezug zu den Zygoten berechnet, um einen Einfluss der Prä-Inkubation auf die Embryonen-Entwicklung beziehungsweise deren Geschwindigkeit zu ermitteln. Abbildung 7 enthält Fotos dreier Embryonalstadien, links eine Morula, mittig eine Blastozyste, rechts eine expandierte Blastozyste.



Abbildung 7: Embryonen nach 8 Tagen Kultivierung

3.5 Lebend-Tot-Färbung der Embryonen

Um die Anteile lebender und toter Zellen zwecks Qualitätsbeurteilung nachzuvollziehen, wurde eine Fluoreszenz-Färbung mit einem Bisbenzimid (Hoechst 33342) und Ethidium-Homodimer eingesetzt. Ethidium-Homodimer kann aufgrund stark positiver Ladung lediglich in membrangeschädigte und tote Zellen eindringen. Es fluoresziert unter UV-Licht mit einer Wellenlänge um 528 nm rot.

Die 0,1 %ige Stocklösung des Ethidium-Homodimers (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde aus 1 mg Ethidium-Homodimer auf 1 ml Aqua bidest hergestellt, in 10 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C in 0,5 ml-Reagiergefäßen gelagert. Vor der Färbung erfolgte das Auftauen eines Aliquots und die Zugabe von 90 μ l PBS-PVA, um eine Endkonzentration von 0,01 % zu erreichen.

Zunächst wurden die Embryonen, Blastozysten und expandierte Blastozysten an Tag 8 der Kultivierung dreimalig durch PBS-PVA (100 μ l-Tropfen) gewaschen und bei 37 °C für 15 Minuten unter Lichtausschluss in 50 μ l Ethidium-Homodimer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte und die Überführung der Embryonen für drei Minuten in 100 μ l 0,002 %iges Hoechst 33342. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS-PVA wurden die Embryonen einzeln auf entfettete und angewärmte Objektträger aufgebracht und mit Deckgläschen versehen. Um eine Darstellung der Zellen in annähernd einer Ebene zu erreichen, erfolgte das Auflegen der Deckgläser auf Vaseline-Streifen als Abstandshalter und mithilfe von Kanülen ein vorsichtiges Quetschen der Embryonen unter stereomikroskopischer Sichtkontrolle.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden bei 20- bis 40-facher Vergrößerung und dem DAPI-beziehungsweise dem GFP-Filter Aufnahmen angefertigt, die dann im Anschluss mit der Software CellSensDimension (Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgewertet wurden. Die jeweilige Anzahl toter und lebender Zellen wurde erfasst und zur Gesamtzell-Zahl addiert, sowie die Lebend-Tot-Ratio angegeben über die Division der Zahl lebender durch die Anzahl toter Zellen. Abbildung 8 zeigt eine gefärbte Blastozyste, die lebenden Zellen fluoreszieren blau, die toten Zellen rot.

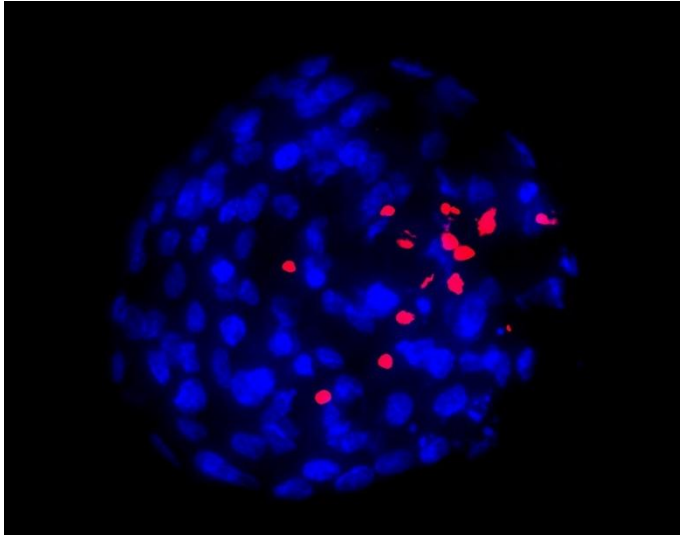


Abbildung 8: Blastozyste mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbt

3.6 Geschlechtsbestimmung via Polymerase-Kettenreaktion (Sexing-PCR)

Zur Geschlechtsbestimmung wurde ein PCR-Verfahren eingesetzt, das ein bovin- und ein Y-Chromosom-spezifisches Primer-Paar nutzte. Die hierfür verwendeten Embryonen, Blastozysten und expandierte Blastozysten, waren einzeln in 15 μ l PBS-PVA-Tropfen in 0,5 ml-Reagiergefäßen bei -80 °C eingelagert.

In einem Durchgang wurden 16 Embryonen, eine männliche und eine weibliche Referenzprobe (männliche bzw. weibliche DNA aus Rinderleber) sowie als Negativ-Kontrolle steriles Wasser (Ampuwa®, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland) analysiert.

Die Aufbereitung der embryonalen DNA erfolgte über das QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). In die Reagiergefäße mit den gefrorenen Embryonen wurden je 25 μ l steriles Wasser gegeben. Zur Freisetzung der DNA erfolgte eine Erhitzung der Reagiergefäße für fünf Minuten auf 95 °C, gefolgt von Lagerung für zwei Minuten auf Eis, und einer Wiederholung der beiden vorangegangenen Schritte. Anschließend wurden je 125 μ l PB-Puffer zugesetzt, durchmischt und auf die QIAquick-Säulen gegeben. Diese enthalten Silikat-Membranen zur Bindung der zuvor freigesetzten DNA, die durch den PB-Puffer noch unterstützt wird. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 17900 g sowie ein Waschschriff mit jeweils 750 μ l PE-Puffer. Danach wurden die Säulen zweimal je eine Minute lang zentrifugiert und in 1,5 ml-Reagiergefäße gesetzt. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von je 30 μ l EB-Puffer, gefolgt von 1 Minute Inkubation, vor einer erneuten Zentrifugation über eine Minute. Die erhaltenen Eluate in den Reagiergefäßen wurden nochmals auf die Säulen gegeben, eine Minute inkubiert, und eine Minute zentrifugiert.

Es folgte die Zugabe von je 10 µl der gewonnenen DNA zu 12,8 µl des Mastermixes und 0,2 µl Taq-Polymerase sowie 27 µl sterilem Wasser. Die Zusammensetzung des Mastermixes (MM), der für alle Proben zusammen angesetzt wurde, ist Tabelle 3 zu entnehmen, die Sequenz der verwendeten Primer befindet sich in Tabelle 4.

Die Negativkontrolle umfasste 37 µl steriles Wasser, die männliche und weibliche Referenzprobe je 0,5 µl DNA und 36,5 µl Wasser, insgesamt waren es also 50 µL pro PCR-Ansatz.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Master-Mixes (MM) für die Sexing-PCR

Komponente	Konzentration	Volumen
10x PCR-Puffer	1x	5 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 l
dNTPs	10 mM	1 µl
Y-Primer (forward und reverse)	10 nM	Je 2,5 µl
Bovin-spezifischer Primer (forward und reverse)	10 nM	Je 0,15 µl

Tabelle 4: Sequenz der verwendeten Primer

Primer	Primer-Sequenz (vom 5'- zum 3'-Ende)	Größe des Amplifikates (bp)	Patent-Nr.
bovin-spezifischer Primer	Forward: AGGTCGCGAGATTGGTCGGTAGGTCATGCA Reverse: AAGACCTCGAGAGACCCTCTTCAACACGT	300	PCT WO 86/07095
Y-Chromosom-spezifischer Primer	Forward: CCTCCCCTTGTTCAAACGCCCGGAATCATT Reverse: TGCTTGACTGCAGGGACCGAGAGGTTTGGG	210	PCT WO 86/07095

Nach einer anfänglichen Denaturierung im Thermo-Cycler (Personal Cycler, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) über 2 Minuten bei 97 °C folgten 36 Wiederholungen der folgenden Einzelschritte:

1. Denaturierung: 30 Sekunden bei 95 °C
 2. Annealing der Primer: 30 Sekunden bei 60 °C
 3. Elongation: 30 Sekunden bei 72 °C
- letzte Elongation 5 Minuten bei 72 °C, dann Abkühlen auf 4 °C.

In der anschließenden Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Amplifikate anhand der Längenunterschiede. Hierzu wurden die Proben nach der PCR in die Taschen eines 2%igen Agarosegels (Fa. Bionline, London, Großbritannien) eingebracht, das sich in Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer, TRIS 89 mM, Borsäure 89 mM, EDTA 2 mM; Fa. Carl Roth, Karlsruhe Deutschland) befand. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe Deutschland), welches zwischen den Strängen der DNA interkaliert und unter ultraviolettem Licht fluoresziert. Die angelegte Spannung von 120 Volt wurde für 60 Minuten aufrechterhalten, wodurch die DNA dank negativer Ladung zur positiven Anode wanderte, je kürzer das Amplifikat, desto weiter wandert es. Um die Amplifikate anhand ihrer Länge zuordnen zu können, wurde ein Marker (Gene Ruler 50 bp, Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet, der eine „DNA-Leiter/-Ladder“ bildet, die alle 50 Basenpaare eine Markierung im Gel erzeugt. Mit einem Fluoreszenz-Bildgebungssystem (ChemiDoc XRS, Fa. Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) und zugehöriger Software (Quantity One 4.6.9, Fa. Biorad) erfolgte eine Aufnahme des Gels. Eine beispielhafte Aufnahme enthält Abbildung 9. Männliche Embryonen verfügen über zwei Banden, da sowohl der Primer für den bovin-spezifischen DNA-Abschnitt als auch der für den Y-Chromosom-spezifischen eine Bande erzeugen. Weibliche Embryonen weisen entsprechend nur eine Bande auf.

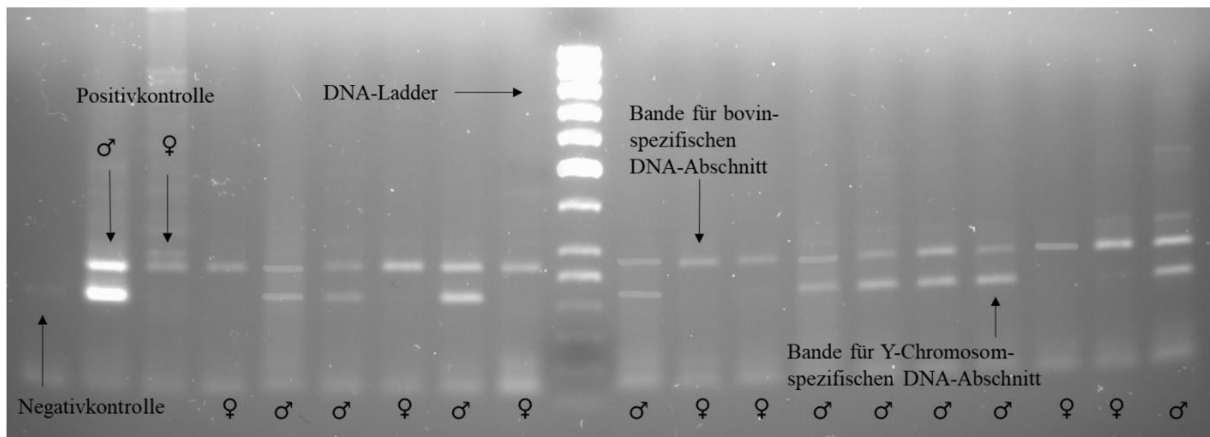


Abbildung 9: Aufnahme eines Gels nach Sexing-PCR

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der SigmaStat 3.5-Software (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Die Daten werden als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (engl. standard deviation, SD) angegeben.

Zunächst wurden alle Daten auf eine Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Testes überprüft. Die Daten wurden dann per t-Test auf Signifikanz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe

untersucht. Unterschiede von $P \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und Unterschiede von bis zu $P \leq 0,07$ als Tendenz. Für die Auswertung des Geschlechterverhältnisses der erzeugten Embryonen wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt, also das jeweilige Geschlechterverhältnis gegen das erwartete Geschlechterverhältnis von 50:50 gerechnet.

Bei der statistischen Überprüfung der Werte der Spermienfärbungen lag keine Normalverteilung der Werte vor. Dies lässt sich mit einer, bis auf vereinzelte Ausreißer, geringen Schwankungsbreite der Einzelwerte erklären. Zur Überprüfung wurde nach den Ergebnissen des t-Tests ein Man-Whitney Rank Sum Test angeschlossen, mit gleichem Ergebnis.

Die Anteile weiter entwickelter Embryonalstadien waren von einer fehlenden Normalverteilung betroffen, dies erklärt sich aus den starken Schwankungen, die die einzelnen Durchgänge bei diesen Entwicklungsstadien aufweisen (ab frühe Blastozyste aufwärts). Von diesen gab es vergleichsweise weniger Stadien als von den früheren, sodass einzelne Embryonen hierbei stärker ins Gewicht fielen und entsprechend hohe Standardabweichungen verursachten. Nach Durchführung des t-Tests schloss sich jeweils ein Man-Whitney Rank Sum Test an, der in keinem Fall ein anderes Ergebnis erbrachte.

3.8 Versuchsaufbau

Für diese Arbeit wurden drei IVP-taugliche Bullen verwendet. In Vorversuchen erfolgte die Ermittlung der Dauer der bullenspezifisch benötigten Prä-Inkubation über die Kapazitations-Färbung (WARD & STOREY, 1984). Hierzu wurden nach Aufbereiten des TG-Spermas über einen Zeitraum von vier Stunden alle 30 Minuten Färbungen durchgeführt, um den Zeitpunkt zu detektieren, an dem der Anteil kapazitierter Spermien größtmöglich ist. Für Bulle A umfasste die Prä-Inkubation 90 Minuten, für die Bullen B und C je 180 Minuten.

Entsprechend dieser Zeitangabe erfolgte die Aufbereitung des TG-Spermas in der Versuchsgruppe vor dem eigentlichen IVF-Schritt und dessen Prä-Inkubation im Brutschrank.

Sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe wurden unmittelbar nach der Aufbereitung des TG-Spermas eine Vital- und eine Kapazitationsfärbung der Spermien durchgeführt, in der Versuchsgruppe zudem nach Ablauf der Prä-Inkubation, kurz vor der Zugabe zu den KOK. Zudem erfolgte die Beurteilung der progressiven Motilität der Spermien nach dem Auftauen, nach der Aufbereitung und nach der Prä-Inkubation unter dem Lichtmikroskop.

Abbildung 10 gibt einen schematischen Überblick über die Abfolge der Arbeitsschritte nachdem die Eizellen aus den Ovarien gewonnen wurden.

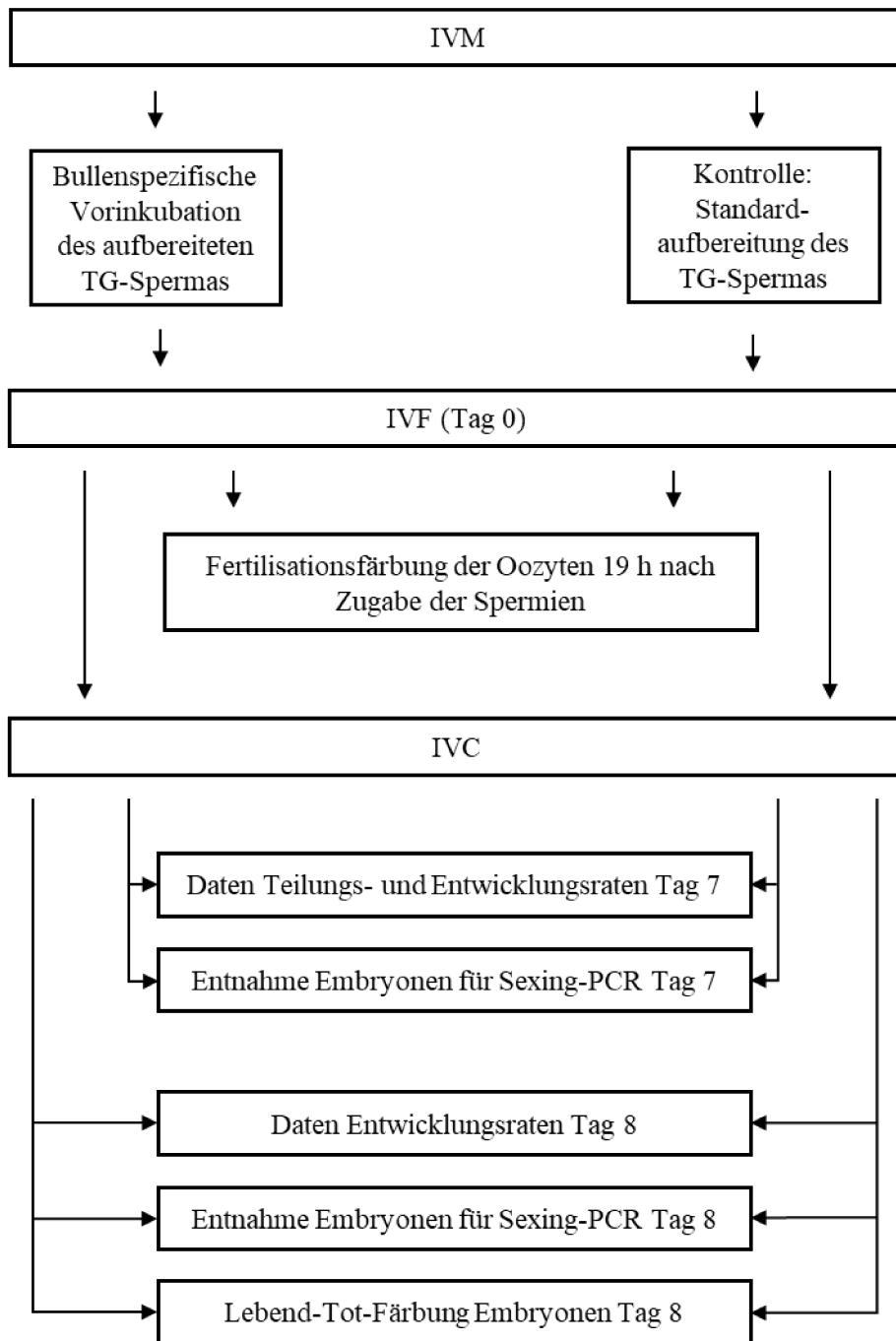


Abbildung 10: Schematischer Versuchsaufbau

4 Ergebnisse

4.1 Erstellung der in vitro produzierten Embryonen

Im IVP-Labor der Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden jede Woche routinemäßig Embryonen erstellt. Die Vorversuche zur Erlernung der Techniken dauerten neun Monate an und die Hauptversuche nahmen zwei Jahre in Anspruch.

Insgesamt wurden 8011 KOK unter Nutzung von Tiefgefrier-Sperma von drei verschiedenen Bullen (A, B, C) in vitro fertilisiert, für jeden Bullen waren es zwischen 20 und 23 Durchgänge. In der Versuchsgruppe wurde das Sperma eines jeden Bullen nach Aufbereitung für eine bullenspezifische Zeit prä-inkubiert, während in der Kontrollgruppe eine weitere Sperma-Portion des selben Bullen erst kurz vor dem IVF-Schritt aufbereitet wurde. Nach 19 Stunden IVF erfolgte die Vorkern-Färbung via Hoechst 33342 an einigen zufällig ausgewählten vermeintlichen Zygoten, um eine Aussage zur erfolgten Fertilisation treffen zu können. Die meisten Zygoten wurden für maximal 8 Tage in vitro kultiviert, an Tag 7 und 8 wurden außerdem Embryonen entnommen und für die Sexing-PCR bei -80 °C tiefgefroren. Zur Qualitätsbeurteilung der Embryonen wurden diese an Tag 8 mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbt, um die Anzahl toter und lebender Zellen zu erheben.

4.2 Ergebnisse der Spermienfärbungen und Nativpräparate

Vor und nach Aufbereitung, sowie in der Versuchsgruppe nach Prä-Inkubation, wurden in einem Nativpräparat die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Hierbei zeigt sich für alle Bullen eine signifikante Abnahme der Motilität nach Prä-Inkubation ($P \leq 0,001$; s. Tabelle 5)

Nach Aufbereitung der Spermien vor dem IVF-Schritt wurden in der Versuchs- und Kontrollgruppe ein Teil der Spermien der Kapazitations-Färbung oder der Vital-Färbung unterzogen, in der Versuchsgruppe nochmals nach Beendigung der Prä-Inkubation vor Zugabe der Spermien zu den KOK. Darüber konnte einerseits der Anteil kapazitierter als auch der Anteil lebender Spermien bestimmt werden. Zum Vorgehen und der Auswertung wird auf das entsprechende Kapitel 3.2 im Material- und Methodenteil verwiesen.

Nach Prä-Inkubation der Spermien im Brutschrank waren bei allen drei Bullen signifikant mehr Spermien kapazitiert als direkt nach Aufbereitung, auch im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Aufbereitung ($P \leq 0,001$). In der Vital-Färbung zeigte sich ein entgegengesetztes Bild für die drei Bullen, nach Prä-Inkubation waren signifikant weniger lebende Spermien nachzuweisen als zuvor oder in der Kontrollgruppe ($P \leq 0,001$). In Tabelle 5 sind die Werte für die beiden Färbungen vor und nach Prä-Inkubation aufgelistet (MW \pm SD, $P \leq 0,001$, a : b, c : d, e : f).

Tabelle 5: Durchschnittswerte der Motilität, Kapazitations-, Vital-Färbung

Vor / nach Prä-Inkubation	Motilität [%]	Kapazitation [%]	Lebend [%]
Bulle A vor	63,0 ± 5,5 ^a	24,9 ± 3,7 ^c	59,8 ± 11,2 ^e
Bulle A nach	28,3 ± 9,8 ^b	31,9 ± 5,4 ^d	26,8 ± 11,4 ^f
Bulle B vor	65,7 ± 3,3 ^a	25,5 ± 3,7 ^c	62,8 ± 7,1 ^e
Bulle B nach	29,0 ± 5,6 ^b	33,3 ± 6,4 ^d	28,6 ± 6,8 ^f
Bulle C vor	64,3 ± 5,2 ^a	25,7 ± 3,1 ^c	59,9 ± 12,7 ^e
Bulle C nach	28,0 ± 7,5 ^b	35,2 ± 8,0 ^d	26,9 ± 9,5 ^f

4.3 Auswertung der Vorkernfärbung

Die mit Hoechst 33342 angefärbten Zygoten wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Zygoten mit zwei Vorkernen und Polkörpern wurden als befruchtet gewertet. Die Fertilisationsrate ergab sich aus der Anzahl befruchteter Zygoten im Verhältnis zu den gesamt gefärbten Zygoten.

Für jeden Bullen wurden zwischen 40 und 50 Zygoten angefärbt, sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe. Die Fertilisationsrate lag für Bulle A bei 70,0 % ± 0,0 in der Versuchsgruppe und bei 70,0 % ± 8,2 in der Kontrolle, für Bulle B in Versuchs- und Kontrollgruppe bei 72,5 % ± 5,0 und für Bulle C bei 68,0 % ± 4,5 nach Präinkubation und ohne bei 66,0 % ± 8,9. Abbildung 11 gibt die Fertilisationsraten der einzelnen Gruppen und Bullen wieder. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden ($P > 0,05$).

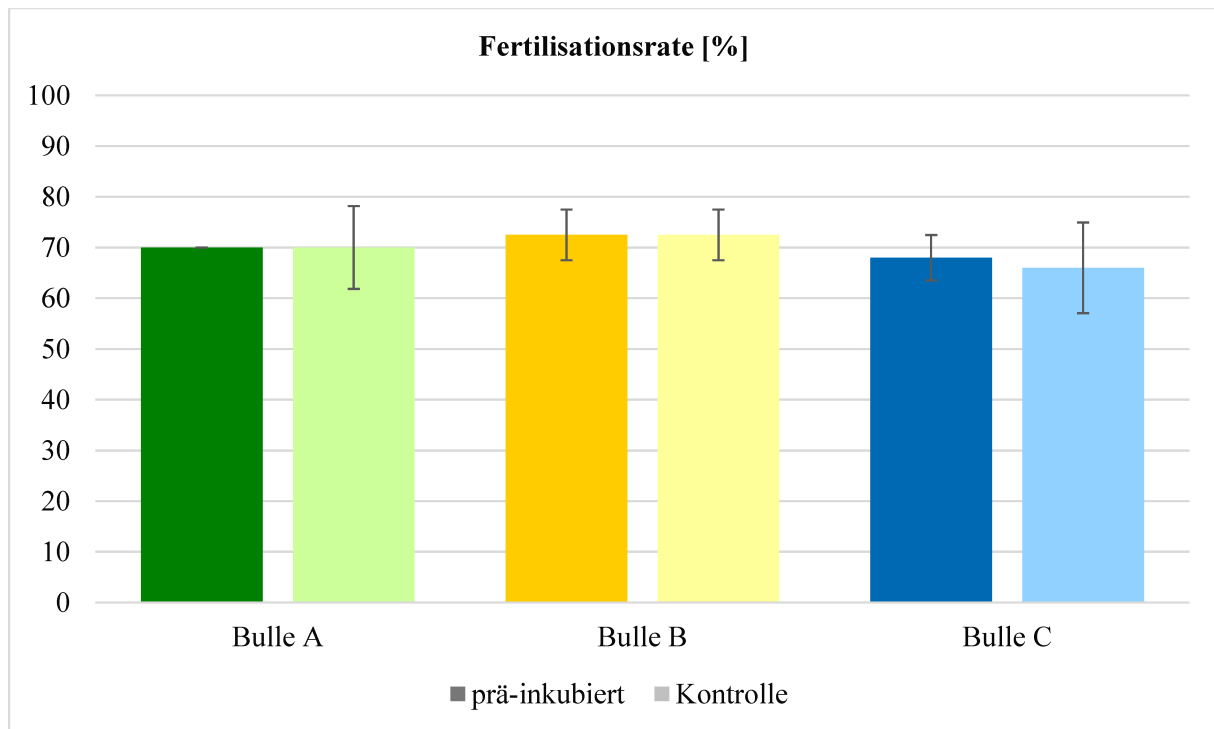


Abbildung 11: Fertilisationsraten der drei Bullen nach IVF mit prä-inkubiertem oder unbehandeltem Sperma der Kontrollgruppe

4.4 Ermittlung der Teilungs- und Entwicklungsraten

Die Teilungs- und Entwicklungsraten wurden sieben und acht Tage nach IVF unter einem Stereomikroskop erhoben. Die Teilungsraten der Embryonen des Bullen A betragen $82,6 \% \pm 6,6$ und $77,8 \% \pm 7,5$ für die prä-inkubierte und die Kontrollgruppe, die damit signifikant niedriger war ($P \leq 0,05$). Für den Bullen B ergaben sich je $73,3 \% \pm 7,9$ und $76,3 \% \pm 9,4$ und für den Bullen C je $69,8 \% \pm 12,1$ und $75,4 \% \pm 8,6$. Damit zeigten sich für die letzten beiden Bullen keine Signifikanzen zwischen den Gruppen ($P > 0,05$). Abbildung 12 fasst die Teilungsraten der drei Bullen zusammen (a : b, $P \leq 0,05$).

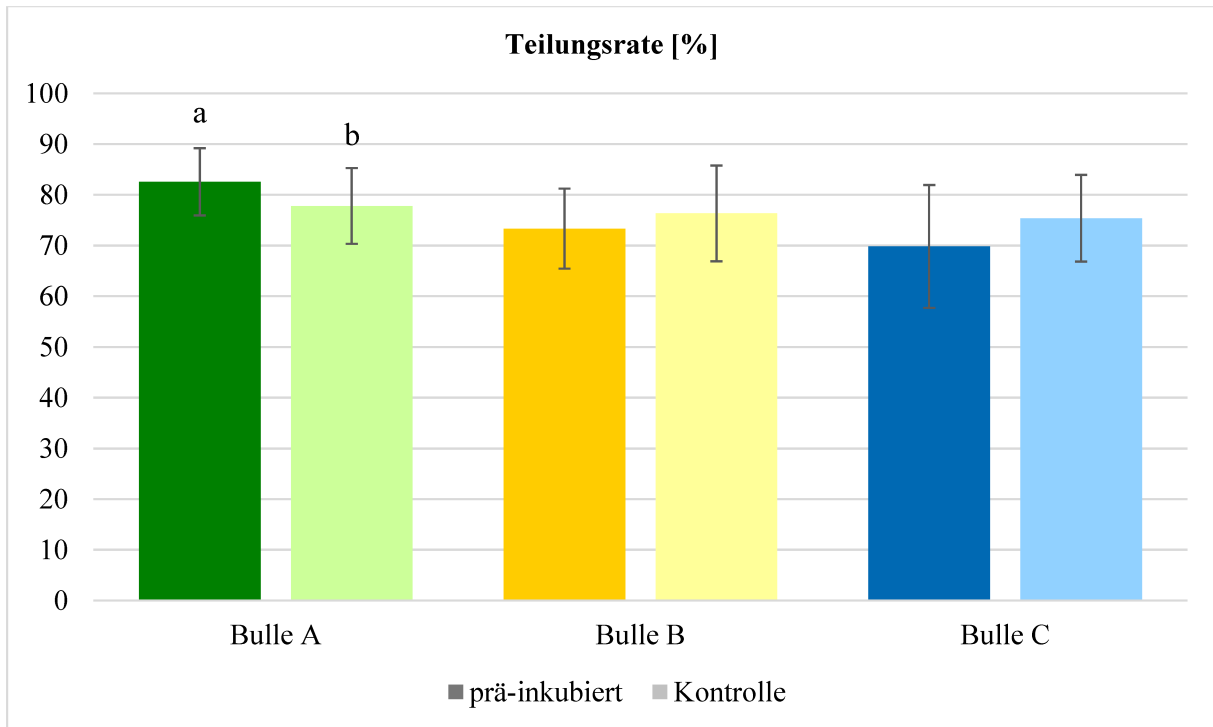


Abbildung 12: Teilungsraten der drei Bullen nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation

Als Entwicklungsrate wurden in der Versuchsgruppe des Bullen A $28,9 \% \pm 10,7$ und in der Kontrolle $27,1 \% \pm 12,9$ erreicht, bei Bulle B $25,6 \% \pm 8,2$ und $27,5 \% \pm 11,0$ und bei Bulle C Entwicklungsraten von $24,2 \% \pm 9,4$ und $27,0 \% \pm 8,7$. Keine dieser Raten wies signifikante Unterschiede auf ($P > 0,05$). Abbildung 13 zeigt die Entwicklungsraten aller Bullen im Vergleich.

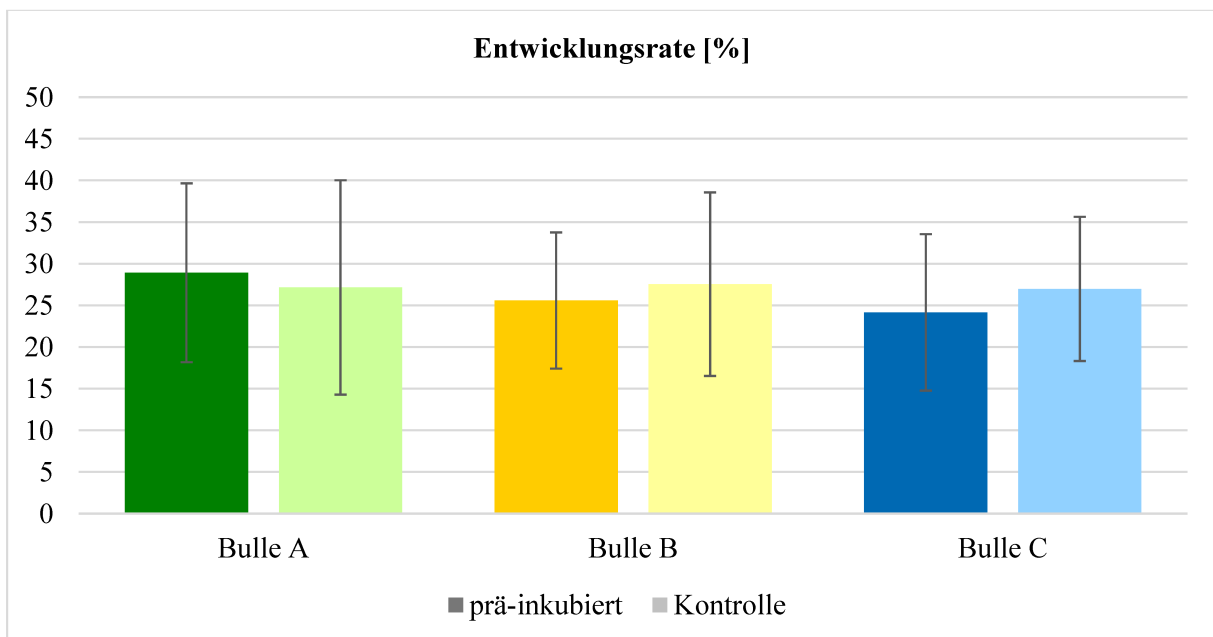


Abbildung 13: Entwicklungsraten der drei Bullen nach IVF mit prä-inkubierten oder unbehandelten Spermien der Kontrolle

Für den Bullen B ergaben sich an Tag 7 für das Entwicklungsstadium der Morula mit $13,0 \% \pm 7,0$ in der Versuchsgruppe signifikant mehr Stadien dieses Entwicklungsstandes als in der Kontrollgruppe mit $8,9 \% \pm 5,4$ ($P \leq 0,05$). Die Anzahl schlüpfender Blastozysten in der Versuchsgruppe des Bullen A war an Tag 7 signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($0,6 \% \pm 1,3$ vs. $0,0 \% \pm 0,0$, $P \leq 0,05$). Der umgekehrte Fall galt für die schlüpfenden Blastozysten des Bullen C, die Gruppe nach Prä-Inkubation zeigte signifikant weniger dieser Stadien an Tag 7 als die Kontrolle ($0,0 \% \pm 0,0$ vs. $0,6 \% \pm 1,3$, $P \leq 0,05$). Abbildung 14 gibt die Ergebnisse der genannten Entwicklungsstadien wieder (a : b, c : d, e : f $P \leq 0,05$).

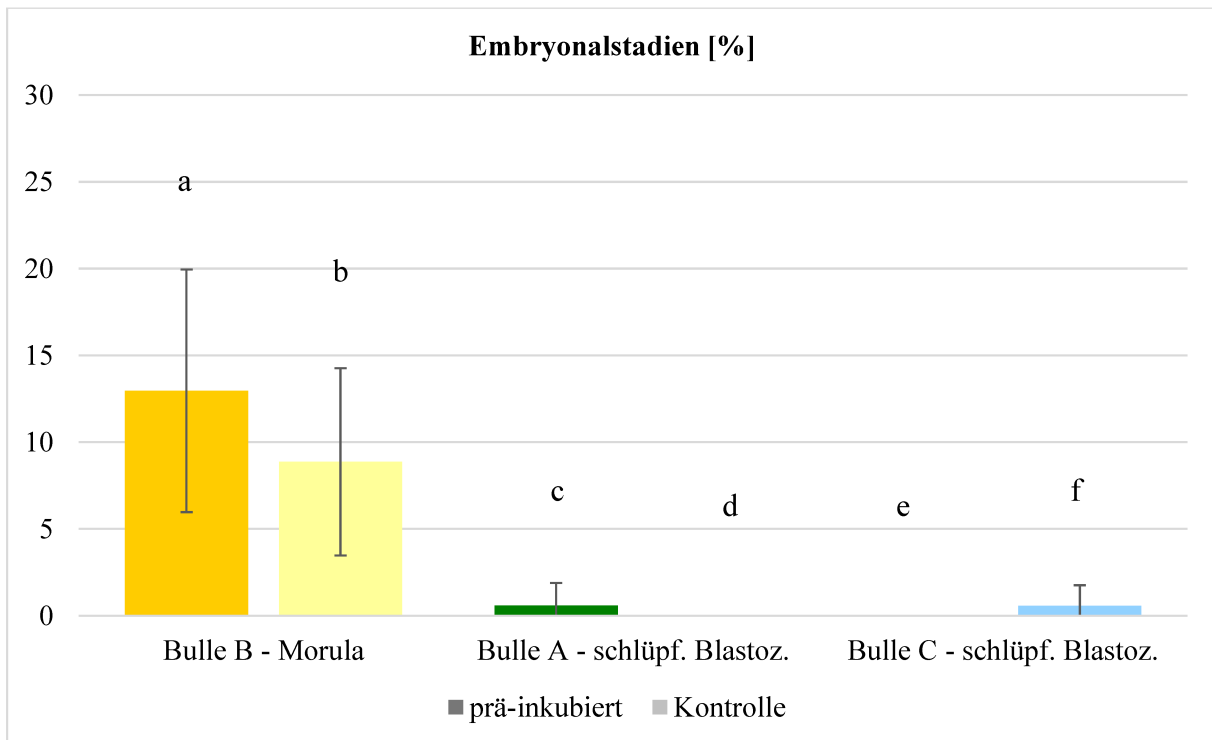


Abbildung 14: Anteil ausgewählter Embryonalstadien nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation

4.5 Resultate der Lebend-Tot-Färbung

Blastozysten und expandierte Blastozysten wurden an Tag 8 mit Hoechst 33342 und Ethidiumhomodimer angefärbt. In jeder Gruppe der jeweiligen Bullen wurden zwischen 26 und 39 Embryonen ausgewertet. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung der erzeugten Embryonen nach IVF mit oder ohne prä-inkubiertes Spermia (+/-) gibt Tabelle 6 (MW ± SD).

Tabelle 6: Durchschnittswerte der Lebend-Tot-Färbung der Embryonen an Tag 8 nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation der Spermien

mit/ohne Prä-Inkubation (+/-)	Blastozysten				expandierte Blastozysten			
	Lebende Zellen [n]	Tote Zellen [n]	Gesamt [n]	Ratio	Lebende Zellen [n]	Tote Zellen [n]	Gesamt [n]	Ratio
Bulle A +	71,4 ±	8,0 ±	79,4 ±	9,4 ±	105,8 ±	5,7 ±	111,4 ±	22,0 ±
	10,7	1,7	10,4	2,8	18,4	2,3	18,6	10,0
Bulle A -	71,0 ±	7,0 ±	78,0 ±	11,5 ±	107,0 ±	5,7 ±	112,7 ±	22,2 ±
	13,4	2,2	12,8	5,5	19,6	2,3	20,0	10,6
Bulle B +	67,9 ±	8,9 ±	76,8 ±	8,9 ±	101,7 ±	6,2 ±	107,8 ±	19,0 ±
	7,4	3,3	7,8	4,1	12,8	2,0	12,4	9,1
Bulle B -	70,7 ±	8,2 ±	78,8 ±	10,0 ±	94,8 ±	5,3 ±	100,1 ±	21,5 ±
	6,2	2,6	5,9	4,7	15,2	2,0	15,6	10,9
Bulle C +	70,7 ±	9,7 ±	80,3 ±	8,0 ±	107,7 ±	6,1 ±	113,7 ±	20,0 ±
	7,1	2,6	5,6	3,0	20,4	2,0	20,2	8,3
Bulle C -	70,2 ±	7,4 ±	77,7 ±	12,5 ±	109,7 ±	5,8 ±	115,5 ±	23,0 ±
	11,7	3,4	12,2	8,3	18,1	2,5	17,4	11,2

Es ergaben sich für keinen der erhobenen Werte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($P > 0,05$).

4.6 Erhebung des Geschlechterverhältnisses der in vitro produzierten Embryonen

Mithilfe der Sexing-PCR wurden die Geschlechter der Embryonen bestimmt. Hierfür waren an Tag 7 und 8 Blastozysten und expandierte Blastozysten bei -80 °C bis zur PCR-Analyse eingefroren worden. Zwischen 13 und 27 Embryonen wurden je Gruppe für jeden Bullen ausgewertet. Grundsätzlich wird ein Geschlechterverhältnis von 50:50 erwartet.

Lediglich die Embryonen aus den Gruppen von Bulle C wichen nicht signifikant von diesem Verhältnis ab ($45,5\text{ ♀} : 54,5\text{ ♂}$ vs. $42,3\text{ ♀} : 57,7\text{ ♂}$, $P > 0,05$), dargestellt in Abbildung 15. Interessanterweise traf dies in der Kontrolle nur zu, wenn alle Embryonen betrachtet wurden, in den Untergruppen bestand ansonsten eine Verschiebung zu mehr männlichen Embryonen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass tendenziell das Geschlechterverhältnis der Versuchsgruppe ausgeglichener war als in der Kontrolle. Signifikant war dieser Effekt bei den an Tag 8 analysierten Embryonen, also Blastozysten und

expandierten Blastozysten (41,7 ♀: 58,3 ♂ vs. 9,0 ♀: 91,0 ♂, $P \leq 0,001$). Gleiches galt für die Blastozysten von Bulle C, entnommen an Tag 7 und 8 (50,0 ♀: 50,0 ♂ vs. 10,0 ♀: 90,0 ♂, $P \leq 0,001$).

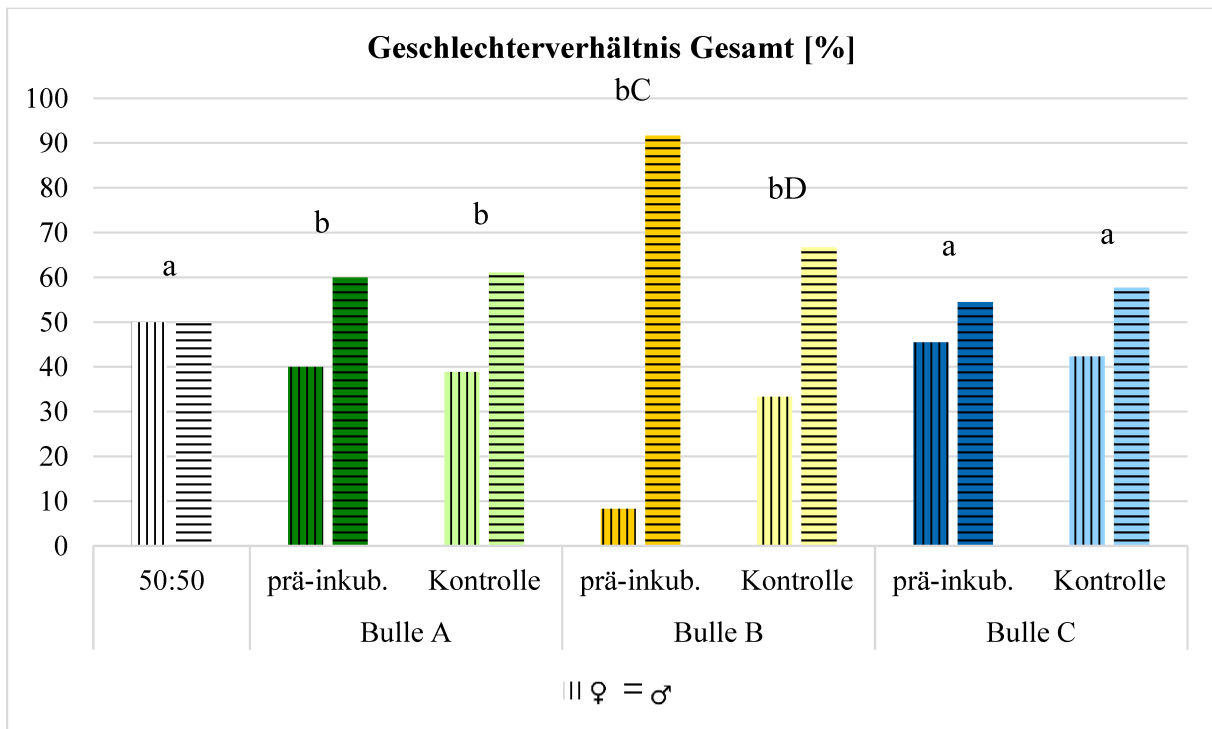


Abbildung 15: Geschlechterverhältnisse aller Embryonen der drei Bullen, nach IVF mit prä-inkubierten oder Spermien der Kontrollgruppe

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse des Bullen B, bei dem insgesamt deutlich mehr männliche Embryonen nachgewiesen wurden, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit. Bei diesem Bullen verstärkte sich diese Verschiebung Richtung männlich in der Gruppe mit vorinkubierten Spermien noch (8,3 ♀: 91,7 ♂ vs. 33,3 ♀: 66,7 ♂, $P \leq 0,01$). Abbildung 15 gibt das Geschlechterverhältnis aller Embryonen von Bulle B zusammengefasst wieder ($a : b, C : D, P \leq 0,01$). Die verstärkte Verschiebung traf auch zu, wenn nur das Geschlechterverhältnis der expandierten Blastozysten, entnommen an Tag 7 und 8, betrachtet wurde (7,1 ♀: 92,9 ♂ vs. 43,7 ♀: 56,3 ♂, $P \leq 0,01$). Ebenso waren mehr Embryonen, die an Tag 7 entnommen wurden (Blastozysten und expandierte Blastozysten) nach Prä-Inkubation des Spermias männlich (0,0 ♀: 100,0 ♂ vs. 46,7 ♀: 53,3 ♂, $P \leq 0,01$).

Zwischen den Gruppen fertilisiert mit Sperma von Bulle A bestanden keine signifikanten Unterschiede. Allerdings sind auch bei diesem Bullen insgesamt deutlich weniger weibliche Embryonen nachgewiesen worden (40,0 ♀: 60,0 ♂ vs. 38,9 ♀: 61,1 ♂, s. Abbildung 15, $a : b, C : D, P \leq 0,01$). Sowohl bei den an Tag 7 entnommenen Embryonen (50,0 ♀: 50,0 ♂ vs. 55,0 ♀: 44,5 ♂) als auch bei den expandierten Blastozysten von Tag 7 und 8 (45,5 ♀: 54,5 ♂ vs. 40,0 ♀: 60,0 ♂) ist das Geschlechterverhältnis allerdings ausgeglichen ($P > 0,05$).

5 Diskussion

Jeder einzelne Schritt der In-vitro-Produktion (IVP) kann Einfluss auf die Entwicklung und Qualität der resultierenden Embryonen nehmen. Um den Erfolg des verwendeten Systems zu messen, können bezüglich IVM und IVF die Maturations- und Fertilisationsraten verglichen werden (LENZ et al., 1983; LAURINCÍK et al., 1992) sowie die Dynamik und Genexpression der sich teilenden und entwickelnden Embryonen (MASSIP & MULNARD, 1980; RIZOS et al., 2003). Deren Qualität kann über Zellfärbungen, also das Verhältnis toter zu lebender Zellen, und den Anteil schlüpfender und geschlüpfter Blastozysten, beispielsweise nach Auftauen kryokonservierter Embryonen, bestimmt werden (STINSHOFF et al., 2011).

Trotz kontinuierlicher Forschung und Verbesserung der eingesetzten Methoden in der IVP sind in vivo generierte Embryonen den in vitro erzeugten weiterhin überlegen. Dies betrifft die Morphologie und die Entwicklungsdynamik (HOLM & CALLESEN, 1998), die Genexpression, sowie die verringerte Tauglichkeit für die Kryokonservierung (WRENZYCKI et al., 2002; WRENZYCKI & STINSHOFF, 2013).

Die mehrstündige Prä-Inkubation von Spermien vor der In-vitro-Fertilisation (IVF) kann die Kapazitation und Befruchtungsfähigkeit boviner Spermien erhöhen (PARRISH et al., 1988). Dabei können sowohl nach Dauer der Vorinkubation als auch in Abhängigkeit von der IVF-Dauer unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Zur Auswertung wurden die Fertilisations-, Teilungs- und Entwicklungsraten der erzeugten Embryonen in Relation zu den in die In-vitro-Kultivierung (IVC) eingesetzten vermeintlichen Zygoten gesetzt und die Anteile weiter entwickelter Embryonalstadien wie expandierte, schlüpfende und geschlüpfte Blastozyste berechnet. Zudem wurde das jeweilige Geschlechterverhältnis in den Gruppen bestimmt und miteinander, sowie mit dem in vivo ausgeglichenen Anteil weiblicher und männlicher Embryonen verglichen (KOCHHAR et al., 2003; LECHNIAK et al., 2003; IWATA et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde TG-Sperma von drei Bullen für eine individuelle Zeitdauer prä-inkubiert und dann zur Befruchtung in vitro gereifter KOK eingesetzt. Um den möglichen Einfluss dieser Behandlung auf die Fertilisation, frühembryonale Entwicklung und das resultierende Geschlechterverhältnis der Embryonen zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter betrachtet: der Anteil erfolgreich fertilisierter Eizellen, die Teilungs- und Entwicklungsraten, das Verhältnis lebender zu toter Zellen in den Embryonen und die Anzahl erzeugter männlicher und weiblicher Embryonen.

5.1 Vorkernfärbung

Mithilfe dieser Färbung werden die Vorkerne der vermeintlichen Zygoten angefärbt und damit eine mögliche Befruchtung im IVF-Schritt nachgewiesen. Prinzipiell könnte es sich auch bei zwei darstellbaren Vorkernen um eine parthenogenetisch aktivierte Eizelle handeln, dies betrifft allerdings nur sehr wenige Eizellen (PLANTE & KING, 1996).

Die ersten penetrierenden Spermien können vier Stunden nach Zugabe zu den Eizellen nachgewiesen werden, nach 16 Stunden IVF-Dauer haben die Spermien den überwiegenden Teil der Eizellen penetriert (XU & GREVE, 1988). Die ersten Vorkerne sind jedoch schon nach acht Stunden sichtbar (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989) und die meisten Zygoten weisen nach ca. 17 Stunden zwei Vorkerne auf (LAURINCÍK et al., 1998).

Die Ergebnisse der Vorkernfärbung wiesen für die Embryonen der einzelnen Bullen keine Unterschiede zwischen der prä-inkubierten Gruppe und der Kontrolle auf und lagen zwischen $66,0\% \pm 8,9$ und $72,5\% \pm 5$ ($P > 0,05$). Dies ist vergleichbar mit anderen Arbeiten, die ebenfalls Fertilisationsraten um die 70 % nachweisen konnten (KANG et al., 2015), allerdings sind auch Raten bis an die 90 % möglich (WARD et al., 2003; ALOMAR et al., 2008). In einer Arbeit mit fünfstündigem IVF reduzierte sich die Ausbildung der Vorkerne von 71 auf 65 %, wenn die Spermien vor IVF eine Stunde inkubiert wurden (IWATA et al., 2008). Dies zeigte sich in der aktuellen Arbeit nicht, da die Vor-Inkubation der Spermien keinen signifikanten Unterschied in der Fertilisationsrate aufwies.

Grundsätzlich unterscheiden sich einzelne Bullen in der Fähigkeit, Eizellen zu befruchten (PARRISH et al., 1986; KROETSCH & STUBBINGS, 1992). Bullen mit einer hohen Non-Return-Rate, also guter Fruchtbarkeit in vivo, zeigen oft auch bessere Befruchtungseigenschaften in vitro, allerdings scheint dies nicht zwingend einen Unterschied in der weiteren embryonalen Entwicklung zu machen (AL NAIB et al., 2011), in anderen Arbeiten hingegen schon (ORTEGA et al., 2018). Auch die Schnelligkeit der Penetration und die Anzahl penetrierter Eizellen im IVF liegt bei Bullen mit höherer Fertilität im Feld über den Bullen mit schlechterer (WARD et al., 2002). Andererseits gibt es im Vergleich von Bullen mit guter Fertilität in vitro unterschiedliche Verläufe der Penetration während des IVF, die endgültigen Fertilisationsraten sind dann aber gleich (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). Bei der Verwendung von Sperma unterschiedlich fertiler Bullen in der IVF zeigen sich bullenabhängige Unterschiede in der Ausprägung des Zentrosoms, der Mikrotubuli und der Spindel in der befruchteten Eizelle. Die beteiligten Strukturen sind bei Bullen mit höherer Non-Return- und Entwicklungsrate in vitro größer, nehmen aber keinen Einfluss auf die Teilungsrate (NAVARA et al., 1996). Die in dieser Arbeit verwendeten Bullen wiesen Non-Return-Raten auf 56 Tage gerechnet zwischen 49 und 58 % auf. Dies sind eher mittlere bis niedrige Werte, jedoch waren die drei Bullen primär auf ihre Fähigkeit selektiert worden, gute Raten in IVF und IVC zu erzielen.

Dabei zeigt sich eine Varianz der Fertilisationsrate pro Bulle auch in Abhängigkeit von der verwendeten Heparin-Dosis während der Kapazitation (MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1990; SAEKI et al.,

1995). In der gleichen Arbeit konnte zudem eine schwankende Fruchtbarkeit zwischen unterschiedlichen Ejakulaten festgestellt werden. Bei Veränderung der eingesetzten Spermien-Dichte verändert sich proportional auch der Befruchtungserfolg *in vitro*, allerdings mit dem Risiko zunehmender Polyspermie (WARD et al., 2003). Wird bei der Verwendung der Dichtegradienten-Zentrifugation während der Spermien-Aufbereitung die Umdrehungs-Zahl und damit die Zentripetalkraft gesenkt, sinken die reaktive Sauerstoffspezies-Konzentrationen (reactive oxygen species, ROS) in den Spermien und die Befruchtungsrate nimmt zu (GUIMARÃES et al., 2014). Die verwendete Heparin-Dosis und die Aufbereitung der Spermien blieb für alle drei Bullen in den Versuchen gleich.

5.2 Teilungs- und Entwicklungsraten

Die Teilungsrate für die Embryonen der prä-inkubierten Gruppe des Bullen A war signifikant höher als in der Kontrolle, in der das Sperma vor der IVF nicht prä-inkubiert worden war ($82,6 \% \pm 6,6$ vs. $77,8 \% \pm 7,5$, $P \leq 0,05$). Dieses Ergebnis eines einzelnen Bullen entspricht einer anderen Arbeit, bei der die einstündige Vorinkubation einen verbessernden Effekt auf die Teilungsrate, aber einen verschlechternden auf die Fertilisationsrate hat. Im Unterschied zu den hier vorliegenden Versuchen wurde in der betreffenden Arbeit die IVF für fünf statt für 18-19 Stunden durchgeführt, dafür betrug die Prä-Inkubationszeit für Bulle A 90 statt 60 min (IWATA et al., 2008). Es könnte sein, dass die Befruchtung durch den hohen Anteil kapazitierter Spermien, die von Bulle A nach der Vorinkubation zu den Eizellen gegeben wurden, schneller stattfinden konnte, und sich dadurch mehr geteilte Embryonalstadien nachweisen ließen. In einer der ersten Arbeiten mit Heparinzusatz zu TG-Sperma wurde nur eine 15-minütige Inkubation vor der IVF angewandt, ausdrücklich nicht, um die Kapazitation hervorzurufen, sondern dies ausschließlich über die Heparin-Zugabe zu erreichen (PARRISH et al., 1986). Mit frisch ejakuliertem Sperma hingegen wurden die meisten Eizellen befruchtet, wenn die Spermien mit Heparin-Zusatz vier Stunden inkubiert, kapazitiert und dann zur IVF eingesetzt wurden (PARRISH et al., 1988).

Sowohl die Entwicklungsraten für Bulle A als auch die Teilungs- und Entwicklungsraten an Tag 7 und 8 der anderen Bullen unterschieden sich nicht zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (TR $69,8\%$ - $77,8\%$ ER d7 $19,7\%$ - $23,9\%$, ER d8 $24,2\%$ - $28,9\%$, $P > 0,05$). Die erzielten Raten sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten ohne prä-inkubierte Spermien im IVF, die Teilungsraten zwischen 70 und 80% angeben und Entwicklungsraten zwischen 20 und 40% (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996; KHURANA & NIEMANN, 2000; RIZOS et al., 2003). In einer Arbeit mit dreistündiger Prä-Inkubation vor der IVF wurden ebenfalls in den Teilungs- und Entwicklungsraten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (KOCHHAR et al., 2003). Der Vergleich von drei Gruppen, ohne,

mit sechsständiger oder eintägiger Vorinkubation, erbringt für die ersten beiden keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl geteilter und weiterentwickelter Embryonalstadien, vergleichbar zur vorliegenden Arbeit. Allerdings sind nach IVF mit 24 Stunden prä-inkubiertem Spermia die Teilungs- und Entwicklungsraten um ein Drittel bzw. die Hälfte schlechter als ohne oder mit kürzerer Inkubation (LECHNIAK et al., 2003). Eine Ursache hierfür könnte eine Zunahme von ROS und damit von oxidativem Stress und DNA-Schäden sein, dem die Spermien in der Prä-Inkubation ausgesetzt sind (GUALTIERI et al., 2014; GÜRLER et al., 2016).

Für Bulle A waren an Tag 7 sowohl mehr Morulae als auch mehr schlüpfende Blastozysten in der Gruppe nachzuweisen, die das IVF mit prä-inkubierten Spermien beinhaltete (Morulae $13,0 \% \pm 7,0$ vs. $8,9 \% \pm 5,4$ und schlüpfende Blastozysten $0,6 \% \pm 1,3$ vs. $0,0\% \pm 0,0$, $P \leq 0,05$). Für Bulle C stellte sich die Situation bei den schlüpfenden Blastozysten genau umgekehrt dar, die Kontrollgruppe enthielt mehr Embryonen dieses Stadiums ($0,0 \% \pm 0,0$ vs. $0,6 \% \pm 1,3$, $\leq 0,05$). Bei beiden Bullen lag für die Anteile der schlüpfenden Blastozysten keine Normalverteilung vor, diese ist durch die geringe und stark schwankende Anzahl des betreffenden Embryonalstadiums zu erklären. Denkbar ist, dass erneut bei Bulle A über die Vorinkubation der höhere Anteil kapazitierter Spermien, nach gegebenenfalls schnellerer Befruchtung, eine gleichfalls schnellere Embryonalentwicklung angestoßen hat. Für Bulle C könnten trotz mehr kapazitierter Spermien ein schädigender Einfluss der Prä-Inkubation mit der Entstehung von ROS überwiegen, wobei die Teilungs- und Entwicklungsraten zwischen den Gruppen gleich hoch waren.

Die im IVF verwendeten Bullen können grundsätzlich unterschiedliche Teilungs-, Entwicklungsraten und Embryoqualitäten bedingen (ZHANG et al., 2003; BARCELÓ-FIMBRES et al., 2011). In der Humanmedizin wird zwischen frühen und späten paternalen Effekten auf die Embryonalentwicklung unterschieden. Ersterer wird auf eine fehlerhafte Eizell-Aktivierung durch das Spermium oder abweichende Chromatin-Packung zurückgeführt, wirkt sich jedoch vor der Aktivierung des embryonalen Genoms, zum Teil schon auf die Zygote und Teilungsrate aus (TESARIK et al., 2002). Der späte paternale Effekt wird DNA-Schäden der Spermien zugeschrieben, resultierend in schlechter Embryonalentwicklung und ausbleibenden Schwangerschaften nach Transfer (TESARIK et al., 2004). Eine so explizite Unterscheidung wird beim Bullen nicht betrieben, es werden allerdings verschiedene Einflüsse der väterlichen Seite auf die frühe embryonale Entwicklung diskutiert. Beispielsweise auf den Zeitpunkt der ersten Teilung des Embryos, wobei ein hoher Anteil früh teilender Embryonen mit einer hohen Fruchtbarkeit der Bullen im KB-Einsatz korrelierte (WARD et al., 2001). Beim Vergleich von Bullen mit unterschiedlich guter Fertilität in vitro erbringen Bullen mit guter Fruchtbarkeit nicht nur mehr Embryonen (ZHANG et al., 1997), sondern auch weiterentwickelte, die seltener während der ersten drei Teilungszyklen arretieren. Dabei weisen die Embryonen der weniger fruchtbaren Bullen eine erhöhte Genexpression in Zusammenhang mit DNA-Schäden sowie pro-apoptischen Faktoren auf. Die Embryonen der fertileren Bullen hingegen exprimieren stärker Gene, die positiv mit Transkription und Zellteilung in Verbindung stehen (LOCKHART et al., 2023). In einer anderen Studie zeigten die

Bullen bzw. deren Spermien keinen Einfluss auf die Entwicklungs- oder Teilungsraten, jedoch auf die Gentranskripte der erzeugten Embryonen. Die Embryonen der weniger fruchtbaren Bullen wiesen ebenfalls mehr hochregulierte Gene im Bereich von Apoptose und Zellschädigung auf (ALMEIDA et al., 2022).

Werden Spermien verschiedener Bullen auf bestimmte Eigenschaften hin analysiert wie Motilität vor und nach Dichtegradienten-Zentrifugation, Akrosomen-, Plasmamembran- und Chromatin-Integrität, und in eine Rangfolge abgestuft, dann zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Motilität und den anderen Eigenschaften. Die Selektion auf motile Spermien fördert also auch mehr akrosomen-, membran- und chromatin-intakte Spermien. Dem zuwider läuft das Ergebnis derselben Studie, dass weniger motile oder weniger akrosom-intakte Spermien, die im IVF eingesetzt wurden, bessere Entwicklungsraten bei gleichbleibenden Teilungsraten lieferten (PEREZ SIQUEIRA et al., 2018). Die Autoren vermuten, dass die Spermien mit höherer Motilität und Akrosomen-Integrität während der Kapazitation vermehrt ROS produzieren und damit die spätere embryonale Entwicklung mindern.

Der Einsatz von Spermien mit Zytoplasma-Tröpfchen in der IVF resultiert nicht in schlechteren Teilungs-, Entwicklungs- und Schlupfraten, obwohl die Spermien seltener akrosom-intakt und öfter membrangeschädigt waren und die Tröpfchen einen Marker für eine unzureichende epididymale Reifung darstellen. Vielmehr ergaben sich Unterschiede in den Raten, die auf einzelne Bullen zurückzuführen waren, nicht auf die Spermien-Morphologie (CARREIRA et al., 2012). Im Gegensatz hierzu wurden die Entwicklungs- und Teilungsraten durchaus beeinflusst, wenn Sperma zur IVF genutzt wurde, das von Bullen stammte, die für 48 h einer hohen skrotalen Temperatur ausgesetzt waren. Daraus resultierten nach zwei und drei Wochen Spermien mit unterschiedlich abnormen Kopfmorphologien, die oft mit DNA-Schäden in Verbindung standen. Die Ausprägung der Schädigung variierte zwischen den Bullen, ebenso der zeitliche Verlauf und die Auswirkung auf die embryonale Entwicklung (WALTERS et al., 2005).

Der Einsatz gesexten Spermas kann durch eine angepasste Heparin-Konzentration deutlich unterstützt werden. Hierbei werden bullenabhängig unterschiedliche Heparin-Konzentrationen gefunden, mit denen sich die Entwicklungsraten annähernd auf das Niveau derer mit ungesextem Sperma steigern lassen, diese Konzentration unterscheiden sich zwischen ungesextem und gesextem Sperma (AN et al., 2017). Es wird eine gewisse induzierte Kapazitation durch die flowzytometrische Sortierung der Spermien während des Sexens angenommen, die entsprechend andere Heparin-Konzentrationen voraussetzt, um gute Entwicklungsraten zu erhalten.

5.3 Lebend-Tot-Färbung

Die mit Höchst 33342 und Ethidium-Homodimer angefärbten Embryonen an Tag 8 unterschieden sich in den erhobenen Zellzahlen nicht zwischen der Kontrolle und der Gruppe mit prä-inkubiertem Sperma ($P > 0,05$).

Die Gesamt-Zellzahl für die Blastozysten lag zwischen $76,8 \pm 7,8$ und $80,3 \pm 5,6$, das ist etwas niedriger als in einer Studie, die ebenfalls SOF als Kultivierungsmedium verwendete (86 ± 29), dafür aber fetales Kälberserum statt BSA enthielt (POMAR et al., 2005). Für die expandierten Blastozysten ergaben sich Zellzahlen zwischen $100,1 \pm 15,6$ und $115,5 \pm 17,4$, diese liegen etwas über einer Arbeit, in der $94,7 \pm 33,3$ bis $104,7 \pm 44,4$ Gesamtzellen nachgewiesen wurden, jedoch in abweichenden Kultivierungsmedien, TCM 199 und Menezo B2. Außerdem wurden mehrere Embryonalstadien berücksichtigt, von der Morula bis zur geschlüpften Blastozyste, was einen großen Schwankungsbereich ergibt (VAN SOOM et al., 1996). Eine weitere Arbeit, die SOF in der IVC einsetzte, nutzte dafür entweder fetales Kälberserum oder zwei verschiedene Ersatzpräparate. Unter Berücksichtigung von expandierten und geschlüpften Blastozysten erhielten die Autoren Zellzahlen zwischen $84,0 \pm 8,6$ und $104,1 \pm 107$ (DUQUE et al., 2003), die ebenfalls etwas niedriger waren als die hier vorliegenden.

Die Aufbereitung von TG-Spermien vor der In-vitro-Fertilisation zeigt im Vergleich zwischen der Swim-Up-Methode zu der Dichtegradienten-Zentrifugation, dass letztere sowohl eine Erhöhung der Motilität und anteilig mehr lebende und akrosomintakte Spermien hervorbringt. Die Zellzahl der nach Zentrifugation erzeugten Embryonen ist signifikant höher als nach Swim-up (SAMARDZIJA et al., 2006b). Eine Vermutung der Autoren war, dass mit der Dichtegradienten-Zentrifugation besonders Spermien mit kompaktem Chromatin und unbeschädigter DNA selektiert werden, und damit die Entwicklung von qualitativ besseren Embryonen nach der Befruchtung begünstigen. Beim Vergleich der Aufbereitung von Spermien mit Percoll® oder per Swim-up zeigt sich bullenabhängig eine höhere Zellzahl der Embryonen nach IVF mit Percoll aufgereinigten Spermien als mit Spermien nach Swim-up. Letztere weisen weniger akrosomreagierte Spermien nach Aufbereitung auf und unterscheiden sich in der Membran-Protein-Zusammensetzung (CESARI et al., 2006). Daraus wurde eine Befruchtung mit mehr akrosomreagierten, vitalen Spermien nach Percoll® gefolgert, die qualitativ bessere Embryonen erbringt.

Im Vergleich verschiedener Bullen in der IVF und anschließender Kultivierung der Embryonen wurden weder unterschiedliche Fertilisations- oder Teilungsraten aufgefunden, noch unterschieden sich die Embryonen in der Zellzahl. Lediglich die Entwicklungsrate schwankte zwischen den Bullen (EYESTONE & FIRST, 1989). Werden Bullen unterschiedlicher Fertilität zur Besamung nach Superovulation eingesetzt und die In-vivo-Embryonen sieben Tage später gewonnen, zeigen die Embryonen der fruchtbareren Bullen höhere Zellzahlen als die Embryonen der weniger fertilen Bullen. In einer Studie wurden nach Transfer der Embryonen mehr Trächtigkeiten festgestellt und besser entwickelte Embryonen an Tag 15 (O'CALLAGHAN et al., 2021).

Eine Arbeit konnte einen gewissen Kreuzungseffekt *in vitro* nachweisen, bei der in der IVF Spermia von weißblauen Belgier-Bullen mit KOK von geschlachteten Rindern der gleichen Rasse, Limousin oder Holstein-Friesian angepaart wurde. Dabei wiesen die Embryonen aus der Kreuzung weißblauer Belgier und Limousin bessere Teilungs- und Entwicklungsraten auf, die Zellzahl war zwar nicht signifikant verbessert, aber die Anzahl der Inneren Zellmasse war erhöht, was gleichfalls eine höhere Qualität der Embryonen andeutet (RESIDIWATI et al., 2020).

5.4 Geschlechterverhältnis

Bei Bulle A zeigte sich eine grundsätzliche Verschiebung der erzeugten Embryonen zugunsten von mehr männlichen Embryonen im Vergleich zum erwarteten 1:1 ($P \leq 0,05$). Zwischen der Gruppe mit IVF mit prä-inkubiertem Spermia und der Kontrolle bestand kein Unterschied (40,0 ♀: 60,0 ♂ vs. 38,9 ♀: 61,1 ♂, $P > 0,05$).

Bulle B wies ebenfalls deutlich weniger weibliche als männliche Embryonen auf ($P \leq 0,05$), die Gruppe mit prä-inkubierten Spermien war allerdings noch stärker zu mehr männlichen Embryonen verschoben (8,3 ♀: 91,7 ♂ vs. 33,3 ♀: 66,7 ♂, $P \leq 0,01$).

Bei Bulle C hingegen war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen, wenn alle analysierten Embryonen zusammengezogen wurden (45,5 ♀: 54,5 ♂ vs. 42,3 ♀: 57,7 ♂, $P > 0,05$). Bei Betrachtung der Entnahme-Tage bzw. der Entwicklungsstadien blieb diese Ausgeglichenheit in der Versuchsgruppe bestehen, in der Kontrolle waren dagegen mehr männliche Embryonen vorhanden (Blastozysten 50,0 ♀: 50,0 ♂ vs. 10,0 ♀: 90,0 ♂, Embryonen d8 41,7 ♀: 58,3 ♂ vs. 9,0 ♀: 91,0 ♂, $P \leq 0,001$).

Ein zugunsten männlicher Embryonen verschobenes Geschlechterverhältnis *in vitro* wird von vielen Autoren nachgewiesen, damit sind die vorliegenden Ergebnisse übereinstimmend (AVERY et al., 1991, XU et al., 1992).

Der in der Fertilisation eingesetzte Bulle kann eine Verschiebung oder eine ausgeglichene Ratio der Geschlechter verursachen (ALOMAR et al., 2008; LEME et al., 2020). Bulle A zeigt dieses unausgeglichene Geschlechterverhältnis, ebenso Bulle B und die unbehandelte Kontrollgruppe von Bulle C. Die Vorinkubation der Spermien von Bulle C vor der IVF ergab gleich viele weibliche und männliche Embryonen, ähnlich der einstündigen Prä-Inkubation in einer anderen Arbeit, die damit das in Richtung männliche Embryonen verschobene Geschlechterverhältnis ausglich. In der Studie wurde die IVF jedoch nur fünf Stunden durchgeführt und ergab ohne Spermien-Vorinkubation die Verschiebung der Geschlechterzahlen bei den Embryonen. Wurde die Ko-Inkubation von Eizellen und Spermien auf 18 Stunden verlängert, dann war das Geschlechterverhältnis ebenso ausgeglichen (IWATA et al., 2008). In einem weiteren Versuch der genannten Arbeit wurden Spermien mit Kumuluszellen inkubiert und abhängig von ihrem Bindungsverhalten an den Kumuluszellen in bindende

und nicht-bindende Spermien aufgeteilt und separat zur IVF eingesetzt. Bindende Spermien erbrachten deutlich weniger weibliche als männliche Embryonen. Hieraus wird abgeleitet, dass Spermien, die besser an Kumulus-Zellen binden schneller kapazitieren und eher ein Y-Chromosom aufweisen, wodurch die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses erklärt werden kann. Dies lässt sich auch für Bulle B nachvollziehen, der nach Vorinkubation und damit einhergehender Kapazitation der Spermien noch mehr männliche Embryonen produziert als ohnehin schon. Allerdings steht die Erklärung in Gegensatz zu dem ausgeglicheneren Geschlechterverhältnis bei Bulle C nach Prä-Inkubation. Denkbar ist, dass bei Bulle C die Vorinkubation den X-Chromosomen-tragenden Spermien ausreichend Zeit bot, um gleichfalls zu kapazitieren.

In der vorgenannten Arbeit wurde als Kultivierungsmedium SOF mit fetalem Kälberserum und 1,5 mM Glukose verwendet. Der Zusatz von fetalem Kälberserum erbringt mehr männliche als weibliche Embryonen in der In-vitro-Kultivierung (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001). Glukose im IVC-Medium verringert gleichfalls den Anteil weiblicher Embryonen (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996; LARSON et al., 2001). In einer Studie wurden in vivo erspülte Embryonen mit in vitro produzierten verglichen, die während der IVC entweder in SOF mit Serum-Zusatz oder mit BSA kultiviert worden waren. In der RNA-Sequenzierung der einzelnen Blastozysten wiesen die Embryonen aus der Kultivierung mit Serum deutlich stärkere Abweichungen von den In-vivo-Embryonen auf, dies wurde noch deutlicher, wenn nur die männlichen Embryonen betrachtet wurden. Die unterschiedliche Expression erstreckte sich auch auf den Vergleich mit Embryonen aus der serumfreien IVC. Die weiblichen Embryonen der serumhaltigen Kultivierung wichen in ihrer Genexpression in separater Analyse auch von den in vivo entwickelten Embryonen ab, jedoch nicht ganz so stark wie die männlichen (HERAS et al., 2016). Damit nimmt der Serumzusatz einen größeren Einfluss als der Albumin-Zusatz in der IVC, mit besonders starken Auswirkungen auf die Entwicklung männlicher Embryonen. In dieser Studie wiesen die in vitro erzeugten Embryonen zwischen den Geschlechtern weniger starke Differenzen in der Genexpression auf als die Embryonen in vivo, unabhängig von der Proteinquelle. Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Studie, die ein Drittel unterschiedlich exprimierte Gene nachweisen konnte, allerdings auch keine IVC-Systeme verglich, sondern die unterschiedliche Expression zwischen den Geschlechtern in vitro erzeugter Rinder-Embryonen. Hierbei waren vor allem autosomale Gene verschieden stark exprimiert, sodass die unterschiedlichen Geschlechtschromosomen deren Expression mit steuern dürften. Weibliche Embryonen hatten vermehrt Transkripte im Bereich der Genexpression, Zelldifferenzierung und Signal-Transduktion. Bei den männlichen Embryonen war die Genexpression erhöht für Gene, die im Bereich des Protein-Stoffwechsels und der Mitochondrien exprimieren (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010b).

Der Zusatz von Glukose zum Kultivierungsmedium verschiebt das Geschlechterverhältnis in Richtung männliche Embryonen (LARSON et al., 2001). Werden zu einer 4 mM Glukose-Konzentration Inhibitoren der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) zugesetzt, dann ergibt dies gleichviele weibliche und männliche Embryonen (KIMURA et al., 2005). G6PD ist das limitierende Enzym des

indirekt Glukose verstoffwechselnden Pentose-Phosphat-Weges, über den NADPH erzeugt wird, das für den Schutz der Zelle vor oxidativem Stress genutzt wird. Da G6PD auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, werden in weiblichen Embryonen mehr Gentranskripte für dieses Enzym exprimiert, entsprechend viel NADPH fällt an. Dieses könnte dann nicht mehr nur protektiv wirken, sondern selbst durch Reoxidation als Stressor wirken oder den Purin-Stoffwechsel erhöhen (KIMURA et al., 2005). Einige Purine haben toxische Eigenschaften und blockieren in der Maus die frühe embryonale Entwicklung im Zweizellstadium (DOWNS & DOW, 1991).

Neben G6PD ist in weiblichen frühen Blastozysten auch das Gen HPRT 1 (für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) signifikant stärker exprimiert als bei männlichen Embryonen (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000). Dieses Gen ist gleichfalls auf dem X-Chromosom lokalisiert und greift in den Purin-Stoffwechsel ein, seine Aktivität wird durch Glukose teilweise eingeschränkt. Das Gen für die Phosphoglyceratkinase PGK ist ebenso auf dem X-Chromosom gelagert und spielt eine Rolle in der Glykolyse. In weiblichen IVP-Embryonen kann auch hierfür eine höhere Genexpression festgestellt werden als in männlichen (WRENZYCKI et al., 2002).

Eine weitere Arbeit, die prä-inkubiertes TG-Sperma zweier Bullen einsetzte, weist für weibliche und männliche Embryonen gleiche Anteile aus, auch die verwendete Kontrollgruppe zeigt keine Verschiebung (KOCHHAR et al., 2003). Lediglich eine Verkürzung der Ko-Inkubationsdauer auf sechs Stunden erbrachte mehr männliche Embryonen, vergleichbar mit den Ergebnissen einer anderen Arbeit (IWATA et al., 2008). In der eingangs genannten Arbeit kamen ein 10%iger Serumzusatz und bovine Ovidukt-Epithelzellen (BOEC) zum Einsatz. Wird die IVC mit Medium durchgeführt, das zuvor mit BOEC konditioniert wurde, oder direkt im Schaf-Ovidukt, dann wird ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis erreicht (GRISART et al., 1995; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 1996).

Gegensätzlich zu Kochhar et al. (2003) ergab die sechsstündige Vorinkubation von Spermien einer weiteren Arbeit für alle Blastozystenstadien zusammengenommen vermehrt weibliche Embryonen. Gleiches gilt für die 24-stündige Vorinkubation, die ebenfalls mehr weibliche Embryonen im Stadium der geschlüpften Blastozyste erbringt (LECHNIAK et al., 2003). Dadurch wird eine erhöhte Lebensdauer der X-chromosomalen Spermien angenommen, die nach den Prä-Inkubationen zu größeren Anteilen Oozyten befruchten können. Bei dieser Studie ist anzumerken, dass ebenfalls Serum und BOEC in der IVC als Ko-Kultur verwendet wurden und zudem das Geschlechterverhältnis an Tag 9 der IVC ausgewertet wurde. Eine Arbeit konnte zeigen, dass an Tag 6 und 7 mehr männliche Embryonen festgestellt werden können, an Tag 8 und 9 vermehrt weibliche (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001).

5.5 Schlussfolgerung

Die Prä-Inkubation von TG-Sperma verschiedener Bullen vor der In-vitro-Fertilisation zeigt unterschiedliche Auswirkungen in der IVF und der folgenden In-vitro-Kultivierung.

Trotz der dank Vorinkubation erhöhten Anteile kapazitierter Spermien wurden genauso viele Eizellen befruchtet wie in der Kontrollgruppe. Damit erweist sich die Prä-Inkubation allerdings auch als nicht schädlich für den Befruchtungsprozess, trotz der deutlich abnehmenden Motilität und geringerer Anteile vitaler Spermien.

Nach IVF mit prä-inkubierten Spermien werden gleich hohe Teilungs- und Entwicklungsraten wie in der Kontrollgruppe erzielt. Auch hier kann kein negativer Einfluss auf die Spermien durch die teils mehrstündige Inkubation vor der IVF festgestellt werden. Vereinzelt zeigen einzelne Bullen partielle Effekte durch die Prä-Inkubation, entweder über eine verbesserte Teilungsrate oder veränderte Anteile einzelner Embryonalstadien. Diese können einer in Teilen höheren Entwicklungsgeschwindigkeit zugeschrieben werden, die durch die schnelle Befruchtung bereits kapazitierter Spermien verursacht werden kann.

Die erzeugten Embryonen wiesen unabhängig von der Spermienbehandlung ähnliche Zellzahlen auf, was auf eine gute Qualität in beiden Gruppen schließen lässt. Damit scheinen die Spermien nach Vorinkubation vor der IVF keine Schädigung davon zu tragen, auch nicht auf DNA-Ebene, wodurch sich eine Qualitätsminderung oder verlangsamte Entwicklung der Embryonen ergeben könnte.

Das Geschlechterverhältnis der erzeugten Embryonen zeigte in der Gesamtbetrachtung weniger weibliche Embryonen nach der IVC auf, anders als das in vivo vorgefundene 1:1-Verhältnis. Dabei kann die Prä-Inkubation der Spermien unterschiedliche Effekte je nach Bulle entwickeln. Bei einem Bullen verstärkte sich der Trend, es wurden noch mehr männliche Embryonen in der Sexing-PCR nachgewiesen. Bei einem anderen Bullen trat das Gegenteil ein, es wurde ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis vorgefunden, wenn die Spermien prä-inkubiert wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien bullenspezifisch auf die Prä-Inkubation reagieren, da die restlichen Bedingungen wie Medien, IVF- und IVC-Protokolle zwischen den Gruppen gleichblieben.

Zusammenfassend kann die Vorinkubation boviner Spermien vor der IVF verwendet werden um vermehrt kapazitierte Spermien bereits zu Beginn der Ko-Inkubation mit Eizellen einsetzen zu können. Es scheint keine Benachteiligung der befruchtenden Spermien vorzuliegen, da Fertilisations-, Teilungs- und Entwicklungsraten nicht vermindert werden, gleichfalls die Zellzahl der Embryonen. Eine positive Beeinflussung der vorgenannten Parameter, ebenso wie auch das erhaltene Geschlechterverhältnis, scheint nur partiell und in Abhängigkeit des verwendeten Bullen in der Prä-Inkubation und IVF möglich. Eine abschließende Beurteilung bedürfte weiterer Analysen. Die Untersuchung der DNA-Integrität der Spermien vor und nach Vorinkubation, sowie des mitochondrialen Potenzials und der Membran-Integrität könnte ein besseres Verständnis für den direkten Einfluss der Prä-Inkubation auf die Spermien

bieten. Der zusätzliche Einsatz gesexten Spermas der jeweiligen Bullen wäre hierbei hilfreich, um die Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses besser zu verstehen. Eine Verlaufskontrolle der Fertilisation mit Färbungen der Eizellen zu unterschiedlichen Zeiten während der IVF könnte Aufschluss über die Dynamik der Befruchtung der unterschiedlichen Bullen geben, jeweils mit und ohne prä-inkubierte Spermien. Weiterhin wäre über eine differenzierte Anfärbung der ICM und des Trophektooderms eine weitere Qualitätseinstufung der erzeugten Embryonen möglich.

6 Zusammenfassung

Ann-Selina Fries

Einfluss einer Spermien-Präinkubation vor der In-vitro-Fertilisation auf die Entwicklung boviner Embryonen

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Spermien-Präinkubation vor der IVF auf die resultierenden Embryonen zu untersuchen. Die Dauer der Prä-Inkubation war in Vorversuchen individuell für drei Bullen bestimmt worden, ermittelt als der Zeitpunkt, an dem der Anteil der kapazitierten Spermien am höchsten war. In 64 IVP-Sitzungen wurden 8011 KOK gewonnen, und mit prä-inkubiertem oder unbehandeltem TG-Sperma der einzelnen Bullen fertilisiert. Nach Aufbereitung und vor Zugabe der Spermien zu den Eizellen erfolgten verschiedene Untersuchungen um die Motilität, den Anteil kapazitierter und den Anteil lebender Spermien zu erheben. Nach 19 h IVF-Dauer wurden die Fertilisationsraten der Bullen in den beiden Versuchsgruppen mittels Färbung mit Hoechst 33342 erhoben, und die IVC für eine Dauer von 8 Tagen (Tag der IVF = Tag 0) gestartet. Insgesamt konnten aus 6628 zur IVC eingesetzten Zygoten 1756 weiter entwickelte Embryonen in vitro erzeugt werden (Morula-, Blastozysten-Stadium, etc.). Einige Blastozysten und expandierte Blastozysten wurden an Tag 7 und 8 der In-vitro-Kultivierung entnommen und eingefroren für die Geschlechtsbestimmung via PCR, die einen bovin- und einen Y-Chromosom-spezifischen Primer nutzte. An Tag 8 erfolgte zusätzlich mit einem Teil der vorgenannten Embryonal-Stadien eine Differential-Färbung mit Ethidium-Homodimer und Hoechst 33342. Damit wurde die Gesamt-Zellzahl und die Lebend-Tot-Ratio erhoben und eine Beurteilung der Qualität der Embryonen möglich.

Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Nach Prä-Inkubation zeigte sich eine signifikante Abnahme der Motilität der Spermien bei allen Bullen, von 63,0 - 65,7 % auf 28,0 - 29,0 %. Gleichzeitig sank der Anteil lebender Spermien von 59,8 – 62,8 % auf 26,8 – 28,6 %. Im Gegenzug stieg der Anteil kapazitierter Spermien der jeweiligen Bullen über die Prä-Inkubation an, von 24,9 – 25,7 % auf 31,9 – 35,2 %.
2. Die Fertilisationsraten für die drei Bullen lagen zwischen 66,0 % und 72,5 % und wiesen zwischen der Versuchsgruppe nach Prä-Inkubation und der Kontrollgruppe jeweils keinen signifikanten Unterschied auf.
3. Die durchschnittliche Teilungsrate nach IVP betrug 75,6 % (n = 5013 / 6628), die durchschnittliche Entwicklungsrate an Tag 8 26,5 % (n = 1756 / 6628). Für Bulle A konnte eine signifikant höhere Teilungsrate nach IVF mit prä-inkubiertem Sperma nachgewiesen werden

als in der Kontrollgruppe ($82,6\% \pm 6,6$ vs. $77,8\% \pm 7,5$). Die Raten der beiden anderen Bullen wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit Prä-Inkubation und den Kontrollen auf, ebenso die Entwicklungsraten von Bulle A.

4. An Tag 7 der IVC hatten sich bei Bulle B signifikant mehr Embryonen zur Morulae entwickelt in der Gruppe mit prä-inkubierten Spermien als in der Kontrolle ($13,0\% \pm 7,0$ vs. $8,9\% \pm 5,4$). Für Bulle A ergab sich am gleichen Tag der IVC ein signifikant höherer Anteil schlüpfender Blastozysten in der Versuchsgruppe als in der Gruppe ohne Prä-Inkubation ($0,6\% \pm 1,3$ vs. $0,0\% \pm 0,0$). Umgekehrt wies die Gruppe fertilisiert mit prä-inkubierten Spermien von Bulle C weniger schlüpfende Blastozysten an Tag 7 auf als die Kontrolle ($0,0\% \pm 0,0$ vs. $0,6\% \pm 1,3$). Die Anteile der anderen Embryonalstadien wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.
5. In der Lebend-Tot-Färbung der Embryonen aller Bullen an Tag 8 ergaben sich für die Blastozysten Gesamt-Zellzahlen zwischen $76,8 \pm 7,8$ und $80,3 \pm 5,6$, sowie die Ratio lebender zu toter Zellen zwischen $8,0 \pm 3,0$ und $12,5 \pm 8,3$. Für das Stadium der expandierten Blastozyste wurden Gesamt-Zellzahlen zwischen $100,1 \pm 15,6$ und $115,5 \pm 17,4$ und eine Ratio zwischen $19,0 \pm 9,1$ und $23,0 \pm 11,2$. Zwischen der Kontrolle und der Gruppe mit Prä-Inkubation vor der IVF bestanden keine signifikanten Unterschiede.
6. Üblicherweise wird ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis von 1 : 1 erwartet. Dies galt für die Embryonen von Bulle C, sowohl in der Gruppe mit prä-inkubierten Spermien als auch ohne ($45,5 \text{ ♀} : 54,5 \text{ ♂}$ vs. $42,3 \text{ ♀} : 57,7 \text{ ♂}$). Bei Betrachtung der Untergruppen war das Geschlechterverhältnis lediglich in der Versuchsgruppe ausgeglichen, nicht jedoch in der Kontrolle. Sowohl für die Embryonen entnommen an Tag 8 (Blastozysten und expandierte Blastozysten, $41,7 \text{ ♀} : 58,3 \text{ ♂}$ vs. $9,0 \text{ ♀} : 91,0 \text{ ♂}$) als auch für die Blastozysten (entnommen an Tag 7 und 8, $50,0 \text{ ♀} : 50,0 \text{ ♂}$ vs. $10,0 \text{ ♀} : 90,0 \text{ ♂}$) wies die Kontrollgruppe signifikant mehr männliche Embryonen und ein unausgeglichenes Geschlechterverhältnis auf, im Vergleich zur Gruppe fertilisiert mit prä-inkubiertem Sperma.

Bei Bulle B wurde grundsätzlich ein verschobenes Geschlechterverhältnis nachgewiesen, wobei die Prä-Inkubation diesen Effekt noch verstärkte ($8,3 \text{ ♀} : 91,7 \text{ ♂}$ vs. $33,3 \text{ ♀} : 66,7 \text{ ♂}$). In dieser Gruppe mit prä-inkubierten Spermien in der IVF waren signifikant mehr der expandierten Blastozysten männlich (entnommen an Tag 7 und 8, $7,1 \text{ ♀} : 92,9 \text{ ♂}$ vs. $43,7 \text{ ♀} : 56,3 \text{ ♂}$), sowie der Embryonen, die an Tag 7 eingefroren wurden (Blastozysten und expandierte Blastozysten, $0,0 \text{ ♀} : 100,0 \text{ ♂}$ vs. $46,7 \text{ ♀} : 53,3 \text{ ♂}$).

Für Bulle A konnte ebenfalls kein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis aller Embryonen nachgewiesen werden ($40,0 \text{ ♀} : 60,0 \text{ ♂}$ vs. $38,9 \text{ ♀} : 61,1 \text{ ♂}$), es bestand allerdings zwischen den

Embryonen erzeugt nach IVF mit Prä-Inkubation und denen der Kontrolle kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine bullenspezifische Prä-Inkubation der Spermien vor der IVF mehr kapazitierte Spermien zur Verfügung stellt, eine Beeinflussung der erzeugten Embryonen allerdings nur partiell und individuell abhängig vom einzelnen Bullen möglich ist. Trotz verminderter Motilität und geringerer Anteile lebender Spermien nach der Prä-Inkubation werden ähnlich hohe Fertilisations-, Teilungs- und Entwicklungsraten erzielt, sowie Anteile und Qualitäten der einzelnen Embryonalstadien. Dies spricht gegen eine nachhaltige Schädigung der befruchtenden Spermien. Im Gegenteil kann partiell eine beschleunigte Embryonal-Entwicklung nach IVF mit prä-inkubierten Spermien unterstellt werden, die sich in vereinzelt höheren Raten niederschlägt. Die X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien scheinen, in Abhängigkeit vom verwendeten Bullen, unterschiedlich auf die Prä-Inkubation zu reagieren. Zwar wurde insgesamt ein zur männlichen Seite verschobenes Geschlechterverhältnis nachgewiesen, jedoch variierte dieser Effekt zwischen den Gruppen der einzelnen Bullen oder trat gar nicht auf. Zu einem größeren Verständnis dieser individuellen Einflüsse der Prä-Inkubation könnten Untersuchungen der Zell-Integrität der Spermien und ihres Stoffwechsels während und nach der Prä-Inkubation, Verlaufsdarstellungen der Befruchtung und Untersuchungen der Inneren Zellmasse und des Trophektoderms der Embryonen beitragen.

7 Summary

Ann-Selina Fries

Influence of the pre-incubation of sperm prior to fertilization on development of in vitro produced bovine embryos

The objective of the present study was to determine the effects of a pre-incubation of sperm prior to IVF on the resulting embryos. The time span to gain the maximum amount of capacitated sperm was measured in previous experiments for each of the three bulls used, and defined as the duration of pre-incubation. In 64 IVP-sessions 8011 cumulus-oocyte-complexes could be gained and fertilized with pre-incubated or untreated, frozen-thawed sperm of the individual bulls. After thawing and preparation of the sperm and before adding to the oocytes, motility, count of capacitated and of alive sperm were examined. After 19 h of IVF fertilization rates in both groups were analysed using Hoechst 33342-stain and IVC enduring for 8 days was started (day of IVF = day 0). In total 6628 zygotes were used and 1756 embryos of later embryonic stages could be produced (morula, blastocyst, etc.). One part of the blastocysts and expanded blastocysts were frozen at day 7 and 8 of IVC for sexing PCR using Y-chromosome and bovine specific primers. Additionally, at day 8 another part of the mentioned embryonic stages were stained with ethidium-homodimer and Hoechst 33342. To determine the quality of the gained embryos, the total cell number and ratio of live and dead cells were counted.

The following results could be obtained:

1. After pre-incubation sperm motility decreased significantly for all bulls, from 63,0 - 65,7 % to 28,0 - 29,0 %. Simultaneous, the amount of alive sperm was lowered from 59,8 – 62,8 % to 26,8 – 28,6 %. In contrast, more sperm of the individual bulls were capacitated after pre-incubation, increasing from 24,9 – 25,7 % up to 31,9 – 35,2 %.
2. Fertilization rates of the three bulls resulted in no significant difference between the groups, using pre-incubated sperm or not (66,0 % - 72,5 %).
3. The cleavage rates after IVP averaged at 75,6 % (n = 5013 / 6628), the average developmental rate at day 8 was 26,5 % (n = 1756 / 6628). Bull A produced a significant higher cleavage rate after IVF with pre-incubated sperm compared to the control group (82,6 % ± 6,6 vs. 77,8 % ± 7,5). Developmental rates of bull A and the rates of the other bulls were not statistically different.

4. At day 7 of IVC significantly more embryos of bull B reached the morula stage after IVF with sperm pre-incubation as in the control group ($13,0 \% \pm 7,0$ vs. $8,9 \% \pm 5,4$). Bull A delivered a significant higher amount of hatching blastocysts in the experimental group compared to the control group without pre-incubated sperm ($0,6 \% \pm 1,3$ vs. $0,0 \% \pm 0,0$). Conversely, more hatching blastocysts were gained in the control group of bull C compared to the group with IVF following pre-incubation ($0,0 \% \pm 0,0$ vs. $0,6 \% \pm 1,3$).

5. After cell staining at day 8 of the embryos of all bulls, blastocyst cell counts averaged between $76,8 \pm 7,8$ and $80,3 \pm 5,6$, and the ratio of live and dead cells between $8,0 \pm 3,0$ and $12,5 \pm 8,3$. Expanded blastocysts delivered cell counts between $100,1 \pm 15,6$ and $115,5 \pm 17,4$, the average cell ratio was between $19,0 \pm 9,1$ and $23,0 \pm 11,2$. There was no significant difference between the groups.

6. The expected sex ratio is 1 : 1. This held true for embryos of bull C, after IVF with pre-incubated sperm as well as in the control group ($45,5 \text{ ♀} : 54,5 \text{ ♂}$ vs. $42,3 \text{ ♀} : 57,7 \text{ ♂}$). Looking at the subgroups, only embryos of the pre-incubation group showed a balanced sex ratio compared to embryos of the control group. Especially embryos frozen at day 8 of IVC (blastocysts and expanded blastocysts, $41,7 \text{ ♀} : 58,3 \text{ ♂}$ vs. $9,0 \text{ ♀} : 91,0 \text{ ♂}$) and embryos at the blastocyst stage (frozen at day 7 and 8, $50,0 \text{ ♀} : 50,0 \text{ ♂}$ vs. $10,0 \text{ ♀} : 90,0 \text{ ♂}$) showed a significant shift towards more males in the control.
Bull B displayed in general a shifted sex ratio towards male embryos, but pre-incubation of sperm increased their amount significantly ($8,3 \text{ ♀} : 91,7 \text{ ♂}$ vs. $33,3 \text{ ♀} : 66,7 \text{ ♂}$). In this group using pre-incubated sperm, more expanded blastocysts were males (frozen at day 7 and 8, $7,1 \text{ ♀} : 92,9 \text{ ♂}$ vs. $43,7 \text{ ♀} : 56,3 \text{ ♂}$) as well as embryos taken out at day 7 (blastocysts and expanded blastocysts, $0,0 \text{ ♀} : 100,0 \text{ ♂}$ vs. $46,7 \text{ ♀} : 53,3 \text{ ♂}$).
The sex ratio of embryos of bull A differed significantly from the expected 1 : 1 ($40,0 \text{ ♀} : 60,0 \text{ ♂}$ vs. $38,9 \text{ ♀} : 61,1 \text{ ♂}$), but there was no significant difference between the group of embryos produced after sperm pre-incubation and the control group.

In conclusion it may be said, that a bull-dependent pre-incubation of sperm prior to IVF delivers an higher amount of capacitated sperm, but effects on the produced embryos are only partial and depending on the individual bull. Despite reduced motility and lower amounts of alive sperm after pre-incubation, similar fertilization, cleavage and developmental rates could be achieved, as well as amounts and quality of different embryonic stages. This contradicts a lasting damage of the fertilizing sperm. Conversely, a partially accelerated embryonic development could be supposed with partly higher rates of the resulting embryos. X- and Y-bearing sperm seem to react different to the pre-incubation, depending on the bull used for IVF. Even though the sex ratio was shifted in general towards more male embryos, this effect

varied between the groups of the individual bulls, with some groups displaying a balanced sex ratio. To increase knowledge of the effect of pre-incubation, analyzing sperm cell integrity and their metabolism during and after pre-incubation, recording time course of fertilization afterwards and examining inner cell mass and trophectoderm of the produced embryos could be helpful.

8 Anhang

8.1 Einzeldaten der In-vitro-Produktion

Tabelle 7: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Sperma von Bulle A

A mit Prä-Inkubation	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungsrate [%]	Tag 7 Entwicklungsrate [%]	Tag 8 Entwicklungsrate [%]
Durchgang							
1	80	72	49	49	68,1	18,1	23,6
2	60	47	34	34	72,3	12,8	19,1
3	40	25	21	21	84,0	52,0	68,0
4	60	45	32	32	71,1	24,4	40,0
5	60	42	37	37	88,1	21,4	35,7
6	60	37	34	34	91,9	18,9	18,9
7	60	41	29	29	70,7	12,2	17,1
8	80	65	56	56	86,2	18,5	23,1
9	80	33	29	29	87,9	27,3	33,3
10	60	56	45	45	80,4	23,2	25,0
11	80	74	59	59	79,7	43,2	47,3
12	60	59	41	41	69,5	18,6	27,1
13	40	39	28	28	71,8	23,1	23,1
14	80	74	56	56	75,7	16,2	18,9
15	60	59	42	42	70,0	10,0	11,7
16	60	60	49	49	81,7	23,3	25,0
17	60	44	32	32	72,7	18,2	20,5
18	80	58	42	42	72,4	13,8	19,0
19	60	45	34	34	75,6	13,3	17,8
20	80	66	57	57	86,4	22,7	28,8
Summe / MW	1300	1041	806	806	77,8	21,6	27,1
SD	-	-	-	-	7,5	10,1	12,9

Tabelle 8: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Sperma von Bulle A

A Kontrolle	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungs- rate [%]	Tag 7 Entwicklungs- rate [%]	Tag 8 Entwicklungs- rate [%]
Durchgang							
1	80	76	56	56	73,7	14,5	19,7
2	60	44	37	37	84,1	18,2	22,7
3	60	36	29	29	77,8	38,9	52,8
4	60	51	38	38	74,5	17,6	29,4
5	60	45	37	37	82,2	35,6	42,2
6	60	40	32	32	82,5	7,5	17,5
7	60	42	38	38	90,5	23,8	28,6
8	80	62	60	60	96,8	19,4	27,4
9	80	33	29	29	87,9	39,4	42,4
10	60	54	50	50	92,6	37,0	37,0
11	80	74	53	53	71,6	35,1	43,2
12	60	56	49	49	87,5	35,7	42,9
13	40	37	30	30	81,1	18,9	23,3
14	80	74	56	56	75,7	20,3	20,3
15	60	59	48	48	80,0	23,3	23,3
16	60	55	49	49	89,1	20,0	23,6
17	60	48	37	37	77,1	20,8	22,9
18	80	67	55	55	82,1	16,4	19,4
19	60	45	37	37	82,2	13,3	13,3
20	80	69	57	57	82,6	23,2	26,1
Summe / MW	1320	1067	877	877	82,6	23,9	28,9
SD	-	-	-	-	6,6	9,5	10,7

Tabelle 9: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Spermia von Bulle B

B mit Prä-Inkubation	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungsrate [%]	Tag 7 Entwicklungsrate [%]	Tag 8 Entwicklungsrate [%]
Durchgang							
1	60	52	31	31	59,6	5,8	11,5
2	44	30	25	25	83,3	30,0	33,3
3	80	52	37	37	71,2	13,5	23,1
4	80	63	51	51	81,0	36,5	36,5
5	60	48	36	36	75,0	16,7	16,7
6	60	51	42	42	82,4	29,4	29,4
7	60	48	35	35	72,9	29,2	35,4
8	60	53	37	37	67,9	28,3	28,3
9	40	40	33	33	82,5	37,5	37,5
10	60	50	37	37	74,0	34,0	34,0
11	60	54	40	40	74,1	22,2	24,1
12	80	76	55	55	72,4	26,3	26,3
13	40	39	29	29	74,4	23,1	35,9
14	40	39	30	30	76,9	23,1	23,1
15	60	59	32	32	54,2	22,0	22,0
16	60	60	37	37	61,7	15,0	18,3
17	80	72	52	52	72,2	16,7	18,1
18	60	59	49	49	83,1	25,4	28,8
19	60	48	39	39	81,3	27,1	31,3
20	60	49	37	37	75,5	10,2	10,2
21	40	31	20	20	64,5	19,4	22,6
22	60	49	36	36	73,5	16,3	16,3
Summe / MW	1304	1122	820	820	73,3	23,1	25,6
SD	-	-	-	-	7,9	8,3	8,2

Tabelle 10: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Spermia von Bulle B

B Kontrolle	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungs- rate [%]	Tag 7 Entwicklungs- rate [%]	Tag 8 Entwicklungs- rate [%]
Durchgang							
1	60	54	25	25	46,3	13,0	27,8
2	42	27	24	24	88,9	37,0	44,4
3	80	56	39	39	69,6	10,7	19,6
4	80	62	59	59	95,2	38,7	38,7
5	60	46	36	36	78,3	13,0	13,0
6	60	51	41	41	80,4	27,5	29,4
7	60	48	36	36	75,0	35,4	43,8
8	60	30	23	23	76,7	23,3	30,0
9	40	37	29	29	78,4	18,9	29,7
10	60	50	41	41	82,0	36,0	38,0
11	60	54	42	42	77,8	18,5	20,4
12	80	78	62	62	79,5	21,8	24,4
13	40	40	32	32	80,0	37,5	52,5
14	40	43	33	33	76,7	14,0	14,0
15	60	58	37	37	63,8	24,1	24,1
16	60	60	45	45	75,0	16,7	23,3
17	80	77	54	54	70,1	15,6	16,9
18	60	60	48	48	80,0	30,0	33,3
19	60	46	39	39	84,8	21,7	28,3
20	60	47	35	35	74,5	8,5	8,5
21	40	30	21	21	70,0	20,0	26,7
22	60	47	36	36	76,6	14,9	19,1
Summe / MW	1302	1101	837	837	76,3	22,6	27,5
SD	-	-	-	-	9,4	9,5	11,0

Tabelle 11: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Spermia von Bulle C

C mit Prä-Inkubation	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungsrate [%]	Tag 7 Entwicklungsrate [%]	Tag 8 Entwicklungsrate [%]
Durchgang							
1	63	37	22	22	59,5	10,8	16,2
2	80	77	48	48	62,3	18,2	28,6
3	60	35	22	22	62,9	8,6	11,4
4	60	44	35	35	79,5	29,5	38,6
5	50	41	24	24	58,5	19,5	19,5
6	80	54	50	50	92,6	24,1	35,2
7	80	60	53	53	88,3	10,0	20,0
8	60	45	39	39	86,7	31,1	33,3
9	60	50	40	40	80,0	24,0	28,0
10	40	36	30	30	83,3	30,6	30,6
11	40	38	21	21	55,3	18,4	28,9
12	60	59	33	33	56,0	22,0	27,1
13	60	54	27	27	50,0	16,7	20,4
14	80	76	60	60	78,9	34,2	34,2
15	60	58	36	36	62,1	6,9	10,3
16	60	62	36	36	58,1	17,7	19,4
17	40	36	22	22	61,1	22,2	22,2
18	80	75	46	46	61,3	17,3	20,0
19	60	41	31	31	75,6	4,9	4,9
20	60	47	32	32	68,1	10,6	12,8
21	40	30	22	22	73,3	26,7	33,3
22	40	32	24	24	75,0	18,8	21,9
23	80	67	52	52	77,6	31,3	38,8
Summe / MW	1393	1154	805	805	69,8	19,7	24,2
SD	-	-	-	-	12,1	8,5	9,4

Tabelle 12: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Spermia von Bulle C

C Kontrolle	KOK [n]	Zygoten [n]	Tag 7 Embryonen [n]	Tag 8 Embryonen [n]	Tag 7 Teilungs- rate [%]	Tag 7 Entwicklungs- rate [%]	Tag 8 Entwicklungs- rate [%]
Durchgang							
1	62	34	25	25	73,5	11,8	20,6
2	80	54	38	38	70,4	13,0	29,6
3	60	40	33	33	82,5	25,0	25,0
4	60	43	36	36	83,7	37,2	39,5
5	50	42	24	24	57,1	19,0	21,4
6	80	55	51	51	92,7	16,4	34,5
7	80	65	59	59	90,8	20,0	24,6
8	60	49	37	37	75,5	30,6	32,7
9	60	50	39	39	78,0	30,0	38,0
10	40	37	31	31	83,8	13,5	21,6
11	40	32	22	22	68,8	21,9	28,1
12	60	59	46	46	78,0	39,0	45,8
13	60	56	38	38	67,9	19,6	25,0
14	80	78	56	56	71,8	24,4	26,9
15	60	61	44	44	72,1	21,3	24,6
16	60	59	45	45	76,3	18,6	18,6
17	40	38	26	26	68,4	18,4	18,4
18	80	79	62	62	78,5	35,4	41,8
19	60	43	32	32	74,4	9,3	9,3
20	60	48	36	36	75,0	16,7	16,7
21	40	30	24	24	80,0	20,0	26,7
22	40	31	18	18	58,1	9,7	22,6
23	80	60	46	46	76,7	26,7	28,3
Summe / MW	1392	1143	868	868	75,4	21,6	27,0
SD	-	-	-	-	8,6	8,4	8,7

8.2 Einzeldaten der Lebend-Tot-Färbung

Tabelle 13: Einzeldaten der mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbten Embryonen nach IVF mit prä-inkubiertem Sperma

nach Prä-Inkubation											
Blastozysten						expandierte Blastozysten					
GZ			Ratio			GZ			Ratio		
Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C
74	87	74	7,2	7,7	7,2	95	118	126	22,8	12,1	24,2
88	89	77	11,6	5,8	5,4	103	109	147	33,3	12,6	35,8
64	72	82	5,4	8,0	5,3	129	100	88	15,1	15,7	11,6
78	88	81	10,1	10,0	9,1	77	84	99	18,3	20,0	23,8
65	79	70	6,2	18,8	5,4	94	103	106	10,8	24,8	9,6
79	66	87	8,9	12,2	11,4	103	114	99	33,3	27,5	13,1
76	74	83	14,2	4,7	9,4	111	110	113	26,8	14,7	17,8
83	74	83	12,8	5,7	5,4	113	109	144	36,7	12,6	23,0
95	66	86	9,6	12,2	13,3	116	127	77	22,2	24,4	24,7
92	74		8,2	8,3		142	89	118	46,3	10,1	13,8
	79			8,9		114	123	97	37,0	14,4	18,4
	74			4,3		113	108	96	17,8	11,0	11,0
						121	118	133	16,3	38,3	21,2
						131	94	135	13,6	17,8	18,3
						112	126	99	15,0	41,0	10,0
						105	92	122	10,7	10,5	39,7
						129	107	138	10,7	16,8	26,6
						82	110	99	12,7	17,3	23,8
						106		125	12,3		14,6
						92			12,1		
						89			21,3		
						95			22,8		
						106			16,7		
						96			31,0		
						119			18,8		
						109			11,1		
						134			32,5		
						156			38,0		
						139			22,2		

Tabelle 14: Einzeldaten der mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbten Embryonen aus der Kontrollgruppe

Kontrolle											
Blastozysten						expandierte Blastozysten					
GZ			Ratio			GZ			Ratio		
Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C	Bulle A	Bulle B	Bulle C
69	77	100	7,2	14,4	8,1	127	100	125	17,1	24,0	40,7
76	88	66	11,6	8,8	7,3	140	117	80	27,0	15,7	10,4
61	77	75	5,4	6,0	5,3	130	92	101	15,3	14,3	32,7
80	73	73	10,1	6,3	7,1	105	97	128	20,0	9,8	17,3
80	87	76	6,2	9,9	6,6	109	86	79	14,6	20,5	12,2
78	68	85	8,9	21,7	13,2	141	97	134	27,2	15,2	21,3
65	74	91	14,2	5,7	21,8	114	69	115	21,8	16,3	9,5
103	73	62	12,8	6,3	30,0	118	106	133	22,6	12,3	32,3
90	81	71	9,6	10,6	13,2	77	117	111	10,0	22,4	12,9
	84		8,2	11,0		103	93	134	16,2	45,5	43,7
	82			15,4		92	132	126	45,0	17,9	13,0
	80			7,0		86	103	105	20,5	33,3	8,5
	81			7,1		86	101	111	27,7	11,6	21,2
						123	92	94	12,7	45,0	17,8
						107	79	118	16,8	18,8	18,7
						126	90	120	41,0	17,0	39,0
						84	122	129	13,0	39,7	24,8
						101	94	137	9,1	12,4	33,3
						135	122	114	44,0	23,4	27,5
						149	92		12,5	14,3	
						126			20,0		
						100			19,0		
						114			37,0		

8.3 Einzeldaten der Sexing-PCR

Tabelle 15: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle A

Bulle A	d7		d8		Blastozysten		Expand. Bla.		gesamt	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Nach Prä-Inkubation	5	5	3	7	2	7	6	5	8	12
Kontrolle	4	5	3	6	3	5	4	6	7	11

Tabelle 16: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle B

Bulle B	d7		d8		Blastozysten		Expand. Bla.		gesamt	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Nach Prä-Inkubation	0	12	2	10	1	9	1	13	2	22
Kontrolle	7	8	2	10	2	9	7	9	9	18

Tabelle 17: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle C

Bulle C	d7		d8		Blastozysten		Expand. Bla.		gesamt	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Nach Prä-Inkubation	5	5	5	7	4	4	6	8	10	12
Kontrolle	10	5	1	10	1	9	10	6	11	15

8.4 Medien IVP

Tabelle 18: PBS-Stocklösung

Substrat	Hersteller	g/500 ml A. dest.
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich P 3662	1,80 g
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich S 6501	2,50 g
D-Glukose	Sigma-Aldrich 16301	50,0 g
CaCl ₂ x H ₂ O	Sigma-Aldrich C 7902	6,65 g
Penicillin G	Sigma-Aldrich PENK	3,0 g

Tabelle 19: PBS-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
PBS-Pulver	Sigma-Aldrich D 5773	9,65 g
PBS-Stocklösung		10,0 ml
Aqua dest.		ad 1,0 L

Tabelle 20: PBS complete

Substrat	Hersteller	Menge
Heparin	Sigma-Aldrich H3149	11,2 mg
BSA (Fraktion V)	Sigma-Aldrich A 9647	1,0 g
PBS-Gebrauchslösung		1,0 L

Tabelle 21: 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl)

Substrat	Hersteller	Menge
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich S 5886	9,0 g
Aqua dest.		ad 1,0 L

Tabelle 22: NaCl complete

Substrat	Hersteller	Menge
0,9 % NaCl-Lösung		1,0 L
Penicillin G	Sigma-Aldrich PENK	0,06 g
Streptomycin	Sigma-Aldrich S 6501	0,1 g

Tabelle 23: TCM-BSA-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
TCM199	Sigma-Aldrich M 2520	1,51 g
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich G 3632	0,005 g
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich P 3662	0,0022 g
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich S 5761	0,22 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius Kabi	ad 100,0 ml
BSA (FAF)	Sigma-Aldrich A 7030	0,1 g

Tabelle 24: TCMAir-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
TCM199	Sigma-Aldrich M 2520	1,51 g
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich G 3632	0,005 g
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich P 3662	0,0022 g
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich S 5761	0,035 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100,0 ml
BSA (FAF)	Sigma-Aldrich A 7030	0,1 g

Tabelle 25: FertTALP-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	g/mol	Menge
NaCl	Sigma-Aldrich S 5886	114,0	58,44	0,6658 g
KCl	Sigma-Aldrich P 5405	3,2	74,60	0,0239 g
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich S 5761	25,0	84,01	0,2100 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Sigma-Aldrich S 5761	0,3	137,99	0,0041 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich C 7902	2,0	147,02	0,0294 g
MgCl ₂	Sigma-Aldrich M 2643	0,5	95,22	0,0048 g
Phenolrot	Sigma-Aldrich P 5530	0,01 µl/ml		0,0010 g
Penicillamine	Sigma-Aldrich P 4875	20,0	149,20	0,0003 g
Natrium-Lactat (60 %)	Sigma-Aldrich L 4263	10,0	112,10	0,1860 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius			ad 100 ml

Tabelle 26: Gentamycin-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich G 3632	50,0 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 1,0 ml

Tabelle 27: Natriumpyruvat-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich P 3662	2,0 mg
Fert-TALP-Stocklösung		1,0 ml

Tabelle 28: FertTALP-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
Fert-TALP-Stocklösung		10,0 ml
Gentamycin-Stocklösung		1,0 µl
BSA (FAF)	Sigma-Aldrich A 7030	60,0 mg
Natrium-Pyruvat-Lösung		140,0 µl

Tabelle 29: Epinephrin-Lösung

Substrat	Hersteller	Menge
Epinephrin	Sigma-Aldrich E 4250	1,83 mg
Natrium-Lactat (60%)	Sigma-Aldrich L 4263	165,0 mg
Natriummetabisulfit	Sigma-Aldrich S 9000	50,0 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	50,0 ml

Tabelle 30: Hypotaurin-Lösung

Substrat	Hersteller	Menge
Hypotaurine	Sigma-Aldrich H 1384	1,09 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	10,0 ml

Tabelle 31: Heparin-Lösung

Substrat	Hersteller	Menge
Heparin	Sigma-Aldrich H 3149	2,82 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	10,0 ml

Tabelle 32: HHE-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Epinephrin-Lösung		4,0 ml
Hypotaurin-Lösung		10,0 ml
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	26,0 ml

Tabelle 33: HHE-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
HHE-Stocklösung		80,0 µl
Heparin-Lösung		40,0 µl

Tabelle 34: FertTALP-HHE-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
Fert-TALP-Gebrauchslösung		2,0 ml
HHE-Gebrauchslösung		120,0 µl

Tabelle 35: Spermfilter-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
Spermfilter	Gynotec BV	675,0 µl
Fertilisations-Gebrauchslösung		75,0 µl

Tabelle 36: SOF-Stocklösung A

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	g/mol	Menge
NaCl	Sigma-Aldrich S 5886	108,0	58,44	3,145 g
KCl	Sigma-Aldrich P 5405	7,2	74,55	0,267 g
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich P 5655	1,2	136,1	0,081 g
MgSO ₄	Sigma-Aldrich M 2643	1,5	120,4	0,091 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius			49,2 ml
Natrium-Lactat	Sigma-Aldrich L 4263	4,2	112,1	0,300 ml

Tabelle 37: SOF-Stocklösung B

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	g/mol	Menge
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich S 5761	25	84,01	1,05 g
Phenolrot	Sigma-Aldrich P 5530	1 mg/100 ml	376,4	0,005 ml
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius			50,0 ml

Tabelle 38: SOF-Stocklösung C

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	g/mol	Menge
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich P 3662	0,73	110	0,04 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius			5,0 ml

Tabelle 39: SOF-Stocklösung D

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	g/mol	Menge
CaCl ₂ x2H ₂ O	Sigma-Aldrich C 7902	1,78	147	0,131 ml
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius			5,0 ml

Tabelle 40: Glutamin-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Glutamin	Sigma-Aldrich G 6392	0,292 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	10,0 ml

Tabelle 41: SOFaa-Lösung

Substrat	Hersteller	Konzentration mM	Menge
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich I 7508	2,77	0,05 g
Tri-Natrium-Citrate	Sigma-Aldrich S 4641	0,34	0,01 g
Gentamycin	Sigma-Aldrich P 5655	50 µg/ml	0,005 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius		78,0 ml
Glutamine-Stocklösung	Sigma-Aldrich G 3632	0,2	100,0 µl
Stocklösung A			10,0 ml
Stocklösung B			10,0 ml
Stocklösung C			1,0 ml
Stocklösung D			1,0 ml
BME	Sigma-Aldrich B 6766	30 µl/ml	3,0 ml
MEM	Sigma-Aldrich M 7145	10 µl/ml	1,0 ml

Tabelle 42: SOFaa-Gebrauchslösung

Substrat	Hersteller	Menge
SOFaa-Lösung		10,0 ml
BSA (FAF)	Sigma-Aldrich A 7030	0,04 g

Tabelle 43: eCG-hCG-Aliquot

Substrat	Hersteller	Menge
SUIGONAN	MSD Intervet	1 Flasche 400 I.E. eCG, 200 I.E. hCG
0,9% NaCl	Fresenius Kabi B 230423	1 ml

Tabelle 44: Silikonöl-Überschichtung

Substrat	Hersteller	Menge
Silikon-Öl M 100	Carl Roth 4025	

8.5 Medien Färbungen

Tabelle 45: CTC-Stammlösung

Substrat	Hersteller	Menge
Chlortetracyclin	Sigma-Aldrich C 4881	0,02576 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100 ml

Tabelle 46: Tris-Puffer 20 mM

Substrat	Hersteller	Menge
TRIS	Carl-Roth 4855.2	0,24228 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100 ml

Tabelle 47: Tris-Puffer 1 M

Substrat	Hersteller	Menge
TRIS	Carl-Roth 4855.2	12,114 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100 ml

Tabelle 48: NaCl-Lösung 130 mM

Substrat	Hersteller	Menge
NaCl	Sigma-Aldrich S 5886	0,75972 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100 ml

Tabelle 49: Cystein-Lösung 5mM

Substrat	Hersteller	Menge
L-Cystein	Sigma-Aldrich W 326305	0,06058 g
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 100 ml

Tabelle 50: Glutaraldehyd-Lösung 1%

Substrat	Hersteller	Menge
Glutaraldehyd 50 %	Sigma-Aldrich G7651	0,2 ml
Tris-Puffer 1 M		ad 100 ml

Tabelle 51: CTC-Arbeitslösung

Substrat	Hersteller	Menge
CTC-Stammlösung		5 ml
Tris-Puffer 20 mM		5 ml
NaCl-Lösung 130 mM		5 ml
Cystein-Lösung 5 mM		5 ml

Tabelle 52: Vitalfärbung

Substrat	Hersteller	Menge
Eosin B	Sigam-Aldrich 1.15934	2 g
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich 1.06448	3 g
Aqua dest.		ad 100 ml

Tabelle 53: PVA-Lösung

Substrat	Hersteller	Konzentration	Menge
PBS-Gebrauchslösung			100 ml
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich P 8136	0,1%	10 mg

Tabelle 54: Hoechst 33342-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich 14533	2 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 1 ml

Tabelle 55: Ethidium-Homodimer-Stocklösung

Substrat	Hersteller	Menge
Ethidium-homodimer	Sigma-Aldrich 46043	1 mg
H ₂ O	Ampuwa® Fresenius	ad 1 ml

8.6 Labormaterial und -Geräte

Tabelle 56: verwendete Geräte

Gerät	Firma	Sitz	Bestellnummer
Fluoreszenzmikroskop	Olympus	Hamburg	IX73
Grün-Filter für Ethidium	Olympus	Hamburg	U-FGW
UV-Filter für Hoechst 33342	Olympus	Hamburg	U-FUW
Monochrome CCD-Kamera	Olympus	Hamburg	DP73
Heizplatte	Labotect	Rosdorf	
Heracell 150i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt	51026281
Mini-spin Plus Zentrifuge	Eppendorf	Hamburg	5453000011
Stereomikroskop	Olympus	Hamburg	SZX7
Lichtmikroskop	Leica	Wetzlar	DM 750
Wärmeplatte	IVFtech	Stenløse, Dänemark	HP 009311
Wärmeschrank	Memmert	Schwabach	D00109
Wasserbad	Memmert	Schwabach	ONE 10
Kühlschrank	Liebherr	Biberach an der Riß	KX1021-21

Tabelle 57: verwendete Labormaterialien

Labormaterial	Firma	Sitz	Bestellnummer
Deckgläschen	Carl Roth	Karlsruhe	NK75.1
Objektträger	Carl Roth	Karlsruhe	NK72.1
Zählkammer nach Thoma	Carl Roth	Karlsruhe	T732.1
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt	Nümbrecht	72.706.400
Reagiergefäße (2,0 ml)	Sarstedt	Nümbrecht	72.695.500
Glaskapillare 20 µl Blaubrand® intraMark	Brand	Wertheim	708718
micro-classic Pipettierhelfer	Brand	Wertheim	25900
Mikro-Pipette	Research Instruments Ltd.	Falmouth, Großbritannien	MXL3-STR
135 µm Pipettenspitzen	Gynemed	Sierksdorf	#3000 135/10
Petrischale groß (90 mm)	Greiner Bio one	Frickenhausen	633181
Petrischale mittel (60 mm)	Greiner Bio one	Frickenhausen	628161
Petrischale klein (35 mm)	Greiner Bio one	Frickenhausen	627161
Thermobehälter Dewar Typ 28B	KGW Isotherm	Karlsruhe	1213
Feinsieb 75 µm	Retsch	Haan	7205288
Kürschnerklingen	Martor	Solingen	13615

9 Verzeichnisse

9.1 Abkürzungsverzeichnis

aa	mit Aminosäurezusatz (amino acids)
ADAM	a disintegrin and a metalloproteinase domain containing protein
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
A1	Annexin A1 (bovin)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSP A1	Bovines Seminalplasma bindendes Protein 1
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclo-Adenosin-Monophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (dies)
DNA	Desoxyribonucleic acid
eCG	equines Choriogonadotropin
et al.	und andere (et alii)
Fa.	Firma
FAF	Fatty Acid Free (ohne Fettsäuren)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde (hora)
HDL	High-Density-Lipoproteine
HHE	Hypotaurin-Heparin-Epinephrin
HSPA5	Heat Shock Protein family A member 5
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
hCG	humanes Choriogonadotropin
ICM	Inner Cell Mass

I.E.	Internationale Einheiten
IETS	International Embryo Technology Society
IFNt	Interferon tau
IGF	Insulin Growth Factor
IVC	In vitro culture (engl., In-vitro-Kultivierung)
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
KB	Künstliche Besamung / Instrumentelle Besamung
kDa	kilo Dalton
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
M/8	Medium M/8
M	Molar/e
mAC	Membran-ständige Adenylatcyclase
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MM	Master Mix
mm	Millimeter
mod.	Modifiziert
MOET	Multiple Ovulation Embryo-Transfer
mOsm/kg	Milliosmol, Einheit Osmolalität
MPF	Maturation Promoting Faktor
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OPU	Ovum Pick-Up
P	Propabilität, Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
PGK	Phosphoglyceratkinase
PKA	Protein-Kinase A
PVA	Polyvinylalkohol

Verzeichnisse

RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
s	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TALP	Tyrodé's Albumin Laktat Pyruvat
TCM199	Tissue Culture Media 199
TE	Trophektoderm
TG-Sperma	Tiefgefriersperma
u.	und
u.a.	unter anderem
vs.	gegenüber / im Gegensatz zu (versus)
z.B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink
ZP2	Zona-Protein 2
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
%	Prozent

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CTC-Fluoreszenz-Assay (modifiziert nach Ward & Storey, 1984).....	16
Abbildung 2: FITC-PSA-Färbung (modifiziert nach Cross et al., 1987, 1988, Morales & Cross, 1989)	18
Abbildung 3: Abfolge der Arbeitsschritte zur Behandlung der Spermien	28
Abbildung 4: Beispielbild der Kapazitationsfärbung mit CTC	29
Abbildung 5: Beispielbild Vital-Färbung Spermien mit Eosin B.....	30
Abbildung 6: Beispielbild der Vorkernfärbung.....	31
Abbildung 7: Embryonen nach 8 Tagen Kultivierung	32
Abbildung 8: Blastozyste mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbt	33
Abbildung 9: Aufnahme eines Gels nach Sexing-PCR.....	35
Abbildung 10: Schematischer Versuchsaufbau.....	37
Abbildung 11: Fertilisationsraten der drei Bullen nach IVF mit prä-inkubiertem oder unbehandeltem Sperma der Kontrollgruppe	40
Abbildung 12: Teilungsraten der drei Bullen nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation.....	41
Abbildung 13: Entwicklungsraten der drei Bullen nach IVF mit prä-inkubierten oder unbehandelten Spermien der Kontrolle.....	41
Abbildung 14: Anteil ausgewählter Embryonalstadien nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation.....	42
Abbildung 15: Geschlechterverhältnisse aller Embryonen der drei Bullen, nach IVF mit prä- inkubierten oder Spermien der Kontrollgruppe	44

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einflussfaktoren und ihre Auswirkungen auf das Geschlechterverhältnis	23
Tabelle 2: Merkmale zur Qualitätsbeurteilung der KOK	25
Tabelle 3: Zusammensetzung des Master-Mixes (MM) für die Sexing-PCR	34
Tabelle 4: Sequenz der verwendeten Primer	34
Tabelle 5: Durchschnittswerte der Motilität, Kapazitations-, Vital-Färbung	39
Tabelle 6: Durchschnittswerte der Lebend-Tot-Färbung der Embryonen an Tag 8 nach IVF mit oder ohne Prä-Inkubation der Spermien	43
Tabelle 7: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Sperma von Bulle A	62
Tabelle 8: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Sperma von Bulle A	63
Tabelle 9: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Sperma von Bulle B	64
Tabelle 10: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Sperma von Bulle B	65
Tabelle 11: Einzeldaten der IVP mit prä-inkubiertem Sperma von Bulle C	66
Tabelle 12: Einzeldaten der IVP mit unbehandeltem Sperma von Bulle C	67
Tabelle 13: Einzeldaten der mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbten Embryonen nach IVF mit prä-inkubiertem Sperma	68
Tabelle 14: Einzeldaten der mit Hoechst 33342 und Ethidium-Homodimer gefärbten Embryonen aus der Kontrollgruppe	69
Tabelle 15: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle A	69
Tabelle 16: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle B	70
Tabelle 17: Ergebnisse der Geschlechterbestimmung der Embryonen mittels Sexing-PCR bei Bulle C	70
Tabelle 18: PBS-Stocklösung	70
Tabelle 19: PBS-Gebrauchslösung	70
Tabelle 20: PBS complete	70
Tabelle 21: 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl)	71
Tabelle 22: NaCl complete	71
Tabelle 23: TCM-BSA-Gebrauchslösung	71
Tabelle 24: TCMAir-Gebrauchslösung	71
Tabelle 25: FertTALP-Stocklösung	72
Tabelle 26: Gentamycin-Stocklösung	72
Tabelle 27: Natriumpyruvat-Stocklösung	72
Tabelle 28: FertTALP-Gebrauchslösung	72
Tabelle 29: Epinephrin-Lösung	73

Verzeichnisse

Tabelle 30: Hypotaurin-Lösung	73
Tabelle 31: Heparin-Lösung.....	73
Tabelle 32: HHE-Stocklösung.....	73
Tabelle 33: HHE-Gebrauchslösung.....	73
Tabelle 34: FertTALP-HHE-Gebrauchslösung.....	73
Tabelle 35: Spermfilter-Gebrauchslösung.....	74
Tabelle 36: SOF-Stocklösung A.....	74
Tabelle 37: SOF-Stocklösung B.....	74
Tabelle 38: SOF-Stocklösung C.....	74
Tabelle 39: SOF-Stocklösung D.....	74
Tabelle 40: Glutamin-Stocklösung.....	74
Tabelle 41: SOFaa-Lösung.....	75
Tabelle 42: SOFaa-Gebrauchslösung.....	75
Tabelle 43: eCG-hCG-Aliquot	75
Tabelle 44: Silikonöl-Überschichtung.....	75
Tabelle 45: CTC-Stammlösung.....	76
Tabelle 46: Tris-Puffer 20 mM	76
Tabelle 47: Tris-Puffer 1 M.....	76
Tabelle 48: NaCl-Lösung 130 mM	76
Tabelle 49: Cystein-Lösung 5mM.....	76
Tabelle 50: Glutaraldehyd-Lösung 1%	76
Tabelle 51: CTC-Arbeitslösung	77
Tabelle 52: Vitalfärbung	77
Tabelle 53: PVA-Lösung.....	77
Tabelle 54: Hoechst 33342-Stocklösung.....	77
Tabelle 55: Ethidium-Homodimer-Stocklösung	77
Tabelle 56: verwendete Geräte.....	78
Tabelle 57: verwendete Labormaterialien.....	79

10 Literaturverzeichnis

- Abele, E., Stinshoff, H., Hanstedt, A., Wilkening, S., Meinecke-Tillmann, S. & Wrenzycki, C. (2012) Influence of selected (pre-)maturational parameters on in vitro development and sex distribution of bovine embryos. *Zygote*, 22(1), 41–49. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000275>
- Adenot, P.G., Szöllösi, M.S., Geze, M., Renard, J.P. & Debey, P. (1991) Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 28(1), 23–34. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280105>
- Adeoya-Osiguwa, S.A. & Fraser, L.R. (1996) Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 44(1), 111–120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199605\)44:1<111::AID-MRD13>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199605)44:1<111::AID-MRD13>3.0.CO;2-7)
- Agung, B., Otoi, T., Wongsrikeao, P., Taniguchi, M., Shimizu, R. & Watari, H. et al. (2006) Effect of Maturation Culture Period of Oocytes on the Sex Ratio of In Vitro Fertilized Bovine Embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 52(1), 123–127. <https://doi.org/10.1262/jrd.17055>
- Aiken, C.E.M., Swoboda, P.P.L., Skepper, J.N. & Johnson, M.H. (2004) The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction*, 128(5), 527–535. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00281>
- Al Naib, A., Hanrahan, J.P., Lonergan, P. & Fair, S. (2011) In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, 76(1), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.038>
- Almeida, T.G. de, Mingoti, R.D., Signori de Castro, L., Perez Siqueira, A.F., Rose Dos Santos Hamilton, T. & Kubo Fontes, P. et al. (2022) Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile. *Theriogenology*, 178, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.027>
- Alomar, M., Tasiaux, H., Remacle, S., George, F., Paul, D. & Donnay, I. (2008) Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal Reproduction Science*, 107(1-2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.009>
- Alvarez, J.G. & Storey, B.T. (1983) Taurine, Hypotaurine, Epinephrine and Albumin Inhibit Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 29, 548–555
- An, L.-Y., Chaubal, S.A., Liu, Y., Chen, Y., Nedambale, T.L. & Xu, J. et al. (2017) Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 63(2), 175–183. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-142>
- Angel-Velez, D., Coster, T. de, Azari-Dolatabad, N., Fernández-Montoro, A., Benedetti, C. & Pavani, K. et al. (2023) Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. *Scientific Reports*, 13(1), 4765. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31268-6>

- Asquith, K.L., Baleato, R.M., McLaughlin, E.A., Nixon, B. & Aitken, R.J. (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 16), 3645–3657. <https://doi.org/10.1242/jcs.01214>
- Austin, C.R. (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326. <https://doi.org/10.1038/170326a0>
- Austin, C.R. (1956) Cortical granules in hamster eggs. *Experimental Cell Research*, 10(2), 533–540. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(56\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(56)90025-8)
- Austin, C.R. & Bishop, M.W. (1958) Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature*, 181(4612), 851. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1017>
- Avery, B., Schmidt, M. & Greve, T. (1989) Sex Determination of Bovine Embryos Based on Embryonic Cleavage Rates. *Biology of Reproduction*, 28(3), 717–725. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.3.717>
- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S. & Toyoda, Y. (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31845–31849. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31772-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31772-1)
- Babcock, D.F., First, N.L. & Lardy, H.A. (1976) Action of ionophore A23187 at the cellular level. Separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 251(13), 3881–3886. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33330-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33330-6)
- Bailey, J.L. (2010) Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(5), 334–348. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.512377>
- Baker, M.A., Hetherington, L. & Aitken, R.J. (2006) Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 15), 3182–3192. <https://doi.org/10.1242/jcs.03055>
- Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D. & First, N.L. (1983) Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, 28(3), 717–725. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.3.717>
- Barceló-Fimbres, M., Campos-Chillón, L.F. & Seidel, G.E. (2011) In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(3), 495–502. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01696.x>
- Barros, C. & Yanagimachi, R. (1971) Induction of Zona Reaction in Golden Hamster Eggs by Cortical Granule Material. *Nature*, 233(5317), 268–269. <https://doi.org/10.1038/233268a0>
- Bavister, B.D. & Yanagimachi (1977) The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 16(2), 228–237. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.2.228>

- Bedford, J.M., Moore, H.D. & Franklin, L.E. (1979) Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Experimental Cell Research*, 119(1), 119–126. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90341-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90341-0)
- Bermejo-Alvarez, P., Lonergan, P., Rath, D., Gutiérrez-Adan, A., Rizos, D. & Bermejo-Álvarez, P. (2010a) Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(2), 426–436. <https://doi.org/10.1071/RD09142>
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. & Gutierrez-Adan, A. (2008a) Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiological Genomics*, 32(2), 264–272. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00234.2007>
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. & Gutiérrez-Adán, A. (2008b) Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? *Biology of Reproduction*, 79(4), 594–597. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070169>
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. & Gutierrez-Adan, A. (2010b) Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3394–3399. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913843107>
- Bermejo-Alvarez, P., Roberts, R.M. & Rosenfeld, C.S. (2012) Effect of glucose concentration during in vitro culture of mouse embryos on development to blastocyst, success of embryo transfer, and litter sex ratio. *Molecular Reproduction and Development*, 79(5), 329–336. <https://doi.org/10.1002/mrd.22028>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G.J. (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Bleil, J.D., Beall, C.F. & Wassarman, P.M. (1981) Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology*, 86(1), 189–197. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90329-8)
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J.L. & Sirard, M.-A. et al. (2004) Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1879–1889. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026849>
- Bondioli, K.R., Ellis, S.B., Pryor, J.H., Williams, M.W. & Harpold, M.M. (1989) The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90567-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90567-0)
- Bondioli, K.R. & Wright, R.W. (1983) In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. *Journal of Animal Science*, 57(4), 1001–1005. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5741001x>

- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. & Dressel, M.A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27(1), 147–158. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- Brackett, B.G., Oh, Y.K., Evans, J.F. & Donawick, W.J. (1980) Fertilization and early development of cow ova. *Biology of Reproduction*, 23(1), 189–205. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.1.189>
- Brackett, B.G. & Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 12(2), 260–274. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.2.260>
- Bredbacka, K. & Bredbacka, P. (1996) Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(2), 169–172. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060169>
- Bucci, D., Galeati, G., Tamanini, C., Vallorani, C., Rodriguez-Gil, J.E. & Spinaci, M. (2012) Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa. *Theriogenology*, 77(6), 1206–1216. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.028>
- Burkart, A.D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M. & Dean, J. (2012) Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *The Journal of Cell Biology*, 197(1), 37–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112094>
- Carlson, A.E., Westenbroek, R.E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D.E. & Hille, B. et al. (2003) CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14864–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536658100>
- Carreira, J.T., Mingoti, G.Z., Rodrigues, L.H., Silva, C., Perri, S.H.V. & Koivisto, M.B. (2012) Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and in-vitro embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-1>
- Carrel, A. & Ebeling, A.H. (1923) Action of Serum on Fibroblasts in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*, 37(6), 759–765. <https://doi.org/10.1084/jem.37.6.759>
- Carrera, A. (1996) Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation. *Developmental Biology*, 180, 284–296. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0301>
- Casey, P.J., Hillmann, R.B., Robertson, K.R., Yudin, A.I., Liu, I.K.M. & Drobni, E.Z. (1993) Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm that Differentiates between Living and Dead Sperm. *Journal of Andrology*, 14(4), 289–297. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1993.tb03367.x>
- Cesari, A., Kaiser, G.G., Mucci, N., Mutto, A., Vincenti, A. & Fornés, M.W. et al. (2006) Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*, 66(5), 1185–1193. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.029>

- Chalbi, M., Barraud-Lange, V., Ravaux, B., Howan, K., Rodriguez, N. & Soule, P. et al. (2014) Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*, 141(19), 3732–3739. <https://doi.org/10.1242/dev.111534>
- Chamberland, A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M.A., Sullivan, R. & Bailey, J.L. (2001) The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, 55(3), 823–835. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00446-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00446-0)
- Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A. & Manjunath, P. (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 26(4), 313–318. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260404>
- Chang, M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697–698. <https://doi.org/10.1038/168697b0>
- Chang, M.C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 184(4684), 466–467
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L. & Levin, L.R. et al. (2000) Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*, 289(5479), 625–628. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.625>
- Cheng, W.T.K., Moor, R.M. & Polge, C. (1986) In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 25(1), 146
- Chiu, P.C.N., Wong, B.S.T., Chung, M.-K., Lam, K.K.W., Pang, R.T.K. & Lee, K.-F. et al. (2008) Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 79(5), 869–877. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069344>
- Collin, S., Sirard, M.-A., Dufour, M. & Bailey, J.L. (2000) Sperm Calcium Levels and Chlortetracycline Fluorescence Patterns are Related to the In Vivo Fertility of Cryopreserved Bovine Semen. *Journal of Andrology*, 21(6), 938–943. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03425.x>
- Cormier, N. & Bailey, J.L. (2003) A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 69(1), 177–185. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011056>
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W. & Hanson, F.W. (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, 15(3), 213–226. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150303>
- Dallemagne, M., Ghys, E., Schrevel, C. de, Mwema, A., Troy, D. de & Rasse, C. et al. (2018) Oxidative stress differentially impacts male and female bovine embryos depending on the culture medium and the stress condition. *Theriogenology*, 117, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.020>

- Desnoyers, L. & Manjunath, P. (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 10149–10155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50212-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50212-5)
- Dominko, T. & First, N.L. (1997) Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology*, 47(5), 1041–1050. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00061-7)
- Dorval, V., Dufour, M. & Leclerc, P. (2002) Regulation of the phosphotyrosine content of human sperm proteins by intracellular Ca²⁺: role of Ca²⁺-adenosine triphosphatases. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1538–1545. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004127>
- Downs, S.M. & Dow, M.P. (1991) Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biology of Reproduction*, 44(6), 1025–1039. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.1025>
- Druart, X., Cognié, J., Baril, G., Clément, F., Dacheux, J.-L. & Gatti, J.-L. (2009) In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction*, 138(1), 45–53. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0108>
- Dubé, C., Leclerc, P., Baba, T., Reyes-Moreno, C. & Bailey, J.L. (2005) The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *Journal of Andrology*, 26(4), 519–528. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04163>
- Ealy, A.D., Wooldridge, L.K. & McCoski, S.R. (2019) Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Human Reproduction*, 97(6), 2555–2568. <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>
- Eckert, J. & Niemann, H. (1995) In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology*, 43, 1211–1225. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00093-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00093-n)
- Ehrenwald, E., Parks, J.E. & Foote, R.H. (1988) Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Research*, 20(2), 145–157. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120200205>
- Eyestone, W.H. & First, N.L. (1989) Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology*, 31(1), 191. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90599-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90599-2)
- Feng, H.L., Hershlag, A., Han, Y.B. & Zheng, L.J. (2006) Localizations of intracellular calcium and Ca²⁺-ATPase in hamster spermatogenic cells and spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 69(8), 618–623. <https://doi.org/10.1002/jemt.20329>
- Florman, H.M. & First, N.L. (1988) The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Developmental Biology*, 128(2), 453–463. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90307-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90307-7)

- Florman, H.M., Tombes, R.M., First, N.L. & Babcock, D.F. (1989) An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology*, 135(1), 133–146. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90164-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90164-4)
- Florman, H.M. & Wassarman, P.M. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 41(1), 313–324. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90084-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90084-4)
- Foote, R.H. (1977) Sex ratios in dairy cattle under various conditions. *Theriogenology*, 8(6), 349–356. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(77\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(77)90186-8)
- Fraser, L.R., Abeydeera, L.R. & Niwa, K. (1995) Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 40(2), 233–241. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080400213>
- Frei, R.E., Schultz, G.A. & Church, R.B. (1989) Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86(2), 637–641. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0860637>
- Gadella, B.M. & Harrison, R.A.P. (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127, 2407–2420. <https://doi.org/10.1242/dev.127.11.2407>
- Galantino-Homer, H.L., Florman, H.M., Storey, B.T., Dobrinski, I. & Kopf, G.S. (2004) Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*, 67(4), 487–500. <https://doi.org/10.1002/mrd.20034>
- Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E. & Kopf, G.S. (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biology of Reproduction*, 56(3), 707–719. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.707>
- García-Herreros, M. & Leal, C.L.V. (2014) Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(6), 338–347. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.938279>
- Gardner, A.J., Williams, C.J. & Evans, J.P. (2007) Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction*, 133(2), 383–393. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0304>
- Go, K.J. & Wolf, D.P. (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biology of Reproduction*, 32(1), 145–153. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.1.145>

- Gonçalves, F.S., Barretto, L.S.S., Arruda, R.P., Perri, S.H.V. & Mingoti, G.Z. (2014) Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 50(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9675-4>
- Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi Y. & Ogawa, K. (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 753–758
- Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. & Ogawa, K. (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83(2), 753–758. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830753>
- Grisart, B., Massip, A., Collette, L. & Dessy, F. (1995) The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology*, 43(6), 1097–1106. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00073-h](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00073-h)
- Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, D. & Longobardi, S. et al. (2014) Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82(4), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.028>
- Guimarães, A.C.G., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.B., Giotto, A.B. & Machado, C.I.U. et al. (2014) Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*, 146(3-4), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.016>
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C. & Kastelic, J.P. et al. (2016) Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
- Gutiérrez-Adán, A., Behboodi, E., Andersen, G.B., Medrano, J.F. & Murray, J.D. (1996) Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology*, 46(3), 515–525. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00173-2](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00173-2)
- Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F.A., Boland, M.P. & Pintado, B. et al. (2001) Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 55(5), 1117–1126. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00471-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00471-x)
- Gutiérrez-Adán, A., Oter, M., Martínez-Madrid, B., Pintado, B. & La Fuente, J. de (2000) Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Molecular Reproduction and Development*, 55(2), 146–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200002\)55:2<146::AID-MRD3>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<146::AID-MRD3>3.0.CO;2-F)

- Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P. & Suarez, S.S. (2006) Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, 75(4), 501–507. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053306>
- Handrow, R.R., First, N.L. & Parrish, J.J. (1989) Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *The Journal of Experimental Zoology*, 252(2), 174–182. <https://doi.org/10.1002/jez.1402520209>
- Hasler, J.F. (2000) In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, 15(Suppl 5), 47–58. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_5.47
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D. & Mower, S.A. et al. (1995) Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141–152. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00020-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U)
- Henkel, R.R. & Schill, W.-B. (2003) Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>
- Heras, S., Coninck, D.I.M. de, van Poucke, M., Goossens, K., Bogado Pascottini, O. & van Nieuwerburgh, F. et al. (2016) Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 17, 72. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2393-z>
- Holm, P. & Callesen, H. (1998) In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reproduction Nutrition Development*, 38, 579–594. <https://doi.org/10.1051/rnd:19980601>
- Holm, P., Shukri, N.N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C. & Callesen, H. (1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology*, 50(8), 1285–1299. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00227-1)
- Hunter, R.H.F. (2002) Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(4), 186–190. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00376.x>
- Hyttel, P., Greve, T. & Callesen, H. (1988) Ultrastructure of in-vivo fertilization in superovulated cattle. *Journals of Reproduction and Fertility*, 82(1), 1–13. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820001>
- Hyttel, P., Xu, K.P., Smith, S., Callesen, H. & Greve, T. (1987) Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anatomy and Embryology*, 176, 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF00309749>
- Ignatz, G.G., Cho, M.Y. & Suarez, S.S. (2007) Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of Reproduction*, 77(6), 906–913. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062505>
- Igusa, Y., Miyazaki, S. & Yamashita, N. (1983) Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. *The Journal of Physiology*, 340, 633–647. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014784>

- Ikeda, H., Kikuchi, K., Noguchi, J., Takeda, H., Shimada, A. & Mizokami, T. et al. (2002) Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology*, 57(4), 1309–1318. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00630-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00630-1)
- Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M. (2011) The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 81–87. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.70>
- Iritani, A., Kasai, M., Niwa, K. & Song, H.B. (1984) Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(2), 487–492. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700487>
- Iritani, A. & Niwa, K. (1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50, 119–121
- Iwata, H., Shiono, H., Kon, Y., Matsubara, K., Kimura, K. & Kuwayama, T. et al. (2008) Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.006>
- Jansen, R.P. (1978) Fallopian Tube Isthmic Mucus and Ovum Transport. *Science*, 201(4353), 349–351. <https://doi.org/10.1126/science.580814>
- Jin, J., Jin, N., Zheng, H., Ro, S., Tafolla, D. & Sanders, K.M. et al. (2007) Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of Reproduction*, 77(1), 37–44. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060186>
- Kanai, S., Yonezawa, N., Ishii, Y., Tanokura, M. & Nakano, M. (2007) Recombinant bovine zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4 coexpressed in Sf9 cells form a sperm-binding active hetero-complex. *The FEBS Journal*, 274(20), 5390–5405. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06065.x>
- Kang, S.-S., Koyama, K., Huang, W., Yang, Y., Yanagawa, Y. & Takahashi, Y. et al. (2015) Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 61(2), 99–105. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-112>
- Kato, Y., Ohshima, Y., Sasaki, A., Yoshikawa, E., Xu, H. & Nagao, Y. (2022) The secretion and metabolism of cumulus cells support fertilization in the bovine model. *Theriogenology*, 193, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.025>
- Keskintepe, L. & Brackett, B.G. (1996) In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*, 55(2), 333–339. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.2.333>
- Khurana, N.K. & Niemann, H. (2000) Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54(5), 741–756. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00387-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00387-3)

- Kimura, K., Spate, L.D., Green, M.P. & Roberts, R.M. (2005) Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 72(2), 201–207. <https://doi.org/10.1002/mrd.20342>
- King, W.A., Yadav, B.R., Xu, K.P., Picard, L., Sirard, M.A. & Supplizi, A.V. et al. (1991) The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 36(5), 779–788. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90343-c](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90343-c)
- Kochhar, H.S., Kochhar, K.P., Basrur, P.K. & King, W.A. (2003) Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 77(1-2), 33–49. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00006-x)
- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G. & Palma, G. (1998) Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 49(4), 435–443. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199804\)49:4<435::AID-MRD11>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199804)49:4<435::AID-MRD11>3.0.CO;2-T)
- Kölle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Totzauer, I., Amselgruber, W. & Plendl, J. (1996) Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *The Histochemical Journal*, 28(6), 441–447. <https://doi.org/10.1007/BF02331435>
- Kotarski, F., Zimmer, B. & Wrenzycki, C. (2019) 147 Pre-incubation of bovine sperm used for IVF accelerates the developmental kinetics of the resulting embryos and possibly their sex ratio. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 198. <https://doi.org/10.1071/RDv31n1Ab147>
- Kroetsch, T.G. & Stubbings, R.B. (1992) Sire and insemination dose does effect in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 37(1), 240. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90309-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90309-F)
- Lamirande, E. de & Gagnon, C. (2002) The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Molecular Human Reproduction*, 8(2), 124–135. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.124>
- Lane, M.E., Thérien, I., Moreau, R. & Manjunath, P. (1999) Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biology of Reproduction*, 60(1), 169–175. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.1.169>
- Larson, M.A., Kimura, K., Kubisch, H.M. & Roberts, R.M. (2001) Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9677–9682. <https://doi.org/10.1073/pnas.171305398>
- Laurincík, J., Hyttel, P., Baran, V., Eckert, J., Lucas-Hahn, A. & Pivko, J. et al. (1998) A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure. *Molecular Reproduction and Development*, 50(2), 192–199. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199806\)50:2<192::AID-MRD10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199806)50:2<192::AID-MRD10>3.0.CO;2-9)
- Laurincík, J., Kroslák, P., Hyttel, P., Pivko, J. & Sirotkin, A.V. (1992) Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture in vitro. *Reproduction Nutrition Development*, 32(2), 151–161. <https://doi.org/10.1051/rnd:19920208>

- Lawson, C., Dorval, V., Goupil, S. & Leclerc, P. (2007) Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. *Molecular Human Reproduction*, 13(5), 307–316. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam012>
- Lechniak, D., Strabel, T., Bousquet, D. & King, A.W. (2003) Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(3), 224–227. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00410.x>
- Lee, C.N. & Ax, R.L. (1984) Concentrations and Composition of Glycosaminoglycans in the Female Bovine Reproductive Tract. *Journal of Dairy Science*, 67, 2006–2009
- Lefebvre, R., Chenoweth, P.J., Drost, M., LeClear, C.T., MacCubbin, M. & Dutton, J.T. et al. (1995) Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of Reproduction*, 53(5), 1066–1074. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.5.1066>
- Leibfried, M.L. & Bavister, B.D. (1982) Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster pp yp. *Journal of Reproduction and Fertility*, 66, 87–93. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660087>
- Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Parrish, J.S. & First, N.L. (1989) In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31(1), 61–74. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90564-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90564-5)
- Leibo, S.P. & Rall, W.F. (1990) Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 33(2), 531–552. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90510-z](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90510-z)
- Leme, L.O., Carvalho, J.O., Franco, M.M. & Dode, M.A.N. (2020) Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 141, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.002>
- Lenz, R.W., Ball, G.D., Lohse, J.K., First, N.L. & Ax, R.L. (1983) Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 28(3), 683–690. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.3.683>
- Lessley, B.A. & Garner, D.L. (1983) Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Research*, 7(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120070105>
- Litscher, E.S. & Wassarman, P.M. (2014) Evolution, structure, and synthesis of vertebrate egg-coat proteins. *Trends in Developmental Biology*, 8, 65–76. 26504367
- Lockhart, K.N., Drum, J.N., Balboula, A.Z., Spinka, C.M., Spencer, T.E. & Ortega, M.S. (2023) Sire modulates developmental kinetics and transcriptome of the bovine embryo. *Reproduction*, 166(5), 337–348. <https://doi.org/10.1530/REP-23-0030>
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D. & Evans, A.C.O. (2006) Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65(1), 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>

- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P. & Boland, M.P. (1999) Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(1), 159–167. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170159>
- Lopata, A., Patullo, M.J., Chang, A. & James, B. (1976) A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertility and Sterility*, 27(6), 677–684. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)41899-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)41899-6)
- Luthardt, F.W. & Donahue, R.P. (1973) Pronuclear DNA synthesis in mouse eggs. An autoradiographic study. *Experimental Cell Research*, 82(1), 143–151. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90256-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90256-5)
- Machado, G.M., Carvalho, J.O., Filho, E.S., Caixeta, E.S., Franco, M.M. & Rumpf, R. et al. (2009) Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 71(8), 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>
- Madgwick, S., Levasseur, M. & Jones, K.T. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 17), 3849–3859. <https://doi.org/10.1242/jcs.02506>
- Marquant-Le Guienne, B., Humblot, P., Thibier, M. & Thibault, C. (1990) Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reproduction Nutrition Development*, 30(2), 259–266. <https://doi.org/10.1051/rnd:19900212>
- Massip, A. & Mulnard, J. (1980) Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58(2), 475–478. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0580475>
- Miller, D.J. (2018) Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *Animal*, 12(s1), s110-s120. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000526>
- Miller, D.J., Winer, M.A. & Ax, R.L. (1990) Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, 42(5-6), 899–915. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.6.899>
- Miller, G.F., Gliedt, D.W., Rakes, J.M. & Rorie, R.W. (1994) Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology*, 41(3), 689–696. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90178-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90178-1)
- Mocé, E., Graham, J.K. & Schenk, J.L. (2006) Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66(4), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.063>
- Moore, S.G. & Hasler, J.F. (2017) A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>

- Morales, P. & Cross, N.L. (1989) A new procedure for determining acrosomal status of very small numbers of human sperm. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37(8), 1291–1292. <https://doi.org/10.1177/37.8.2474023>
- Morton, K.M., Herrmann, D., Sieg, B., Struckmann, C., Maxwell, W.M.C. & Rath, D. et al. (2007) Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74(8), 931–940. <https://doi.org/10.1002/mrd.20573>
- Müller, P., Erlemann, K.R., Müller, K., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E. & Marienfeld, K. et al. (1998) Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, 27(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s002490050108>
- Naaby-Hansen, S., Mandal, A., Wolkowicz, M.J., Sen, B., Westbrook, V.A. & Shetty, J. et al. (2002) CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Developmental Biology*, 242(2), 236–254. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0527>
- Nagano, M., Katagiri, S. & Takahashi, Y. (2006) Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, 14(1), 53–61. <https://doi.org/10.1017/S0967199406003510>
- Navara, C.S., First, N.L. & Schatten, G. (1996) Phenotypic variations among paternal centrosomes expressed within the zygote as disparate microtubule lengths and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5384–5388. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5384>
- Nedambale, T.L., Dinnyés, A., Yang, X. & Tian, X.C. (2004) Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1671–1676. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027987>
- Neri-Vidaurre, P.D.C., Torres-Flores, V. & González-Martínez, M.T. (2006) A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.095>
- Niwa, K. & Ohgoda, O. (1988) Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30(4), 733–741. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90308-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90308-1)
- Nixon, B., Bielanowicz, A., Anderson, A.L., Walsh, A., Hall, T. & McCloghry, A. et al. (2010) Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology*, 224(1), 71–83. <https://doi.org/10.1002/jcp.22090>
- O'Callaghan, E., Sánchez, J.M., McDonald, M., Kelly, A.K., Hamdi, M. & Maicas, C. et al. (2021) Sire contribution to fertilization failure and early embryo survival in cattle. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 7262–7271. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19900>

- Orgal, S., Zeron, Y., Elior, N., Biran, D., Friedman, E. & Druker, S. et al. (2012) Season-Induced Changes in Bovine Sperm Motility Following a Freeze-Thaw Procedure. *Journal of Reproduction and Development*, 58(2), 212–218. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-149N>
- Ortega, M.S., Moraes, J.G.N., Patterson, D.J., Smith, M.F., Behura, S.K. & Poock, S. et al. (2018) Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biology of Reproduction*, 99(6), 1244–1254. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy141>
- Parrish, J.J. (2014) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Parrish, J.J., Krogenaes, A. & Susko-Parrish, J.L. (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6), 859–869. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00271-9)
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A. & First, N.L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1780. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Parrish, J.J. & Susko-Parrish, J.L. (2001) Calcium increases in the anterior head of bovine sperm during capacitation. *Biology of Reproduction*, 64 (Suppl. 1), 112
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. & First, N.L. (1985) Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology*, 24(5), 537–549. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(85\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(85)90060-3)
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. & First, N.L. (1989b) Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction*, 41(4), 683–699. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683>
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M. & First, N.L. (1989a) Capacitation of Bovine Spermatozoa by Oviduct Fluid. *Biology of Reproduction*, 40(5), 1020–1025. <https://doi.org/10.1095/biolreprod40.5.1020>
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H. & First, N.L. (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4). [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3)
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Uguz, C. & First, N.L. (1994) Differences in the Role of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate during Capacitation of Bovine Sperm by Heparin or Oviduct Fluid. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1099–1108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.6.1099>
- Perez Siqueira, A.F., Castro, L.S. de, Assis, P.M. de, Bicudo, L.d.C., Mendes, C.M. & Nichi, M. et al. (2018) Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. *PLoS One*, 13(7), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200273>
- Pérez-Crespo, M., Ramírez, M.A., Fernández-González, R., Rizos, D., Lonergan, P. & Pintado, B. et al. (2005) Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Molecular Reproduction and Development*, 72(4), 502–510. <https://doi.org/10.1002/mrd.20366>

- Perry, G. (2016) *2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. Available from: <https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>
- Pertoft, H., Rubin, K., Kjellén, L., Laurent, T.C. & Klingeborn, B. (1977) The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll(TM). *Experimental Cell Research*, 110(2), 449–457. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90311-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90311-1)
- Plante, L. & King, W.A. (1996) In Vitro Development of Spontaneously Activated Bovine Oocytes. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*, 13(5), 435–446
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.j., Beteridge, K.J. & Suarez, S.S. (1991) Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 44(1), 102–107. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.1.102>
- Quinton, H. (2023) *Commercial Embryo Transfer Activity in Europe 2022*
- Reichenbach, H.D., Liebrich, J., Berg, U. & Brem, G. (1992) Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95(2), 363–370. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950363>
- Residiwati, G., Tuska, H.S.A., Dolatabad, N.-A., Sidi, S., van Damme, P. & Pavani, K.C. et al. (2020) Crossbreeding effect of double-muscled cattle on in vitro embryo development and quality. *Reproductive Biology*, 20(3), 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.007>
- Ricart, M.C., Breininger, E., Rodriguez, P.C. & Beconi, M.T. (2015) Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, 47(1), 30–36. <https://doi.org/10.1111/and.12218>
- Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A. & Lonergan, P. (2008a) Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(6), 734–740. <https://doi.org/10.1071/RD08083>
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., La Fuente, J. de, Boland, M.P. & Lonergan, P. (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236–243. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P. & Lonergan, P. (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>
- Rogers, B.J. & Yanagimachi, R. (1975) Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 13(5), 568–575. <https://doi.org/10.1095/biolreprod13.5.568>
- Rubessa, M., Boccia, L., Campanile, G., Longobardi, V., Albarella, S. & Tateo, A. et al. (2011) Effect of energy source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. *Theriogenology*, 76(7), 1347–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.004>

- Rubessa, M., Kandel, M.E., Schreiber, S., Meyers, S., Beck, D.H. & Popescu, G. et al. (2020) Morphometric analysis of sperm used for IVP by three different separation methods with spatial light interference microscopy. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(1), 26–36. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1701139>
- Saeki, K., Nagao, Y., Hoshi, M. & Nagai, M. (1995) Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology*, 43(4), 751–759. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00017-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00017-3)
- Saha, S., Rajamahendran, R., Boediono, A., Sumantri, C. & Suzuki, T. (1996) Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 46(2), 331–343. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00189-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00189-6)
- Samardzija, M., Karadjole, M., Getz, I., Makek, Z., Cergolj, M. & Dobranic, T. (2006b) Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 58. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-58>
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I. & Dobranic, T. et al. (2006a) A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3-4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>
- Sattar, A., Rubessa, M., Di Francesco, S., Longobardi, V., Di Palo, R. & Zicarelli, L. et al. (2011) The influence of gamete co-incubation length on the in vitro fertility and sex ratio of bovine bulls with different penetration speed. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), 1090–1097. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01791.x>
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J. & Blayney, L.M. et al. (2002) PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129, 3533–3544. <https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3533>
- Schenk, J.L., Suh, T.K., Cran', D.G. & Seidel Jr., G.E. (1999) Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52(8), 1375–1391. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00224-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00224-1)
- Schenk, J.L., Suh, T.K. & Seidel, G.E. (2006) Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, 65(2), 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.026>
- Seidel, G.E., Bowen, R.A. & Kane, M.T. (1976) In vitro fertilization, culture, and transfer of rabbit ova. *Fertility and Sterility*, 27(7), 861–870. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)41964-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)41964-3)
- Shalgi, R. & Phillips, D.M. (1988) Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biology of Reproduction*, 39(5), 1207–1213. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.5.1207>
- Simerly, C.R., Hecht, N.B., Goldberg, E. & Schatten, G. (1993) Tracing the incorporation of the sperm tail in the mouse zygote and early embryo using an anti-testicular alpha-tubulin antibody. *Developmental Biology*, 158(2), 536–548. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1211>
- Sirard, M.A. & Lambert, R.D. (1985) In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biology of Reproduction*, 33(2), 487–494. <https://doi.org/10.1095/biolreprod33.2.487>

- Smith, T.T., Mckinnon-Thompson, C.A. & Wolf, D.E. (1998) Changes in lipid diffusibility in the hamster sperm head plasma membrane during capacitation in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 50(1), 86–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199805\)50:1<86::AID-MRD11>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199805)50:1<86::AID-MRD11>3.0.CO;2-W)
- Smith, T.T. & Yanagimachi, R. (1990) The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biology of Reproduction*, 42(3), 450–457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.3.450>
- Smith, T.T. & Yanagimachi, R. (1991) Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct, 91(2), 567–573. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910567>
- Sostaric, E., Dieleman, S.J., van de Lest, C.H.A., Colenbrander, B., Vos, P.L.A.M. & Garcia-Gil, N. et al. (2008) Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Molecular Reproduction and Development*, 75(1), 60–74. <https://doi.org/10.1002/mrd.20766>
- Stauss, C.R., Votta, T.J. & Suarez, S.S. (1995) Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona Pellucida. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1280–1285. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1280>
- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K. & Wrenzycki, C. (2011) Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76(8), 1433–1441. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.013>
- Suarez, S.S., Brockman, K. & Lefebvre, R. (1997) Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 56(2), 447–453. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.447>
- Susko-Parrish, J.L., Wheeler, M.B., R.L. Ax, First, N.L. & Parrish, J.J. (1990) The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite, on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 33(1), 333. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90757-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90757-K)
- Talevi, R. & Gualtieri, R. (2001) Sulfated Glycoconjugates Are Powerful Modulators of Bovine Sperm Adhesion and Release from the Oviductal Epithelium In Vitro. *Biology of Reproduction*, 64(2), 491–498. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.2.491>
- Tanghe, S., van Soom, A., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L. & Kruijff, A. de (2003) Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 60(1), 135–149. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01360-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01360-2)
- Tannert, A., Töpfer-Petersen, E., Herrmann, A., Müller, K. & Müller, P. (2007) The lipid composition modulates the influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on membrane stability. *Biochemistry*, 46(41), 11621–11629. <https://doi.org/10.1021/bi7011299>
- Teijeiro, J.M., Ignatz, G.G. & Marini, P.E. (2009) Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm-oviduct interaction. *Molecular Reproduction and Development*, 76(4), 334–341. <https://doi.org/10.1002/mrd.20958>

- Tesarik, J., Greco, E. & Mendoza, C. (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19(3), 611–615. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh127>
- Tesarik, J., Mendoza, C. & Greco, E. (2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, 17(1), 184–189. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.184>
- Thérien, I., Moreau, R. & Manjunath, P. (1998) Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, 59(4), 768–776. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.4.768>
- Thérien, I., Moreau, R. & Manjunath, P. (1999) Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, 61(3), 590–598. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.590>
- Tokuhiro, K. & Dean, J. (2018) Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Developmental Cell*, 46(5), 627–640. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.07.020>
- Tominaga, K. (2004) Cryopreservation and Sexing of In Vivo- and In Vitro-Produced Bovine Embryos for Their Practical Use. *Journal of Reproduction and Development*, 50(1), 29–38. <https://doi.org/10.1262/jrd.50.29>
- Travnickova, I., Hulinska, P., Kubickova, S., Hanzalova, K., Kempisty, B. & Nemcova, L. et al. (2021) Production of sexed bovine embryos in vitro can be improved by selection of sperm treatment and co-culture system. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(6), 864–871. <https://doi.org/10.1111/rda.13926>
- Uguz, C., Vredenburg, W.L. & Parrish, J.J. (1994) Heparin-Induced Capacitation But Not Intracellular Alkalinization of Bovine Sperm Is Inhibited by Rp-Adenosine-3',5'-Cyclic Monophosphorothioate. *Biology of Reproduction*, 51(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.5.1031>
- van Gestel, R.A., Brewis, I.A., Ashton, P.R., Helms, J.B., Brouwers, J.F. & Gadella, B.M. (2005) Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction*, 11(8), 583–590. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah200>
- van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E.J., Vanroose, G., Lein, A. & Coryn, M. et al. (1997b) Timing of Compaction and Inner Cell Allocation in Bovine Embryos Produced In Vivo after Superovulation. *Biology of Reproduction*, 57, 1041–1049. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1041>
- van Soom, A., Ysebaert, M.-T. & Kruijff, A. de (1997a) Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)

- van Wagendonk-de Leeuw, A.M., Aerts, B.J.G. & Daas, J.H.G. den (1998) Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*, 49(5), 883–894. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00038-7)
- Verlhac, M.-H., Kubiak, J.Z., Clarke, H.J. & Maro, B. (1994) Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, 120(4), 1017–1025. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1017>
- Viana, J.H.M. (2018) *2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*. Available from: <https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>
- Viana, J.H.M. (2023) *2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*. Available from: <https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. & Kopf, G.S. (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129–1137. <https://doi.org/10.1242/dev.121.4.1129>
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A. & Pan, D. et al. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4), 1139–1150. <https://doi.org/10.1242/dev.121.4.1139>
- Vishwakarma, P. (1962) The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertility and Sterility*, 13, 481–485. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)34633-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)34633-7)
- Viuff, D., Avery, B., Greve, T., King, W.A. & Hyttel, P. (1996) Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 43(2), 171–179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199602\)43:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199602)43:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-O)
- Vredenburg-Wilberg, W.L. & Parrish, J.J. (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 40(4), 490–502. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080400413>
- Walters, A.H., Eyestone, W.E., Saacke, R.G., Pearson, R.E. & Gwazdauskas, F.C. (2005) Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. *Theriogenology*, 63(7), 1925–1937. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.001>
- Ward, C.R. & Storey, B.T. (1984) Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*, 104(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90084-8)
- Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M. & Lonergan, P. (2002) Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57(8), 2105–2117. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9)

-
- Ward, F., Rizos, D., Boland, M.P. & Lonergan, P. (2003) Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, 59(7), 1575–1584. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01202-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01202-5)
- Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn, K., Boland, M. & Lonergan, P. (2001) Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development*, 60(1), 47–55. <https://doi.org/10.1002/mrd.1060>
- Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P. & Boland, M.P. (2000) Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 54, 433–446. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00360-5)
- Wheeler, M.B. & Seidel, G.E. (1987) Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Research*, 18(3), 237–250. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120180305>
- Whittingham, D.G. (1968) Fertilization of Mouse Eggs in vitro. *Nature*, 220, 592–593
- Wolf, C.A., Brass, K.E., Rubin, M.I.b., Pozzobon, S.E., Mozzaquatro, F.D. & de la Corte, F.D. (2008) The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 5(3), 110–115
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W. & Niemann, H. (1998) Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112(2), 387–398. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1120387>
- Wrenzycki, C., Herrmann, D. & Niemann, H. (2007) Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S77-83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.028>
- Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K. & Niemann, H. (2002) In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 66(1), 127–134. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.127>
- Wrenzycki, C. & Stinshoff, H. (2013) Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 48 Suppl 1, 38–43. <https://doi.org/10.1111/rda.12204>
- Wrobel, K.-H., Kujat, R. & Fehle, G. (1993) The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell & Tissue Research*, 271(2), 227–239. <https://doi.org/10.1007/BF00318609>
- Xu, K.P. & Greve, T. (1988) A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(1), 127–134. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820127>

- Xu, K.P., Yadav, B.R., King, W.A. & Betteridge, K.J. (1992) Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31(4), 249–252. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310404>
- Yadav, B.R., King, W.A. & Betteridge, K.J. (1993) Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 36(4), 434–439. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360405>
- Yamaguchi, R., Muro, Y., Isotani, A., Tokuhira, K., Takumi, K. & Adham, I. et al. (2009) Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biology of Reproduction*, 81(1), 142–146. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074021>
- Yanagimachi, R. & Chang, M.C. (1964) In Vitro Fertilization of Golden Hamster Ova. *The Journal of Experimental Zoology*, 156, 361–375. <https://doi.org/10.1002/jez.1401560312>
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A. & Brackett, B.G. (1991) In vitro fertilization of goat oocytes. *Biology of Reproduction*, 44(6), 1177–1182. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.1177>
- Zanetti, N. & Mayorga, L.S. (2009) Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 81(2), 396–405. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076166>
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N. & Rodriguez-Martinez, H. (1997) Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*, 48(2), 221–231. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)84069-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)84069-1)
- Zhang, M., Lu, K.H. & Seidel, G.E. (2003) Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, 60(9), 1657–1663. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00177-8)

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden bereits der Öffentlichkeit vorgestellt:

46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) am 04./05. Juni 2019 in Wülflingen, Schweiz:

A. Fries, F. Kotarski, A. González, C. Wrenzycki

„Einfluss einer Spermien-Präinkubation auf die In-vitro-Produktion boviner Embryonen“

48. Jahrestagung der Internationalen Gesellschaft für Embryotechnologie (IETS), 10.-13. Januar 2022 in Savannah, Georgia, USA:

A. Fries, B. Zimmer, B. Rabenau, F. Kotarski, C. Wrenzycki

“Influence of a sperm pre-incubation on development and sex-ratio of in vitro produced bovine embryos”

55. Jahrestagung Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung und gleichzeitig 47. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 02.-04. März 2022 in Gießen, Deutschland:

A. Fries, B. Zimmer, B. Rabenau, F. Kotarski, C. Wrenzycki

„Einfluss einer Spermien-Präinkubation auf die Entwicklung und das Geschlechterverhältnis in vitro produzierter boviner Embryonen“

47. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) am 16./17. Juni 2022 in Bremerhaven, Deutschland:

A. Fries, B. Zimmer, B. Rabenau, F. Kotarski, C. Wrenzycki

„Einfluss einer Spermien-Präinkubation auf die In-vitro-Produktion boviner Embryonen“

Erklärung zur Dissertation

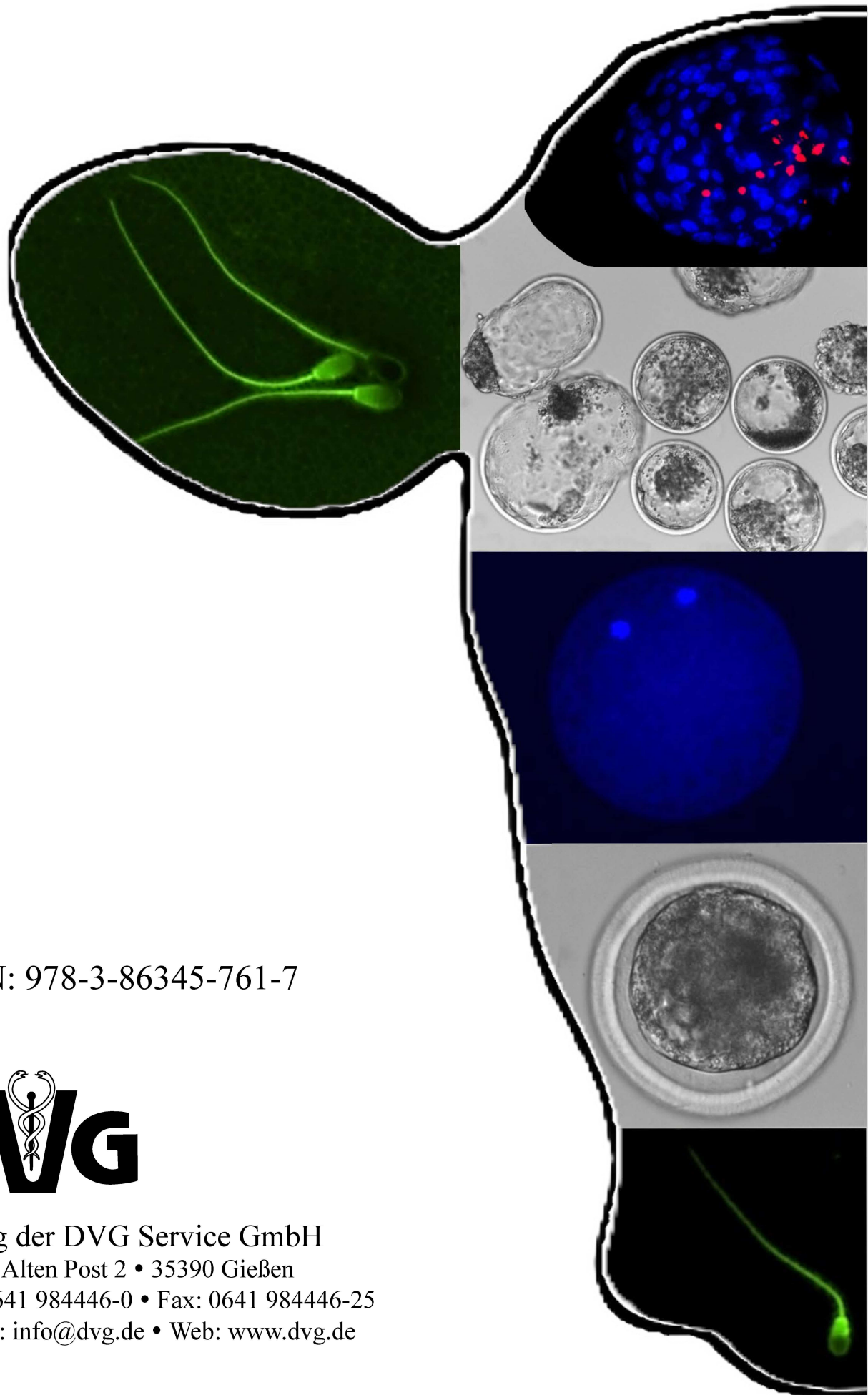
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 15.10.2024

Ann-Selina Fries

Danksagung

- Prof. Dr. Christine Wrenzycki danke ich für die Überlassung des spannenden Themas und ihrer unerschütterlichen Unterstützung bei allen größeren und kleineren Anliegen. Sei es bei der Themen-Absteckung, der Planung im Labor und natürlich auch während der Korrekturen dieser Arbeit, Du hattest und hast jederzeit ein offenes Ohr. Vielen Dank!
- Ein Dankeschön möchte ich Dr. Andrés Gonzalez aussprechen, der mir die ersten Schritte bei der Bearbeitung wies.
- Bettina Zimmer und Birgit Rabenau danke ich für ihre Unterstützung im IVP- und PCR-Labor, ohne Euch wäre vieles unmöglich!
- Der Besamungsverein Neustadt Aisch und die Masterrind GmbH (Synetics) stellten dankenswerterweise das TG-Sperma der drei verwendeten Bullen zur Verfügung.
- Danke an die Belegschaft des Fleischmarktes Olpe, für die zuverlässige, teils unterhaltsame, Bereitstellung der Ovarien, auch in Pandemie-Zeiten.
- Prof. Dr. John Ziebuhr und Dr. Heiko Slanina aus der Medizinischen Virologie der JLU danke ich für das Ermöglichen eben dieser Material-Gewinnung am Schlachthof, über die vorgeschriebenen PCR-Testungen im ersten Pandemie-Jahr.
- Vielen Dank an Dr. Patricia Kasper, Dr. Larissa Richter und Dr. Nadja Blad-Stahl! Dafür, dass Ihr mich geduldig in die Arbeiten im IVP-Labor eingeführt habt und wir gemeinsam eine tolle Arbeitszeit hatten.
- Ein großes Dankeschön geht an Franziska Kotarski! Unter Deiner Mithilfe ist das Projekt ins Rollen gekommen, immer wieder hattest Du Tipps und Lösungen parat, ein Glück und Spaß Dich zur Kollegin zu haben.
- Meinen Mit-Doktorierenden Markus Ritz, Olav Granacher, Maike Vornhagen und Svea Beermann danke ich für die großartige, gegenseitige Unterstützung, den nicht nur fachlichen Austausch unter anderem in den Mittagspausen und Eure Nachsicht mit mir, wenn es mal wieder viel zu tun gab!
- Dank meiner Geschwister und Familie habe ich Rückhalt in jeder Phase dieser Dissertation gehabt, hoffentlich kann ich Euch Eure Zeit, Geduld und Rücksichtnahme wiedergeben. Naali bedankt sich übrigens auch...
- Meine Mutter, Hanna Fries, ist steter Antrieb und Anker, während der Anfertigung dieser Arbeit im Speziellen und sonst in allen Lebenslagen. Danke Dir!



ISBN: 978-3-86345-761-7



Verlag der DVG Service GmbH
An der Alten Post 2 • 35390 Gießen
Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de