

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierzucht und Genetik
(Leiter: O.Univ.-Prof. Dr.med.vet Mathias Müller)

Einfluss der Embryo-Embryo-Interaktion in der *In vitro*-Kultur von Rinderembryonen

Diplomarbeit

Reproduktionszentrum Wieselburg
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Valentina Kuczwara

Wien, im Mai 2020

Diplomstudium Veterinärmedizin (UG2002/14U)

I 209

Veterinärmedizinische Universität Wien

Valentina Kuczwara

geboren am 02. Juli 1995 in St. Pölten

Matrikelnummer: 01345040

Ao.Univ.-Prof. Dipl.ECAR Dr.med.vet. Urban Besenfelder

Institut für Tierzucht und Genetik

Abteilung für Reproduktionsbiologie

Reproduktionszentrum Wieselburg

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorwort

Die vorliegende Diplomarbeit „Einfluss der Embryo-Embryo-Interaktion in der *In vitro*-Kultur von Rinderembryonen“ wurde als Diplomarbeit des Studiengangs Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien verfasst. Die praktische Forschung zum Thema Reproduktionsmedizin wurde am Reproduktionszentrum Wieselburg (RCW) der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Am interuniversitären Forschungsdepartment für Agrarbiotechnologie (IFA) Tulln fanden die Genexpressionsanalysen statt.

Im Zeitraum von Jänner bis März 2019 legte ich den Schwerpunkt auf die praktische Forschung meiner Diplomarbeit, anschließend wurden von September 2019 bis Mai 2020 noch weitere Schreifarbeiten vorgenommen, sowie statistische Auswertungen und Literaturrecherche durchgeführt.

Aufgrund meines bereits vorhandenen Interesses für Reproduktionsbiotechnologie war die Wahl meines Vertiefungsmodules „Reproduktionsbiotechnologie“ unter der Leitung von Herrn Professor Besenfelder für das zehnte Semester meines Studiums selbstverständlich. Im Zuge dessen war es für mich außerdem klar, mir als Ziel zu setzen, meine Diplomarbeit zum Thema Reproduktion, unter der Leitung von Herrn Professor Besenfelder, zu verfassen. Nachdem ich bereits im zehnten Semester Einsicht in die komplexen Zusammenhänge der Fruchtbarkeit der Haussäugetiere bekam, war es mir ein Anliegen, dieses Wissen auszubauen und mich noch intensiver mit der Thematik im speziellen beim Rind zu beschäftigen, um noch mehr Verständnis für das komplexe Forschungsfeld zu bekommen. Dadurch gelang es uns in gemeinsamer Zusammenarbeit eine Fragestellung im Bereich der assistierten Reproduktionstechnik beim Rind zu entwickeln.

Herr Ao.Univ.-Prof. Dipl.ECAR Dr.med.vet.Besenfelder, sowie Herr Univ.Ass. Dr. med. vet. Havlicek unterstützen mich stets bei praktischen Fragestellungen als auch bei Tätigkeiten in allen Bereichen der Durchführung. Die mit Abstand größte Hilfe war dabei aber vor allem die moralische Unterstützung, mit der sie mir immer zur Seite standen. Herr Dr.med.vet. Jörg Burgstaller war eine große Hilfe, als es um die praktische Durchführung, Arbeit und die

Auswertungen der Genexpressionsanalysen im Labor am IFA Tulln ging. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Claus Vogl war meine Anlaufstelle bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen genannten Begleitern meiner Abschlussarbeit für die großartige Unterstützung bedanken und ein herzliches Dankeschön aussprechen. Ein weiterer Dank gilt außerdem meiner gesamten Familie, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt hat, mir meine Ausbildung und damit meinen Traum ermöglicht hat.

Hiermit möchte ich aber besonders meiner Mutter, Susanna Kuczvara, für all die Jahre der unermüdlichen und aufopfernden Unterstützung danken, was maßgeblich zu meinem Erfolg beigetragen hat. Danke für alles!

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	- 4 -
1 LITERATURÜBERSICHT	- 9 -
1.1 UMWELTEINFLÜSSE	- 10 -
1.2 <i>IN VIVO</i> -BEDINGUNGEN: VORAUSSETZUNGEN IM EILEITER	- 11 -
1.3 <i>IN VITRO</i> -BEDINGUNGEN: ANFORDERUNGEN AN DIE KULTUREN	- 12 -
1.4 EMBRYO-MATERNALE KOMMUNIKATION	- 14 -
1.5 EMBRYO-EMBRYO-INTERAKTION	- 15 -
1.5.1 <i>Gruppengröße</i>	- 16 -
1.5.2 <i>Zusätze zur Kompensation der Single Embryo Culture</i>	- 18 -
1.5.3 <i>Volumen</i>	- 19 -
1.5.4 <i>Abstand</i>	- 20 -
1.6 ZIEL UND HYPOTHESE	- 23 -
2 MATERIAL UND METHODEN.....	- 25 -
2.1 MATERIAL	- 25 -
2.2 <i>IN-VITRO</i> -PRODUKTION BOVINER EMBRYONEN	- 25 -
2.2.1 <i>Ovarpunktion</i>	- 25 -
2.2.2 <i>Klassifizierung von Kumulus-Oozyten-Komplexen</i>	- 26 -
2.2.3 <i>In vitro</i> -Maturation (IVM)	- 27 -
2.2.4 <i>In vitro</i> -Fertilisation (IVF).....	- 28 -
2.2.5 <i>In vitro</i> -Kultivierung (IVK)	- 30 -
2.2.6 <i>Versuchsdesign</i>	- 30 -
2.3 QUANTITATIVE BEURTEILUNG DER EMBRYONEN	- 34 -
2.3.1 <i>Teilungsraten</i>	- 34 -
2.3.2 <i>Blastozystenraten</i>	- 34 -
2.4 KERNFÄRBUNG	- 35 -
2.4.1 <i>Fixierung zur histologischen Färbung</i>	- 35 -
2.4.2 <i>Histologische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie</i>	- 35 -
2.5 VORBEREITUNG DER EMBRYONEN FÜR GENEXPRESSIONSANALYSE	- 36 -
2.6 BLASTOZYSTEN-GENEXPRESSIONSANALYSE	- 36 -
2.6.1 <i>Genexpressionsanalyse der Rinderembryonen</i>	- 36 -

2.6.2	<i>Standards für qPCR</i>	- 38 -
2.6.3	<i>Blastozysten</i>	- 38 -
2.6.4	<i>qPCR</i>	- 38 -
2.7	STATISTIK.....	- 40 -
3	ERGEBNISSE	- 41 -
3.1	TEILUNGSRATEN	- 41 -
3.2	BLASTOZYSTENRATEN	- 42 -
3.2.1	<i>Embryokinetik</i>	- 45 -
3.3	KERNFÄRBUNGEN	- 46 -
3.4	GENEXPRESSIONSANALYSE	- 48 -
4	DISKUSSION	- 50 -
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	- 56 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 57 -
7	SUMMARY	- 59 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 61 -
9	ABBILDUNGS-/TABELLENVERZEICHNIS	- 73 -
9.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 73 -
9.2	TABELLENVERZEICHNIS	- 76 -
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 77 -
11	ANHANG	- 78 -
11.1	PHOSPHAT GEPUFFERTE SALZLÖSUNG (PBS).....	- 78 -
11.2	MODIFIZIERTE PBS (M-PBS)	- 78 -
11.3	TRANSPORTMEDIUM	- 78 -
11.4	MODIFIED PARKER MEDIUM (MPM).....	- 78 -
11.5	EGF-LÖSUNG	- 79 -
11.6	WASCHMEDIUM	- 79 -
11.7	MATURATIONS-MEDIUM.....	- 79 -
11.8	SPERM TYRODE'S-LAKTAT-STOCKLÖSUNG (SPERM TL-STOCKLÖSUNG).....	- 79 -
11.9	GENTAMYCIN-STOCKLÖSUNG	- 80 -
11.10	KAPAZITATIONS-MEDIUM (KM).....	- 80 -
11.11	TYRODE'S-LAKTAT-STOCKLÖSUNG (TL-STOCKLÖSUNG).....	- 80 -

11.12	PYRUVAT- STOCKLÖSUNG	- 81 -
11.13	BEFRUCHTUNGSMEDIUM (BM)	- 81 -
11.14	HEPARIN-MEDIUM	- 81 -
11.15	SOF-STOCKLÖSUNG	- 81 -
11.16	KULTURMEDIUM	- 82 -
11.17	HISTOLOGISCHE FÄRBE LÖSUNGEN ZUR ZELLKERNFÄRBUNG	- 82 -

1 Literaturübersicht

Moderne Reproduktionsbiotechnologien bieten mittlerweile eine breite Basis für den Einsatz von Embryonen für züchterische Zwecke. Assistierte Fortpflanzungstechnologien sind dabei nicht nur sehr nützliche Instrumente zur Gewinnung und Bereitstellung dieser Embryonen, sondern dienen auch zur detaillierten Untersuchung früher Embryonalstadien, die sich unter den verschiedensten Bedingungen entwickelt haben. Im weiten Spektrum der assistierten Reproduktion in der Biotechnologie der Rinderzucht stellt die *In vitro*-Embryoproduktion und die damit einhergehende Möglichkeit, die frühe Embryonalentwicklung ins Labor verlagern zu können, einen wesentlichen Bestandteil der Forschung, aber auch der Praxis der letzten Jahrzehnte dar.

Wie die Statistik der Internationalen Embryo Technologie Gesellschaft (IETS) zeigt, wurden im Jahr 2017 weltweit zum ersten Mal mehr Embryonen mittels *In vitro*-Produktion (IVP) bereitgestellt als über die Verwendung von Hormonen zur Superstimulation der Spendertiere mit anschließender Gewinnung der Embryonen (Viana 2018), 2018 wurden erstmals über 1 Million Embryonen *In vitro* zur Verfügung gestellt (Viana 2019).

Mit dieser rasanten Entwicklung der *In vitro*-Embryoproduktion eröffnen sich Schwerpunkte für die Forschung, deren Fokus unter anderem auf die Kontrolle und Verbesserung der ersten Abschnitte der frühen Entwicklungskompetenzen boviner Embryonen gerichtet ist, mit dem Ziel, die *In vitro*-Technologie zur potentiellen Gewinnung und Kultur von Embryonen mehr an das Verständnis der Entwicklung im Tier (*In vivo*) anzuschließen.

Jegliche Maßnahmen und Varianten der assistierten Reproduktionstechniken (ART) erfordern die erfolgreiche Gewinnung qualitativ hochwertiger Embryonen als Voraussetzung für den Erhalt einer gesunden Nachkommenschaft. Embryonen, die aus der IVP hervorgehen, werden heutzutage immer noch unterschiedlich beurteilt und können noch nicht mit gleichen Erfolgschancen wie Embryonen aus der *Ex vivo*-Gewinnung zur Verfügung gestellt werden. Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre lassen erkennen, dass als jenes vorhandene Entwicklungs- und Qualitätsdefizit vor allem Umweltbedingungen der ersten sieben Tage der *In vitro*-Kultur (IVK) von Embryonen gesehen werden (Bonilla *et al.* 2014; Farin *et al.* 2010; Hasler 2014, Lonergan *et al.* 2003; Rizos *et al.* 2002).

1.1 Umwelteinflüsse

Die Rinderhaltung und damit auch die Leistung der Tiere sind sehr stark an Faktoren gekoppelt, die der Fruchtbarkeit zuzuordnen sind. Fertilitätsstörungen wirken sich wirtschaftlich betrachtet negativ auf die Rinderhaltung aus.

So wurde gezeigt, dass der Verlust der sich früh entwickelnden Embryonen mit steigender Milchleistung deutlich zunimmt (Diskin und Moris 2008). Insgesamt wird klar, dass die *In vivo*-Bedingungen der frühen Embryonalentwicklung in einer gesunden, fruchtbaren Kuh den Goldstandard für *In vitro*-Produktionssysteme darstellen. Da jedes *In vivo*-System aber keinem starren Konstrukt folgt, sondern von dynamischen Prozessen geleitet wird, die weitgehend von der Umgebung bestimmt werden, dürfen auch solche Umwelteinflüsse nicht außer Acht gelassen werden.

Umwelteinflüsse haben nicht nur einen Kurzzeiteffekt auf den sich entwickelnden Embryo, sondern sie verursachen auch Abweichungen, in deren Folge die Eizellen bis zum geborenen Kalb betroffen sind. So haben zum Beispiel zahlreiche Studien an Tiermodellen im Laufe der vergangenen Jahre gezeigt, dass Embryonen empfindlich gegenüber Umweltbedingungen sind, die das zukünftige Wachstum und Entwicklungspotenzial des Kalbes vor und nach der Geburt beeinflussen können (Lonergan *et al.* 2014).

Die verschiedensten Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel Krankheiten, Hitze und oxidativer Stress, können zu abnormalem Wachstum, pathologischen Funktionen und Apoptose in Granulosazellen schon während des Follikelwachstums und der Eizellenreifung führen. Eine Studie lieferte Hinweise dafür, dass ebenfalls Granulosazellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, auf Stress reagieren, indem sie Kaskaden von zellulären Antioxidansmolekülen aktivieren, die auch über Exosomen in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt werden können (Saeed-Zidane *et al.* 2017).

Insgesamt lassen zahlreiche Studien erkennen, dass die *In vitro*-Umwelt massive Veränderungen des sich entwickelnden Embryos hervorrufen kann, wie an den Beispielen der Überlebensrate nach Kryokonservierung (Havlicek *et al.* 2010), den inkorrekten Mitoseabläufen nach Blastomereinteilung (Tšuiiko *et al.* 2017), den epigenetischen

Abweichungen (Salilew-Wondim *et al.* 2018) und den Abweichungen der Genexpressionsmuster (Loneragan *et al.* 2003) aufgezeigt werden kann.

Die Fruchtbarkeit ist demnach als ein empfindlicher Indikator für negative Umwelteinflüsse zu werten und spielt vor allem im Rahmen der Anwendung von ARTs eine große Rolle. Bei diesen Techniken werden steuernde Maßnahmen von außen, wie zum Beispiel Hormonapplikationen, eingesetzt oder Teilprozesse *In vitro*, extrakorporal, verlagert. Die Embryonen sind fern von jeglicher natürlichen Umgebung und der erste Schritt ihrer Entwicklung muss in einem fremden, künstlichen Umfeld stattfinden. Embryonen werden in diesem Abschnitt empfindlich getroffen, jeder Embryo muss sich an die artifiziellen Bedingungen anpassen. Eine große Aufgabe der *In vitro*-Techniken besteht darin, sich mithilfe von *In vivo*-Abläufen an den Bedingungen der Natur zu orientieren, um eine optimale Entwicklung der Embryonen zu ermöglichen.

1.2 *In vivo*-Bedingungen: Voraussetzungen im Eileiter

Die Forschung hat zum Ziel, oben genannte Voraussetzungen für eine erfolgreiche frühe Embryonalentwicklung in der IVP bestmöglich zu gewährleisten und die *In vivo*-Bedingungen der frühen Embryonalentwicklung im Eileiter der Kuh aufzuschlüsseln und detailliert nachzuahmen. Der Eileiter besitzt charakteristische, anatomische Voraussetzungen, welche durch seine drei Abschnitte (Infundibulum, Ampulla und Isthmus) und eine 4-lagige Ausstattung (Serosa, Muscularis, Submucosa, Mucosa) gekennzeichnet sind und die Aufnahme der Gameten, die die Befruchtung der Eizelle und die Ernährung und den Weitertransport der Embryonen gewährleisten.

Mit dieser Ausstattung ist der Eileiter in der Lage, sehr komplexe Vorgänge auf metabolischer Ebene zeit- und ortsgerecht, vor allem durch seine zilientragenden und sekretorischen Epithelzellen, zu bewältigen und sich den ständig ändernden Bedingungen dynamisch anzupassen (Yániz *et al.* 2000). Somit werden den sich rasch teilenden Embryonen die nötigen Makromoleküle, wie Proteine, Kohlenhydrate und Fette (Hugentobler *et al.* 2007, 2008, Desmet *et al.* 2016), optimal zugeführt, sowie weitere Inhaltsstoffe (z.B. Ionen, Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytocine) bereitgestellt. Zudem sind die Viskosität, Osmolarität und der pH-Wert weitere Garanten für alle Vorgänge im Eileiter (Menezo und Guerin 1997, Hugentobler *et al.* 2010, Hunter *et al.* 2011, Lamy *et al.* 2016, Saint-Dizier *et al.* 2019).

Dieses Mikrosystem ist sehr empfindlich, daher haben Störungen dieses Milieus einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen *In vivo*, wie Gesundheit, Milchleistung und externe Hormonbehandlungen zeigen (Gad *et al.* 2011, Maillo *et al.* 2012, Zebeli *et al.* 2015).

1.3 *In vitro*-Bedingungen: Anforderungen an die Kulturen

Vor über 40 Jahren wurden die Grundsteine zur IVP von Embryonen gelegt. Die IVP umgeht einen wesentlichen Teil der finalen Gametenreifung und der frühen Embryonalentwicklung im Tier und führt diese Schritte, nach der Follikelpunktion zur Eizellgewinnung, im Labor durch. Im Wesentlichen umfasst die IVP die Schritte der Maturation der Kumulus-Oozyten-Komplexe (*In vitro*-Maturation, IVM), der Fertilisation (*In vitro*-Fertilisation, IVF) und der Kultur der Embryonen bis zur Blastozyste (IVK). Die Schritte haben allesamt die Aufgabe, die komplexen Abschnitte im Tier *ex vivo* nachzuvollziehen, um kompetente Embryonen für den Re-Transfer ins Tier bereitzustellen. Jedoch hat sich seit Beginn der Nutzung der IVP gezeigt, dass der Eileiter eine besondere Aufgabe wahrnimmt: Es stellt ein Organ dar, welches sehr exakte Steuerungssignale aufnimmt und diese phasenspezifisch, während der Spermienreifung, der Befruchtung und zellteilungsabhängigen Entwicklung, zeit- und ortskorrekt umsetzt. Somit werden den Gameten und Embryonen im Eileiter zu jeder Zeit die notwendigen Komponenten in einer adäquaten Umwelt zur Verfügung gestellt. Diese Situation *In vitro* zu verlagern, bedingt eine weitgehend vollständige Erkennung und Umsetzung dieser physiologischen Voraussetzungen. Da diese Faktoren in ihrer Gesamtheit nicht bekannt sind, haben sich *In vitro*-Kultursysteme mit entsprechendem Schwerpunkt entwickelt, um die notwendigen *In vivo*-Bedingungen einzeln nachzuvollziehen, wie zum Beispiel:

- Standardmedien (ohne Zusätze tierischen Ursprungs),
- Medien mit Zusätzen, die von Tieren gewonnen wurden (bovines Serum Albumin, fötales Kälberserum, Follikelflüssigkeit)
- zwei- bzw. dreidimensionale Ko-Zellkultursysteme,
- konditionierte Medien,
- Kultursystem mit Mikrokanälchen,
- direkter Zusatz von Flüssigkeit aus dem Eileiter,
- Organkultur (Mäuseeileiter)

Insgesamt lassen vier Jahrzehnte intensiver Forschungsarbeiten erkennen, dass zwar elementare Erkenntnisse gewonnen und Einzelereignisse erfasst wurden, deren komplexe und dynamische Zusammenhänge *In vitro* aber derzeit nicht nachvollzogen werden können. Diese Limits der IVP erfordern weitere Wege zur Erfassung und zum Verständnis von physiologischen Entwicklungsvorgängen. Daher wurde am Institut für Tierzucht und Genetik ein Schwerpunkt auf den direkten Vergleich der Embryonalentwicklung *In vitro* (IVP) und *In vivo* (im Eileiter) gelegt.

Auf der Basis endoskopischer Verfahren zur Gewinnung und zum Transfer von Embryonen aus dem bzw. in den Eileiter verschiedener Spezies wurde eine spezielle Technik beim Rind etabliert. Diese Technik erlaubt es, unter Routinebedingungen Embryonen jederzeit aus dem Eileiter zu gewinnen und Embryonen verschiedener Herkunft zu übertragen und damit Vergleichsstudien zwischen den Bedingungen, die *In vivo* und *In vitro* vorherrschen, durchzuführen (Besenfelder *et al.* 2010).

Es gibt zahlreiche Studien, die aufzeigen, dass sich *In vitro* produzierte Embryonen, die für eine kurze Zeit im Schaf- oder Rindereileiter kultiviert werden, qualitativ deutlich bessere Entwicklungsergebnisse zeigen (Gad *et al.* 2012, Lazzari *et al.* 2010). Hier wurden *In vitro*-Embryonen in ihre physiologische Umwelt zurücktransferiert. Um aber diese Umwelt *In vitro* aufzubauen und einzusetzen, müsste ein reziproker Ansatz gewählt werden.

Da die Ermittlung einzelner Komponenten für die IVP weder qualitativ noch quantitativ einen holistischen Ansatz bringt, stellt die Gewinnung und Überführung der Eileiterflüssigkeit als Ganzes für *In vitro*-Kulturansätze eine erste Möglichkeit dar, den physiologischen Bedingungen *In vitro* näherzukommen.

Erste Versuche haben jedoch gezeigt, dass der Zusatz von Eileiterflüssigkeit zum Kulturmedium schon bei bestimmten Konzentrationen (von $\geq 5\%$) zu deutlichen Hemmeffekten in der IVK führt (Lopera-Vasquez *et al.* 2017). Obwohl die Eileiterflüssigkeit die besten Voraussetzungen für die IVK zu haben scheint, führt deren Einsatz zu negativen Ergebnissen bzw. spricht die entsprechende Arbeitsgruppe von einem toxischen Erscheinungsbild (Fernandez-Fuertes *et al.* 2018).

In weiterführenden Arbeiten konnten Emmerstorfer *et al.* (2018) und Kuczwara (2018) veranschaulichen, dass bei Zugabe von einer höheren Konzentration an Eileiterflüssigkeit zum Kulturmedium ein erheblich höherer Blastozystenanteil und qualitative Verbesserungen resultieren können. Mit diesem Kulturansatz konnte gezeigt werden, dass mittels der Übertragung von Eileiterflüssigkeit auf die IVK Blastozysten gewonnen werden können, deren

Entwicklung ein Modell darstellt, welches Ansätze zu Vergleichsstudien *In vivo* vs. *In vitro* bieten könnte (Kuczwara 2018, Emmerstorfer *et al.* 2018).

Eindeutige Beweise deuten darauf hin, dass die *In-vitro*-Kulturbedingungen bei weitem nicht optimal sind und sich Mängel in kurz- und langfristigen Auswirkungen auf den Embryo manifestieren. Ein besseres Wissen über Mechanismen zur Steuerung der Wechselwirkungen zwischen Embryo und Mutter würde daher die Entwicklung neuartiger Strategien zur Verbesserung der *In-vitro*-Embryo-Bedingungen und der Reproduktionsergebnisse bei Rindern ermöglichen (Rodríguez-Alonso *et al.* 2020).

Um die Funktion des Eileiters als Vorlage für erfolgreichere *In vitro*-Entwicklungen besser verstehen zu können, ist es jedoch neben den nutritiven Effekten des Mediums auch wichtig, den Austausch von (Signal-) Stoffen zwischen dem Embryo und dem Eileiterepithel miteinzubeziehen. Dies bedeutet, dass möglicherweise nur dann bestimmte Stoffe im Medium vorhanden sind und ihre Wirkung entfalten, wenn unter Anwesenheit beider, Embryo und Epithel, im Sinne einer embryo-maternalen Kommunikation eine Erkennung erfolgt.

1.4 Embryo-Maternale Kommunikation

Bei Säugetieren ist der Eileiter die erste mütterliche Stelle, die mit dem Embryo in Kontakt kommt und damit die erste Möglichkeit zum Austausch von Signalstoffen bietet. Bei Rindern kommt dieser Kontakt in den ersten vier Tagen nach der Befruchtung zustande. Innerhalb dieses Zeitfensters treten wichtige Entwicklungsereignisse im Embryo auf, darunter beispielsweise die ersten Teilungsabschnitte, die epigenetische Reprogrammierung und Aktivierung des embryonalen Genoms (Graf *et al.* 2014). Um in dieser sensiblen Phase eine optimale Umgebung zu schaffen und die korrekte Synchronisation dieser Ereignisse sicherzustellen, muss der Eileiter einen Dialog mit dem sich entwickelnden Embryo auf molekularer Ebene initiieren (García *et al.* 2017).

Die gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen Eileiter und den Gameten bzw. Embryonen stellen jedoch eine große wissenschaftliche Herausforderung dar, da die Botenstoffe nicht nur in Kleinstmengen vorhanden sind, sondern auch einem temporalen und örtlichen Muster unterliegen. Dies macht *In vivo*-Studien in der Durchführung besonders schwierig. Insbesondere sind Studien bei Großtieren, wie dem Rind, arbeitstechnisch wie auch

molekularbiologisch aufwendig und teuer und selbst die Probenmenge, die nur geringste Konzentrationen zu analysierender Moleküle enthält, sind stark begrenzt (Maillo *et al.* 2015).

Bei anderen Tierspezies, wie Maus, Ratte, Schwein und Pferd, wurde schon gezeigt, dass die Anwesenheit des Embryos im Eileiter über die Messung von Expressionsprofilen der messenger RNA (mRNA) bzw. von Proteinmustern erkannt wird (Smits *et al.* 2016, Georgiou *et al.* 2005, Fazeli und Holt 2016, García *et al.* 2017). Wird die Eizelle im Eileiter nicht befruchtet, so wird bei Pferd und Ratte schon der Weitertransport in die Gebärmutter gehemmt (Freeman *et al.* 1992, Villalón *et al.* 1982). Beim Kaninchen ist die obligate Eileiterpassage insofern gut sichtbar, da während der Eileitermigrationsphase eine Mucinschicht um den Embryo gelegt wird, ohne die es keine Implantation gäbe (Murakami und Imai 1996).

Erst Systemanalysen ermöglichten genauere Untersuchungen auf der Ebene der Wechselwirkungen zwischen Embryonen, im Stadium vor der Implantation, Epithelzellen des Eileiters und der Gebärmutter. Sie zeigten, dass die frühe embryonale Entwicklung, die Implantation und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit entscheidend von einer intakten Kommunikation zwischen Embryo und Muttertier abhängen (Wolf *et al.* 2003, Maillo *et al.* 2016).

Diese Erkenntnisse um die embryo-maternale Kommunikation werfen im Rahmen der Zell-zu-Zell-Interaktion auch die Frage auf, ob sich Embryonen guter und schlechter Qualität gegenseitig helfen können, sofern sie im gleichen Kulturmilieu gehalten werden. Die IVK zum Beispiel bedingt, dass Rinderembryonen im Gegensatz zu den *In vivo* Verhältnissen im Eileiter, *In vitro* in Gruppen kultiviert werden. Dies ermöglicht die Produktion und die Abgabe von Stoffen gesunder und entwicklungsfähiger Embryonen in ihre Umgebung. Möglicherweise können benachbarte Embryonen in ihrer Entwicklung z.B. mittels *apokriner* und *parakriner* Sekretion beeinflusst werden (Paria und Dey 1990, Thibodeaux *et al.* 1995, Lim und Hansel 1996, O'Neill 1997).

1.5 Embryo-Embryo-Interaktion

Erste Studien der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass in Gruppen kultivierte Rinderembryonen eine signifikant höhere Entwicklungsrate im Blastozystenstadium als einzeln kultivierte Embryonen zeigten (Keefer *et al.* 1994).

Jene Ergebnisse veranlassten zur Annahme, dass die Embryonen eine Form der Kommunikation und der kooperativen Interaktion untereinander haben müssen. Diese Annahme legt die Hypothese nahe, dass Embryonen als Helferzellen dienen könnten.

Deb und Mitarbeiter gewannen mittels Ovum-Pick-Up (OPU) Eizellen, befruchteten diese und betteten die Embryonen mit Helferembryonen in Agar-Chip ein. Mit diesem Ko-Kultursystem konnten sie zeigen, dass die Entwicklung zu Blastozysten durch Embryo-Ko-Kultur im Vergleich zu OPU-Zygoten, die allein kultiviert wurden, nachweislich gefördert wurde (*Deb et al.* 2011).

Insgesamt wird hieraus ersichtlich, dass für die IVK insbesondere die Anzahl der Embryonen in der Kulturschale (Gruppengröße), das Volumen des Kulturmediums und der Kontaktabstand der Embryonen zueinander eine besondere Rolle spielen kann, um den Austausch von Boten- und Signalstoffen zwischen den Embryonen zu ermöglichen.

1.5.1 Gruppengröße

Nicht alle Embryonen sind in der Lage, ihre Entwicklung bis zur Blastozyste selbstständig zu bewerkstelligen. Der gegenseitige Einfluss mehrerer Embryonen *In vivo* erscheint bis auf wenige Ausnahmen (Zwillings- und Drillingsträchtigkeit) nicht vorhanden zu sein. Demgegenüber stellt die Erzeugung von Embryonen mittels der IVP eine künstliche Situation dar, in der Gruppen von Embryonen unterschiedlicher Qualität einen gegenseitigen Einfluss ausüben können. Als Beispiel dafür können die Gasbedingungen genannt werden, die für die Eizell- und Embryoentwicklung *In vitro* vorherrschen. Schon geringe Unterschiede haben einen nachhaltigen Einfluss auf den Embryostoffwechsel auch im Zusammenhang mit der Bildung von Sauerstoffradikalen (engl. reactive oxygen species, ROS) (Krisher 2004).

2005 wurde aus der Arbeitsgruppe von Lopes *et al.* ein Beitrag bei der International Embryo Technology Society vorgestellt, aus dem hervorging, dass der Sauerstoffpartialdruck in unmittelbarer Umgebung zum Embryo sehr stark von der Embryogruppierung der Embryonen abhängt. Waren in der gleichen Petrischale Embryonen vereinzelt bzw. in Gruppen beieinander, so war der Sauerstoffpartialdruck, der unmittelbar im Gruppenzentrum gemessen wurde, zum Teil um das 100-fache reduziert gegenüber dem, welcher an der Oberfläche einzelner Embryonen gemessen werden konnte. Mittels dieses Messbeispiels konnte gezeigt werden, dass in unmittelbarer Nachbarschaft/Kontakt mehrerer Embryonen deutlich andere Bedingungen herrschen, als um einzelne Embryonen (Lopes *et al.* 2005).

Khurana und Niemann ko-kultivierten Zygoten schlechter Qualität jeweils zusammen mit 20 bzw. 40 Embryonen. Sie kamen zu dem Schluss, dass Gruppengrößen von 40 Embryonen einen deutlich positiveren Entwicklungseffekt auf die Zygoten hatten wie kleinere Gruppen von je 20 Embryonen (Khurana und Niemann 2000). Hoelker und Mitarbeiter konnten diese Beobachtung mit 16 bzw. 50 Embryonen in den Kulturgruppen bestätigen. In der Kulturschale mit 50 Embryonen erreichten deutlich mehr Embryonen das Blastozystenstadium (22,3% vs. 30,3%; Hoelker *et al.* 2009). Eine Studie von Ferry *et al.* (1994) konnte verdeutlichen, dass einzeln kultivierte Rinderembryonen keine Entwicklung bis zum Blastozystenstadium zeigten, die Kultur in Gruppen jedoch erfolgreich war. Der Mechanismus dieser Kooperation ist nicht bekannt, die Autoren verweisen aber auf autokrine bzw. parakrine Faktoren, wahrscheinlich Wachstumsfaktoren, die die Embryoentwicklung fördern könnten, wie schon bei Mäusen gezeigt wurde (Ferry *et al.* 1994).

Ieda und Mitarbeiter (2018) etablierten ein Mikrowellsystem, in dem „Well of the Well“ (WOW) das Zusammenwirken von kleinen Embryogruppen erfasst werden konnte. Embryonen wurden einzeln in Mikrowells kultiviert. Die einzelnen Kultursysteme waren aber miteinander verbunden (Abb. 1):

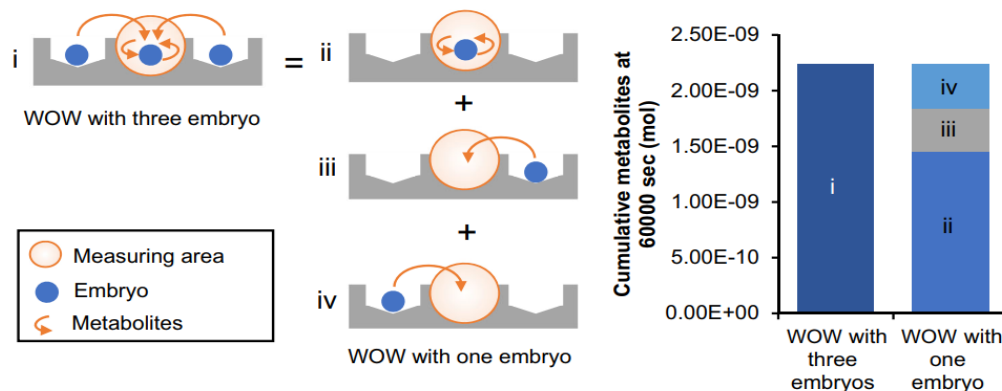


Abbildung 1: Darstellung der Anreicherung von Metaboliten in einem Well-of-the-Well System mit drei Embryonen;
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Die Ansammlung von Stoffwechselprodukten um einen Embryo, der zwischen zwei weiteren platziert und kultiviert wurde, lag nach deren Messung bei 226 % bezogen auf eine einzelne Embryoleistung. Der in der Grafik dargestellte mittlere Embryo profitierte aus den Stoffwechselleistungen aller Kompartimente, d.h. aus seinem eigenen plus den zwei benachbarten. Die Autoren sehen dieses *In vitro*-Modell als potentielle Möglichkeit zur Unterstützung in der IVP (Ieda *et al.* 2018).

In Irland kam das Team von Ward (2000) zu dem Schluss, dass die Blastozystenerträge maximiert werden konnten, wenn Embryonen in Gruppengrößen von nicht weniger als fünf kultiviert wurden. Zur Optimierung der Blastozystenqualität wurde eine Gruppengröße von 25 Embryonen empfohlen. Die irische Arbeit machte deutlich, dass die Gruppengröße und nicht das mittlere Volumen pro Eizelle/Embryo der Faktor war, der die Blastozystenausbeute und -qualität beeinflusste (Gordon 2003).

Sugimura und Mitarbeiter (2013) konnten zudem feststellen, dass die Gruppengröße einen Einfluss auf die Entwicklungskinetik hat. Sie kultivierten Embryonen in 5-, 15- und 25-Gruppen im Tropfen und konnten mittels Zeitraffer-Kinematographie (engl. time lapse cinematography, TLC) darstellen, dass das 4-Zell- bzw. Blastozysten-Stadium bei den Embryonen, die in 15- und 25-Gruppen kultiviert wurden, früher auftraten, als bei Embryonen, die zu jeweils 5 in einem Kulturtropfen waren. Diese Entwicklungsunterschiede spiegelten sich auch im gemessenen mRNA-Expressionsmuster wider (Sugimura *et al.* 2013).

In weiteren Beispielen wurde die Auswirkung der Gruppengröße auf die Entwicklung und die Interferon-Tau-Sekretion (IFN-t) von Rinderembryonen von Larson und Kubisch (1999) in den USA untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Kultivierung von IVP-Rinderembryonen in Gruppen nicht nur ihr Entwicklungsschicksal beeinflusste, sondern auch die Sekretion von IFN-t signifikant veränderte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Gruppenhaltung möglicherweise einen Einfluss auf die Trächtigkeit nach Transfer haben kann (Gordon 2003).

1.5.2 Zusätze zur Kompensation der Single Embryo Culture

Kulturen mit einzelnen Embryonen erlauben eine separate Betrachtung der Weiterentwicklung und sind aus dieser Perspektive von besonderem wissenschaftlichen Interesse. Zudem kann es unter praktischen Bedingungen auftreten, dass nur einzelne Eizellen von einem Tier gewonnen werden und für die Weiterentwicklung zur Verfügung stehen. Nachdem bereits angeführt worden ist, dass die Gruppenhaltungen von Embryonen in der Kultur einen positiven Einfluss auf die Blastozystenraten haben können, wird versucht, diese Unterstützung in der Einzelembryokultur auf anderen Wegen zu bewerkstelligen:

Gardner und Mitarbeiter haben der Kultur von einzelnen Embryonen Aminosäuren und Vitamin beigefügt und ebenfalls einen positiven Entwicklungseffekt beobachtet (Gardner *et al.* 1994).

In weiteren Versuchsansätzen zur IVK von Einzelembryonen konnten zahlreiche Hinweise ermittelt werden, die erkennen lassen, welche Zusätze zu den Medien zu erheblichen Verbesserungen der Entwicklungsraten geführt haben, so z.B. die Zusätze von:

- Aminosäuren (Gardner *et al.* 1994, Li *et al.* 2006)
- Hypotaurine und β -Mercaptoethanol (Mizushima und Fukui 2001)
- Epidermal Growth Factor (EGF) (Oyamada *et al.* 2004)
- Platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor (TGF- β 1 and β 2) (Lim und Hansel 1996)

Neben dem Zusatz einzelner Substanzen besteht die Möglichkeit durch Ko-Zellkulturen, Embryonen entsprechende Entwicklungsunterstützung zukommen zu lassen: Dazu wurden beispielsweise

- Granuloszellen (Konishi *et al.* 1996, O'Doherty *et al.* 1997),
- Bovine Eilieter Epithelzellen (BOEC; Cordova *et al.* 2014),
- Buffalo rat liver-Zellen (BRL) und
- Kumulus-Zellen (Donnay *et al.* 1997, Goovaerts *et al.* 2009)

erfolgreich verwendet.

1.5.3 Volumen

Neben dieser Möglichkeit, über die Gruppengröße effektive Konzentrationen von Substanzen im Medium zu erreichen, wird ein weiterer Weg diskutiert. In Anlehnung an *In vivo*-Bedingungen, welche dem Embryo nur sehr geringe Mengen an Eileiterflüssigkeit zur Verfügung stellen, wird versucht, den Embryo auch *In vitro* in einer Mikroumwelt aus einem Kleinstvolumen bestehend zu kultivieren. Das Team rund um Vajta (2000) designte ein WOW-System, in dem Embryonen in einer V-förmigen Vertiefung mit 0,004 μ l Medium verbracht wurden. Damit konnten Substanzen zugeführt und die Embryonen für die Dauer der Kultur einzeln beurteilt werden (Gordon 2003).

Dieser Systemansatz bringt den Vorteil mit sich, dass *autokrin* und *parakrin* sezernierte Stoffe in weniger ausverdünnter Umgebung ihre Wirkung entfalten können, Nährstoffe aber in geringeren Mengen zur Verfügung stehen bzw. toxisch wirkende Metaboliten nicht genügend aus dem embryonalen Umfeld entzogen werden.

Ieda und Mitarbeiter (2018) konnten diesen Effekt grafisch darstellen. Wie die Abbildung 2 zeigt, scheint die Akkumulation von Metaboliten mehr durch die Anzahl von Embryonen pro Volumen gekennzeichnet zu sein, wie durch das Medium-Volumen (Abb. 2) (Ieda *et al.* 2018).

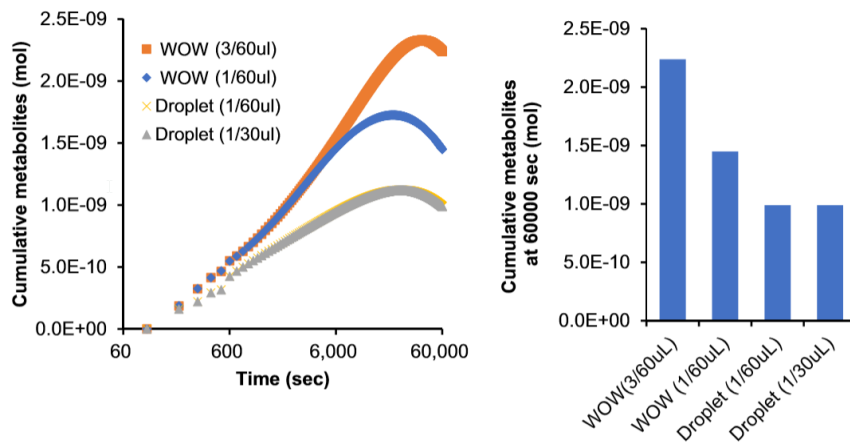


Abbildung 2: Kumulative Darstellung von Metaboliten in Abhängigkeit von der Anzahl von Embryonen bzw. vom Volumen; © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Hoelker und Mitarbeiter konnten sowohl für Kulturtropfen als auch für das WOW-System zeigen, dass mit der Zunahme des Embryo-Volumen-Verhältnisses eine bessere Weiterentwicklung bis zur Blastozyste gegeben ist (Hoelker *et al.* 2009, 2010).

1.5.4 Abstand

Arbeiten, wie jene von Smith und Mitarbeitern (2012), gehen über die Zusammensetzung löslicher Medien hinaus und untersuchen Themen wie das Medienvolumen und den Embryo-Abstand (Smith *et al.* 2012).

Mit dem Fokus auf den Embryo-Abstand als Einflussfaktor der Embryo-Embryo-Interaktion in der gemeinsamen Kultivierung von Rinderembryonen forschte auch die Arbeitsgruppe zur Studie von Garcia (2017). Zur Durchführung und Untersuchung der gemeinsamen IVK der Embryonen wurde ein spezielles, nicht toxisches, gewobenes Netz (engl. Mesh) aus Polyethylenterephthalat (PET; Polyester) verwendet (García *et al.* 2017).

Die Sinnhaftigkeit des Einsatzes eines PET-Mesh in der IVP von Rinderembryonen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. So war es das Ziel einer Forschungsgruppe, die Machbarkeit einer Polyesternetzkultur für die IVP zu untersuchen, da das Mesh eine alternative Methode zur Erfassung einzelner Embryonen während der gesamten Kultur mithilfe

der TLC darstellt. Die in dieser Studie untersuchten PET-Netzprodukte haben sich als wirksam erwiesen, um die Embryonenbewegung zu verhindern. Die Ergebnisse zeigen, dass Rinderembryonen in PET-Netzabschnitten ohne negative Nebenwirkungen kultiviert werden können, und legen nahe, dass der durch das Mesh bestimmte Embryoabstand die Embryoqualität bei atmosphärischer Sauerstoffspannung beeinflusst (Somfai *et al.* 2010).

Matoba und Mitarbeiter führten systematisch Untersuchung zur Einzelkultur von Embryonen durch. Sie testeten drei Systeme, in denen die Embryonen in der Kulturschale einzeln platziert waren, aber dennoch über Kontakt und unterschiedlichen Abstand miteinander verbunden waren. Dazu benutzten sie das WOW-System, das Cell-Tak-System und Polyesternetze unterschiedlicher Größe (Abb. 3).



Abbildung 3: Einzelembryokultur mittels WOW-System, Cell-Tak und Polyesternetz nach Matoba *et al.* 2010; © CSIRO 2010

- a) WOW-System: 4 x 5 Tropfenformation in 100 µl Medium, Vertiefung weist einen Durchmesser von ~700 µm eine Höhe von 500 µm auf
- b) Cell-Tak: 4 x 5 Embryonen pro Kulturschale in 100 µl Medium, Abstand ca. 160 µm
- c) Kleines (170 µm), mittleres (240 µm) und großes Mesh (500 µm)

In allen Anordnungen war eine Kommunikation zwischen den Embryonen während der Kulturphase möglich. Die getesteten Systeme unterschieden sich unter anderem in der Anordnung der Kompartimente und im Abstand der Embryonen zueinander. Die Autoren berichten über die erfolgreiche Entwicklung der Embryonen in allen Systemen unter Aufrechterhaltung der Beobachtung einzelner Embryonen während der gesamten Kulturphase. Die Handhabung der Embryonen im Mesh war leichter möglich (Matoba *et al.* 2010).

Gopichandran *et al.* (2006) gingen näher auf den Abstand zwischen den Embryonen während der Kultur ein. Dazu verwendeten sie das Cell-Tak-System, welches den Abstand einzelner Embryonen in der Gruppe konstant hielt. Somit konnten während der Kulturphase fixe

Abstände zwischen 0 und 689 μm ermittelt werden. Der Abstand der Embryonen in der Kultur zueinander hatte einen deutlichen Einfluss auf die Anzahl der entwickelten Blastozysten, die Zell-Zahl der Blastozysten sowie den Metabolismus. Beispielsweise wurde eine optimale Blastozystenentwicklung bei einem Abstand von 165 μm ermittelt. Größere Abstände resultierten in einer reduzierten Embryonalentwicklung bis zur Blastozyste. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass sich *parakrin* und *autokrin* sezernierte Faktoren wesentlich an der Regulation der frühen Embryonalentwicklung beteiligen (Gopichandran *et al.* 2006).

Somfai und Mitarbeiter bildeten Quadrate aus PET-Netzen, welche Flächen von 217 x 217 μm^2 , 230 x 230 μm^2 und 238 x 238 μm^2 aufwiesen. Bei den Embryonen aus den Kleinstflächen konnten mittels TLC die höchste Anzahl von entwickelten Blastozysten und der Anzahl aller Zellen bzw. der Trophektodermzellen festgestellt werden. Aus diesen Daten scheint ersichtlich zu sein, dass der Abstand der Embryonen zueinander über die Netzstruktur offensichtlich eine Barriere hinsichtlich der Kommunikation zwischen den Embryonen darstellt (Somfai *et al.* 2010). Neben der Möglichkeit, Embryonen nutzbringend in der Gruppe bzw. mit geringem Abstand zu anderen Embryonen zu kultivieren, zieht die Arbeitsgruppe von Spindler (2006) in Erwägung, auch Embryonen anderer Spezies in die Ko-Kultur einzubeziehen. Sie kultivierten Katzenembryonen mit Maus- bzw. Rinderembryonen und konnte auch hier einen positiven Entwicklungseffekt über die heterologe Embryokommunikationsschiene berichten (Spindler *et al.* 2006).

Zurückblickend auf all die bislang vielseitigen und aufwendig durchgeführten Versuche zur verbesserten IVP von Embryonen merkt Krisher (2004) aber an, dass, solange die Mechanismen, die an der Eizellen-/Embryoqualität beteiligt sind, nicht aufgeklärt sind, die Bemühungen, assistierte Reproduktionstechnologien bei Tieren für Produktions- oder biomedizinische Zwecke einzusetzen, ineffizient sein werden (Krisher 2004).

1.6 Ziel und Hypothese

Aufgrund der bisherigen Forschungsarbeiten scheint es von besonderer Bedeutung zu sein, in weiteren Untersuchungen den Effekt von Embryo-Embryo-Interaktion in der frühen Embryonalentwicklung von Rindern in der IVP zu erforschen. Dabei wird der Abstand zwischen den Embryonen als mögliche Auswirkung auf zentrale Stoffwechselvorgänge und deren Dynamik sowie auf epigenetische Effekte in Erwägung gezogen.

Die Entwicklungskompetenz von Embryonen in der *In vitro*-Entwicklung unterliegt unterschiedlichen Einflussfaktoren, daher wird folgende **Hypothese** aufgestellt:

Werden Embryonen *In vitro* kultiviert, so kann diese Entwicklung durch die Anwesenheit zusätzlicher Embryonen, die der Kultur zugesetzt werden, beeinflusst werden.

Mit diesem Effekt könnten in Zukunft weitere Schritte zum Verständnis der Embryo-Embryo-Interaktion und des Einsatzes von Embryonen als Helferzellen in IVK gemacht werden.

Am Reproduktionszentrum in Wieselburg können Untersuchungen zur IVP von Rinderembryonen jederzeit durchgeführt werden. Das zugrundeliegende Wissen und die Erfahrungen bisheriger Untersuchungen werden genutzt, um die Vorselektion der *postmortem* Ovarien von Kalbinnen und Kühen und die Auswahl qualitativ hochwertiger Embryonen zu gewährleisten und damit optimale Bedingungen für die IVK der Rinderembryonen zu schaffen.

Es soll eine *In vitro*-Methode zur Kultivierung von Rinderembryonen in Form des Polyesternetzes (Mesh) herangezogen werden und für die erfolgreiche Kultivierung, mit Fokus auf die Interaktion zwischen den Embryonen mit definiertem Abstand zueinander, zum Einsatz kommen. Damit können Informationen über die Art der Interaktion bzw. Kommunikation, mit möglichem Effekt auf die frühe Embryonalentwicklung, auf metabolischer und genetischer Grundlage geliefert werden.

Durch Zellkernfärbung mittels Hoechst-Färbung und anschließender Zellkernzählung können Veränderungen auf zellulärer Ebene festgestellt werden. Aufgrund von Ergebnissen früherer

Untersuchungen von *In vitro* vs. *In vivo* kultivierten Embryonen wurde außerdem ein selektiertes Set an Genen für Expressionsanalysen ausgewählt, die zum einen Gene aus der Atmungskette und zum anderen epigenetische und metabolische Faktoren berücksichtigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Benötigte Chemikalien, die für die IVP zum Einsatz kamen und sowohl für die selbsthergestellten Stocklösungen als auch für die Arbeitslösungen verwendet wurden, sind Produkte der Firma Sigma Aldrich und Emsure®. Das Wasser, welches für die Analysen notwendig wurde, stammt von Merck KGaA (siehe Anhang).

2.2 *In-vitro*-Produktion boviner Embryonen

2.2.1 Ovarpunktion

Nach Gewinnung und Sammlung der Ovarien von Kalbinnen und Kühen am Schlachthof, anschließender Aufbewahrung und Transport in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) wurden diese im Labor zweimal mit 37 °C warmem PBS gewaschen und gereinigt. Dieser Reinigungsvorgang diente der Beseitigung von Blutbeimengungen oder anderen Verschmutzungen, welche durch den Schlachtprozess entstanden sind. Alle Follikel auf der Ovarienoberfläche mit einer Größe von 2–10 mm wurden mit einer Kanüle (18G, Firma Braun, Melsungen, Deutschland), welche auf eine 5 ml Einwegspritze aufgesetzt wurde, punktiert. Das Punktat aus der 5 ml Spritze wurde in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt, welches in einem Wasserbad bei 37 °C gehalten wurde, bis alle Follikel auf den Eierstöcken punktiert wurden. Während der kurzen Wartezeit sedimentierten die COC im 50 ml-Falconröhrchen. Im Anschluss wurde die bodenständige, sedimentierte Schicht von COC aus dem Falconröhrchen mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen und in eine große Petrischale (Ø 10 cm) überführt. Allen Petrischalen wurde zuvor auf der Unterseite ein mittels einer Kanüle selbstgezogenes Raster graviert und diente dem systematischen Auffinden aller COC unter dem Mikroskop (Nikon SMZ 645 Zoom Stereomikroskop, 10–40-fache Vergrößerung).

2.2.2 Klassifizierung von Kumulus-Oozyten-Komplexen

Das Sediment wurde unter dem Stereomikroskop bei 20-facher Vergrößerung auf COC untersucht. Die COC wurden anschließend in einer kleinen Petrischale ($\varnothing$ 3,5 cm) in PBS-Medium gesammelt und anhand ihrer Kumulusschichtung und des Ooplasmas morphologisch klassifiziert. Für die folgende IVP wurden nur jene COC der Klasse I und II, welche die besten Qualitätsmerkmale aufwiesen (siehe Tab. 1), verwendet (siehe Abb. 4).

Tabelle 1: Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe in Anlehnung an LEIBFRIED und FIRST (1979) (Leibfried & First 1979)

Qualitätsklasse	Eigenschaften der Oozyte	Eigenschaften der Kumuluszellen
I	dunkles, gleichmäßig fein granuliertes, dichtes Ooplasma	kompakter, mindestens fünflagiger, die ganze Oozyte umschließender Kumulus
II	dunkles, gleichmäßig fein granuliertes, dichtes Ooplasma	kompakter, weniger als fünflagiger, die ganze Oozyte umschließender Kumulus
III	Ooplasma gleichmäßig dicht und feingranuliert, bis Granula in moderater Größe enthaltend	kompakter aus wenigen Lagen bestehender Kumulus, der mindestens die Hälfte der <i>Zona pellucida</i> umgibt
IV	abnorm große oder kleine Oozyten; stark verformte Oozyten; Ooplasma mit großen Granula; starke Dichteunterschiede des Ooplasmas	Oozyte ohne umgebende Kumuluszellen („nackte“) oder teilweise bis total expandierter Kumulus

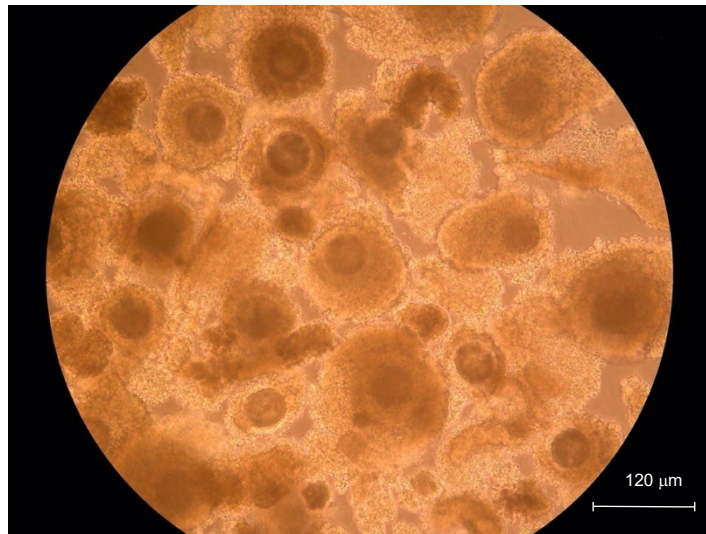


Abbildung 4: COC mit besten Qualitätsmerkmalen, vor IVM (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna)

2.2.3 *In vitro*-Maturation (IVM)

Alle COC, die aus dem Punktat gewonnen und ausgewählt worden sind, wurden vor der IVM zweimal in 2 ml Waschmedium und im Anschluss daran erneut in 2 ml Maturationsmedium überführt. Während des gesamten Prozesses wurden die COC besonders schonend, das heißt langsam und unter Vermeidung turbulenter Strömungen, in die Pipettenspitze aufgenommen, in den jeweiligen Waschlösungen abgesetzt und in der Schale mehrfach geschwenkt. Ziel dabei war es, das zusammenhängende Gefüge aus Eizelle und Kumulus nicht zu zerstören. Zur Maturation wurden die COC schließlich in eine 4-Well-Schale (Nunc™, ThermoFisher), welche mit 400 µl überschichtetem Paraffinöl und gleichem Volumen des Maturationsmediums vorbereitet war, transferiert.

Die Gruppengröße in jeder Vertiefung der 4-Well-Schale war von den pro Tag gesammelten Eierstöcken bzw. den punktierten Eizellen abhängig. Pro Vertiefung wurden Gruppen von 40 bis maximal 50 COC gebildet. Schließlich wurden die Eizellen zur Maturation für 22–24 Stunden bei 39 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.4 *In vitro*-Fertilisation (IVF)

2.2.4.1 Spermiovorbereitung

Das Tiefgefriersperma eines Bullen (Vox, Fleckvieh AT 228.932.317, Genostar, Österreich) wurde mit Hilfe des Swim-Up-Verfahrens für die IVF vorbereitet. Hierbei wurden die tiefgefrorenen Samenröhrchen im Wasserbad bei einer Temperatur von 38 °C und einer Dauer von 10 Sekunden aufgetaut. Anschließend mussten die Röhrchen mit Zellstoff getrocknet werden, um das Auskühlen durch Verdunstung und den Kontakt der Spermien mit Wasser zu verhindern. Nach Aufschneiden der Samenröhrchen wurde der Inhalt (gelbe Lösung) in einem 4 ml Kunststoffröhrchen gesammelt. Im Anschluss wurden 15 ml graduierte Falconröhrchen mit jeweils 1,6 ml Kapazitationsmedium (rote Lösung) befüllt. 200 µl des aufgetauten Spermas wurden langsam unterhalb des Kapazitationsmediums abgesetzt. Die erfolgreiche Unterschichtung war daran zu erkennen, dass eine scharfe horizontale Trennungslinie zwischen der gelben und roten Lösung zu sehen war. Ziel der vorsichtigen Unterschichtung war, dass es nicht zur Durchmischung der Spermien-Lösung und des darüber liegenden Kapazitationsmediums kam. Um eine Trennung zwischen beweglichen und unbeweglichen Spermien zu erreichen, war eine Inkubation der Röhrchen bei 39 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank notwendig. Bei erfolgreichem Swim-Up der Spermien war nach 45 Minuten eine Unschärfe der oben genannten Trennungslinie zwischen den beiden Medien zu erkennen. Das Kapazitationsmedium und die beweglichen Spermien bildeten dabei den Überstand, welcher in einem Röhrchen gesammelt und bei 200 x g für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Nach erfolgreicher Zentrifugation war ein Samenpellet in der Röhrchenspitze zu erkennen. Der Überstand über dem Samenpellet wurde mittels einer Pipette soweit wie möglich und ohne Teile des Samenpellets abgenommen. Damit ergab sich meist eine Relation des Pellets zum Restvolumen von 1:3. Das Pellet wurde in diesem Restmedium resuspendiert. Zur Ermittlung der Spermienkonzentration wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet und das Volumen der resuspendierten Spermienlösung ermittelt, welches für eine Endkonzentration von 2×10^6 Spermien/ml im IVF-Medium für die Befruchtung nötig war.

2.2.4.2 Befruchtung

Maturierte Oozyten, die durch deutlich expandierte Kumuluszellen zu erkennen waren, wurden für die weiteren Schritte der Befruchtung verwendet (siehe Abb. 5). Sie wurden zunächst in die vorbereiteten 4-Well-Schalen mit je 20 µl Heparin-Medium und 400 µl Befruchtungsmedium, das mit derselben Menge an Paraffinöl überschichtet war, umgesetzt. Das errechnete Spermiesuspensionsvolumen (siehe Punkt 2.2.4.1) wurde etwa 30 Minuten, nachdem die Eizellen in das IVF-Medium umgesetzt worden waren, am Boden der Schale meist als wolkige Masse sichtbar abgesetzt (siehe Abb. 6). Auch nach diesem Verfahrensschritt wurden die Eizellen und Spermien für 20-22 Stunden bei 39 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

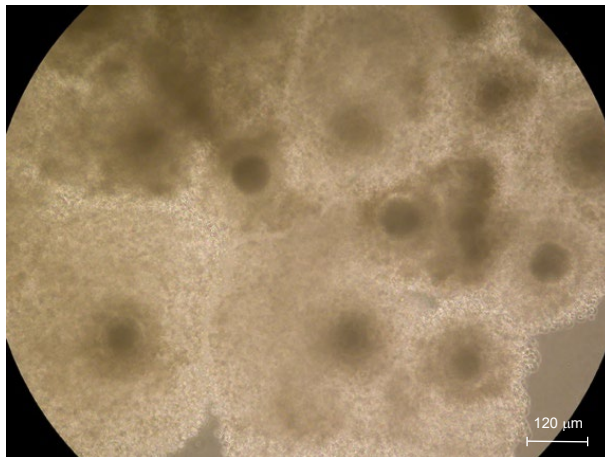


Abbildung 5: Oozyten nach IVM mit deutlich gelockerten Kumuluszellen (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna)

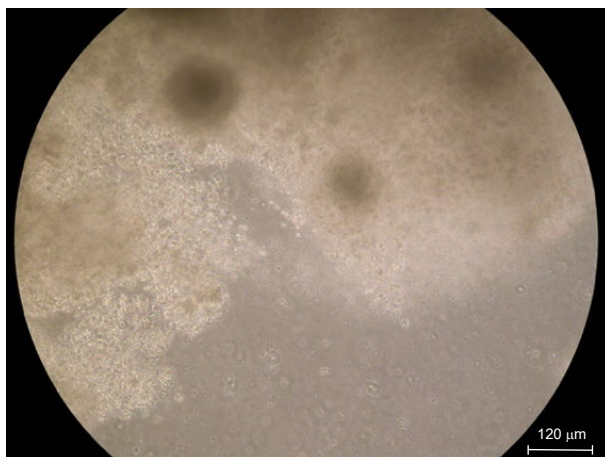


Abbildung 6: Oozyten nach IVM, mit deutlich gelockerten Kumuluszellen und zugesetzten Spermien (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna)

2.2.5 *In vitro*-Kultivierung (IVK)

Zur Vorbereitung der Kulturansätze wurde in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale 60 µl bis 80 µl Kulturmedium nach der Gruppengröße (1–2 µl/Embryo) vorgelegt und mit 800 µl Paraffinöl überschichtet. Das Kulturmedium setzte sich bei allen Versuchsgruppen sowie bei der Kontrollgruppe aus synthetischer Eileiterflüssigkeit (engl. synthetic oviductal fluid, SOF) und 5 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS) zusammen.

Die Embryonen für die IVK wurden zuerst von den Kumuluszellen befreit. Die COC/Zygoten, die sich im Befruchtungsmedium befanden, mussten in 1 ml m-PBS überführt werden und im Anschluss für 120 Sekunden bei maximaler Stufe gevortext werden. Dieser Verfahrensschritt diente zur Ablösung der verbliebenen Kumuluszellen (Denudation) von der *Zona Pellucida* der Eizellen/Zygoten. Der Röhrcheninhalt wurde nach dem Vortexen in eine kleine Petrischale überführt und unter dem Mikroskop untersucht. Gefundene denudierten Eizellen/Zygoten wurden zweimal in 2 ml Kulturmedium gewaschen. Nach der Befruchtung war somit eine gleichmäßige Aufteilung der gewaschenen und von Kumuluszellen befreiten Eizellen/Zygoten auf die verschiedenen Versuchs- und Kontrollgruppen möglich.

2.2.6 Versuchsdesign

2.2.6.1 Versuchsaufbau

Um die Hypothese mit der Frage, ob es auch eine Embryo-Embryo-Interaktion gibt, d.h. ob sich Embryonen während ihrer Entwicklung gegenseitig helfen können, beantworten zu können, wurde folgendes experimentelles Design kreiert und die Embryonen nach IVM und IVF zufällig folgenden Gruppen zugeteilt:

- **Kontrollgruppe:** Standard IVK von jeweils 40–50 Embryonen über acht Tage im Kulturtropfen; Gruppenbezeichnung = **J**
- **Versuchsgruppe 1 „Jung (J) + Jung (J)“:** 22 Stunden nach IVF wurden die COC mit gleichem Entwicklungszustand von Kumulus befreit und in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt, mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen, $n_{\text{gesamt}} = 50$). Gruppenbezeichnung = **MJJ**

- **Versuchsgruppe 2 „Jung (J) + Jung am Tag 2 (J2)“:** 22 Stunden nach IVF wurden die COC von Kumulus befreit und in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt, der zusätzlich die gleiche Anzahl von bereits geteilten *In vitro*-Embryonen entwicklungssynchron am Tag 2 (Tag 0 - Tag der Befruchtung) zugesetzt wurden, mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen, $n_{\text{gesamt}} = 50$). Gruppenbezeichnung = **MJJ2**
- **Versuchsgruppe 3 „Jung (J) + Alt (A)“:** 22 Stunden nach IVF wurden die COC von Kumulus befreit und in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt, der zusätzlich asynchrone *In vitro*-Embryonen im Vier- bis Achtzellstadium (bereits zwei Tage *In vitro* kultiviert) zugesetzt wurden (Progressiver Entwicklungszustand), mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen, $n_{\text{gesamt}} = 50$). Gruppenbezeichnung = **MJA**
- **Versuchsgruppe 4 „Alt (A) + Alt (A)“:** nach getrennter, synchroner IVK vorab für zwei Tage wurden die *In vitro*-Embryonen im Vier- bis Achtzellstadium in eine Kulturschale mit Mesh zusammengesetzt mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen, $n_{\text{gesamt}} = 50$). Gruppenbezeichnung = **MAA**

2.2.6.2 Spezielles Kultursystem „Mesh“

Für die bisher noch wenig angewandte *In vitro* „Multi-Kultur“ der Rinderembryonen wurde, mit dem Ziel der Erforschung einer möglichen Embryo-Embryo-Interaktion, ein spezielles, nicht toxisches, gewebtes Polyester-Netz (Mesh) (Sefar Petex; Sefar, Bury, Lancashire, UK) mit der Gittergröße von 41 x 41 Öffnungen und einer Fläche von 121 mm² verwendet und auf die Grundfläche eines Wells einer NuncTM 4-Well-Schale (1,9 cm²/Well) angepasst (García *et al.* 2017).

Das Mesh wurde auf den Boden der 4-Well-Schalen gelegt (siehe Abb. 7). In einem Vortest wurde versucht, die Embryonen in ein Mesh mit größerer Maschenweite zu überführen und dort für die Kultivierung zu positionieren. Während der Kultur stellte sich jedoch heraus, dass dieses Mesh zu groß war, die Embryonen nicht stabil in ihrer Position fixiert werden konnten und sich somit frei in der Kulturschale bewegten. Außerdem war der Abstand zwischen den

einzelnen Embryonen zu groß und es wäre zu einem unerwünschten Verdünnungseffekt gekommen.

Um sowohl den lokalen Kontaktbereich zwischen den Embryonen konstant zu halten, als auch um die oben beschriebene Problematik zu vermeiden, wurde das System angepasst und das beschriebene kleine Mesh für die IVK verwendet. Damit konnte eine Fixierung und stabile Position der einzelnen Zygoten/Embryonen der verschiedenen Versuchs- und Kontrollgruppen während des gesamten Kulturzeitraumes gewährleistet werden. Dabei nahm das spezielle Kultursystem keinen Einfluss auf die Embryo-Embryo-Interaktion. Eine spätere Differenzierung der unterschiedlich alten und entwickelten Embryonen war mit diesem System ebenfalls sichergestellt.

Das Mesh bot ausreichend Platz, um die Anzahl der Zygoten/Embryonen der Versuchs- und Kontrollgruppen gleichmäßig (siehe Abb. 8 und 9) zu verteilen und damit eine definierte Ausgangssituation einzuhalten. In den Versuchsgruppen wurde die Anzahl kultivierter und zugesetzter Embryonen im synchronen bzw. asynchronen Entwicklungszustand (siehe Punkt 2.2.6.1) im Verhältnis 1:1 im Mesh eingesetzt.

Die Kultivierung fand im Brutschrank (Bindermodell, CO₂-Inkubator Modell CB 170 inkl. O₂ Regelung) bei reduziertem O₂-Gehalt (8 % O₂, 5 % CO₂) und 39 °C statt.

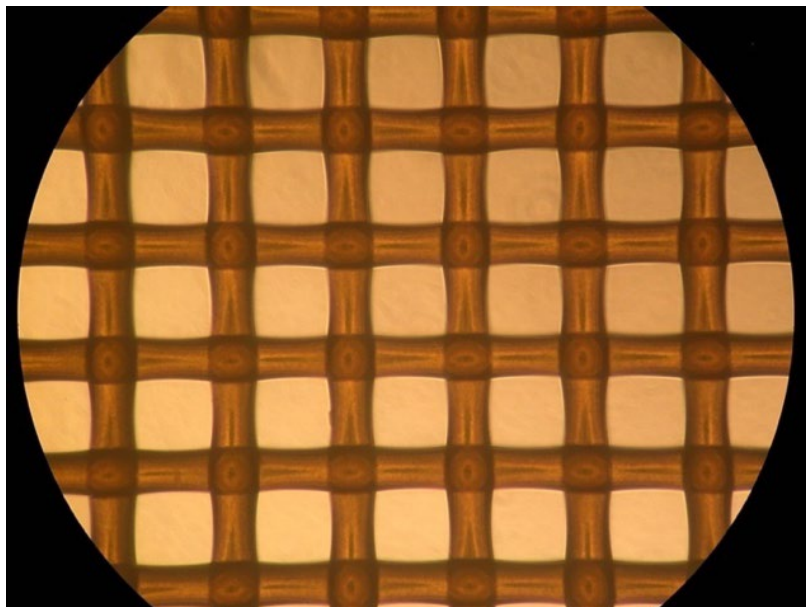


Abbildung 7: Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh) am Boden einer 4-Well-Schale (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019)

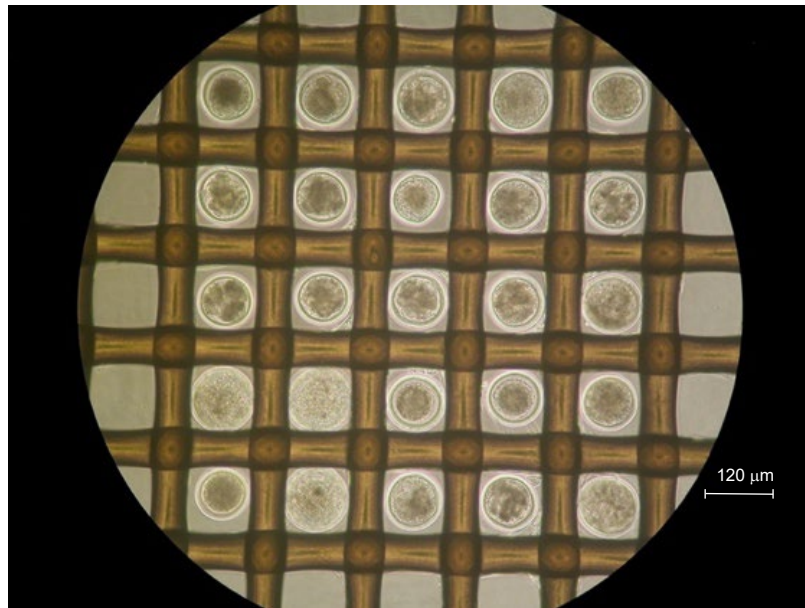


Abbildung 8 (links): Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh), nach Überführen der Zygoten/Embryonen (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019)

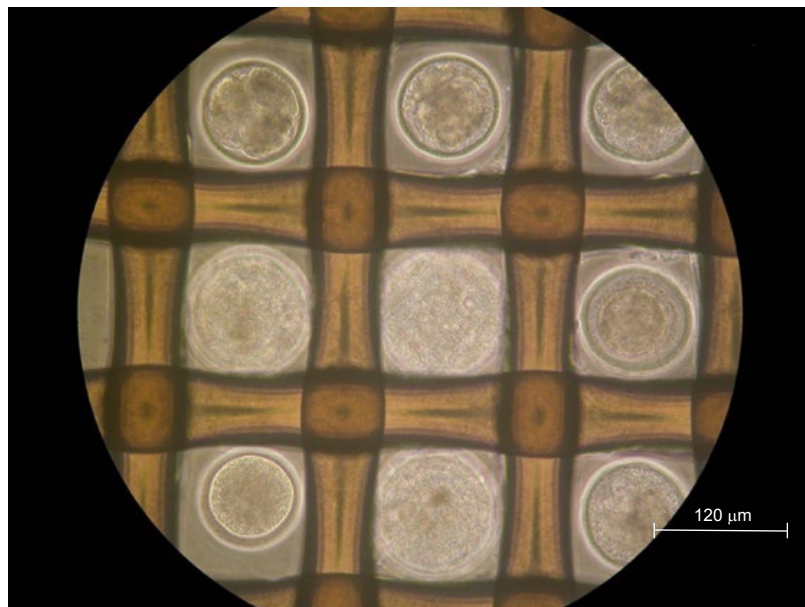


Abbildung 9 (rechts): Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh), nach Überführen der Zygoten/Embryonen (Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019)

2.3 Quantitative Beurteilung der Embryonen

2.3.1 Teilungsraten

Die Kulturstadien wurden am Tag 2 nach der Befruchtung unter dem Mikroskop untersucht und dabei jene Embryonen erfasst, die sich in Teilung befanden. Anhand dieser Erhebung konnte der Befruchtungserfolg beurteilt werden.

2.3.2 Blastozystenraten

Die Blastozystenrate wurde an den Tagen 7 und 8 erhoben. Mithilfe einer morphologischen Unterteilung unter dem Stereomikroskop (40-fache Vergrößerung) in frühe, normale, expandierte und geschlüpfte Blastozysten nach den IETS Richtlinien (siehe Abb. 10) konnte die Rate bestimmt werden und ein Teil der Embryonen für die histologische Untersuchung (nur Tag 7 Embryonen) verwendet werden. Der andere Teil wurde der Genexpressionsanalyse (nur Tag 7 Embryonen) zugeführt.

Weiters wurde zwischen der **Blastozystenrate 1**, der Anteil der Blastozysten im Verhältnis zu den eingesetzten Eizellen, und der **Blastozystenrate 2**, die jenen Anteil an Blastozysten im Verhältnis zu den geteilten Embryonen beschreibt, unterschieden. Um zu erkennen, welche Kulturansätze die Blastozoelformation beschleunigen und welches Verhältnis der Blastozysten von Tag 7 auf Tag 8 erreicht werden konnte, wurde außerdem die Entwicklungskinetik untersucht und der Anteil der Tag 7 Blastozysten in der Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten (Tag 8) errechnet.

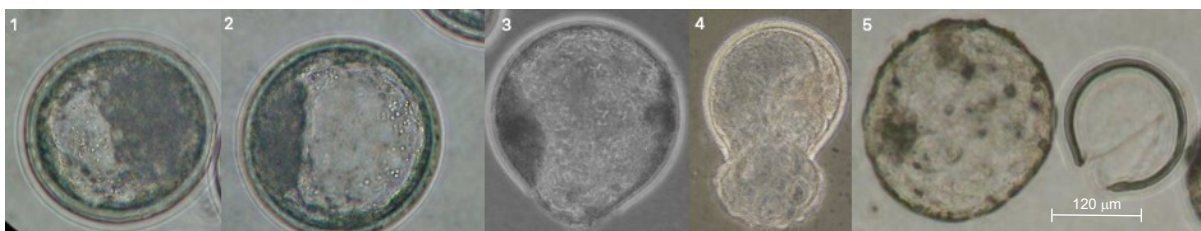


Abbildung 10: Blastozystenstadien: 1 Blastozyste mit beginnender Blastocoelbildung, 2 normale Blastozyste, 3 expandierte Blastozyste vor dem Schlüpfen, 4 schlüpfende Blastozyste, 5 geschlüpfte Blastozyste mit leerer Zona pellucida (Kuczwara 2018; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna)

2.4 Kernfärbung

Zur Bestimmung der Anzahl an Blastomeren wurden die Blastozysten mittels Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) gefärbt, fixiert und deren Zellkerne unter Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt (siehe Abb. 11).

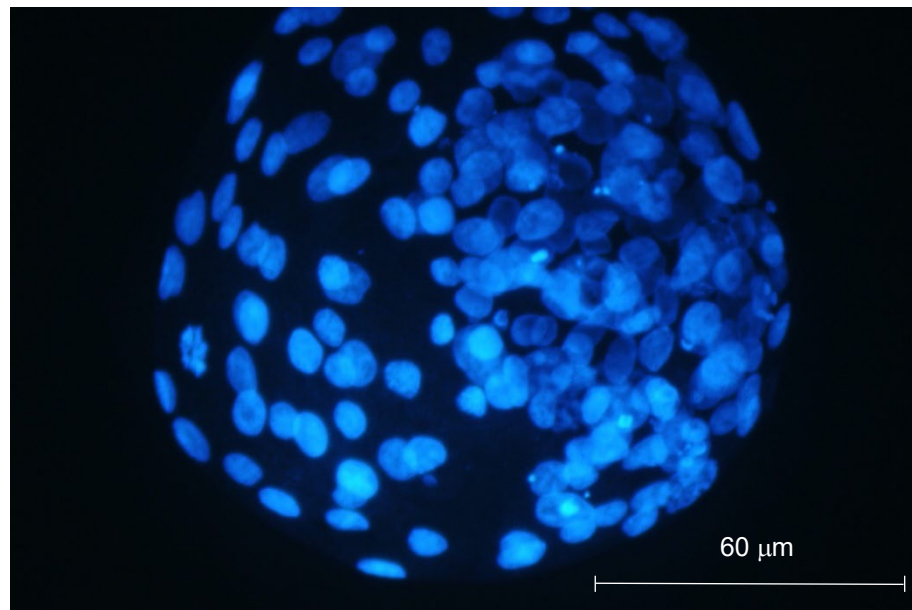


Abbildung 11: Mittels Hoechst gefärbte Blastozyste mit sichtbaren Zellkernen; Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung; Epifluoreszenzmikroskops (Nikon DIAPHOT 300, Japan; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019)

2.4.1 Fixierung zur histologischen Färbung

Tag 7 Blastozysten wurden aus dem Kulturmedium in eine Polyvinylalkohol (PVA) -Lösung zum Waschen überführt. Danach wurden diese Embryonen für eine Stunde in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nach zweimaligem Waschen in einer PBS-Lösung wurden die fixierten Blastozysten bei 4 °C in einer PBS-Lösung im Kühlschrank gelagert.

2.4.2 Histologische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde unter abgedunkelten Bedingungen im Labor eine Vertiefung der 4-Well-Schale mit 400 µl Färbelösung und die anderen drei Vertiefungen mit jeweils 400 µl PVA-Lösung vorbereitet. Die Farblösung färbt durch den Hoechstfarbstoff (Hoechst 33342,

Fluoreszenzfarbstoff) die DNA (engl. deoxyribonucleic acid) in den Zellkernen. Es wurden pro Gruppe fünf fixierte Blastozysten für 10 Minuten in 400 µl der Färbelösung gefärbt. Nach dreimaligem Waschen der nun gefärbten Blastozysten wurden pro Objektträger jeweils zwei Embryonen mit minimaler Menge des Mediums platziert und mit je einem Deckglas bedeckt. Nach der Färbung wurden alle Embryonen mit Hilfe eines inversen Epifluoreszenzmikroskops (Nikon DIAPHOT 300, Japan) bei 200-facher Vergrößerung fotografiert. Die Akquisition der Bilder wurde für die Höchst-Färbung bei einer Extinktionswellenlänge (Ex) von 365 nm und Emissionswellenlänge (Em) von 445/450 nm durchgeführt. Die Zellkerne wurden dann aus den erstellten Bildern ermittelt.

2.5 Vorbereitung der Embryonen für Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Embryonen am Tag 7 nach Beurteilung der Blastozystenrate in flüssigem Stickstoff fixiert. Das hierfür angewandte Verfahren wird als Snap Freezing bezeichnet. Vor der geplanten Analyse wurden die Blastozysten in PVA-Lösung (1 mg/ml PVA in PBS) überführt. Es wurden je fünf Embryonen aus der PVA-Lösung zweimal in PBS gewaschen und danach wurden sie in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit kleinstmöglichem Anteil an PBS überführt. Die 0,5 ml-Reaktionsgefäße wurden gruppenweise (MJJ, MJJ2, MJA, MAA) sowohl von den Versuchsgruppen als auch von den Kontrollgruppen in perforierten und beschrifteten 50 ml Sammel tubes (Falcon tubes) gestapelt und bei minus 196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6 Blastozysten-Genexpressionsanalyse

2.6.1 Genexpressionsanalyse der Rinderembryonen

Das Protokoll für die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNS, engl. RNA) aus Blastozysten, Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary DNA, cDNA), die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. real-time quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR) und Primer Sequenzen wurden von Samuel Etay von der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn zur Verfügung gestellt (Saeed Zidane 2017). Diese Methode wurde auch für die Diplomarbeit von Kuczwara (2018) verwendet.

Folgende Gene wurden untersucht:

Tabelle 2: Liste der verwendeten Gene für die Genexpressionsanalyse

B-ACTIN	Beta-Actin; Housekeeping-Gen	Actin, eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in der Natur, ist daran beteiligt unzählige zelluläre Funktionen von Organellenhandel bis Pathogenmotilität zur Zellmigration und Regulation der Gentranskription (Drazic <i>et al.</i> 2018)
GAPDH	Housekeeping-Gen; Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	ein Enzym der Glycolyse; katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (Housekeeping gene)
DNMT1	DNA (cytosine-5) Methyltransferase	ein Enzym, das den Transfer von Methylgruppen auf spezifische CpG-Strukturen in der DNA katalysiert (Hauptenzym der DNA Methylierung)
DNMT3A	DNA (cytosine-5) Methyltransferase 3 alpha	ein Enzym, das den Transfer von Methylgruppen auf spezifische CpG-Strukturen in der DNA katalysiert (<i>de novo</i> -Methylierung)
COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5a	eine Untereinheit des Enzymkomplexes, die zu einem elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran beiträgt
MDH2	Malate Dehydrogenase 2	katalysiert die reversible Oxidation von Malat zu Oxalacetat unter Verwendung des NAD / NADH-Cofaktorsystems im Zitronensäurezyklus im Mitochondrium

2.6.2 Standards für qPCR

Als Standards für die qPCR wurde cDNA verwendet. Diese cDNA wurde durch Reverse Transkription aus RNA gewonnen, die aus Rinder-Ovarien aus dem Schlachthof extrahiert wurde. Eierstockgewebe mit einer Würfelgröße von ca. 3 mm wurde dafür entnommen. Zur Reinigung von Gesamt-RNA aus dem Eierstockgewebe wurde der RNeasy mini kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Um die genomische DNA zu entfernen, wurde zusätzlich eine DNase Behandlung mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Für die cDNA Synthese von RNA wurde der RT2 First Strand Kit (Qiagen) (Standard-Protokoll) verwendet.

2.6.3 Blastozysten

In jeder Gruppe wurden vier Proben von je fünf gepoolten Blastozysten analysiert. In jeder Probe wurde zuerst mittels des PicoPure™ RNA Isolation Kit (Thermo Scientific) die RNA extrahiert.

Um die genomische DNA zu entfernen, wurde zusätzlich eine DNase Behandlung mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Die eluierten 11 µl RNA wurden mittels eines RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) in cDNA konvertiert. Die 20 µl cDNA wurden mit 80 µl Tris-EDTA Buffer (pH 8.0, Sigma-Aldrich) verdünnt, um genug cDNA für die qPCR zur Verfügung zu haben (3 µl/ Reaktion).

2.6.4 qPCR

Relative mRNA-Expression von Kandidatengen und Housekeeping-Genen wurde unter Verwendung einer qPCR bestimmt. Mit Hilfe des „automated pipetting system epMotion 5075TMX“ (Eppendorf, Deutschland) wurden die Reaktionskomponenten in eine 384-Well Platte (Life Technologies, USA) pipettiert. In jede Vertiefung wurde 10 µl iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad Laboratories, Deutschland), je 0,6 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 µM, Sigma-Aldrich), 5,8 µl Wasser und 3 µl cDNA aus der Probe pipettiert. Alle qPCRs wurden in Triplikaten durchgeführt. Bei jeder qPCR wurde außerdem eine Standardkurve (mindestens vier Verdünnungen; 1:4) und eine NTC (Non-Template Kontrolle) getestet. Die Amplifikation des korrekten PCR Produkts wurde durch Kontrolle der Schmelzkurve kontrolliert.

Die qPCR wurde auf einem ViiA 7 Real-Time PCR System mit der ViiATM 7 Software v1.1 (Life Technologies, USA) durchgeführt. Nach dem Starten der Polymerase bei 95 °C für 40 Sekunden wurden zwei unterschiedliche Temperaturprotokolle verwendet. Für die Genexpressionsanalyse von B-ACTIN, GAPDH, DNMT1 und DNMT3A wurden 40 Zyklen mit 95 °C für 15 Sekunden und 58 °C für 60 Sekunden durchgeführt; für COX5A und MDH2 40 Zyklen mit 54 °C für 20 Sekunden und 60 °C für 40 Sekunden. Anschließend folgte eine Schmelzkurvenanalyse. Die Primersequenzen für die einzelne qPCR Assays sind in der Tabelle 3 dargestellt.

In Vorläufen wurde mit Test-Embryonen gezeigt, dass die RT-Kontrollen tatsächlich negativ waren. Die relative Genexpression wurde mithilfe der Standardkurven-Methode berechnet (Karaghiosoff *et al.* 2003). Standard-Kurven wurden in Triplikaten mit jedem qPCR Assay laufen gelassen. R^2 für jeden Assay > 0.99;

Standardkurven-Daten der Assays: Schnittpunkt mit der Y-Achse; Steigung der Standardgeraden: B-ACTIN; 30,845; -3,552; DNMT1; 38,746; -3,3; DNMT3A; 37,151; -3,247; GAPDH; 33,212; -3,503; COX5A; 34,809; -3,302; MDH2; 32,149; -3,2.

Tabelle 3: qPCR Assays für die Genexpressionsanalysen

Gen	GenBank	Primersequenz (5'-3')	Amplikon (bp)
B-ACTIN	NM_173979	<u>TGTCCACCTTCCAGCAGAT</u> TCACCTTCACCGTTCCAGT	249
GAPDH	BC102589	<u>ACCCAGAAGACTGTGGATGG</u> ACGCCTGCTTCACCACCTTC	247
DNMT1	NM_182651	<u>TGACTACATCAAGGGCAGCA</u> AGGTTGATGTCTGCGTGGTA	192
DNMT3A	NM_181813	<u>AGCACAACGGAGAAGCCTAA</u> CAGCAGATGGTGCAGTAGGA	245
COX5A	AY528254	<u>AGACGAGGAGTTTGATGCTC</u> GAGGTCCTGCTTTGTCCTTA	212
MDH2	NM_001013587	<u>CCCTTTCGAAGAGAAGATGA</u> AGGGGTGGTTCGTTAATACA	218

2.7 Statistik

Es wurden die Effekte von insgesamt fünf (einer Kontroll- und vier Versuchsgruppen) unterschiedlichen *In vitro*-Behandlungen auf die Quantität und Qualität von produzierten Embryonen untersucht.

Zielgrößen waren die geteilten Embryonen in Bezug zu den Zygoten, die Anzahl von Blastozysten am Tag 7 und 8 in Bezug zu den Zygoten, die Anzahl von Blastozysten am Tag 7 und 8 in Bezug zu den geteilten Embryonen, die Anzahl von Blastozysten am Tag 7 in Bezug zu den Blastozysten am Tag 8. Diese Daten wurden mittels generalisierten linearen Modellen (GLM) unter der Annahme von binomialen Daten und einer Logit-Linkfunktion ausgewertet. Mittels der konservativen Bonferroni-Methode wurde für multiples Testen korrigiert.

Eine weitere Zielgröße war die Anzahl der Zellen, wobei die Kerne mittels Kernfärbung angefärbt wurden. Diese Daten wurden mittels einer ANOVA ausgewertet, also unter den Annahmen von Normalverteilung der Residuen und homogenen Varianzen zwischen Gruppen; die Signifikanz der paarweisen Vergleiche wurde mittels Tukey's honestly significant difference (HSD) Test ermittelt, wodurch für multiples Testen korrigiert wurde.

Die statistische Auswertung für die Parameter Teilungsrate, Blastozystenrate, Embryokinetik und Embryozellzahl erfolgte mit „R“ (R Core Team, 2015).

Die Statistische Auswertung der Genexpression erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 8.4.1 (GraphPad Software, USA). Es wurde One-way ANOVA, gefolgt von einem multiple comparisons test durchgeführt.

3 Ergebnisse

Für diese Studie wurden insgesamt 4270 Eizellen aus 670 Eierstöcken gewonnen. Für jeden *In vitro*-Kulturtermin wurden in Abhängigkeit von der erfolgreichen, tagesabhängigen Sammlung von Eierstöcken am Schlachthof und der Punktionsausbeute mindestens 320 bis maximal 600 Eizellen eingesetzt. Nach der IVM und IVF wurden insgesamt 1863 Zygoten und 846 geteilte Embryonen im Zwei- bis Achtzellstadium in den Gruppen J, MJJ, MJA, MJJ2 und MAA kultiviert und ausgewertet. Hierbei steht das „M“ in den Gruppenbezeichnungen für die Kultivierung der verschiedenen Versuchsgruppen (J + J, J + A, J + J2 und A + A) mit Mesh, während die Kontrollgruppe „J“ ohne Mesh, im Tropfen, kultiviert wurde.

3.1 Teilungsraten

Von insgesamt 1863 eingesetzten Zygoten wurde mindestens bei 1297 Embryonen am Tag 2 der IVK eine Teilung beobachtet (Teilungsrate 69,6 %). Die Ergebnisse der Teilungsraten der eingesetzten Embryonen am Tag 2 nach der Befruchtung sind in nachstehender Tabelle (Tab. 4) zu erkennen.

Die Teilungsrate bei den Zygoten in der Gruppe MJJ2 war signifikant höher im Vergleich zu den restlichen Gruppen (Abb. 12).

Tabelle 4: Darstellung der absoluten Teilungsraten der vier Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil geteilter Embryonen in Bezug zur Anzahl der absolut eingesetzten Eizellen/Zygoten

	Zygoten	Geteilte Embryonen	
		n	%
J	717	496	69,2
M JJ	548	370	67,5
M JJ2	300	238	79,3
M JA	298	193	64,8

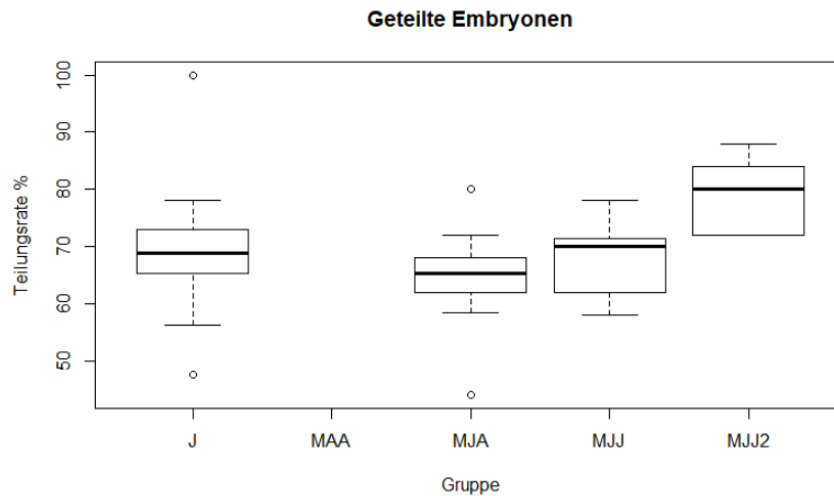


Abbildung 12: Darstellung der Teilungsraten (%) der vier Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil geteilter Embryonen im Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten; Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Die Teilungsrate der Zygoten in der Gruppe MJJ2 war signifikant höher im Vergleich zu den restlichen Gruppen; $p < 0,05$

3.2 Blastozystenraten

Die erreichte gesamte Blastozystenrate 1, in Bezug zu den Zygoten, war 25 % am Tag 7 (im Intervall von 21,5 % bis 28 %) und 33,4 % am Tag 8 (in Intervall von 27,9 % bis 39,7 %) (Tab. 5). Am Tag 7 wurden keine statistischen Unterschiede unter den Versuchsgruppen beobachtet (Abb. 13). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant höhere Blastozystenrate am Tag 8 in der Gruppe M JJ2 im Vergleich zu den Gruppen MJA und MJJ beobachtet werden (Abb. 14).

Tabelle 5: Blastozystenraten 1, Anteil der entwickelten Blastozysten in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten

	Zygoten ¹	Blastozysten			
		Tag 7		Tag 8	
		n	%	n	%
J	717	197	27,5	255	35,6
M JJ	548	118	21,5	165	30,1
M JJ2	300	84	28	119	39,7
M JA	298	66	22,1	83	27,9

¹Bezieht sich auf die Summe aller Zygoten aus den Kontrollgruppen „J“

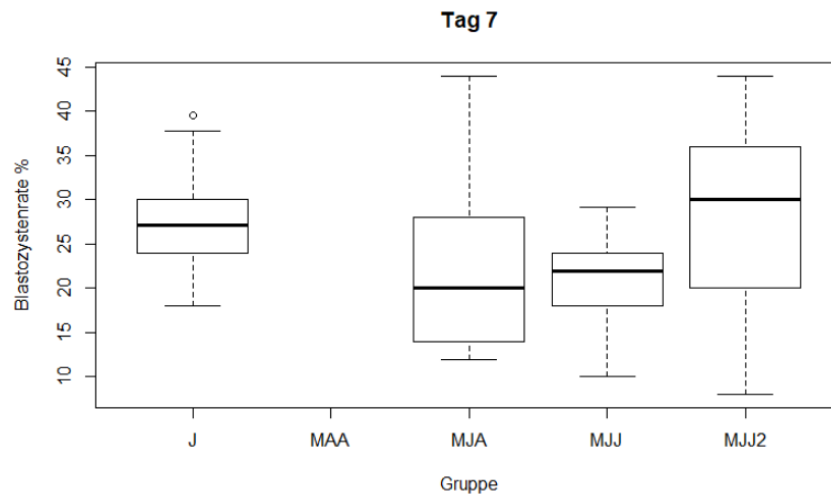


Abbildung 13: Blastozystenraten 1 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten am Tag 7; Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Am Tag 7 konnten keine statistischen Unterschiede unter den Versuchsgruppen beobachtet werden; $p < 0,05$

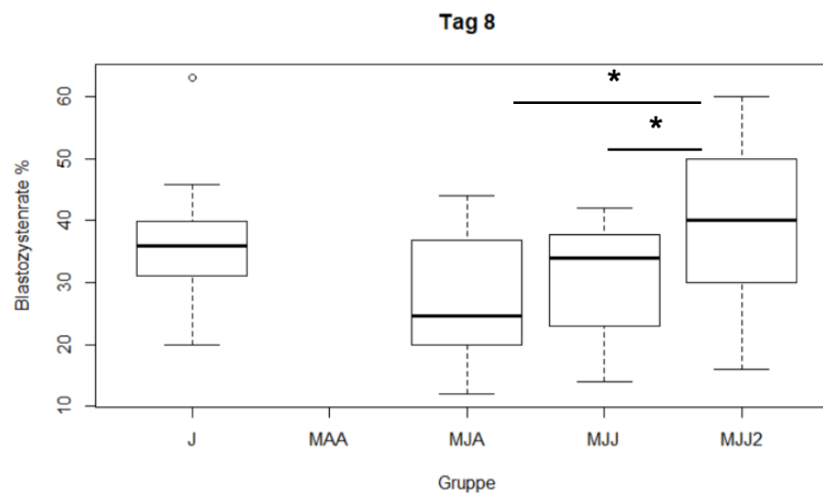


Abbildung 14: Blastozystenraten 1 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten am Tag 8; Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Am Tag 7 konnten keine statistischen Unterschiede unter den Versuchsgruppen beobachtet werden; $p < 0,05$

Die erreichte gesamte Blastozystenrate 2, in Bezug zu den geteilten Embryonen, war 35,9 % am Tag 7 (im Intervall von 31,9 % bis 39,7 %) und 48,3 % am Tag 8 (in Intervall von 43 % bis 51,4 %) (Tab. 6).

Tabelle 6: Blastozystenrate 2, Anteil der entwickelten Blastozysten in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen

	Geteilte Embryonen	Blastozysten			
		Tag 7		Tag 8	
		n	%	n	%
J	496	197	39,7	255	51,4
M JJ	370	118	31,9	165	44,6
M JJ2	238	84	35,3	119	50
M JA	193	66	34,2	83	43
M AA	248	90	36,3	124	50

Bei den Blastozystenraten war sowohl am Tag 7 als auch am Tag 8 in den verschiedenen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 15 und 16).

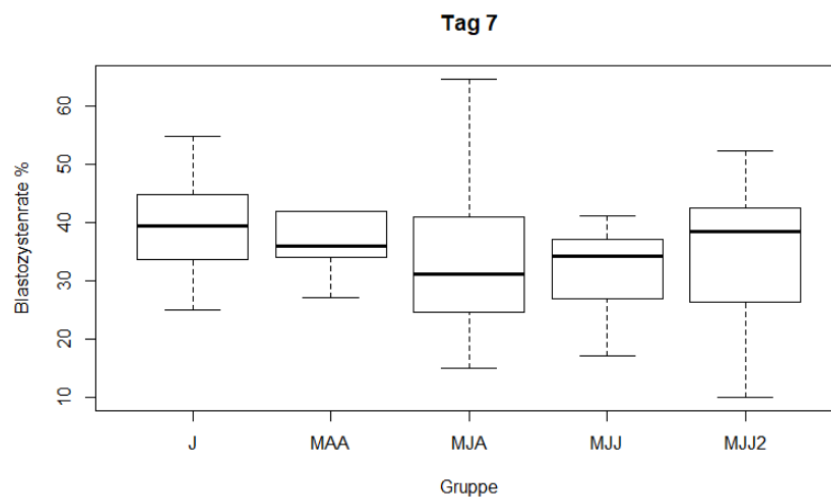


Abbildung 15: Blastozystenraten 2 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen am Tag 7; Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, $p < 0,05$

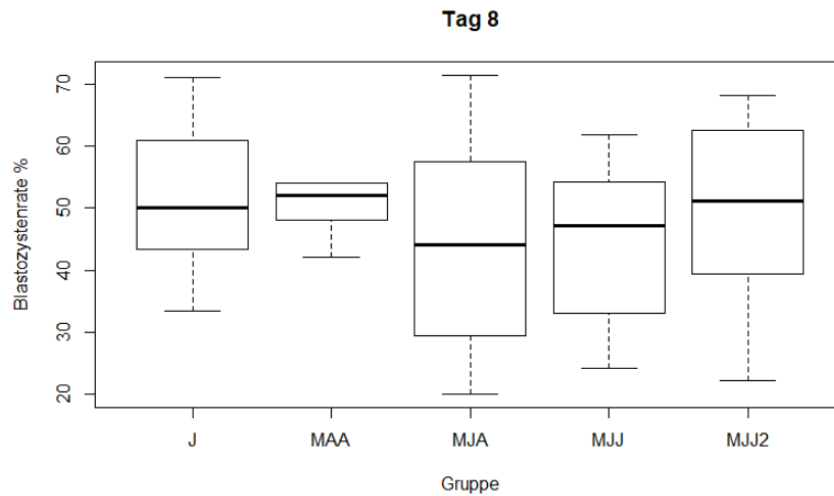


Abbildung 16: Blastozystenraten 2 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen am Tag 8; Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Signifikanzen werden mit Asterisk angegeben, Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, $p < 0,05$

3.2.1 Embryokinetik

Der Anteil der Tag 7 Blastozysten in der Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten am Tag 8 erreichte 74,8% (im Intervall von 70,6 % in der Gruppe MJJ2 bis 79,5 % in der Gruppe MJA) (Tab. 7). Innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 17).

Tabelle 7: Embryokinetik; Anteil der Tag 7 Blastozysten in Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten (%)

	T7/T8 (%)
J	77,3
M JJ	71,5
M JJ2	70,6
M JA	79,5
M AA	72,6

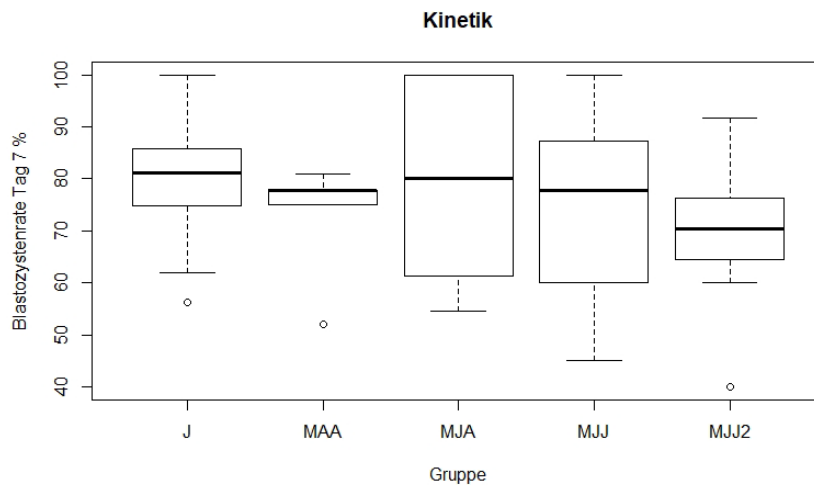


Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Embryokinetik der verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil der Tag 7 Blastozysten in Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten (%); Gruppen: **J**: Kontrollgruppe im Tropfen, **MAA**: Versuchsgruppe A + A im Mesh, **MJA**: Versuchsgruppe J + A im Mesh, **MJJ**: Versuchsgruppe J + J im Mesh, **MJJ2**: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden

3.3 Kernfärbungen

Um eine Aussage über die Auswirkung von Ko-Kultivierung mit einem Mesh auf die Ausbildung der Zellkerne der Rinderembryonen treffen zu können, wurden die Blastozysten am Tag 7 mittels Hoechst 33342 gefärbt, fixiert und im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Embryo am Tag 7 lag bei 166,9 (im Intervall von 68 Zellen pro Embryo bis 264 Zellen pro Embryo) (Abb. 18). Die durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Embryo unter den Gruppen ging von 118 Zellen pro Embryo (Gruppe MJA) bis 218,2 Zellen pro Embryo (Gruppe J). Zwischen diesen zwei Gruppen wurde der einzige signifikante Unterschied gefunden (Abb. 19).

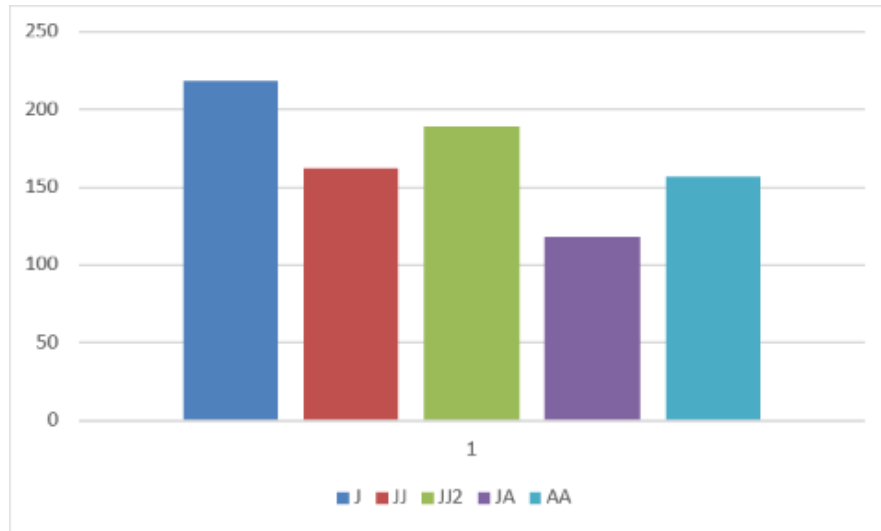


Abbildung 18: Säulendiagramm zur Darstellung der Anzahl an Blastomeren (Tag 7) in den Blastozysten nach Kernfärbung mittels Hoechst

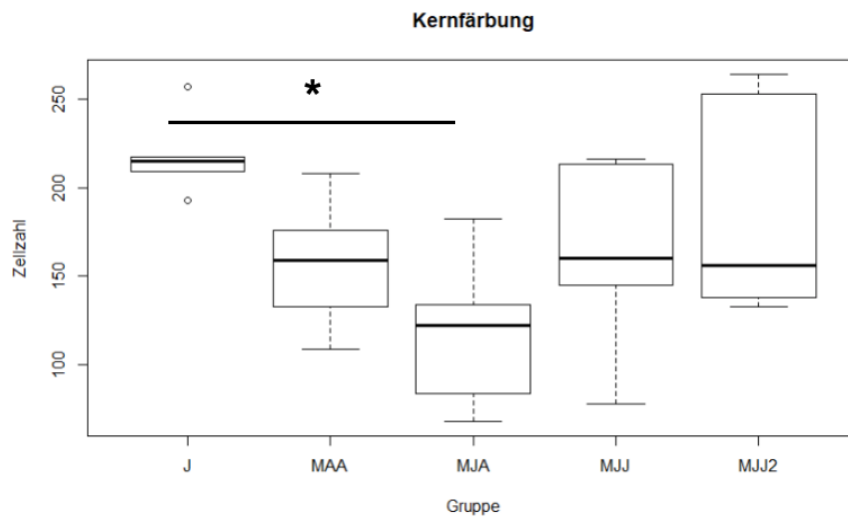


Abbildung 19: Zellzahlen der verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe nach Kernfärbung mittels Hoechst; Gruppen: J: Kontrollgruppe im Tropfen, MAA: Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA: Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ: Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Signifikanzen werden mit Asterisk angegeben; Linien zeigen, zwischen welchen Gruppen Signifikanzen gefunden wurden; * $p < 0,05$

3.4 Genexpressionsanalyse

Sechs qPCR Assays wurden für diese Studie verwendet. Mittels Standard-Kurven Methode wurde die Effizienz der PCR gemessen, wobei R^2 der Standard-Kurve idealerweise 0.99 betragen sollte (Dhanasekaran *et al.* 2010). Dies wurde für alle Assays mit mindestens vier Punkten erreicht.

Folgende Gene wurden als Housekeeping-Gene verwendet: GAPDH und B-ACTIN. Alle Daten wurden auf B-ACTIN normalisiert, in Bezug auf GAPDH gab es keinen signifikanten Unterschied (siehe unten).

Bei GAPDH und DNMT1 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 20). Bei COX5A, DNMT3A und MDH2 gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

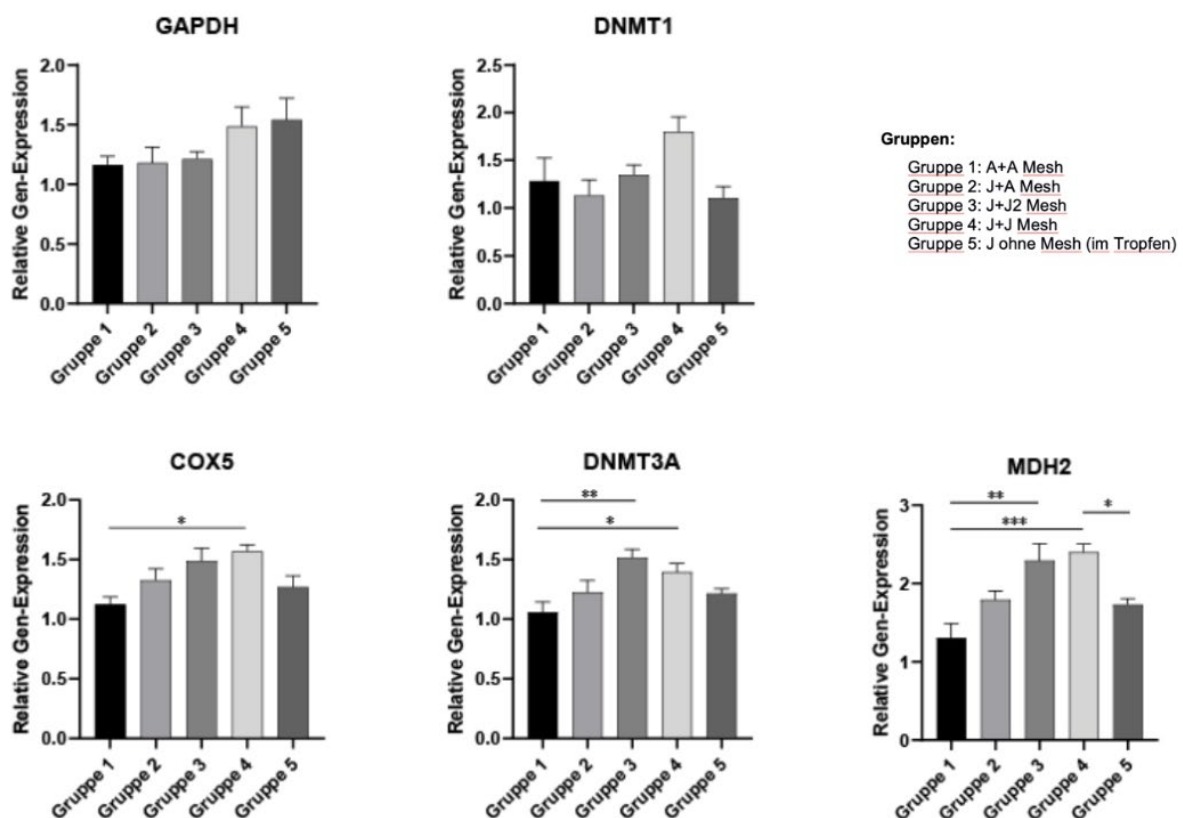


Abbildung 20: Relative Genexpression der ausgewählten Gene in Bezug auf die verschiedenen Gruppen (1-5); © Dr. Burgstaller J., Vetmeduni Vienna 2020

Abbildung 20 zeigt die relative Genexpression der angezeigten Gene bezogen auf den ersten Blastozystenpool (Gruppe 1). Jede Gruppe besteht aus gepoolten Blastozysten (n=5). Signifikanzen werden mit Asterisk angegeben, Linien zeigen, zwischen welchen Gruppen Signifikanzen gefunden wurden (COX5A, * $p = 0,0153$; DNMT3A, * $p = 0,0482$, ** $p = 0,0054$; MDH2, * $p = 0,0450$, ** $p = 0,0026$, *** $p = 0,0010$; One-way ANOVA). Fehlerbalken = SEM.

4 Diskussion

Die Entwicklungskompetenz von Embryonen in der *IVP* ist sehr unterschiedlich und weist im Vergleich zur *In vivo*-Entwicklung noch immer Einschränkungen, sowohl auf qualitativer als auch quantitativer Ebene, auf. Ziel und Hypothese der vorliegenden Arbeit waren es, zu zeigen, dass durch die Anwesenheit und den Einsatz zusätzlicher Embryonen die Entwicklung von Embryonen, die *In vitro* kultiviert werden, beeinflusst werden kann.

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die versuchen, eine Kommunikation zwischen dem Mutterorganismus und den Gameten bzw. den sich früh entwickelnden Embryonen darzustellen. Arbeiten, die Interaktionen zwischen Embryonen aufdecken, um zu eruieren, ob sich Embryonen mit unterschiedlicher Entwicklungskompetenz unterstützen können, sind hingegen weniger zu finden und konzentrierten sich bisher meist auf die Gruppengröße.

Die Ergebnisse von Vergleichsstudien aus den letzten Jahren lassen erkennen, dass es zudem notwendig ist, geeignetere *In-vitro*-Modelle zu etablieren, um gezielt Faktoren zu finden, die die embryonale Entwicklung unterstützen (Maillo *et al.* 2016, García *et al.* 2017).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von zusätzlichen Embryonen, die in unterschiedlichen Stadien und zu unterschiedlichem Zeitpunkt der *In vitro*-Kultur zugegeben wurden, auf die Entwicklungskinetik, die gesamte Zellzahl und die Genexpressionsaktivität der Embryonen näher untersucht.

Da die *IVP* von Rinderembryonen auf mehreren Teilschritten basiert und sich jede kleinste Abweichung jeder Kulturphase negativ auf die Entwicklungserfolge auswirken können, war es zu Beginn der praktischen Arbeit besonders wichtig, neue Ansätze zu etablieren. In vorangegangenen Studien und während der Vorversuchsphase zu dieser Studie war es wichtig, eine Strategie für die Positionseffekte zu finden. Dazu standen verschiedene Netze (Mesh) als Einlage für die Kulturschale zur Verfügung, deren Handhabung und Anwendung für die Studie vorab zu überprüfen waren.

Um den Einfluss von gemeinsamer Ko-Kultivierung von Rinderembryonen am besten darzustellen, wurden zusätzlich Embryonen in einem progressiven Entwicklungszustand den bereits vorhandenen Embryonen in der Kultur zugesetzt und mittels eines PET-Netzprodukts

(Mesh) in stabiler Position, mit fixiertem Abstand, gehalten, um diese im Anschluss gemeinsam zu kultivieren.

In früheren Arbeiten kam es bereits zum Einsatz von Mesh aus PET (García *et al.* 2017). Die Ergebnisse zeigen, dass Rinderembryonen in PET-Netzabschnitten ohne negative Nebenwirkungen kultiviert werden können und dass der durch das Mesh bestimmte Embryoabstand die Embryoqualität beeinflusst (Somfai *et al.* 2010).

Während in den vorangegangenen Untersuchungen aber noch detaillierte Erkenntnisse über die Embryo-Embryointeraktion in einer Ko-Kultur mittels Mesh fehlten, wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal Embryonen in unterschiedlichem Alters- und Entwicklungszustand zusammen in ein Mesh zur Kultivierung eingesetzt.

Damit wurde ein neuer Ansatz gewählt, um die zusätzlichen Effekte der Interaktion und Kommunikation der Embryonen untereinander fundiert zu testen und den zukünftigen möglichen Einsatz von Embryonen als Helferzellen in *In vitro*-Kulturen weiter zu etablieren.

Anfänglich wurde versucht, die Embryonen in ein Mesh mit größerem Maschenabstand zu überführen und dort für die Kultivierung zu positionieren. Während der Kultur stellte sich jedoch heraus, dass das Mesh zu groß war und die Embryonen nicht stabil in ihrer Position fixiert werden konnten, herausrutschten und sich somit frei in der Kultur bewegten. Außerdem war der Abstand zwischen den einzelnen Embryonen zu groß, die Signaldistanz konnte nicht standardisiert werden und es kam zu einem unerwünschten Verdünnungseffekt. Um die beschriebene Problematik zu vermeiden, wurde das System angepasst und ein Mesh mit kleineren Maschenabständen für IVK verwendet.

Ein besonders wichtiges Kriterium dieser Arbeit war es, aus der Ko-Kultur mit Mesh eine ausreichende Anzahl an Blastozysten zu erzielen, die für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Aus mehreren Studien ist bereits bekannt, dass der Ursprung der Eizelle (*In vivo* vs. *In vitro*) die Anzahl an Blastozysten in der Kultur bestimmt. Zudem ist offensichtlich, dass schon die Kulturbedingungen per se einen Einfluss auf die Entwicklung der Blastozysten haben. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein international anerkanntes Standardmedium verwendet.

Die Teilungsraten und die Blastozystenraten der Embryonen wurden in vorliegender Arbeit bestimmt.

Anhand der Teilungsraten von durchschnittlich ca. 70 % lassen sich international vergleichbare Werte erkennen. Da die Ergebnisse der aus der *IVP* gewonnenen Embryonen sehr stark von dem eingesetzten Sperma der jeweiligen Stiere abhängen (Ward *et al.* 2001), wurde in der vorliegenden Studie das Sperma eines geprüften Stiers selektiert, welcher bereits aus Voruntersuchungen gute Befruchtungsraten *in vitro* zeigte. Die Teilungsraten sind daher als eine gute und mit anderen Labors vergleichbare Ausgangsbasis für diese Studie zu beurteilen.

In der Versuchsgruppe MJJ2 lag der Wert mit rund 80 % höher als bei allen anderen Gruppen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anzahl der Embryonen in der Kulturschale (Gruppengröße) eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung während der Anfangsphase der IVK spielt und auch einen Effekt auf die Teilungsraten der Zygoten hat. Es ist schon seit längerem bekannt, dass in Gruppen kultivierte Eizellen und Embryonen entwicklungs kompetenter sind. Selbst die Gruppengröße scheint einen Einfluss auf den Entwicklungserfolg zu haben (O'Doherty *et al.* 1997). Produkte der Stoffwechselleistungen der einzelnen Embryonen finden sich in ihrem unmittelbaren Umfeld. Gruppen von beieinanderliegenden Embryonen können offensichtlich diese Stoffe akkumulieren und schaffen dadurch andere Kulturbedingungen als einzelne Embryonen (Lopes *et al.* 2005). Daher liegt es nahe, dass Entwicklungsdefizite bzw. schlechte Qualitätsverhältnisse möglicherweise dadurch ebenfalls verbessert werden könnten. In der Arbeit von Khurana und Niemann wurden Zygoten schlechter Qualität jeweils zusammen mit 20 bzw. 40 Embryonen ko-kultiviert. So kamen sie zu dem Schluss, dass Gruppengrößen von 40 Embryonen einen deutlich positiveren Entwicklungseffekt auf die Zygoten hatten, wie kleinere Gruppen von je 20 Embryonen (Khurana und Niemann 2000). Diese Ergebnisse scheinen auch Labor-spezifischen Bedingungen unterlegen zu sein und weisen größere Variationen auf. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in dieser Studie die Gruppe MJJ2 abseits von den anderen Versuchsgruppen mit nur halb so viel Embryonen bis zum Tag 2 kultiviert wurden. Es erscheint jedoch wichtig zu erwähnen, auch das Volumen des Mediums im Verhältnis zu den Embryonen zu betrachten, um einen möglichen positiven (Anreicherung von Signalstoffen) oder negativen (Akkumulation von Stoffwechselprodukten) Effekt einzubeziehen.

Die Blastozystenrate 1, in Bezug zu den Zygoten, von 25 % (im Intervall von 21,5 % bis 28 %) am Tag 7 und 33,4 % (in Intervall von 27,9 % bis 39,7 %) am Tag 8 repräsentieren stabile

Durchschnittswerte und stellen unter Beweis, dass mittels der IVK in dieser Arbeit gute Ergebnisse erreicht wurden, welche auch im internationalen Vergleich liegen.

Die Blastozystenrate am Tag 7 ist in der Gruppe MJJ2 im Vergleich zu den Versuchsgruppen MJA und MJJ tendenziell besser, welche sich am Tag 8 deutlicher, d.h. signifikant, darstellen ließ. Dieser Effekt ist jedoch eher als Fortsetzung der besseren Startposition der Gruppen mit geteilten Embryonen zu sehen als ein Ergebnis, welches aufgrund der Gruppenbildung zu erklären wäre. Ward und Mitarbeiter konnten bereits 2001 in ihrer Arbeit zeigen, dass sich früh teilende Embryonen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zur Blastozyste entwickeln als Embryonen, deren Teilungsaktivität später einsetzt (Ward *et al.* 2001).

Die Kontrollgruppe J lässt ähnliche Ergebnisse erkennen wie die Versuchsgruppe MJJ2. Hier bleibt jedoch offen zu diskutieren, ob die Kontrollgruppe jene Embryonen beinhaltet, die während der gesamten und sehr empfindlichen Kulturphase am wenigsten manipuliert worden sind und daher einen systematischen Entwicklungsvorteil besaßen.

Die Blastozystenrate 2 gibt Werte an, die auf die geteilten Embryonen bezogen wurden, um eine Basis für den Kulturstartpunkt für die Versuchsgruppen MJJ2 darzustellen. Wie am Tag 7 mit einem Wert von 35,9 % (im Intervall von 31,9 % bis 39,7 %) und am Tag 8 von 48,3 % (in Intervall von 43 % bis 51,4 %) (siehe Tab. 6) zu sehen ist, haben sich diese Unterschiede ausgeglichen und es war kein signifikanter Unterschied mehr zu erkennen. Diese Unterschiede waren auch nicht mehr in der MAA-Gruppe zu finden.

Die Entwicklungskinetik der Embryonen hat gezeigt, dass sich zwischen den Tagen 7 und 8 noch weitere Blastozysten bilden. Demgegenüber zeigte neben der Kontrollgruppe, die tendenziell schon die meisten Blastozysten am Tag 7 aufwies, auch die Versuchsgruppe MJA diese Erscheinung. Hier wäre zu vermuten, dass der Zusatz von asynchronen Embryonen, welche sich in einem progressiveren Teilungsstadium befanden, diese Entwicklungsanregung verursachte. Zudem ist bereits bekannt, dass jene Embryonen, die das Blastozystenstadium früher erreichen (Gad *et al.* 2011, Lonergan *et al.* 2000) als qualitativ hochwertiger einzustufen sind.

Die Formation zur Blastozyste stellt ein rein oberflächliches Bild dar. Bezüglich der Anzahl der Blastomeren einer Blastozyste kann jedoch anhand dieses Stadiums eine bessere Aussage gemacht werden. Daher wurden weiterführende Untersuchung angestellt, indem die Zellkerne

der Blastozyste am Tag 7 mittels Hoechst 33342 gefärbt, anschließend fixiert und ausgezählt wurden.

Am Tag 7 lag die Anzahl an Zellkernen der Blastozysten im Mittel bei 166,9, d.h. die Anzahl der Blastomeren variierte bei allen untersuchten Blastozysten zwischen 68 Zellen bis 264 Zellen pro Embryo. Auffällig hierbei erscheint, dass der größte, signifikante Unterschied zwischen den Blastozysten in der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe MJA auftrat. Während Blastozysten der Kontrollgruppe mit 218 Zellen pro Blastozyste ausgestattet waren, zeigen hingegen Blastozysten der Versuchsgruppe MJA im Mittel nur 118 Zellen pro Embryo. An dieser Stelle liegt die Vermutung nahe, dass hier der Einfluss der zugesetzten, aber weiterentwickelten, progressiven Embryonen auf die Embryonen im noch früheren Entwicklungsstadium bestand. Nachdem die zugesetzten Embryonen bereits mit der Formation ihres Blastozoels begannen, wurden die Embryonen im jüngeren Zellteilungsstadium durch deren Nachbarschaft ebenfalls zur Blastozystenformation angeregt. Diese mögliche Interaktion benachbarter Embryonen wäre zukünftig noch detailreicher histologisch zu verifizieren, indem bei der Färbung die Inner-Cell-Mass und das Trophektoderm getrennt gefärbt würden. Eine differenzierte Färbung würde dann weitere Aussagen bezüglich dieser induktiven Effekte erlauben.

Die IVK von Embryonen stellt zwar zum einen eine gute Möglichkeit dar, die frühe Embryonalentwicklung ins Labor zu verlagern und damit verschiedene Stadien sichtbar zu machen, zum anderen schließt diese Kulturdauer eine nur relativ kurze Zeit ein, in welcher sich mögliche vorhandene Effekte nicht immer histologisch zeigen lassen.

Ein wesentlich sensitiveres und vielseitiges Untersuchungsgebiet stellt der Anschluss der IVP an molekulargenetische Analysen dar. Im Vorfeld wurden dazu bereits ausführliche Vergleichsstudien, unter anderem auf der Ebene der mRNA-Genexpression zwischen *In vivo* und *In vitro*-Embryonen, durchgeführt und sowohl empfindliche Entwicklungsübergänge (Befruchtung, Acht-Zellstadium, Kompaktierung) herausgefiltert wie auch mRNA-Expressionsmuster in Blastozysten detektiert, welche besonders auf Kulturveränderungen über- oder unterreguliert waren (Gad *et al.* 2012). Aus dieser „Large-Scale-Study“ wurde für die vorliegende Arbeit ein Genset für die Expressionsanalyse selektiert, welche als besonders geeignet erschien. Dazu gehörten sechs Gene wie das GAPDH, B-ACTIN, DNMT1, COX5A, DNMT3A und MDH2 (siehe Tab. 2).

GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), B-ACTIN (Zytoskeletales Actin, welches nicht muskelspezifisch ist) wurden als sogenannte House-keeping-Genes eingesetzt, d.h. relativ konstante Expressionsmuster in der Zelle erlauben die Verwendung dieser Gene als Referenz-Gene (Barber *et al.* 2005, Ace und Okulicz 1995). Die weiteren 4 Genexpressionen wurden gegen diese House-Keeping Genes gemessen. DNMT1 (Cytosin Methylierung bei Säugertieren) stellt das Hauptenzym der DNA Methylierung dar, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Hingegen war DNMT3A, welches für die *de novo*-Methylierung relevant ist, in den Versuchsgruppen MJJ und MJJ2 signifikant höher exprimiert als in MAA.

Das Gen COX5A, welches als Enzym in der Mitochondrienmembran arbeitet, war in der Versuchsgruppe MJJ signifikant höher als in MAA.

MDH2, das seine Funktion im Zitronensäurezyklus im Mitochondrium hat, wurde in den Versuchsgruppen MJJ und MJJ2 signifikant höher exprimiert als in der Gruppe MAA und in MJJ signifikant höher als in der Kontrollgruppe J.

Mit diesen repräsentativen drei Genen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass wichtige Bereiche der embryonalen Zellen, wie die Epigenetik, Energiebereitstellung sowie zentrale Stoffwechselmechanismen bereits durch Embryointeraktionen beeinflusst werden können.

Wie bereits in mehreren Untersuchungen von Gad und Mitarbeiter (Gad *et al.* 2011, 2012) gezeigt wurde, wirken sich negative Einflüsse *In vitro* auch *In vivo* deutlich auf die molekulare Aktivität der Embryonen aus, was auch das Kriterium der Auswahl dieser Gene war. Selbst Felmer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bereits die Verwendung eines „Two Steps Culture Systems“ einen deutlichen Einfluss auf die globale Genexpression hat und somit nicht nur das Entwicklungspotential, sondern auch die Qualität der erzeugten Embryonen beeinflussen können (Felmer *et al.* 2011).

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Studie beispielhaft Untersuchungsparameter wie die Entwicklungsrate und Embryokinetik, die Teilungsaktivität anhand der Zellzahlen und die molekulargenetische Erfassung von Expressionsdaten selektierter Gene, gewählt. Mit diesen Parametern sollten Hinweise bzw. Signale zwischen Embryonen (Gruppen von Embryonen) herausgestellt werden.

Insgesamt muss jedoch vor Augen gehalten werden, dass der frühembryonale Entwicklungsprozess hochkomplexe Vorgänge beinhaltet und dynamischen Prinzipien unterlegen ist.

Bei genauerer Betrachtung muss dementsprechend eingeräumt werden, dass, ausgehend von einer stadiumsspezifischen Entwicklung der Embryonen, alle Stadien separat untersucht werden müssen, um weitere Details von essentiellen Vorgängen wie zum Beispiel der De- und Remethylierung (Salilew-Wondim *et al.* 2015), Genomaktivierung (Graf *et al.* 2014) und der embryonale Ausstattung bzw. der *de-novo* Synthese von Mitochondrien (May-Panloup *et al.* 2005), erfassen und darstellen zu können.

Darüber hinaus könnte mittels eines „Time-Lapse-Imaging“ Verfahrens jeder einzelne Teilungsschritt erfasst werden und sowohl die Embryonen wie auch deren mediales Umfeld einer gerichteten Metabolom- bzw. Proteinanalyse unterzogen werden.

6 Zusammenfassung

Die *In vitro*-Produktion stellt seit über vier Jahrzehnten eine Technik dar, welche im Labor versucht, Vorgänge der frühen Embryonalentwicklung unter künstlichen Bedingungen nachzuvollziehen. Unter Berücksichtigung der komplexen und dynamischen Bedingungen im Tier werden die Bedingungen *In vitro* meist durch Zugabe bestimmter Mengen bekannter Chemikalien, durch Beimischen von Flüssigkeiten tierischer Herkunft und durch Stoffwechselleistungen von Ko-Kulturen bewerkstelligt. Über die Effekte zugesetzter Embryonen ist allerdings noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch gezielten Zusatz von Embryonen einen möglichen gegenseitigen Entwicklungseffekt zu erkennen.

Für die *In vitro*-Produktion wurden Ovarien geschlachteter Rinder am Schlachthof gesammelt. Im Labor wurden die Follikel punktiert und die Kumulus-Oozyten-Komplexe unter Verwendung eines Standardprotokolls *In vitro* maturiert und fertilisiert. Alle daraus erhaltenen Embryonen wurden zur *In vitro*-Kultivierung mit einem speziellen Polyester-Netz (Mesh) in vier Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe (ohne Mesh), welche sich aus der Differenzierung des Entwicklungsstandes bzw. der gewünschten Synchronität ergaben, eingeteilt:

Versuchsgruppen (Kultur in Mesh):

1. **Versuchsgruppe „Jung (J) + Jung (J)“:** Wurden im Zygotenstadium (2 Gruppen á 25 Embryonen) in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt und gemeinsam bis Tag 8 kultiviert; Gruppenbezeichnung = **MJJ**
2. **Versuchsgruppe „Jung (J) + Jung am Tag 2 (J2)“:** Wurden im Zygotenstadium (n=25) in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt, der zusätzlich die gleiche Anzahl von bereits geteilten *In vitro*-Embryonen entwicklungssynchron am Tag 2 (Tag 0 - Tag der Befruchtung) zugesetzt wurden, mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen); Gruppenbezeichnung = **MJJ2**
3. **Versuchsgruppe „Jung (J) + Alt (A)“:** Wurden im Zygotenstadium (n=25) mit asynchronen *In vitro*-Embryonen (n=25) im Vier- bis Achtzellstadium (bereits zwei Tage *In*

vitro kultiviert) in eine Kulturschale mit Mesh umgesetzt, mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8; Gruppenbezeichnung = **MJA**

4. **Versuchsgruppe „Alt (A) + Alt (A)“:** nach getrennter, synchroner *In vitro*-Kultivierung vorab für zwei Tage wurden die *In vitro*-Embryonen im Vier- bis Achtzellstadium in eine Kulturschale mit Mesh zusammengesetzt mit anschließender gemeinsamer Kultur bis Tag 8 (jeweils ca. 25 Embryonen). Gruppenbezeichnung = **MAA**

Kontrollgruppe (Kultur ohne Mesh):

Standard *In vitro*-Kultivierung von jeweils 40 bis 50 Embryonen über acht Tage im Kulturtropfen; Gruppenbezeichnung = **J**

Für die Gruppen in dieser Studie wurden von insgesamt 670 Eierstöcken 4270 Eizellen gewonnen, der *In vitro*-Produktion zugeführt und für die Kultur im Tropfen oder auf dem PET-Netzprodukt vorbereitet. In den einzelnen Gruppen wurde die Blastozystenrate mit der Entwicklungskinetik und die Zellzahl mittels Kernfärbung bestimmt sowie mRNA-Expressionsdaten eines selektierten Gensets analysiert. Die Blastozystenentwicklung ergab insgesamt keine Hinweise auf einen interaktiven Embryoeffekt während der Entwicklung. Bei der Untersuchung der Zellzahl der Blastozysten konnte jedoch beobachtet werden, dass die Zugabe von Embryonen in fortgeschrittenem Entwicklungszustand offensichtlich die Blastozystenformation der Embryonen induziert, welche noch nicht die vergleichbare Anzahl an Blastomeren hatten.

Die Genexpressionsanalyse ergab, dass je nach Zugabe von Embryonen, Gene mit zentraler Bedeutung, wie die *de novo*-Methylierung (DNMT3A), ein Enzym in der Mitochondrienmembran (COX5A) und des Zitronensäurezyklus im Mitochondrium (MDH2), beeinflusst wurden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mittels der Verwendung eines Polyester-Netzes Embryonen stabil in Gruppen in der Kultur gehalten werden konnten und sie lieferte Hinweise, welche zeigen, dass es eine Interaktion zwischen Embryonen während der Kulturphase gibt. Da diese Studie zum Ziel hatte, Einflüsse der Kultur auf die Blastozystenentwicklung darzustellen, sind zukünftige Studien mehr auf stadienspezifische Entwicklungsabschnitte zu richten, um dort den jeweiligen Bedürfnissen und Voraussetzungen gerecht zu werden.

7 Summary

For more than four decades, *in vitro* production of bovine embryos has been successively improved. This technique revealed the understanding of processes of early embryonic development under artificial conditions in the laboratory. Taking the complex and dynamic conditions in the animal into account, the conditions are usually achieved *in vitro* by adding certain amounts of known chemicals, by adding liquids of animal origin and co-cultures. Little is known about the effects of co-cultured embryos.

The aim of this work was to detect possible mutual development effects through the targeted addition of embryos.

For *in vitro* production, ovaries from slaughtered cattle were collected at the slaughterhouse. In the laboratory the follicles were punctured and the cumulus-oocyte complexes were matured and fertilized *in vitro* using a standard protocol. For *in vitro* culture all obtained embryos were divided into four test groups, using a special polyester mesh (mesh), and one control group (without mesh), which resulted from the differentiation of the level of development or the desired synchronicity:

Experimental Groups (Culture in Mesh):

1. **Experimental group “Young + Young”** (“Jung (J) + Jung (J)”): were put into a culture dish with mesh in the zygote stage (2 groups of 25 embryos) and cultured together until day 8; Group name = **MJJ**
2. **Experimental group “Young + Young on day 2”** (“Jung (J) + Jung an Tag 2 (J2)”): were transferred in a culture dish with mesh in the zygote stage (n = 25), which additionally had added the same number of already divided *in vitro* embryos on day 2 (day 0 - day of fertilization), followed by group culture until day 8 (approximately 25 embryos each); Group name = **MJJ2**
3. **Experimental group “Young + Old”** (“Jung (J) + Alt (A)”): were transferred in a culture dish with mesh in the zygote stage (n = 25) together with asynchronous *in vitro* embryos

(n = 25) in the four to eight cell stage (already cultured *in vitro* for two days), followed by a group culture until day 8; Group name = **MJA**

4. **Experimental group “Old + Old”** ("Alt (A) + Alt (A)": after separate, synchronous *in vitro* cultivation in advance for two days, the *in vitro* embryos in the four to eight cell stage were put together in a culture dish with mesh, followed by group culture until day 8 (approximately 25 embryos each). Group name = **MAA**

Control Group (Culture without Mesh):

Standard *in vitro* culture of 40 to 50 embryos each over eight days in a culture drop; Group name = **J**

For the groups in this study, 4270 oocytes from a total of 670 ovaries were obtained, transferred *in vitro* and prepared for culture in drops or using a mesh. In the individual groups, the blastocyst rates with the development kinetics and the cell numbers were determined by means of nuclear staining, and mRNA expression data were analyzed by a selected gene set. Blastocyst development showed no evidence of an interactive embryo effect during development. When examining the cell number of the blastocysts, however, it could be shown that the addition of embryos in advanced developmental stage obviously induces early blastocyst formation of the embryos, which did not have a comparable number of blastomeres yet.

The gene expression analysis showed that, depending on the addition of embryos, genes having main impact such as *de novo* methylation (DNMT3A), an enzyme in the mitochondrial membrane (COX5A) and the citric acid cycle in the mitochondrion (MDH2) were affected.

Overall, it could be shown in this work that embryos could be kept stable in groups in the culture by using a network and it provided information which shows that there is an interaction between embryos during the culture phase. Since this study aimed to show the influences of culture condition on blastocyst development, future studies should focus more on stage-specific embryo development in order to meet the respective needs and requirements.

8 Literaturverzeichnis

Ace CL & Okulicz WC. 1995. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 115 (1), 95-103.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389–395. doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005.

Besenfelder U, Havlicek V, Kuzmany A, Brem G. 2010. Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development: Use of the bovine oviduct. *Theriogenology*, 73(6), 768–776. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.003>.

Bonilla L, Block J, Denicol AC, Hansen PJ. 2014. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 229–239. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6943>.

Carolan C, Lonergan P, Khatir H, Mermillod P. 1996. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol Reprod Dev* 1996;45:145–50.

Cordova A, Perreau C, Uzbekova S, Ponsart C, Locatelli Y, Mermillod P. 2014. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*. 81(9):1163-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.012. Epub 2014 Jan 31.

Deb G, Jin JI, Kwon TH, Choi BH, Bang JI, Dey SR, Cho IR, Kong IK. 2011. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-121>.

Desmet KL, Van Hoeck V, Gagné D, Fournier E, Thakur A, O'Doherty AM, Walsh CP, Sirard MA, Bols PE, Leroy JL. 2016. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genomics*. 17(1):1004.

Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J; TB Trials Study Group. 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods* 354(1-2): 34-39.

Diskin MG & Morris DG. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (Suppl 2), 260-267. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.

Donnay I, Van Langendonck A, Auquier P, Grisart B, Vansteenbrugge A, Massip A, Dessy F. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 47(8):1549-61.

Drazic A, Aksnes H, Marie M, Boczkowska M, Varland S, Timmerman E, Foyen H, Glomnes N, Rebowski G, Impens F, Gevaert K, Dominguez R, Arnesen T. 2018. NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018 vol: 115 (17) pp: 4399-4404.

Emmerstorfer R, Radefeld K, Havlicek V, Besenfelder U, Yu H, Mayrhofer C, Vogl C, Brem G, Papp S. 2018. Effect of oviductal fluid during in vitro culture on bovine embryo development and quality. *Reproduction, Fertility and Development* 30(1) 205-206.

Farin CE, Alexander JE, Farin PW. 2010. Expression of messenger RNAs for insulin-like growth factors and their receptors in bovine fetuses at early gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*, 74(7), 1288–1295. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.035>.

Fazeli A & Holt WV. 2016. Cross talk during the periconception period. *Theriogenology*, 86(1), 438–442. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.059>.

Felmer RN, Arias ME, Muñoz GA, Rio JH. 2011. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, Jun;78(6):403-14. doi: 10.1002/mrd.21317. Epub 2011 May 12.

Fernandez-Fuertes B, Rodríguez-Alonso B, Sánchez JM, Simintiras CA, Lonergan P, Rizos D. 2018. Looking at the big picture: understanding how the oviduct's dialogue with gametes and the embryo shapes reproductive success *Anim Reprod*, 15 (1), 751-764.

Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy F. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, 42(3), 445–453. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90682-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90682-9).

Freeman DA, Woods GL, Vanderwall DK, Weber JA. 1992. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fertil*. 95(2),535-538.

Gad A, Besenfelder U, Rings F, Ghanem N, Salilew-Wondim D, Hossain MM, Tesfaye D, Lonergan P, Becker A, Cinar U, Schellander K, Havlicek V, Hölker M. 2011. Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Human Reproduction*, 26(7), 1693–1707. <https://doi.org/10.1093/humrep/der110>.

Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. 2012. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biology of reproduction*, 87(4), 100. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099697>.

Gad A, Schellander K, Hoelker M, Tesfaye D. 2012. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. *Animal Reproduction Science*, 134(1–2), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.014>.

García EV, Hamdi M, Barrera AD, Sánchez-Calabuig MJ, Gutiérrez-Adán A, Rizos D. 2017. Bovine embryo-oviduct interaction in vitro reveals an early cross talk mediated by BMP signaling. *Reproduction*, 153(5), 631–643. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0654>.

Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994;50:390–400.

Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, Moore HD, Fazeli A. 2005. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics* 4, 1785–1796.

Goovaerts IG, Leroy JL, Van Soom A, De Clercq JB, Andries S, Bols PE. 2009. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology*. 71(5):729-38. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.038. Epub 2008 Oct 28.

Gopichandran N, Leese HJ. 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 131(2):269-277.

Gordon IR. 2003. Laboratory Production of Cattle Embryos. In G. J. Persley, M. E. Vayda, & W. D. Park (Hrsg.), *BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE SERIES* No. 27 (2nd Aufl., S. 592). Ireland: CABI Publishing. Abgerufen von [https://fcaib.edu.ng/books/Animal Production/%5BI_Gordon__what_can_be_done_for_the_cow_today_will\(BookFi.org\).pdf](https://fcaib.edu.ng/books/Animal%20Production/%5BI_Gordon__what_can_be_done_for_the_cow_today_will(BookFi.org).pdf).

Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E. 2014. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 18;111(11):4139-44. doi: 10.1073/pnas.1321569111. Epub 2014 Mar 3.

Havlicek V, Kuzmany A, Cseh S, Brem G, Besenfelder U. 2010. The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Journal of Reproduction in Domestic Animals*, 45,832-837. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01364.x.

Hasler JF. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>.

Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Neuhoﬀ C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. 2017. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, 96, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.014>.

Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griesse J, Schellander K, Tesfaye D. 2009. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *REPRODUCTION*, 137(3), 415–425. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0370>.

Hoelker M, Rings F, Lund Q, Phatsara C, Schellander K, Tesfaye D. 2010. Effect of embryo density on in vitro developmental characteristics of bovine preimplantative embryos with respect to micro and macroenvironments. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: e138–145.

Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, Humpherson PG, Watson T, Sreenan JM, Morris DG. 2007. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Molecular Reproduction and Development* 74, 445–454.

Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM Morris DG. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development* 75, 496–503.

Hugentobler SA, Sreenan JM, Humpherson PG, Leese HJ, Diskin MG, Morris DG. 2010. Ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction Fertility and Development* 22, 684–694. doi: 10.1071/RD09129.

Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D. 2011. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28, 191–197.

Ieda S, Akai T, Sakaguchi Y, Shimamura S, Sugawara A, Kaneda M, Matoba S, Kagota M, Sugimura S, Kaijima H. 2018. A microwell culture system that allows group culture and is compatible with human single media. *J Assist Reprod Genet.* 35(10):1869-1880. doi: 10.1007/s10815-018-1252-z. Epub 2018 Jul 11.

Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshäuser G, Baccarini M, Donabauer B, Reichart U, Kolbe T, Bogdan C, Leanderson T, Levy D, Decker T, Müller M. 2003. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nature immunology* 2003 vol: 4 (5) pp: 471-477.

Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P. 1994. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 41(6), 1323–1331. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90491-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90491-Z).

Khurana NK & 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*. 2000 Sep 15;54(5):741-56.

Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*. 45(3):573-581.

Krisher R. 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82(E Suppl):E14-E23. DO - 10.2527/2004.8213_supplE14x.

Kuczwara V. 2018. Eileiterflüssigkeit in der In vitro-Kultur von bovinen Embryonen Bachelorarbeit. Reproduktionszentrum Wieselburg. Abgerufen von <https://www.vetmeduni.ac.at/hochschulschriften/bakk-biomed-biotechn/AC15181690.pdf>.

Lamy J, Liere P, Pianos A, Aprahamian F, Mermillod P, Saint-Dizier M. 2016. Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology* 2016, 86, 1409–1420.

Lazzari G, Colleoni S, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Duchi R, Galli C. 2010. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*. 73(6):748-57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.08.001. Epub 2009 Sep 1.

Leibfried L & First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(1), 76–86. <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>.

Li R, Wen L, Wang S, Bou S. 2006. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology* 2006; 66:404–14.

Lim JM & Hansel W. 1996. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1199-1205.

Lonergan P & Fair T. 2014. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.021>.

Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 57(2), 146–152. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2).

Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland M. 2003. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(6), 657–663. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62088-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62088-3).

Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, Lloreda V, Coy P, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, Rizos D. 2017. Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(3), 621. <https://doi.org/10.1071/RD15238>.

Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Løvendahl P, Råty M, Peippo J, Greve T, Callesen H. 2005. Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction*. 130(5):669-679.

Maillo V, Gaora PÓ, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, Spencer TE, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos, D. 2015. Oviduct-embryo interactions in cattle: two-way traffic or a one-way street? 1. *Biology of Reproduction*, 92(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.127969>.

Maillo V, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. 2016. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86(1), 443–450. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.060>.

Maillo V, Rizos D, Besenfelder U, Havlicek V, Kelly AK, Garrett M, Lonergan P. 2012. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 3865–3876. doi: 10.3168/jds.2011-5270.

Matoba S, Fair T, Lonergan P. 2010. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. *Reprod Fertil Dev*. 22(5): 839–851. doi: 10.1071/RD09277.

May-Panloup P, Vignon X, Chrétien M, Heyman Y, Tamassia M, Malhière Y, Reynier P. 2005. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E 2005 vol: 3 (1) pp: 65.

Menezo Y & Guerin P. 1997. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 73, 99–104.

Mizushima S & Fukui Y. 2001. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology*. 2001 Apr 15;55(7):1431-45.

Murakami H & Imai H. 1996. Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Mol Reprod Dev* 43(2) 167-170.

O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL, Boland MP. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*. 48(1):161-169.

O'Neill C. 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod*. 56(1):229-237.

Oyamada T, Iwayama H, Fukui Y. 2004. Additional effect of epidermal growth factor during in vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote*. 12(2):143-150.

Paria BC & Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(12):4756-60.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, 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>.

Rodríguez-Alonso B, Sánchez JM, González E, Lonergan P, Rizos D. 2020. Challenges in studying preimplantation embryo-maternal interaction in cattle. *Theriogenology*. 2020 Jan 13. pii: S0093-691X(20)30025-X. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.019. [Epub ahead of print].

Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhoff C, Tholen, E, Hoelker M, Schellander K, Tesfaye, D. 2017. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *PloS one*, 12(11), e0187569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187569>.

Saeed-Zidane M. 2017. Epigenetic and exosome-mediated cell-cell communication in follicular cells and preimplantation embryos [Dissertation]. Bonn: Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität.

Saint-Dizier M, Schoen J, Chen S, Banliat C, Mermillod P. 2019. Composing the early embryonic microenvironment: physiology and regulation of oviductal secretions. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 28;21(1). pii: E223. doi: 10.3390/ijms21010223.

Salilew-Wondim D, Fournier E, Hoelker M, Saeed-Zidane M, Tholen E, Looft C, Neuhoﬀ C, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Gagné D, Sirard MA, Robert C, Shojaei Saadi HA, Gad A, Schellander K, Tesfaye D. 2015. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. *PLoS One*. 2015 Nov 4;10(11):e0140467. doi: 10.1371/journal.pone.0140467. eCollection 2015.

Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Hoelker M, Gebremedhn S, Poirier M, Pandey HO, Tholen E, Neuhoﬀ C, Held E, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F, Fournier E, Gagné D, Sirard MA, Robert C, Gad A, Schellander K, Tesfaye D. 2018. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation” *BMC Genomics*, 19, 424. doi:10.1186/s12864-018-4826-3.

Smith GD, Takayama S, Swain JE. 2012. Rethinking In Vitro Embryo Culture: New developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. 1. *Biology of Reproduction*, 86(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095778>.

Smits K, De Coninck DIM, Van Nieuwerburgh F, Govaere J, Van Poucke M, Peelman L, Deforce D, Van Soom A. 2016. The equine embryo influences immune-related gene expression in the oviduct. *Biology of Reproduction* 94(2):36, 1–8. DOI 10.1095/biolreprod.115.136432.

Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Akai T, Hattori H, Konoshi K, Imai K. 2010. Culture of bovine embryos in polyester mesh sections: the effect of pore size and oxygen tension on in vitro development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), 1104–1109. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01502.x>.

Spindler RE, Crichton EG, Agca Y, Loskutoff N, Critser J, Gardner DK, Wildt DE. 2006. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology* 2006;66:82–92.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Aikawa Y, Ohtake M, Matsuda H, Kobayashi S, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. 2013. Effect of embryo density on in vitro development and gene expression in bovine in vitro-fertilized embryos cultured in a microwell system. *J Reprod Dev*. 2013;59(2):115–122. doi:10.1262/jrd.2012-113.

Swain JE & Smith GD. 2011. Advances in embryo culture platforms: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. *Human Reproduction Update*, 17(4), 541–557. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr006>.

Thibodeaux JK, Myers MW, Prough SG, White KL. 1995. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. *Theriogenology*. 44(3):423-432.

Tšuiiko O, Catteeuw M, Zamani Esteki M, Destouni A, Bogado Pascottini O, Besenfelder U, Havlicek V, Smits K, Kurg A, Salumets A, D'Hooghe T, Voet T, Van Soom A, Vermeesch RJ. 2017. Genome stability of bovine in vivo-conceived cleavage-stage embryos is higher compared to in vitro-produced embryos. *Human Reproduction*, 23, 1–10. doi: 10.1093/humrep/dex286.

Viana J. 2018. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Technology Newsletter* 36(4): 08-25, 2018.

Viana J. 2019. 2018 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), 7-25, 2019.

Villalón M, Ortiz ME, Aguayo C, Muñoz J, Croxatto HB. 1982. Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. *Biol Reprod.* 26(2),337-341.

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. *Mol Reprod Dev.* 60(1):47-55. doi: 10.1002/mrd.1060.

Wolf E, Arnold G, Bauersachs S, Beier H, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S, Kölle S, Prella K, Reichenbach HD, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz, F. 2003: Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 276–289. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00435.x>.

Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. 2000. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat. Rec.* 260 268-278.

Zebeli Q, Ghareeb K, Humer E, Metzler-Zebeli BU, Besenfelder U. 2015. Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 103, 126–36. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.09.020.

9 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Anreicherung von Metaboliten in einem Well-of-the-Well System mit drei Embryonen; © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018	17 -
Abbildung 2: Kumulative Darstellung von Metaboliten in Abhängigkeit von der Anzahl von Embryonen bzw. vom Volumen; © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018.....	20 -
Abbildung 3: Einzelembryokultur mittels WOW-System, Cell-Tak und Polyesternetz nach Matoba et al. 2010; © CSIRO 2010	21 -
Abbildung 4: COC mit besten Qualitätsmerkmalen, vor IVM (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna).....	27 -
Abbildung 5: Oozyten nach IVM mit deutlich gelockerten Kumuluszellen (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna).-	29 -
Abbildung 6: Oozyten nach IVM, mit deutlich gelockerten Kumuluszellen und zugesetzten Spermien (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna).....	29 -
Abbildung 7: Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh) am Boden einer 4-Well-Schale (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019)	32 -
Abbildung 8 (links): Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh), nach Überführen der Zygoten/Embryonen (Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019).....	33 -
Abbildung 9 (rechts): Kultursystem mit Polypropylen-Netz (Mesh), nach Überführen der Zygoten/Embryonen (Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung, NIKON SMZ Stereomikroskop, © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019).....	33 -
Abbildung 10: Blastozystenstadien: 1 Blastozyste mit beginnender Blastocoelbildung, 2 normale Blastozyste, 3 expandierte Blastozyste vor dem Schlüpfen, 4 schlüpfende	

Blastozyste, 5 geschlüpfte Blastozyste mit leerer Zona pellucida (Kuczwara 2018; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna).....	- 34 -
Abbildung 11: Mittels Hoechst gefärbte Blastozyste mit sichtbaren Zellkernen; Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung; Epifluoreszenzmikroskops (Nikon DIAPHOT 300, Japan; © Dr. Havlicek V., Vetmeduni Vienna 2019).....	- 35 -
Abbildung 12: Darstellung der Teilungsraten (%) der vier Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil geteilter Embryonen im Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten; Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Die Teilungsrate der Zygoten in der Gruppe MJJ2 war signifikant höher im Vergleich zu den restlichen Gruppen; $p < 0,05$	- 42 -
Abbildung 13: Blastozystenraten 1 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten am Tag 7; Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Am Tag 7 konnten keine statistischen Unterschiede unter den Versuchsgruppen beobachtet werden; $p < 0,05$	- 43 -
Abbildung 14: Blastozystenraten 1 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten am Tag 8; Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Am Tag 7 konnten keine statistischen Unterschiede unter den Versuchsgruppen beobachtet werden; $p < 0,05$	- 43 -
Abbildung 15: Blastozystenraten 2 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen am Tag 7; Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, $p < 0,05$	- 44 -
Abbildung 16: Blastozystenraten 2 (%) der vier verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen am Tag 8; Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Signifikanzen werden mit Asterisk angegeben, Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, $p < 0,05$	- 45 -

Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Embryokinetik der verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil der Tag 7 Blastozysten in Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten (%); Gruppen: J : Kontrollgruppe im Tropfen, MAA : Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA : Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ : Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2 : Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden	46 -
Abbildung 18: Säulendiagramm zur Darstellung der Anzahl an Blastomeren (Tag 7) in den Blastozysten nach Kernfärbung mittels Hoechst	47 -
Abbildung 19: Zellzahlen der verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe nach Kernfärbung mittels Hoechst; Gruppen: J: Kontrollgruppe im Tropfen, MAA: Versuchsgruppe A + A im Mesh, MJA: Versuchsgruppe J + A im Mesh, MJJ: Versuchsgruppe J + J im Mesh, MJJ2: Versuchsgruppe J + J2 im Mesh; Signifikanzen werden mit Asterisk angegeben; Linien zeigen, zwischen welchen Gruppen Signifikanzen gefunden wurden; *p < 0,05	47 -
Abbildung 20: Relative Genexpression der ausgewählten Gene in Bezug auf die verschiedenen Gruppen (1-5); © Dr. Burgstaller J., Vetmeduni Vienna 2020	48 -

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe in Anlehnung an LEIBFRIED und FIRST (1979) (Leibfried & First 1979)	- 26 -
Tabelle 2: Liste der verwendeten Gene für die Genexpressionsanalyse	- 37 -
Tabelle 3: qPCR Assays für die Genexpressionsanalysen	- 39 -
Tabelle 4: Darstellung der absoluten Teilungsraten der vier Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe; Anteil geteilter Embryonen in Bezug zur Anzahl der absolut eingesetzten Eizellen/Zygoten	- 41 -
Tabelle 5: Blastozystenraten 1, Anteil der entwickelten Blastozysten in Bezug zur Anzahl der eingesetzten Eizellen/Zygoten	- 42 -
Tabelle 6: Blastozystenrate 2, Anteil der entwickelten Blastozysten in Bezug zur Anzahl der geteilten Embryonen	- 44 -
Tabelle 7: Embryokinetik; Anteil der Tag 7 Blastozysten in Beziehung zur Gesamtzahl von Blastozysten (%)	- 45 -

10 Abkürzungsverzeichnis

ART	<i>assistierte Reproduktionstechniken</i>
cDNA	<i>komplementäre DNA</i>
COC	<i>Kumulus-Oozyten-Komplexe</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure (DNS)</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FKS	<i>fötales Kälberserum</i>
IETS	<i>Internationale Embryo Technologie Gesellschaft</i>
IFA	<i>Interuniversitäres Forschungsdepartment für Agrarbiotechnologie</i>
IFN-t	<i>Interferon-Tau</i>
IVF	<i>In vitro-Fertilisation</i>
IVK	<i>In vitro-Kultur</i>
IVM	<i>In vitro-Maturation</i>
IVP	<i>In vitro-Produktion</i>
mRNA	<i>messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)</i>
OPU	<i>Ovum-Pick-Up (Eizellgewinnung)</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PET	<i>Polyethylenterephthalat, Polyester</i>
PVA	<i>Polyvinylalkohol</i>
RCW	<i>Reproduktionszentrum Wieselburg</i>
RNS	<i>Ribonukleinsäure (engl. RNA)</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species (Sauerstoffradikale)</i>
RT-qPCR	<i>Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
SOF	<i>Synthetic Oviductal Fluid (synthetische Eileiterflüssigkeit)</i>
TLC	<i>Time Lapse Cinematography (Zeitraffer-Kinematographie)</i>
WOW	<i>„Well of the Well“</i>

11 Anhang

11.1 Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
NaHPO ₄ ·12H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,132 g
MgCL ₂ ·6H ₂ O	0,1 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
- Sterilfiltriert in autoklavierte Flasche	

11.2 Modifizierte PBS (m-PBS)

Lösung 1:	
PBS	1000 ml
Penicilin	30 mg
Streptomycin	100 mg
Lösung 1	9 ml
Fötales Kälberserum (FKS)	1 ml
m-PBS	10 ml

11.3 Transportmedium

PBS	1000 ml
Streptomycin	100 mg
Penicillin	30 mg

11.4 Modified Parker Medium (MPM)

Lösung 1:	
Ca-Laktat	60 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 10 ml

Lösung 2:	
L-Glutamine	10 mg
NaHCO ₃	80 mg
Hepes	140 mg
Na-Pyruvat	25 mg
Gentamycin-Stocklösung	110 µl
TCM 199 (Gibco)	ad 100 ml
MPM:	
Lösung 1	10 ml
Lösung 2	100 ml

Nach Messen der Osmolarität (280-300mOsm) wurde die Lösung sterilfiltriert und für maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

11.5 EGF-Lösung

EGF	100 µl
MPM	10 ml

11.6 Waschmedium

MPM	9 ml
FKS	1 ml

11.7 Maturationsmedium

Waschmedium	9 ml
EGF-Lösung	1 ml

11.8 Sperm Tyrode's-Laktat-Stocklösung (Sperm TL-Stocklösung)

NaCl	580 mg
NaHCO ₃	209 mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4 mg
Hepes	238 mg
Phenol Rot	1 mg

Na-Laktat (Sirup 60%)	365 µl
MgCl ₂ ·6H ₂ O	31 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	38,4 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml

Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 (HCl) und dem Messen der Osmolarität (300 mOsm) wurde die Lösung sterilfiltriert und für maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

11.9 Gentamycin-Stocklösung

Gentamycin	50 mg
NaCl 0,9%	1 ml
- Bei 4°C unbegrenzte Haltbarkeit	

11.10 Kapazitationsmedium (KM)

Na-Pyruvat	1,1 mg
Bovines Serum Albumin (BSA)	60 mg
Gentamycin-Stocklösung	10 µl
Sperm-TL-Stocklösung	10 ml

Nach dem Einstellen des Ph-Wertes 7,35-7,4 (HCl) wurde das Medium sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

11.11 Tyrode's-Laktat-Stocklösung (TL-Stocklösung)

NaCl	666 mg
KCl	23,5 mg
NaHCO ₃	210,3 mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4,7 mg
Penicillin	6,5 mg
Phenol Rot	1 mg
Na-Laktat (Sirup 60%)	186 µl
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	39,7 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml

Nach dem, Messen der Osmolarität (300 mOsm) wurde die Lösung sterilfiltriert und für maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

11.12 Pyruvat- Stocklösung

Pyruvat	11 mg
NaCl 0,9%	5 ml

Aliquots à 300 µl wurden bei -20°C gelagert und immer frisch (kein erneutes Einfrieren) verwendet.

11.13 Befruchtungsmedium (BM)

BSA	60 mg
Pyruvat-Stocklösung	100 µl
TL-Stocklösung	10 ml

Das Medium wurde immer frisch zubereitet und vor der Verwendung sterilfiltriert.

11.14 Heparin-Medium

Heparin	1 mg
Befruchtungsmedium	5 ml
- sterilfiltriert	

11.15 SOF-Stocklösung

NaCl	629,2 mg
KCl	53,4 mg
KH ₂ PO ₄	16,2 mg
CaCl ₂ x2H ₂ O	24,8 mg
MgCl ₂ x6H ₂ O	9,6 mg
NaHCO ₃	210,6 mg
Phenolrot	0,14 mg
Na-Pyruvat	36,3 mg
Glutamin	14,6 mg
Na-Laktat	47,06 µl
H ₂ O bidest.	ad 100 ml

- Osmolarität: 265-270 mOsm
- Sterilfiltriert
- Bei 5°C lagern

11.16 Kulturmedium

SOF-Stocklösung	9,5 ml
OCS	0,5 ml
BME essent. amino acids	200 µl
MEM nicht essent. amino acids	100 µl

11.17 Histologische Färbelösungen zur Zellkernfärbung

Die Lösung zur histologischen Färbelösungen zur Zellkernfärbung wurde lichtgeschützt gelagert.

Die Färbelösung wurde über mehrere Schritte auf die richtige Endkonzentration verdünnt:

1. Schritt: Lösung 1: 10 mg Hoechst 33342 (Sigma B2261) in 1 ml destilliertes Wasser (Stocklösung)
2. Schritt: Lösung 2: 10 µl Lösung 1 in 1 ml PVA-Lösung
3. Schritt: Endlösung: 100 µl Lösung 2 in 1 ml PVA-Lösung (Endkonzentration 10 µg/ml)

Die PVA-Lösung dient zum Waschen der gefärbten Embryonen und kann bei 4 °C gelagert werden.

- PVA-Lösung: 1 mg/ml PVA (Sigma P 8136) in PBS (Sigma D 8662)

