



**38. Jahrestagung der
Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder
(AET-d)**

16. / 17. 6. 2011

**Landwirtschaftszentrum
Haus Riswick**

**Organisation
&
Leitung:**

**Michael Hölker
Uwe Küchenmeister
Mark Holsteg**

Foto: Landwirtschaftskammer NRW

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

Goldspensoren



Silbersponsor



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

Bronzesponsoren

Wörrlein
Medizintechnik



Bodenco B.V.



weitere Sponsoren



Pharmanovo

Sponsorenadressen

Bodenco B.V.

Hofdijkstraat 2
1814 EC Alkmaar
The Netherlands

Labotect Labor Technik Göttingen GmbH

Willi-Eichler-Str. 25
37079 Göttingen

Ceva Tiergesundheit GmbH

Kanzlerstr. 4
40472 Düsseldorf

Pfizer GmbH

Pfizerstr.1
76139 Karlsruhe

Consarctic GmbH

Postfach 1138
63821 Schöllkrippen

Pharmanovo GmbH

Sudetenstr.19
30559 Hannover

CRV Meggele GmbH

Rottmoos 5
83512 Wasserburg

Virbac Tierarzneimittel GmbH

Rögen 20
23843 Bad Oldeslohe

IMV Technologies

Rue Clemenceau
Postfach 61300 L'aigle, France

Veyx Pharma GmbH

Söreweg 6
34639 Scharzenborn

Intervet Deutschland GmbH

Feldstraße 1a
85716 Unterschleißheim

Walter Wörrlein Medizintechnik

Breitstr.8
91522 Ansbach

Programm

12:00 *Welcome mit Kaffee und belegten Brötchen*

13:00 Begrüßung

Dr. Hölker und Dr. Wehren (Leiter des Landwirtschaftszentrums)

Sektion I: Moderation B. Meinecke und J. Detterer

13:15 **EMBRYONIC LOSS IN CATTLE: WHOSE FAULT IS IT?**

P. Lonergan

School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Ireland

14:00 **Beeinflussung der lutealen mRNA-Expression durch die Fütterung konjugierter Linolsäuren**

A. Hanstedt, E. Onnen-Lübben, S. Wilkening, H. Stinshoff, H. Bollwein, C. Wrenzycki

Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

14:15 **Einfluss eines hormonell induzierten akzessorischen Gelbkörpers auf das Wachstum des primären Corpus luteum, den Plasmaprogesteronspiegel und die Graviditätsergebnisse beim Milchrind**

J. Queck, J. Detterer, J. Punsmann, C. Wrenzycki, M. Piechotta, S. Meinecke-Tillmann

Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

14:30 **Einfluss von exogen supplementiertem Progesteron auf das bovine Corpus luteum während der Frühträchtigkeit**

J. Punsmann, J. Queck, J. Detterer, S. Meinecke-Tillmann, C. Wrenzycki

Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

14:45 **Vortrag unseres Silbersponsors Virbac**

Ein neuartiger Schnelltest zur Ovulationsdiagnostik beim Schwein: Testprinzip, bisherige Erfahrungen, Anwendungsmöglichkeiten.

K. Teich, K. Knipper, J. Voss

Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe

15:00 Uhr Kaffeepause / Industrieausstellung

Sektion II: Moderation F. Becker und H. Tenhumberg

- 16:00 **Einfluss der Progesteronkonzentration während wiederholter OPU-Sitzungen auf die Eizellqualität - Erste Ergebnisse-**
 N. Schlüter, A. Hanstedt, C. Wrenzycki
Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover
- 16:15 **Molekulare und subzelluläre Charakterisierung different entwicklungscompetenter boviner Oozyten und deren umgebenen Follikelzellen**
 D. Janowski, D. Salilew-Wondim, H. Alm, W. Tomek, T. Viergutz, D. Tesfaye, H. Torner
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
- 16:30 **Epigenetische Untersuchung ungereifter und gereifter Oozyten von präpuberalen und adulten Bovinen**
 M. Diederich, T. Hansmann, W. Kues, B. Barg-Kues, D. Herrmann, T. Haaf², R. Reinhardt, H. Niemann
Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee
- 16:45 **Einfluss verschiedener Reifungsbedingungen auf Methylierung und Genexpression in bovinen Eizellen**
 J. Heinzmann, T. Hansmann, C. Wrenzycki, U. Zechner, T. Haaf und H. Niemann
Institut für Nutztiergenetik, Friedrich Loeffler Institut, Mariensee
- 17:00 **Die G6PDH Aktivität immaturer equiner Eizellen korreliert sowohl mit dem Entwicklungspotential als auch mit der Exprimierung entwicklungsrelevanter Kandidatengene**
 E. Held, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, N. Ghanem, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hoelker
Institut für Tierzuchtwissenschaften, Universität Bonn, Bonn
- 17:15 **Einfluss ausgewählter Kulturparameter auf In-vitro-Entwicklung und Geschlechts-differenzierung von Rinderembryonen**
 F. Poppicht, E. Abele, H. Stinshoff, S. Wilkening, C. Wrenzycki
Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
- 17:30 **Molekulare Mechanismen und Pathways bei der embryonalen Genomaktivierung beim Rind.**
 A. Gad, U. Besenfelder, V. Havlicek, E. Held, I. Dufort, MA. Sirard, K. Schellander, D. Tesfaye, M. Hoelker
Institut für Tierwissenschaften, Universität Bonn
- 17:45 **Wahl des neuen II. Vorsitzenden**
- ab 19:00 Abendveranstaltung**
-

7:15-8:45 *Welcome mit Kaffee und belegten Brötchen*

Sektion III: Moderation C. Wrenzycki und K. Roschlau

8:45 **Untersuchung von Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Reproduktion bei hochleistenden Milchkühen**

C. Hametner, C. Weber, F. Becker, H. Hammon, W. Kanitz

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf

9:00 **Aktivitätsmessung und „on-farm“- Hormonanalyse: Übereinstimmung hinsichtlich der Brunsterkennung bei Milchkühen?**

A. Boldt, A. Römer, F. Rosner, F. Becker, W. Kanitz

Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei MV, Institut für Tierproduktion, Dummerstorf

9:15 **FOLLICLE NUMBERS, REPRODUCTIVE FUNCTION AND FERTILITY IN CATTLE**

ACO Evans, F Mossa, P Lonergan, JJ Ireland

School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Ireland

10:00 **Vortrag unseres Goldsponsors Pfizer**

Modern Puerperal Metritis Treatment in Cattle

Fausto Tony

Pfizer Animal Health

10:15 - 11:15 Kaffeepause

Sektion IV: Moderation S. Meinecke-Tillmann und H. Hauschulte

- 11:15 **Ist die Anzahl Follikelwellen pro Zyklus im Rahmen des ET ein beachtenswertes Kriterium?**
J. Schneebeili
Summaprada, Schweiz
- 11:30 **Einfluss zweier progesteronfreisetzender Präparate (PRID® alpha, CIDR®) auf die Synchronisation der Empfängertiere im Rahmen eines Embryotransferprogramms beim Rind**
B. Auinger, A. Hanstedt, S. Wilkening, HP. Nohner, C. Leiding, C. Wrenzycki
Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V., Neustadt a.d. Aisch
- 11:45 **Die Wiederholbarkeit der Superovulationsreaktion und der Embryoentnahme bei in kurzen Zeitabständen wiederholt superstimulierten Rindern**
M. Reichenbach, T. Faasch, M. Matthiesen, T. Grupp, C. Gschöderer, C. Prantler, E. Wolf, H-D. Reichenbach
Bayerisches Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie (BFZF), Oberschleißheim
- 12:00 **Ausgewählte Aspekte zur Oozytengewinnung bei Stuten**
A. Vernunft, F. Becker und W. Kanitz
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf
- 12:15 **Unterschiede in der Konzentration von "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG) im Serum verschiedener Rinderrassen und am Tag 35 nach erfolgtem Embryotransfer.**
M. Shahin, M. Friedrich und W. Holtz
Institut für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität, Göttingen
- 12:30 **Genomische Selektion in der Rinderzucht – zukünftige Entwicklungen im Embryotransfer**
K. Roschlau, A. Kuwer, D. Roschlau, C. Kuhnt, U. Michaelis, J. Reinecke, P. Poppe, G. Kuwer, J. Tetens
MASTERRIND GmbH, ET-Station Nückel
- 12:45 **Vier Jahre praktische Erfahrung mit dem Einsatz gesexten Spermas in der Rinderbesamung in Ostfriesland**
J Detterer, S Meinecke-Tillmann
Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland
- 13:00 **Schlusswort und Verabschiedung**
- 13:30 **Besichtigungstour Haus Riswick (freiwillig)**
-

**Zusammenfassungen
der Vorträge**

EMBRYONIC LOSS IN CATTLE: WHOSE FAULT IS IT?

P. Lonergan

*School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, College of Life Sciences,
University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland*

Poor reproductive efficiency is a worldwide problem affecting the dairy industry. There is substantial evidence for an association between high milk production and the lower conception rate observed in cows compared to heifers. However, whether the decline in fertility is due directly to the level of milk production or other factors associated with lactation is unclear. There are various checkpoints along the developmental axis which could, in part, contribute to reduced fertility including suboptimal follicle development associated with poor oestrus exhibition, suboptimal oocyte quality, altered sperm transport and fertilization and/or a suboptimal reproductive tract environment incapable of supporting normal embryo development. The challenge is deciphering where the major problems lie. The major portion of embryo loss occurs very early during pregnancy, around or prior to maternal recognition of pregnancy at approximately Day 16, highlighting the importance of optimal embryo development in the days leading up to this critical period. A considerable proportion of embryo loss may be attributable to inadequate circulating progesterone concentrations and the subsequent downstream consequences on endometrial gene expression and histotroph secretion into the uterine lumen. Conceptus growth and development require the action of progesterone on the uterus to regulate endometrial function including conceptus–maternal interactions, pregnancy recognition and uterine receptivity for implantation. Experiments on the effects of progesterone on endometrial function and conceptus growth will be discussed.

Beeinflussung der lutealen mRNA-Expression durch die Fütterung konjugierter Linolsäuren

A. Hanstedt¹, E. Onnen-Lübben¹, S. Wilkening¹, H. Stinshoff¹, H. Bollwein¹
und C. Wrenzycki^{1,2}

¹*Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

²*Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Die frühembryonale Mortalität stellt ein weltweit auftretendes Problem bei Hochleistungskühen dar. Für die Etablierung einer Trächtigkeit ist unter anderem ein funktionsfähiges Corpus luteum (CL) essentiell. Es gibt Hinweise, dass die Supplementierung konjugierter Linolsäuren (CLA) zur Ration die Gelbkörperfunktion der Tiere positiv beeinflusst (de Veth *et al.* 2009, Medeiros *et al.* 2010, May *et al.* 2011).

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob eine Zufütterung von CLA in unterschiedlichen Konzentrationen sich auf die mRNA-Expression von Schlüsselenzymen der Angiogenese, der Prostaglandin- und Steroidsynthese im Gelbkörper auswirkt.

Dreiundzwanzig HF-Kühe und Rinder wurden randomisiert den verschiedenen Fütterungsgruppen mit unterschiedlichem Zusatz von pansenstabilem CLA-Gemisch zugeteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 0 g CLA je Tag, die der Gruppe I 0 g CLA je Tag und die der die Gruppe II 100 g CLA je Tag. Im Gemisch befanden sich 10,5 % des *cis-9, trans-11* - und 10,4 % *trans-10, cis-12*-Derivats der Linolsäure. Mit der Fütterung wurde ab dem 14. Tag vor der errechneten Abkalbung begonnen. Nach Brunstsynchronisation (Beginn: Tag 59 p.p. ± 3 Tage; PRID-Spirale für 7 Tage, PGF2α beim Entfernen der Spirale) erfolgte 16-18 Stunden nach GnRH-Gabe eine künstliche Besamung. Eine Gelbkörperbiopsie wurde bei allen Versuchstieren am 6. und 13. Tag p.i. durchgeführt. Mittels RT-qPCR erfolgte die Analyse der relativen mRNA-Gehalte verschiedener Gene [VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): Angiogenese; COX-2 (Cyclooxygenase-2) oder auch PGHS-2 (Prostaglandinsynthase-2): Prostaglandinsynthese; 3βHSD (3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase): Progesteronsynthese und StAR (Steroid acute regulator): Progesteronsynthese], die in Zusammenhang mit der Lutealfunktion stehen.

Die CLA-Supplementierung führte in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration zu einer signifikant erniedrigten relativen Transkriptmenge von COX-2, 3βHSD und StAR ($P \leq 0,05$) in den Biopaten, die von CLA-gefütterten Tieren gewonnen wurden im Vergleich zu

denen der Kontrollgruppe. In den Biopaten, die an Tag 13 gewonnen worden waren, war ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von 3β HSD und StAR im Vergleich zu denen von Tag 6 zu beobachten ($P \leq 0,05$). Die Expression der VEGF-mRNA zeigte sich weder von der CLA-Supplementation noch vom Entnahmezeitpunkt beeinflusst.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die Fütterung konjugierter Linolsäuren der relative mRNA-Gehalt von Genen mit funktioneller Relevanz im Gelbkörpergewebe, sowohl Gene der Prostaglandin- als auch Progesteronsynthese, reduziert wird.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes danken wir der Deutschen Forschungsgesellschaft DFG (PAK286/1; WR154/1-1), für die Bereitstellung der Tiere dem Friedrich-Loeffler-Institut in Braunschweig.

Einfluss eines hormonell induzierten akzessorischen Gelbkörpers auf das Wachstum des primären Corpus luteum, den Plasmaprogesteronspiegel und die Graviditätsergebnisse beim Milchrind

Queck, J^{1,2}; Detterer, J²; Punsmann, J^{2,3}; Wrenzycki, C³; Piechotta M³, Meinecke-Tillmann, S¹

¹*Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover,*

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

³*Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover*

Optimale Progesteron (P4)-Konzentrationen gelten als essentieller Faktor hinsichtlich der Etablierung einer Gravidität. Wegen der gesteigerten P4-Metabolisierung bei Hochleistungskühen wird deshalb eine Supplementation dieses Hormons oder eine Förderung der endogenen P4-Produktion diskutiert, um bessere Trächtigkeitsergebnisse zu erzielen. Dies soll u. a. mittels Induktion akzessorischen Gelbkörpergewebes durch die Auslösung einer Luteinisierung oder Ovulation eines Follikels aus der ersten postovulatorischen Follikelwelle zu erreichen sein. Da nicht auszuschließen ist, dass sich akzessorisches Luteingewebe nachteilig auf den bereits vorhandenen Gelbkörper (CL) auswirkt, werden in der vorliegenden Studie die Effekte eines durch Buserelin induzierten akzessorischen CL auf den peripheren Plasmaprogesteronspiegel sowie auf die P4-Produktion des vorhandenen primären Corpus luteum analysiert.

60 Holsteinkühe wurden in verschiedenen Milchviehbetrieben der Regionen Ostfriesland und Ammerland mittels eines Standard-Ovsynchverfahrens synchronisiert, terminorientiert inseminiert (D0 = Tag der Insemination) und danach randomisiert in 3 Versuchsgruppen eingeteilt: Gruppe 1 (n = 21) wurde am Tag 4 p.i. Buserelin (0,02 mg Buserelin in 5ml Lösungsmittel i.m.; Receptal®, Intervet) appliziert. Gruppe 2 (n = 20) erhielt am Tag 4 p.i. ein Placebo i.m. (5 ml isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet., B.Braun). Die Gruppe 3 (n = 19) blieb als Standardkontrolle ohne zusätzliche Behandlung.

Zur Auswertung wurden aus allen Gruppen die Tiere ausgewählt, die einen primären Gelbkörper angebildet hatten. Ein zusätzliches Auswahlkriterium für die Probandinnen der Gruppe 1 war die Anbildung eines akzessorischen Gelbkörpers nach der Buserelin-Gabe. Diesen Kriterien entsprachen in den Gruppen 1, 2 und 3 jeweils 15, 15 und 16 Tiere.

Eine Beprobung der Tiere fand zwischen Tag 4-42 p.i. statt. Die primären CL wurden nach einem festen Zeitprotokoll im Abstand von 6 bis 72 Stunden ab dem Tag 4 p.i. fünfmal, die

akzessorischen Gelbkörper ab dem Tag 12 p.i. dreimal untersucht. Dies beinhaltete eine transvaginal geleitete ultrasonographische Darstellung des CL [LOGIQ Book XP; GE Medical System, Solingen; 8 MHz (4-10 MHz) Mikrokonvexsonde. Das Ultraschallgerät wurde freundlicherweise von H. Bollwein für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt]. Die Aufnahmen im B-Mode dienten zur Bestimmung der CL-Größe sowie des Grauwertes und im Color-Angio-Mode zur Darstellung der Durchblutung. Die Auswertung der sonographischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Programme Pixelflux® und ImageJ®. Gelbkörper-Biopsien wurden an den Zyklustagen 6, 9 (nur vom primären CL), 12, 16 und 42 p.i (vom primären und akzessorischen CL) unter Ultraschallkontrolle transvaginal entnommen. Die Biopsien werden z. Zt., bis zur Bestimmung des Progesterongehalts im Gelbkörpergewebe, bei -196 °C gelagert. Von allen Tieren wurde ein Plasmaprogesteronprofil mit Hilfe von 10 Blutproben, die über den Verlauf des Versuchs gewonnen wurden, erstellt. Die Probenlagerung bis zur Analyse mittels Radioimmunoassay erfolgte bei -20°C. Eine Gravidität der Tiere wurde an den Tagen 30 und 42 p.i. ultrasonographisch verifiziert.

Nach Insemination und Induktion eines akzessorischen CL erwiesen sich 6/15 Tieren (40 %) in Gruppe 1 als gravid. Von den Placebo-behandelten Individuen wurden demgegenüber 9/15 (60 %; Gruppe 2) und von den Standardkontrollen 6/16 (37 %; Gruppe 3) Probandinnen tragend.

Zwischen den Versuchsgruppen sind keine Unterschiede im Plasmaprogesteronprofil zu verzeichnen. Die morphometrischen Messungen lassen vermuten, dass die Größe der primären CL durch das Wachstum der akzessorischen Gelbkörper negativ beeinflusst wird.

Die Analyse des P4-Gehaltes Gelbkörpergewebeproben ist noch nicht abgeschlossen.

Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion akzessorischer Gelbkörper mittels Buserelin weder die Graviditätsergebnisse noch die peripheren Plasmaprogesteronspiegel beim Milchrind positiv beeinflusst.

Einfluss von exogen supplementiertem Progesteron auf das bovine Corpus luteum während der Frühträchtigkeit

Punsmann J.¹, Queck J.², Detterer J.³, Meinecke-Tillmann², Wrenzycki C.^{1,4}

¹ *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover*

² *Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover*

³ *Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Verein Ostfriesischer Stammzüchter,
Südbrookmerland*

⁴ *Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Stiftung Tiho Hannover*

Ein entscheidender Faktor in der erfolgreichen Rinderzucht ist es, früh in der Laktation eine Trächtigkeit zu erzielen. Ein zu niedriger Progesteron(P4)-Wert durch einen erhöhten Leberstoffwechsel oder ein insuffizientes Corpus luteum (CL) können mögliche Ursachen sein, die zum Ausbleiben einer Trächtigkeit und somit zum Umrindern der Tiere führen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von exogen supplementiertem Progesteron auf das bovine Corpus luteum während der Frühträchtigkeit zu untersuchen. Zur Untersuchung wurden 60 Erst- und Zweitkalbinnen der Rasse Holstein Friesian zwischen dem 60. und 120. Laktationstag synchronisiert und terminiert besamt (Tag 0). An Tag 4 folgte eine zufällige Einteilung in drei Behandlungsgruppen: Tiere der Gruppe 1 (CIDR) erhielten eine Controlled intravaginal drug release (CIDR®)-Spange, Tiere der Gruppe 2 (CIDR Placebo) eine Placebo-Spange (Placebo: CIDR-Spange ohne Progesteron), Tiere der Gruppe 3 (Null) blieben unbehandelt. An Tag 10 wurden die CIDR-Spangen bzw. die Placebos entfernt. Trächtigkeitsuntersuchungen (TU) an den Tagen 30 und 42 ermöglichten eine Einteilung in trächtige und nicht-trächtige Tiere. An den Tagen -10, 0, 4, 6, 9, 12, 16, 20 und 42 (bei den tragenden Tieren) wurden jeweils morgens, an Tag 4 zusätzlich abends, Blutproben entnommen. Diese wurden mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA, Count-A-Count®, Fa. Siemens) auf den P4-Gehalt im Serum untersucht. 19 Tiere blieben aufgrund von Erkrankungen, eines pathologisch verkürzten Zyklus oder eines P4-Wertes >1,5 ng/ml an Tag 0 bei der Auswertung unberücksichtigt. Die Zuteilung zu den einzelnen Gruppen und die TU-Ergebnisse an Tag 42 sind Tabelle 1 zu entnehmen

Behandlung	tragend	nicht tragend
CIDR n=13	6	7
CIDR Placebo n=14	8	6
Null n=14	6	8

Tabelle 1 TU-Ergebnisse Tag 42

Die P4-Werte der Tiere der CIDR-Gruppe waren an Tag 4 abends, sowie an Tag 6 signifikant höher als die der Tiere der beiden anderen Gruppen (Tabelle 2).

Behandlung	Tag -10	Tag 0	Tag 4 morgens	Tag 4 abends	Tag 6	Tag 9	Tag 12	Tag 16	Tag 20
CIDR n=13	2,8 ± 0,7	0,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3	3,9 ^a ± 0,3	5,1 ^a ± 0,6	5,2 ± 0,3	5,5 ± 0,5	5,9 ± 0,8	5,5 ± 1,3
CIDR Placebo n=14	3,2 ± 0,6	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,6 ^b ± 0,2	3,2 ^b ± 0,4	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,4	6,4 ± 0,4	5,1 ± 0,7
Null n=14	1,7 ± 0,6	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,6 ^b ± 0,3	3,0 ^b ± 0,6	4,6 ± 0,4	5,7 ± 0,5	5,7 ± 0,7	6,1 ± 1,7

Tabelle 2: P4-Werte (arithmetisches Mittel ± SEM) in ng/ml, a vs. b P<0,05, Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen ohne Berücksichtigung des Trächtigkeitsstatus

Beim Vergleich der trächtigen Tiere der einzelnen Gruppen zeigten sich tendenziell sowie signifikant höhere P4-Werte für die Tiere der CIDR-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen an Tag 4 abends und an den Tagen 6 und 9, 16, 20 und 42 (Tabelle 3).

Behandlung	Tag -10	Tag 0	Tag 4 morgens	Tag 4 abends	Tag 6	Tag 9	Tag 12	Tag 16	Tag 20	Tag 42
CIDR n=6	2,7 ± 1,3	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	4,1 ^a ± 0,4	5,7 ^a ± 1,2	5,8 ^a ± 0,4	6,1 ± 0,7	6,8 ^a ± 0,5	9,0 ^a ± 1,4	9,2 ^a ± 1,1
CIDR Placebo n=8	4 ± 0,6	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,8 ^b ± 0,3	2,8 ^b ± 0,3	4,3 ^b ± 0,4	4,3 ± 0,6	6,2 ± 0,5	5,9 ^{b*} ± 0,6	6,5 ^{b*} ± 0,7
Null n=6	2,2 ± 0,6	0,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,0 ^b ± 0,1	2,1 ^b ± 0,2	3,9 ^b ± 0,3	4,7 ± 0,6	5,0 ^{b*} ± 0,4	5,3 ^b ± 0,8	6,2 ^{b*} ± 0,8

Tabelle 3: P4-Werte (arithmetisches Mittel ± SEM) in ng/ml, a vs. b P<0,05; a vs. b* P<0,1; Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen bei den tragenden Tieren

Der Vergleich der nicht-trächtigen Tiere ergab an Tag 4 abends einen signifikant höheren P4-Wert der CIDR-Tiere zu den Tieren der CIDR Placebo Gruppe und einen tendenziell höheren Wert zu den Tieren der Null-Gruppe (Tabelle 4).

Behandlung	Tag -10	Tag 0	Tag 4 morgens	Tag 4 abends	Tag 6	Tag 9	Tag 12	Tag 16	Tag 20
CIDR n=7	2,9 ± 0,8	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,5	3,7 ^a ± 0,5	4,6 ± 0,4	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,6	5,1 ± 1,4	2,5 ± 1,3
CIDR Placebo n=6	2,2 ± 1,1	0,4 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,4 ^b ± 0,2	3,7 ± 0,7	4,5 ± 0,3	5,3 ± 0,5	6,5 ± 0,6	4,1 ± 1,3
Null n=8	1,3 ± 1,0	0,3 ± 0,2	1,7 ± 0,6	1,7 ^{b*} ± 0,5	3,7 ± 1,0	5,2 ± 0,6	6,5 ± 0,7	6,2 ± 1,2	6,73 ± 3,0

Tabelle 4: P4-Werte (arithmetisches Mittel ± SEM) in ng/ml, a vs. b P<0,05; a vs. b* P<0,1; Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen bei den nicht tragenden Tieren

Die deutlichen Ungleichheiten beim Vergleich der P4-Werte der tragenden und der nicht-tragenden Tiere lassen einen unterschiedlichen Einfluss des exogen supplementierten P4 auf das CL vermuten.

Vortrag unseres Silbersponsors

**Ein neuartiger Schnelltest zur Ovulationsdiagnostik beim Schwein:
Testprinzip, bisherige Erfahrungen, Anwendungsmöglichkeiten.**

Teich Klaus¹; Kristine Knipper² und Jörn Voss²

¹ *Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe*

² *Fassisi, Gesellschaft für Veterinär diagnostik und Umweltanalysen mbH, Göttingen*

Einfluss der Progesteronkonzentration während wiederholter OPU-Sitzungen auf die Eizellqualität -Erste Ergebnisse-N. Schlüter¹, A. Hanstedt¹, C. Wrenzycki^{1,2}¹*Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover*²*Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover*

Die transvaginale, ultraschallgeleitete Follikelpunktion (Ovum-pick-up, OPU) mit anschließender In-vitro-Produktion (IVP) ist inzwischen fest in die züchterische Praxis integriert. Ein limitierender Faktor bei der Produktion transfertauglicher Embryonen stellt dabei die Qualität der gewonnenen Oozyten dar. Die Entwicklungskompetenz der gewonnenen Eizellen wird maßgeblich vom Zyklusstand des Tieres, der folliculären Entwicklungsphase sowie der Follikelgröße beeinflusst.

Ziel dieses Projektes ist es, den Einfluss unterschiedlicher Progesteron (P4)-Konzentrationen während wiederholter OPU-Sitzungen auf die Eizellqualität in vivo zu untersuchen.

Für diese Studie wurden 12 Tiere über einen Zeitraum von 5-6 Wochen zweimal wöchentlich punktiert. Die erste OPU-Sitzung fand an Tag 7 des Zyklus (Brunst = Tag 0) statt. Bei jedem Punktionstermin wurden Anzahl und Größe der punktierten Follikel sowie Größe, Homogenität und Vorhandensein eines Hohlraums des Corpus luteums (CL) erfasst. Follikel der Größe 3-5 mm wurden als kleine, 6-8 mm als mittlere und >8mm als große Follikel eingestuft. Weiterhin wurde jedem Tier bei der Follikelpunktion Blut entnommen und per Radio-Immuno-Assay (RIA) der Progesterongehalt bestimmt. Die gewonnenen Eizellen wurden hinsichtlich ihrer Qualität anhand morphologischer Kriterien kategorisiert, anschließend denudiert und zur späteren mRNA-Analyse bei -80°C tiefgefroren.

Alle Tiere zeigten während des Punktionszeitraumes Brunstanzeichen, die mit großen Follikeln einhergingen. Die durchschnittliche Zykluslänge betrug dabei $23,8 \pm 4,6$ Tage. Nach Punktion des großen Follikels konnte die Bildung einer CL-ähnlichen Struktur beobachtet werden, nachfolgend induziertes CL genannt. Bei Vorliegen eines natürlichen CLs wiesen die Tiere einen signifikant höheren P4-Gehalt im Blut auf [$4,9 \pm 2,3$ ng/ml, (n=12)] als bei Vorhandensein eines induzierten CLs [$3,0 \pm 1,6$ (n=10)].

Die Anzahl und Größen der punktierten Follikel, die Wiederfindungsrate (WFR) sowie Anzahl und Qualität der gewonnenen Oozyten pro Punktion waren in den jeweiligen Zyklusphasen ähnlich und sind in nachfolgenden Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Anzahl der punktierten Follikel sowie Anzahl der kleinen, mittleren und großen Follikel in den Zyklusphasen

Zyklusphase	OPU-Sitzungen	Anzahl an Follikeln	Follikelgröße (mm)		
			3-5	6-8	> 8
Natürliches C.I.	49	9,4 ±3,5	7,1 ±3,2	1,8 ±1,3	0,4 ±0,5
Follikelphase 1	32	10,0 ±3,5	7,7 ±3,4	1,5 ±1,1	0,9 ±0,8
Induziertes C.I.	34	9,8 ±3,1	7,1 ±2,9	2,2 ±1,3	0,5 ±0,7
Follikelphase 2	7	10,3 ±2,1	8,0 ±1,9	2,0 ±1,4	0,3 ±0,8

Tabelle 2: Anzahl der gewonnenen Eizellen, ihre Qualität sowie die Wiederfindungsrate (WFR) pro Punktion während der verschiedenen Zyklusphasen

Zyklusphase	OPU	Anzahl an Oozyten	Kategorie					WFR %
			1	2	3	4	5	
Natürliches C.I.	49	3,7 ±2,6	1,0 ±1,3	1,0 ±1,0	1,1 ±1,1	0,4 ±0,8	0,3 ±0,6	42,7 ±21,8
Follikelphase 1	32	4,0 ±2,6	0,8 ±0,8	1,0 ±0,9	1,5 ±2,0	0,1 ±0,3	0,5 ±0,8	40,4 ±19,9
Induziertes C.I.	34	3,0 ±2,1	0,7 ±0,9	1,1 ±1,2	0,9 ±0,9	0,1 ±0,2	0,4 ±0,5	33,3 ±18,5
Follikelphase 2	7	4,6 ±1,7	0,7 ±0,8	1,3 ±1,4	1,7 ±1,5	0,1 ±0,4	0,7 ±0,8	44,4 ±22,5

Eine Analyse der Oozyten auf molekularer Ebene anhand aussagekräftiger mRNA-Transkripte wird noch erfolgen.

Molekulare und subzelluläre Charakterisierung different entwicklungs-kompetenter boviner Oozyten und deren umgebenen Follikelzellen

D. Janowski^A, D. Salilew-Wondim^B, H. Alm^A, W. Tomek^A, T. Viergutz^A, D. Tesfaye^B und H. Torner^A

^A*Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf*

^B*Institut für Tierwissenschaften, Universität Bonn*

Das Entwicklungspotential von Oozyten wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die es erschweren, eindeutige und zuverlässige Kriterien für die Selektion entwicklungs-kompetenter Oozyten zu bestimmen. Es besteht die Hypothese, dass es zwischen dem Auftreten leicht atretischer Granulosazellen (GC) im Follikel und einer erhöhten Entwicklungskompetenz von Oozyten ein Zusammenhang besteht. Aufgrund der Notwendigkeit nicht-invasive Methoden zu identifizieren, die sich für die Selektion von Oozyten für die In-vitro-Embryonenproduktion eignen, bestand das Ziel der Untersuchung darin herauszufinden, ob different entwicklungs-kompetente Oozyten Unterschiede bezüglich ihres Apoptosegrades oder im Genexpressionsmuster ihrer follikulären Umgebung zeigen [GC und Cumuluszellen (CC)]. Als Grundlage dienten Oozyten, die hinsichtlich der Aktivität des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) mittels eines Brilliant-Cresylblau-Tests (BCB) unterschieden wurden. Die BCB-Färbung wurde bereits erfolgreich genutzt, um kompetente und nicht kompetente bovine Oozyten zu differenzieren. Eine Einzelaspiration von Follikeln (Ø 3-8 mm) ermöglichte die Zuordnung von Oozyten zu ihrer follikulären Herkunft. Die unreifen Cumulus-Oozyten-Komplexe (COKs) wurden anschließend mit 26 µM BCB gefärbt. Basierend auf der Färbung wurden die Oozyten hinsichtlich ihrer Entwicklungskompetenz in BCB⁻ (farbloses Zytoplasma, geringe Entwicklungskompetenz) und BCB⁺ (blaues Zytoplasma, hohe Entwicklungskompetenz) klassifiziert. Die CC und GC wurden ebenfalls nach den BCB-Gruppen der zugehörigen Oozyten unterteilt. Die BCB⁺-Oozyten zeigten in vitro eine signifikant höhere Blastozystenrate am Tag 8 nach Fertilisation (34,1%) verglichen mit BCB⁻-Oozyten (3,9%) (N=601 COK, p<0,05). Die apoptotischen Veränderungen in den GC wurden mit der TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling)-Methode und mit der Annexin-V-Färbung gefolgt von einer durchflusszytometrischen Analyse untersucht. Der Anteil apoptotischer GC der BCB⁺-Oozyten war im Vergleich zur BCB⁻-Gruppe signifikant erhöht (17,0 vs. 11,0%; p<0,05). Das Auftreten der an der Apoptoseinitiation beteiligten Caspase-3 und deren aktiver Form, der cleaved Caspase-3, wurden mittels einer Western Blot-Analyse bestimmt. Die CC, GC und

Oozyten der BCB⁺-Gruppe zeigten einen höheren Anteil von cleaved Caspase-3 verglichen mit allen Zellkompartimenten der BCB⁻-Gruppe, wobei der Unterschied bei den CC und Oozyten signifikant war ($p < 0,05$). Weiterhin wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen den jeweiligen BCB⁺- und BCB⁻-Gruppen von Oozyten, CC und GC durch einen bovinen Affymetrix Microarray identifiziert. Aus dem Vergleich der Expressionsdaten wurde deutlich, dass in BCB⁺-Oozyten Gene stärker exprimiert waren, die an der Genregulation (MYST4), der Proteinsynthese (EIF3F, ART3) und an Detoxifikationsprozessen (GSTA1) beteiligt sind. Die BCB⁺-Follikelzellen wiesen dagegen eine höhere Expression von Genen der Steroidhormonsynthese (STAR, FSHR) und der Immunantwort (TLR2, IL6R) auf. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass zwischen der Entwicklungskompetenz von Oozyten und dem Level an Apoptose und dem Genexpressionsmuster der folliculären Umgebung ein Zusammenhang besteht.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Epigenetische Untersuchung ungereifter und gereifter Oozyten von präpuberalen und adulten Bovinen

Mike Diederich¹, Tamara Hansmann², Wilfried Kues¹, Brigitte Barg-Kues¹, Doris Herrmann¹, Thomas Haaf², Richard Reinhardt³ und Heiner Niemann¹

¹*Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Höltystrasse 10, 30535 Mariensee*

²*Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität, Am Hubland, 97070 Würzburg*

³*Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Ihnestr. 63-73, 14195 Berlin*

Einleitung

Die vollständige Entwicklungskompetenz boviner Oozyten wird während der Follikulogenese erlangt und findet ihren Abschluss in der Fertilisation. Das Erreichen der Entwicklungskompetenz ist von zahlreichen Faktoren wie Jahreszeit, Follikelgröße, Stress, Fütterung, Gesundheit und Alter der Tiere abhängig (ARMSTRONG et al. 1997, *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 333-339; TANEJA et al. 2000, *Biol. Reprod.* 62, 206-213; BOLAND et al. 2001, *Theriogenology* 55, 1323-1340; LI et al. 2007, *Reprod. Domest. Anim.* 42, 666-670). Eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen an Oozyten präpuberaler Rinder hat ergeben, dass sich ihre Entwicklungsfähigkeit deutlich von der von Oozyten adulter Tiere unterscheidet (GANDOLFI et al. 1998, *Mol. Reprod. Dev.* 49, 168-175; STEVENS et al. 1999, *Mol. Reprod.* 54, 49-56; ARMSTRONG 2001, *Theriogenology* 55, 1303-1322; OROPEZA et al. 2004, *Biol. Reprod.* 70, 1634-1643). Als mögliche Ursachen für diese reduzierte Entwicklung werden neben der unvollständigen zytoplasmatischen Reifung, eine veränderte Proteinsynthese, der Oozytendurchmesser, auch epigenetische Veränderungen in Betracht gezogen. Epigenetische Veränderungen beeinflussen die Genexpression während der Oozyten- und Blastozystenentwicklung und führen zur Modifikation des Chromatin; verursachen aber keine strukturelle Änderung der DNA-Sequenz (LUCIFERO et al. 2007, *BMC Dev Biol.* 7, 36; MCGRAW et al. 2007, *Reproduction* 133, 597-608). Ein korrektes DNA-Methylierungsmuster ist für eine normale Säugetierentwicklung und die Aktivierung spezifischer Gene eine essentielle Voraussetzung. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden u.a. vergleichende Untersuchungen des DNA Methylierungsmuster von zwei Repeatsequenzen und drei entwicklungsrelevanten Genen an Oozyten präpuberaler und adulter Rinder durchgeführt. Mithilfe dieser Analysen sollen neue Erkenntnisse über eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen der Erlangung des vollen Entwicklungspotentials boviner Oozyten gewonnen werden.

Material und Methoden

Oozytengewinnung

Bovine Oozyten werden mit Hilfe der Ultraschall geleiteten Follikelpunktion Ovum-Pick-up (OPU) von präpuberalen Kälbern (6-9 Monate) und adulten Tieren (≥ 2 . Laktation) nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Tabelle 1) gewonnen.

Tabelle 1: Behandlungsgruppen

Gruppe	Kontrolle	FSH	FSH+ IGF1	FSH +IGF K*
Kuh	+	+	-	-
Kalb	+	+	+	+

*IGF K = 0.01 M Essigsäure

Analysen

Die Bestimmung des Methylierungsmusters erfolgte unter anderem durch die Analyse zweier Satellitensequenzen (Bovine testis satellite I (1.725 g/ml) DNA, Segment zwei und Bos taurus α -Satellite I DNA, clone pBtKB5) an einem Pool von 5 Oozyten je Behandlungsgruppe. Für diese Analyse werden die Oozyten DNA Bisulfit behandelt und nach Amplifikation ligiert, transformiert und die Klone anschließend sequenziert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Methylierungsmusters bei drei entwicklungsrelevanten, nichtgeprägten Genen (*SCL2A1*; *PRDX1* und *ZAR1*) mittels des neu entwickelten Limiting Dilution Assays.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Repeatanalyse für die Bovine testis satellite Sequenz zeigten zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen vor und nach der Reifung. Für die Bos taurus α -Satellite Sequenz wurde eine signifikante Abnahme der Methylierung bei Oozyten von FSH behandelten Tieren nach der Reifung beobachtet. Für die entwicklungsrelevanten nichtgeprägten Gene *SCL2A1*; *PRDX1* und *ZAR1* wurde für alle Gene eine Demethylierung beobachtet. Daher kann eine Epimutation weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der DNA Methylierung für die Repeatsequenzen bei präpuberalen und adulten Oozyten könnten als mögliche Referenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit angesehen werden. Dadurch könnte die Auswahl entwicklungscompetenter Oozyten für die züchterische Anwendung verbessert werden. Dies würde eine Verkürzung des Generationsintervalls und Optimierung der Nutzung des weiblichen Keimzellpotentials erlauben. Des Weiteren könnten die Ergebnisse als Modell für andere Tierarten dienen, bei denen die Erhaltung der genetischen Vielfalt im Vordergrund steht.

Gefördert durch die W.H. Schaumann-Stiftung, Hamburg

Einfluss verschiedener Reifungsbedingungen auf Methylierung und Genexpression in bovinen Eizellen

J. Heinzmann¹, T. Hansmann², C. Wrenzycki³, U. Zechner⁴, T. Haaf² und H. Niemann¹

¹Institut für Nutztiergenetik, Friedrich Loeffler Institut, Mariensee

²Institut für Humangenetik, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

³Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

⁴Institut für Humangenetik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

1. Einleitung

Bei Rindern ist die *in vitro* Reifung (IVM) integraler Bestandteil der assistierten Reproduktionstechniken (ART); allerdings erreichen nur ca. 30 % der *in vitro* gereiften Oozyten nach Befruchtung das Blastozystenstadium (im Vergleich zu ca. 60 % bei *in vivo* gereiften Eizellen). Dies zeigt, dass die Reifungsbedingungen kritischen Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyte haben. In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass assistierte Reproduktionstechniken, (inkl. des somatischen Klonens bei Nutztieren) ein erhöhtes Risiko fetaler und plazentarer Fehlentwicklungen bei Mensch und Wiederkäuern mit sich bringen (Maher, 2005: Hum.Mol.Genet. 14,133-138). Das Expressionsprofil von Genen kann in bovinen *in vitro* gereiften Oozyten bzw. produzierten Embryonen im Vergleich zu *in vivo* Oozyten und Embryonen teilweise erheblich verändert sein (Wrenzycki et al., 2005: Reprod.Fertil.Dev. 17,23-35; Kues et al., 2008; PNAS 105,19768-19773). Epigenetische Veränderungen der DNA, wie abweichende Methylierung entwicklungspezifischer DNA Sequenzen besonders in geprägten Genen, werden als ein zu Grunde liegender Mechanismus für das Auftreten von Abnormalitäten nach ART vermutet (Farin et al., 2006: Theriogenology 65,178-191). Ziel dieser Arbeit war es, Effekte spezifischer *in vitro* Reifungsbedingungen auf das Methylierungsprofil ausgewählter entwicklungsrelevanter Gene boviner Oozyten und mögliche Zusammenhänge zwischen DNA Methylierung und mRNA Expression zu untersuchen. Auf Grund des hohen Maßes an Ähnlichkeit der bovinen und humanen präimplantatorischen Entwicklung, können die Ergebnisse auch Bedeutung für die Humanmedizin haben und den Einsatz der Assistierten Reproduktionstechniken verbessern.

2. Material und Methoden

***In vitro* Reifung und Gewinnung *in vivo* gereifter boviner Oozyten**

Für die *in vitro* Reifung wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe in zwei unterschiedlichen Mediensystemen (TCM bzw. SOF) bei entsprechender Gaszusammensetzung 24 h gereift. *In vivo* gereifte Eizellen wurden durch Ultraschall-geleitete Follikelpunktion (OPU) nach Super-

ovulation gewonnen.

qPCR und Methylierungsanalyse

Poly(A)⁺ RNA von einzelnen Oozyten wurde präpariert und nach Reverser Transkription für die qPCR eingesetzt. Die anschließende Quantifizierung der normalisierten Daten wurde mittels „Sequence Detection Software 1.3.1“ durchgeführt. Bisulfit-behandelte DNA aus 10 bovinen Eizellen wurde durch eine Kombination aus “Limiting Dilution” und Multiplex-PCR amplifiziert und anschließend in einem Kapillarsequenzierer (ABI) direkt sequenziert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Mit dem Standard-IVM System (TCM) und dem auf SOF-basierenden System wurden vergleichbare Reifungs- und Blastozystenraten erreicht. Für die neuidentifizierten und charakterisierten differentiell methylierten Regionen (DMR) und „Imprinting Control“ Regionen (ICR) des paternal geprägten Gens *H19* und der maternal geprägten Gene *PEG3* und *SNRPN* wurden für die Oozyten aus den verschiedenen Reifungsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des DNA Methylierungsprofils festgestellt. Es zeigten sich lediglich stochastisch bedingte Fehlmethylierungen. Im Gegensatz dazu ergab die Genexpressionsanalyse mittels qPCR signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den *in vivo* gereiften Eizellen und den beiden IVM Gruppen für *PEG3* und *H19*, sowie in der Expression des paternal geprägten *IGF2R*, das in die Entstehung des bovinen LOS involviert ist (Young et al., 2001: Nat.Genet. **27**,153-154). Die beiden IVM Gruppen unterscheiden sich in ihrer Genexpression jedoch nur wenig voneinander. Zusätzlich zu diesen geprägten Genen wurde die Expression weiterer Gene, die in kritische Prozesse der Eizell- und Embryonalentwicklung involviert sind, untersucht: *SLC2A8* (Glukosetransport), *GDF9* (Wachstumsfaktor), *PRDX1* (Antioxidant und interzelluläre Kommunikation), *DNMT1a/b* (Aufrechterhaltung von Methylierung) und *DNMT3a/b* (*de novo* Methylierung). Interessanterweise war die Expression von *DNMT1a* sowie *DNMT3a* und *DNMT3b* in den *in vitro* gereiften Eizellen signifikant höher als in den *in vivo* gereiften Eizellen. Dies könnte ein Hinweis auf die Entstehung fehlerhafter Methylierungsmuster in *in vitro* produzierten Embryonen sein, die in vorangegangenen Studien gefunden wurden (Niemann et al., 2010: *Cell Reprogram.* **12**, 33-42), geben. Diese Ergebnisse zeigen, dass das DNA Methylierungsprofil in Oozyten recht stabil zu sein scheint und offenbar kaum durch die *in vitro* Reifungsbedingungen beeinflusst wird.

(Finanziert im Rahmen der DFG Forschergruppe „Germ Cell Potential“ (FOR1041)).

Die G6PDH Aktivität immaturer equiner Eizellen korreliert sowohl mit dem präimplantativen Entwicklungspotential als auch mit der Expremierung entwicklungsrelevanter Kandidatengene

E. Held, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, N. Ghanem, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hoelker

Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung Universität Bonn, Bonn

Die Bestimmung des Entwicklungspotentials von Eizellen an Hand der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) Aktivität hat sich bei anderen Spezies, wie Rind, Schwein und Maus als äußerst effizient erwiesen. Auch beim Pferd haben wir bereits gezeigt, dass es eine negative Korrelation des präimplantativen Entwicklungspotentials und der G6PDH Aktivität gibt (*Mohammadi-Sangcheshmeh et al., in Press*). Unsere Ergebnisse bestätigten, dass immature Eizellen, die mittels der Brilliant-Cresyl-Blue (BCB) Färbung als gut, das heißt als Eizellen mit geringer G6PDH Aktivität, eingestuft wurden (BCB+), eine signifikant höhere Maturations-, Teilungs- und Blastozystenrate in vitro aufwiesen, als Eizellen mit einer hohen G6PDH Aktivität (BCB-), dargestellt in Tabelle 1.

Aus früheren Untersuchungen an immaturren bovinen Eizellen ist zudem bekannt, dass die auf Grund ihrer G6PDH Aktivität in gut und schlecht eingeteilten Eizellen, sich hinsichtlich ihrer Genexpression stark von einander unterscheiden. Insgesamt haben wir deshalb 11 Gene als Kandidatengene für das Entwicklungspotential selektiert. Von diesen gehören einige zu der Gruppe der mitochondrial kodierten Gene, welche in der frühen embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielen. Es ist bereits für Eizellen vom Schwein und Rind gezeigt worden, dass für ein hohes Entwicklungspotential eine gewisse Menge an mtDNA nach der Maturation in der Eizelle enthalten sein muss.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen deutliche Unterschiede in der Genexpression für 9 der 11 selektierten Kandidatengene. Von diesen sind 8 Transkripte für die BCB+ Eizellen signifikant stärker expremiert während nur ein Transkript in BCB- Eizellen stärker expremiert ist (Abbildung 1).

Die mtDNA kodierten Gene ATPV6E und IF-3 sowie der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) zeigten bereits beim Rind signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Werden diese nicht ausreichend expremiert so ist die mtDNA Transkription gestört. Des Weiteren waren die für den Zellzyklus relevanten Gene DNMT1, STAT3, Aurora-A, ODC1 und CKS2 in den BCB+ Eizellen über expremiert, was sich mit Untersuchungen an murinen und bovinen Eizellen deckt.

Die vorliegende Studie bestätigt auf molekularer Ebene die Kompetenz der G6PDH Aktivität als Marker für das Entwicklungspotential von immaturren equinen Eizellen für die in vitro Produktion.

Tabelle 1: Korrelation zwischen der G6PDH Aktivität und dem Maturations- und Entwicklungspotential equiner Eizellen

Gruppe	Maturation		Entwicklung	
	GV-TI Stadium	MII Stadium	Teilungsrate	Blastozystenrate
BCB +	26/284 (9,2%) ^a	169/284 (59,5%) ^a	45/98 (45,9%) ^a	9/98 (9,2%) ^a
BCB -	93/247 (37,7%) ^b	71/247 (28,7%) ^b	20/69 (29,0%) ^b	1/69 (1,4%) ^b
Kontrolle	106/445 (23,8%) ^c	230/445 (51,7%) ^a	110/214 (51,4%) ^a	15/214 (7,0%) ^a

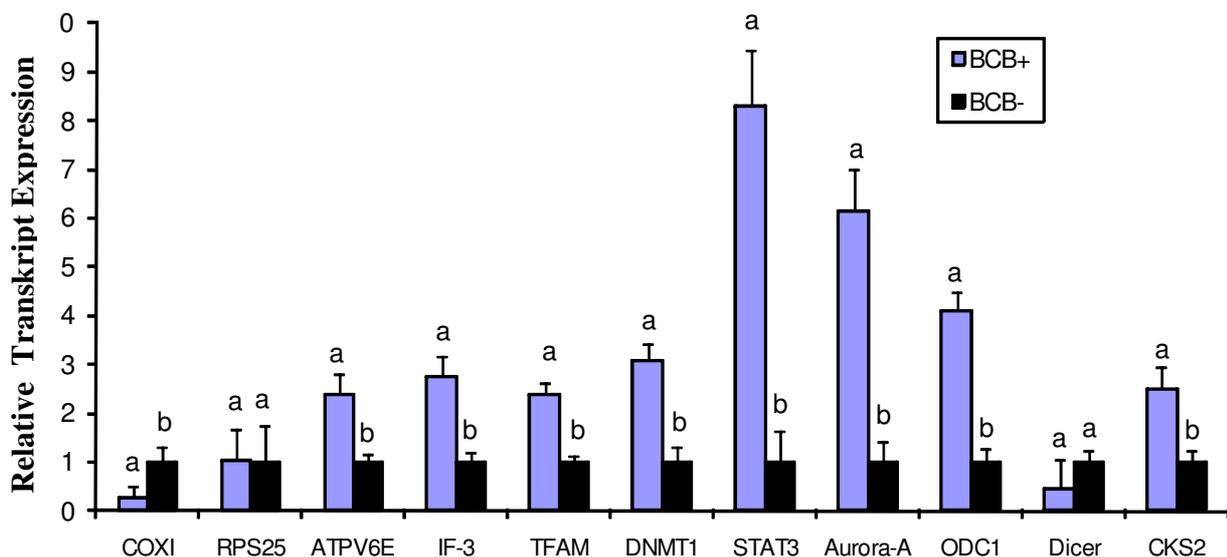


Abbildung 1: Unterschiede in der Genexpression entwicklungsrelevanter Gene zwischen Eizellen mit niedriger G6PDH Aktivität (BCB+) und hoher G6PDH Aktivität (BCB-).

Einfluss ausgewählter Kulturparameter auf In-vitro-Entwicklung und Geschlechtsdifferenzierung von Rinderembryonen

Friederike Poppicht¹, Eva Abele¹, Hanna Stinshoff¹, Sandra Wilkening¹, Christine Wrenzycki^{1,2}

¹ *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

² *Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität in vitro produzierter Embryonen haben vor allem die angewendeten Kulturbedingungen, wie beispielsweise die Sauerstoffkonzentration. Oozyten und Embryonen sind unter In-vivo-Bedingungen nicht einer atmosphärischen, sondern einer reduzierten Sauerstoffkonzentration ausgesetzt. In der Reifung von bovinen Oozyten in vitro wird der Einsatz einer reduzierten Sauerstoffkonzentration jedoch bisher kontrovers diskutiert (PINYOPUMMINTR und BAVISTER 1995; OYAMADA und FUKUI 2004). Einen weiteren Einfluss auf die Qualität und Entwicklung von Oozyten hat die Glukosekonzentration in der Follikelflüssigkeit. So konnte eine positive Korrelation zwischen der Entwicklungskompetenz von Oozyten mit der Fähigkeit dieser Glukose zu verstoffwechseln, beobachtet werden (KRISHER und BAVISTER 1999; HERRICK et al. 2006). In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer reduzierten Sauerstoffkonzentration von 5% während der In-vitro-Maturation (n = 540) und der Einfluss der Glukosekonzentration in der Follikelflüssigkeit präparierter Follikel (n = 240) auf die In-vitro-Entwicklung, die morphologische Qualität und die Geschlechtsverteilung boviner Embryonen untersucht. Dabei zeigte eine reduzierte Sauerstoffkonzentration keinen Einfluss auf die Teilungs- und Entwicklungsraten (Tab. 1). Ferner konnten keine Unterschiede in der morphologischen Qualität durch Untersuchung der Gesamtzellzahl und der Lebend-Tot-Ratio festgestellt werden.

Tab. 1: Einfluss einer Sauerstoffkonzentration von 5% während der Reifung auf die Embryonalentwicklung, Zellzahl, Lebend-Tot-Ratio

Parameter	5% O ₂ (n = 540)	Kontrollgruppe (n = 519)
Teilungsrate ($\bar{x} \pm SD$) [%]	57,5 ± 4,0	57,3 ± 2,9
Entwicklungsrate Tag 7 ($\bar{x} \pm SD$) [%]	21,5 ± 2,4	19,4 ± 2,8
Entwicklungsrate Tag 8 ($\bar{x} \pm SD$) [%]	26,6 ± 2,8	22,6 ± 2,3
Gesamtzellzahl ($\bar{x} \pm SD$)	109,0 ± 3,6	108,7 ± 3,4
Lebend-Tot-Ratio ($\bar{x} \pm SD$)	24,6 ± 6,3	28,5 ± 4,2

Bei den Oozyten, die durch Follikelpräparation gewonnen wurden und deren intrafollikuläre Glukosekonzentration bestimmt wurde, hatte weder eine niedrige ($<1,1$ mmol/l; G_{low}) noch eine hohe ($\geq 1,1$ mmol/l; G_{high}) follikuläre Glukosekonzentration ein Einfluss auf die Teilungs- und Entwicklungsraten der daraus produzierten Embryonen beobachtet werden. Die Glukosekonzentration in der Follikelflüssigkeit hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl oder die Lebend-Tot-Ratio (Tab. 2).

Tab.2: Einfluss einer niedrigen ($<1,1$ mmol/l; G_{low}) oder einer hohen ($\geq 1,1$ mmol/l; G_{high}) follikulären Glukosekonzentration auf die Embryonalentwicklung, Zellzahl, Lebend-Tot-Ratio

Parameter	G_{low} (n = 117)	G_{high} (n = 123)
Teilungsrate ($\bar{x} \pm SD$) [%]	81,8 \pm 4,7	79,3 \pm 4,9
Entwicklungsrate Tag 7 ($\bar{x} \pm SD$) [%]	35,6 \pm 5,2	31,6 \pm 5,2
Entwicklungsrate Tag 8 ($\bar{x} \pm SD$) [%]	47,0 \pm 6,4	49,4 \pm 6,7
Gesamtzellzahl ($\bar{x} \pm SD$)	107,4 \pm 5,6	111,3 \pm 5,2
Lebend-Tot-Ratio ($\bar{x} \pm SD$)	26,8 \pm 4,1	26,6 \pm 4,6

Bei der Untersuchung der Geschlechtsverteilung konnte eine signifikante Verschiebung zugunsten der weiblichen Embryonen in der Versuchsgruppe mit einer reduzierten Sauerstoffkonzentration beobachtet werden. Es zeigte sich außerdem eine signifikante Verschiebung der Geschlechtsverteilung zur weiblichen Seite sowohl bei den Embryonen, die aus Eizellen generiert wurden, die aus Follikeln mit niedriger als auch aus Follikeln mit hoher intrafollikulärer Glukosekonzentration gewonnen wurden (Tab. 3).

Tab. 3 Geschlechtsverteilung der Embryonen

Versuchsgruppen	Anzahl Embryonen	♀ (XX) [%]	♂ (XY) [%]
5% O ₂	21	61,9 ^a (n = 13)	38,1 ^b (n = 8)
G_{low}	20	85,0 ^a (n = 17)	15,0 ^b (n = 3)
G_{high}	22	63,6 ^a (n = 14)	36,4 ^b (n = 8)
Kontrollgruppe	20	55,0 (n = 11)	45,0 (n = 9)

a:b p < 0,05

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit weder durch eine während der Reifung auf 5% reduzierte Sauerstoffkonzentration, noch durch den follikulären Glukosegehalt ein signifikanter Einfluss auf die Entwicklung oder die morphologische Qualität boviner Embryonen beobachtet werden. In allen Versuchsgruppen (5% O₂, G_{low} , und G_{high}) wurde jedoch eine signifikante Verschiebung der Geschlechtsverteilung zugunsten der weiblichen Embryonen festgestellt.

Molekulare Mechanismen und Pathways bei der embryonalen Genomaktivierung beim Rind**Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation**

Gad A¹, Besenfelder U², Havlicek V², Held E¹, Dufort I³, Sirard MA³, Schellander K¹, Tesfaye D¹, Hoelker M¹

¹*Institute of Animal Science, University of Bonn, Bonn, Germany*

²*Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria*

³*Centre de recherche en biologie de la reproduction, Université Laval, Québec, Canada*

Understanding of gene expression patterns due to altered environmental conditions during specific phases of early embryonic development would yield insights into the molecular pathways controlling early development, to improve our knowledge in regulation of embryonic development and to improve success of embryo culture. In the current study, we aimed to understand the influence of alternative culture conditions (in vivo or in vitro) during embryonic genome activation (EGA) stage of development on gene expression pattern and subsequent influence on pathways and biological functions of bovine blastocysts. Six different blastocyst groups were produced under alternative in vivo and in vitro culture conditions. The first two groups (Vitro_4-cell and Vitro_16-cell) were matured, fertilized and cultured in vitro until 4- and 16-cell stage, representing the developmental stages before and after EGA, respectively. Then, each group was endoscopically transferred to synchronized recipients oviduct and blastocysts were collected at day 7 by uterine flushing. The second two groups (Vivo_4-cell and Vivo_16-cell) were matured, fertilized and cultured in vivo until 4- and 16-cell stage, respectively then flushed out and cultured in vitro until day 7 in which blastocysts were harvested. Totally in vitro (IVP) and in vivo blastocysts were produced and used as control groups. A unique custom microarray (Agilent) containing 42,242 oligo probes (60-mers) including 9,322 embryo specific novel transcripts was used over six replicates of each blastocyst group vs. in vivo control group (with dye swap hybridizations).

The results showed that oocyte origin was the main factor affecting developmental rates. In which, Vivo_4-cell and Vivo_16-cell groups had higher overall transferable embryo rates (73.3% and 74.2%, respectively) compared to Vitro_4-cell, Vitro_16-cell and IVP groups (30.3%, 27.1% and 31.1%, respectively). However, culture environment during EGA

stage was critical in determining blastocyst quality, measured in terms of gene expression patterns. Blastocyst groups which spent EGA stage under in vitro culture conditions (Vivo_4-cell and Vitro_16-cell), either started under in vivo or in vitro conditions, showed higher number of DEG's than their counterparts (Vivo_16-cell and Vitro_4-cell) which spent EGA stage under in vivo culture conditions compared to complete in vivo control group. Ontological classification of DEG's showed that metabolic processes including lipid, carbohydrate, nucleic acid, and amino acid, as well as, cell signalling, cellular development and cell death were the most significant functions in all groups, with different trends, compared to in vivo control group ($P \leq 0.05$). Interestingly, genes involved in lipid metabolism were found to be differentially expressed in Vitro_16-cell and Vivo_4-cell groups. Both groups spent the time of EGA in vitro but showed opposite pattern, in which lipid metabolism genes were down-regulated in Vitro_16-cell and up-regulated in Vivo_4-cell group. Pathway analysis revealed that signalling pathways and retinoic acid receptors activation pathways were the dominant pathways in Vitro_4-cell, Vitro_16-cell and IVP groups. However, NRF2-mediated oxidative stress pathway was the dominant pathway in Vivo_4-cell and Vivo_16-cell groups compared to in vivo control group. This study provides the transcriptome dynamics and gene expression patterns of bovine blastocysts produced under alternative in vivo and in vitro culture conditions with respect of EGA developmental stage and will serve for improving our knowledge in embryonic development regulations.

Untersuchung von Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Reproduktion bei hochleistenden Milchkühen

Cornelia Hametner, Claudia Weber, Frank Becker, Harald Hammon, Wilhelm Kanitz

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) – 18196 Dummerstorf, W.- Stahl – Allee 2

Das Ziel der Studie bestand in einer intensiven Phänotypisierung von Hochleistungskühen (HLK) bezüglich ihrer Energiebilanzen sowie der entsprechenden Ausprägung von reproduktiven Leistungen. Damit soll ein Beitrag zum Verständnis von Regel- und Adaptationsmechanismen bei Stoffwechselbelastungen von HLK und deren reproduktiven Leistungen erbracht werden.

Material und Methoden: Kühe der Rasse DH (n=29; >11500 kg Milch/305 Tage in der 2. Laktation) wurden vom Trockenstellen bis ca. 85 Tage in der 3. Laktation intensiv phänotypisiert. Die Fütterung erfolgte als bedarfsgerechte Gesamtmischung *ad libitum*. Trockenmasseaufnahme (TMA), Milchleistung, Milchinhaltsstoffe, Körpergewicht, Rückenfettdicke (RFD) und BCS wurden wöchentlich erfasst. Blutproben wurden zu definierten Zeitpunkten vor und nach dem Abkalben zur Bestimmung metaboler und hormoneller Parameter entnommen. Leberbiopate wurden an den Tagen 56 und 15 vor der Kalbung, sowie an den Tagen 1, 14, 28 und 49 nach der Kalbung gewonnen. Nach der Abkalbung wurden bei den Kühen wöchentlich rektale und ultrasonographische Untersuchungen des Reproduktionstraktes durchgeführt, sowie zweimal wöchentlich Milchproben zur Bestimmung der Progesteronkonzentrationen entnommen. Nach Ovulationssynchronisation und terminorientierter Besamung erfolgte die Schlachtung am Zyklus- bzw. Trächtigkeitstag 0, 4 oder 12 zur Gewinnung von Ovarien, Eileitern und Uteri. Weiterhin wurden Eizellen bzw. Embryonen ausgespült sowie Follikel für eine Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) aspiriert. Die Entwicklungskompetenz von COK aus 3-5 mm großen Follikeln wurde mittels IVM/IVF/IVC geprüft.

Ergebnisse:

Die Tiere wiesen eine hohe Diversität bezogen auf das Merkmal „Einsetzen der ersten lutealen Aktivität post partum“ auf (von der 2. bis zur 20. Woche p.p.). Kühe, die innerhalb der ersten vier Wochen ovulierten, hatten zur Kalbung insgesamt eine etwas geringere RFD

und mobilisierten tendenziell weniger Rückenfett. Je später das Energietief p.p. auftrat, desto früher wiesen die Tiere eine luteale Aktivität p.p. auf. Die RFD vor der Kalbung und die prozentuale RFD-Abnahme in der ersten Wochen p.p. beeinflussten das Intervall von der Kalbung bis zur ersten lutealen Aktivität ebenfalls. Zu hohe und zu geringe RFD und prozentual höhere RFD-Abnahmen verlängern das Intervall.

Die Milchmengenleistung war bei diesen Tieren bei ähnlicher TMA geringfügig niedriger. Interessanterweise war die Konzentration der freien Fettsäuren bei den früher ovulierenden Tieren nach der Kalbung höher.

Die Qualität der Eizellen aus präovulatorischen Follikeln glich morphologisch und zytologisch denen von Rindern mit positiver Energiebilanz. Am TT 4 konnten von 9 Tieren 6 Embryonen gewonnen werden (Gewinnungsrate = 66 %) während am TT 12 eine GR von 33% realisiert werden konnte.

Schlussfolgerung:

Bei vergleichbar hohen Milchleistungen von Kühen gab es interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsparameter. Da die Embryonengewinnungsrate bei diesen hochleistenden Kühen am Zyklustag 4 höher als am ZT 12 war, sollten weiterführende Untersuchungen zur embryonalen Mortalität angestrebt werden. Die Befruchtungsrate und die Entwicklungskompetenz von COK's nach IVM/IVF/IVC können auch unter Bedingungen von Hochleistung ähnlich denen von COK aus Rindern mit positiver Energiebilanz sein. Die Qualität präovulatorischer COK von HLK scheint nicht durch die negative Energiebilanz beeinträchtigt zu werden.

Aktivitätsmessung und „on-farm“- Hormonanalyse: Übereinstimmung hinsichtlich der Brunsterkennung bei Milchkühen?

A Boldt¹, A Römer¹, F Rosner², F. Becker³, W Kanitz³

¹*Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei MV, Institut für Tierproduktion, Dummerstorf*

²*Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Halle/Saale*

³*Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie; Dummerstorf*

Die Aktivitätsmessung ist für die Praxis ein nützliches Hilfsmittel zur Erkennung von brünstigen Milchkühen. Mit der „on-farm“-Hormonanalyse wurde eine weitere, für die Praxis praktikable Methode entwickelt, die zur Brunsterkennung beiträgt. In der Literatur ist derzeit wenig bekannt über die Beziehung beider Methoden hinsichtlich der Bestimmung des Zeitpunktes der Brunst. Das Ziel dieser Studie bestand darin, Informationen aus der Aktivitätsmessung und aus der Progesteronkonzentrationsmessung zum Brunstverhalten von Milchkühen zu kombinieren. Insgesamt wurden 1.282 Aktivitätsintervalle und Progesteronkonzentrationsmessungen von 133 primi- und multiparen Deutschen Holstein Kühen ausgewertet. Des Weiteren wurden 687 Milchproben mittels Radioimmunoassay (RIA) analysiert, um Aussagen über die Präzision der „on-farm“-Werte für das Herdenmanagement zu erhalten. Die elektronische Aktivitätsmessung erfolgte mit Hilfe von Respektoren der Firma DeLaval, welche am Halsband der Kuh befestigt sind. Befindet sich die Kuh in Bewegung, wird dies in Impulse umgewandelt und stündlich aufsummiert. Die stündlichen Aktivitätswerte werden über eine im Stall frei hängende Antenne ausgelesen und an einen PC weitergeleitet. Der Grenzwert für erhöhte Aktivität wird auf Basis eines Kalmanfilters berechnet. Die Milchproben wurden einmal wöchentlich aus dem Vorgemelk entnommen. Die Kuh wurde als brünstig identifiziert, wenn die Progesteronkonzentration unter 5 ng/ml Milch sank und die Aktivität sich über dem normalen Bewegungsniveau zu dieser Zeitpunkt befand. Die Progesteronkonzentrationen der „on-farm“- Messungen korrelierten mit denen der RIA-Methode ($r=0.67$; $P<0.01$). Es konnte eine schwach negative Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration in der Milch (on-farm) und dem Aktivitätsniveau festgestellt werden ($r=-0.11$; $P<0.01$), jedoch keine signifikante Beziehung zwischen RIA-Progesteronkonzentration und Aktivität. Die weitere Analyse zeigte einen Progesteronkonzentrationsabfall mit steigendem Aktivitätsniveau. Bei einem Aktivitätsniveau

von 0 (keine Aktivitätssteigerung) betrug die durchschnittliche Progesteronkonzentration 8,28 ng/ml Milch, bei einem Aktivitätsniveau von 3 (starke Aktivitätssteigerung) 5,12 ng/ml Milch ($P < 0.05$). Hinsichtlich des Zeitpunktes der Brunst konnte eine Übereinstimmung zwischen Aktivitätsmessung und Progesteronmessung (on-farm) von 30.8 % ermittelt werden. 29.0 % der nach der Aktivitätsmessung erkannten Brunsten wurden als falsch positiv eingestuft und 15.2 % der Brunsten nicht erfasst. Der Vergleich der RIA-Progesteronkonzentrationen und der Aktivitätsmessung ergab eine Übereinstimmung von 49.3 % zum Zeitpunkt der Brunst, 10.4 % falsch positive Brunstmeldungen und 31.5 % nicht erfasste Brunsten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die „on-farm“-Methode nicht dementsprechend exakt arbeitet wie die RIA-Methode. Jedoch konnte eine negative Korrelation zwischen dem Aktivitätsniveau und der Progesteronkonzentration ermittelt werden. Weitere Berechnungen ergaben eine signifikante Beziehung zwischen dem Aktivitätsniveau der Kuh und der Progesteronkonzentration in der Milch.

Für die Praxis ist die Nutzung der kombinierten Aktivitäts- und Progesteronkonzentrationsmessung eine empfehlenswerte Methode, um eine optimale Brunsterkennungsrate zu erreichen.

FOLLICLE NUMBERS, REPRODUCTIVE FUNCTION AND FERTILITY IN CATTLE

ACO Evans¹, F Mossa¹, P Lonergan¹, JJ Ireland²

¹*School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Ireland*

²*Department of Animal Science, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA*

Antral follicle count (AFC, follicles ≥ 3 mm in diameter) varies between 5 and 50 follicles in among *Bos taurus* cattle. AFC is highly repeatable within animals, and is correlated with the total number of follicles in ovaries. Cattle with low AFC have higher circulating concentrations of FSH and LH, but lower concentrations of AMH, progesterone and androgens than animals with high AFC. We have evidence to suggest that the variation in AFC in adult animals is associated with the maternal environment that they experienced during gestation. Also additional studies provide evidence to suggest that fertility may be compromised in animals with low AFC due to effects on oocytes, progesterone and the endometrium compared to animals with high AFC. To examine this directly we assessed AFC in post partum dairy cows and found that cows with a high AFC had higher pregnancy rates, shorter calving to conception intervals and received fewer services during the breeding season compared to cows with a low AFC.

Recent publications describing these studies include

F Mossa, S Walsh, ST Butler, DP Berry, F Carter, P Lonergan, GW Smith, JJ Ireland, ACO Evans (2011) Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with poor fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*

JJ Ireland, GW Smith, D Scheetz, F Jimenez-Krassel, JK Folger, JLH Ireland, F Mossa, P Lonergan, ACO Evans (2011) Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of AMH as a diagnostic marker for fertility, and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction Fertility Development*, 23, 1-14

ACO Evans F Mossa, T Fair, P Lonergan, ST Butler, AE Zielak-Steciwo, GW Smith, F Jimenez-Krassel, JK Folger, JLH Ireland, JJ Ireland (2010) Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. In *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, Editors, MC Lucy, JL Pate, MF Smith, TE Spencer, Published by Nottingham University Press (ISBN 978-1-907284-14-4), pages 421-429

Vortrag unseres Goldsponsors

Modern Puerperal Metritis Treatment in Cattle

Fausto Tony

Pfizer Animal Health

Ist die Anzahl Follikelwellen pro Zyklus im Rahmen des ET ein beachtenswertes Kriterium?

Schneebeli Jürg

Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Gemäss der Anzahl dominanter Follikel [DF], die bei unbelegten Rindern zwischen aufeinanderfolgenden Brunsten heranwachsen, lassen sich die allermeisten Lutealphasen entweder als sog. 2-Wellen-Zyklen [2WZ] oder 3-Wellen-Zyklen [3WZ] bezeichnen. In vorangehenden Studien erwiesen sich 2WZ als die häufigere Variante und, soweit vergleichbar, scheint der Rhythmus des Follikelwachstums in 2WZ etwa jenem der ersten Stadien der Frühgravidität zu entsprechen, während in 3WZ die Intervalle zwischen den DF in der Regel verkürzt sind. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass möglicherweise eine unvollständige funktionelle Kompetenz des ersten post ovulationem entstehenden DF das Auftreten einer dritten (zusätzlichen) Follikelwelle begünstigt. Inwiefern die Zahl der DF-Wellen pro Zyklus tatsächlich fertilitätsrelevant ist, wurde bisher nie direkt geprüft. Im Zentrum dieser Studie standen die folgenden 2 Fragen, die auch im Hinblick auf den ET von Bedeutung sind. (1) Sind Brunstfollikel, die aus einem 2WZ bzw. 3WZ hervorgehen, gleicherweise fertil? (2) Gehen aus Lutealphasen, die sich nach einer Belegung zunächst wie 2WZ bzw. 3WZ entwickeln, mit gleicher Wahrscheinlichkeit Graviditäten hervor?

Die vorgestellten Ergebnisse stammen von Braunvieh-Milchkühen und -rindern, deren spontane Ovaritätigkeit kontinuierlich überwacht wurde (transrektale Palpation in 1- bis 2-tägigen Intervallen). Zur Klärung von Frage 1 wurde geprüft, wie erfolgreich Belegungen waren, wenn der Brunst ein 2WZ (n=206) bzw. 3WZ (n=97) vorangegangen war. Die (manuell verifizierten) Trächtigkeitsraten für die beiden Situationen unterscheiden sich mit 61% (2WZ) bzw. 59% (3WZ) statistisch nicht signifikant ($p < 0.05$). Frage 2 kann nicht direkt beantwortet werden, weil im Einzelfall oft unklar bleibt, welche Frühgraviditäten aus einem potentiellen 2WZ bzw. 3WZ hervorgehen. Inwiefern eine Variante insgesamt allenfalls bevorzugt oder vermindert zu Trächtigkeiten beiträgt, lässt sich aber über einen Vergleich ihrer relativen Häufigkeit bei unbelegten und bei umrindernden Tieren objektiv ermitteln. Gemäss den verfügbaren Beobachtungen kamen 3WZ bei unbelegten Tieren (n=312) in einer Häufigkeit von 28% vor, während ihr Anteil bei umrindernden Tieren (n=111) mit 47% hochsignifikant ($p < 0.01$) erhöht war. (2WZ waren dementsprechend bei unbelegten Tieren zu 72% und bei umrindernden zu 53% vertreten.)

Obwohl am Ende von 2WZ und 3WZ offenbar gleichermaßen fertile Follikel heranreifen, erweist sich die Zahl der Follikelwellen pro Zyklus als physiologisch relevant. Die überproportionale Häufung von 3WZ bei umrindernden Tieren zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für die Etablierung einer Trächtigkeit deutlich reduziert ist, wenn das DF-Wachstum nach einer Belegung anfänglich dem 3-Wellen-Muster folgt. Ein suboptimaler Verlauf der frühen Luteinisierung, welcher sowohl das uterine Milieu als auch das DF-Wachstum beeinträchtigt, ist als Erklärung für diese Beobachtungen in Betracht zu ziehen.

Hinsichtlich des ET erweist sich die Anzahl der Follikelwellen pro Zyklus als Parameter, der vor allem bei der Beurteilung der Empfängertauglichkeit besondere Beachtung verdient. Gemäss den Ergebnissen dieser Studie ist davon auszugehen, dass bei allen derzeit gängigen Verfahren des ET beim Rind in erheblichem Umfang Embryonen auf Empfänger übertragen werden, die zum Zeitpunkt des Transfers allein schon deshalb vermindert fertil sind, weil sie sich (zufällig) in einem 3WZ befinden. Als naheliegende und effiziente Möglichkeit zur Optimierung der bisherigen Praxis würde sich eigentlich die ausschliessliche Selektion von Rezipienten anbieten, deren Ovarialtätigkeit zur Zeit des Transfers dem Muster eines 2WZ folgt. Der praktischen Umsetzung einer solchen Absicht steht allerdings gegenwärtig noch die Schwierigkeit im Wege, bereits während der Luteinisierung den aktuellen Verlauf des DF-Wachstums korrekt einem 2WZ oder 3WZ zuzuordnen. Subtile Unterscheidungskriterien, die eine objektive Erkennung der beiden Varianten schon in frühen Zyklusstadien ermöglichen, sind noch weitgehend unbekannt.

Einfluss zweier progesteronfreisetzender Präparate (PRID® alpha, CIDR®) auf die Synchronisation der Empfängertiere im Rahmen eines Embryotransferprogramms beim Rind

Barbara Auinger¹, Ana Hanstedt², Sandra Wilkening², Hans-Peter Nohner¹, Claus Leiding¹,
Christine Wrenzycki^{2,3}

¹ *Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V., Neustadt a.d. Aisch*

² *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

³ *Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken,
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Die Brunstsynchronisation stellt heutzutage eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Embryotransfer (ET), eine terminorientierte Besamung und für die Rationalisierung des fortpflanzungsbiologischen Herdenmanagements bei Kühen und Jungrindern dar. Hierfür können unter anderem Synchronisationsprogramme mit progesteronfreisetzenden Präparaten genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der beiden progesteronfreisetzenden Präparate (PRID® alpha-Spirale und CIDR®-Spange) auf das Endometrium von Empfängertieren, sowie den Einfluss der Medikationsdauer auf den Progesteronspiegel, den Synchronisationserfolg und die Trächtigkeitsraten nach ET zu untersuchen.

Hierfür wurden insgesamt 104 Färsen der Rasse Deutsches Fleckvieh an der Empfängertierstation „Brandhof“ des Besamungsvereins Neustadt / Aisch e.V. synchronisiert. Die Gruppeneinteilung war dabei wie folgt: Gruppe 1A [33 Tiere (Synchronisation mittels PRID-Spirale, Medikationsdauer 8 Tage)], Gruppe 1B [34 Tiere (Synchronisation mittels CIDR-Spange, Medikationsdauer 8 Tage)], Gruppe 2A [11 Tiere (Synchronisation mittels PRID, Medikationsdauer 9 Tage)] und Gruppe 2B [13 Tiere (Synchronisation mittels CIDR, Medikationsdauer 9 Tage)]. Alle Tiere erhielten jeweils 24 Stunden vor der Entnahme der Präparate eine Prostaglandininjektion (Estrumate, 2ml; Gruppen 1A und 1B am Tag 7, Gruppen 2A und 2B am Tag 8). Die Brunst trat ca. 48 Stunden (Tag 9 resp. Tag 10 des Versuchs) nach Entnahme der Präparate ein. Alle Tiere dieser Gruppen erhielten, falls sie als Empfängertier geeignet waren, 7 Tage nach dem Brunsteintritt [Tag 17 (18)] einen Embryo transferiert. Die Auswahl der Empfängertiere erfolgte dabei anhand der Größe und Qualität des gebildeten Gelbkörpers. Des Weiteren wurden alle Rinder am Tag 0, 8 (9), 10 (11) und 17 (18) rektal untersucht. Die Trächtigkeitsuntersuchungen erfolgten am Tag 42 (43) bzw. 53 (54). Zudem

wurde den Tieren für die Bestimmung der Plasmaprogesteronwerte wiederholt Blut entnommen (Die Zahlen in den Klammern gelten für die Gruppen 2A und 2B).

Sechs (Gruppe 3A, Synchronisation mittels PRID, Medikationsdauer 8 Tage) bzw. 7 Tiere (Gruppe 3B, Synchronisation mittels CIDR, Medikationsdauer 8 Tage) wurden ebenfalls an Tag 7 mit Prostaglandin behandelt. Bei diesen Tieren wurde sieben Tage nach der Brunst eine Endometriumsbiopsie anstatt eines Embryotransfers durchgeführt. Die rektalen Untersuchungen, sowie die Blutentnahmen erfolgten entsprechend dem Vorgehen bei Gruppe 1A bzw. 1B. In den Biopsieproben wurde mittels RT-qPCR die mRNA-Expression verschiedener Gene ermittelt. Die analysierten Transkripte waren folgende: β -Aktin (ACTB), Alanin(Amin)-Peptidase (ANPEP), Lipoprotein-Lipase (LPL), Progesteron-Rezeptor (PGR), Diacylglycerol-O-acyltransferase Homolog 2 (DGAT2), Fettsäurebindungsprotein 3 (FABP3), Dickkopf Homolog 1 (DKK1), Asialoglycoprotein-Rezeptor 2 (ASGR2), Solute-carrier-Familie 2-Mitglied 5 (SLC2A5) und Myostatin (MSTN).

Die Verbleiberaten der Präparate für die einzelnen Gruppen lagen bei 93,9 % (Gruppe 1A), 91,2 % (Gruppe 1B), 100 % (Gruppen 2A, 2B und 3A) und 71,4 % (Gruppe 3B). Der Brunstsynchronisationserfolg lag bei 96,8 % (Gruppe 1A und 1B), 90,9 % (Gruppe 2A) und 100 % (Gruppe 2B, 3A und 3B). Die ET-Nutzungsraten betragen 90,0 % (Gruppe 1A und 2A), 93,3 % (Gruppe 1B) und 92,3 % (Gruppe 2B). Folgende Trächtigkeitsraten konnten erzielt werden: 77,8 % (Gruppe 1A), 75,0 % (Gruppe 1B und 2B) bzw. 66,7 % (Gruppe 2A). Die statistische Auswertung ergab, dass weder das verwendete Medikament, noch die Medikationsdauer einen Einfluss auf die ermittelten Parameter hatten. Auch auf den Progesteronwert war durch das Medikament kein Einfluss nachweisbar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass ein P_4 -Wert $> 2,2$ ng/ml am Tag des Transfers unabhängig vom Präparat zu signifikant höheren TR-Raten führte.

Die Genexpressionsbestimmung ergab nur für das ANPEP-Gen eine signifikant höhere Expression in der Gruppe 3B (CIDR 8 Tage) im Vergleich zur Gruppe 3A (PRID 8 Tage). Alle anderen untersuchten Gentranskripte wiesen ähnliche relative Mengen auf.

Damit kann geschlussfolgert werden, dass beide Präparate für die Empfängertivorbereitung gleichermaßen geeignet sind. Zudem kann der Progesteronwert am Tag des ET als zusätzliches Auswahlkriterium herangezogen werden.

Die Wiederholbarkeit der Superovulationsreaktion und der Embryoentnahme bei in kurzen Zeitabständen wiederholt superstimulierten Rindern

M Reichenbach^{1,2}, T Faasch², M Matthiesen², T Grupp³, C Gschöderer³, C Prantler³, E Wolf^{1,2}, H-D Reichenbach⁴

¹*Bayerisches Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie (BFZF), Oberschleißheim;*

²*Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU Munich;*

³*Bayern-Genetik GmbH, Grub;*

⁴*Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Grub*

Eine ökonomisch profitable Embryospenderkuh zeichnet sich durch die Erzeugung von möglichst vielen transfertauglichen Embryonen nach Superstimulation aus. Aus verschiedenen Gründen reagieren jedoch die Spender sehr unterschiedlich auf die Superstimulation. Obwohl etwa 90% der Kühe auf die Superstimulation reagieren, liefern nur etwa ein Drittel mehr als die durchschnittliche Anzahl an transfertauglichen Embryonen.

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Embryoentnahmen an der ET Station der LMU München in Badersfeld wurde die Wiederholbarkeit der Embryogewinnung bei mehrfach in relativ kurzen Zeitabständen superstimulierten Spendern geschätzt.

Innerhalb von drei Jahren wurden Kühe (n=36) und Färsen (n=20) der Rasse Deutsches Fleckvieh in Zeitabständen von vier bis zehn Wochen ($\bar{\Delta} = 5$ Wochen) wiederholt superstimuliert (n=271). Hierfür bekamen die Spender eine Progesteron Spirale (PRID-alpha[®] oder CIDR[®]) zu einem zufälligen Zeitpunkt des Zyklus appliziert (d0). Beginnend an d5 wurde ihnen abfallende FSH (Pluset[®]) Gaben 2-mal täglich (Färsen, total=8,5 ml; Kühe, total=13,5 ml) über vier Tage (d5 - d8) verabreicht. An d7 und d8 erhielten die Spender jeweils 2,0 ml Cloprostenol (Estrumate[®]) und die Spiralen wurden an d8 entfernt. Die Besamungen erfolgten zu festgelegten Zeitpunkten 36, 48 und 60 Std. nach der Entnahme der Spirale. Zum Zeitpunkt der 2. Besamung erhielten die Tiere Buserelinacetat (Receptal[®]). Die Embryoentnahme erfolgte 7 Tage nach der ersten Besamung. Die Erfassten Ergebnisse wurden anhand eines Tiermodels (Mixed Model) mit proc mixed in SAS analysiert, die Varianzen geschätzt und daraus die Wiederholbarkeiten (w) errechnet.

$$w = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_B^2 + \sigma_W^2}$$

mit: σ_B^2 = Varianz zwischen den Gruppen (B = zwischen)
 σ_W^2 = Varianz innerhalb der Gruppen (W = innerhalb)

Die Wiederholbarkeiten lagen im Bereich zwischen 62,6 bis 82,8% und somit hoch für alle untersuchten Merkmale (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wiederholbarkeiten aller Untersuchten Merkmale.

Merkmale	Wiederholbarkeit (w)
Summe Eizellen/ Embryonen	0,654
Unbefruchtete Embryonen	0,626
Degenerierte Embryonen	0,828
ET-taugliche Embryonen	0,709
Befruchtungsrate	0,705

Schlussfolgernd zeigten die Ergebnisse, dass der Individuelle Einfluss des Tieres die wichtigste Rolle in Bezug auf die Superstimulation ausübte und zukünftige Reaktionen eines Tieres in einem gewissen Rahmen voraus gesehen werden können auf der Grundlage von Ergebnissen vorausgehender Superstimulationen die in kurzen Zeitabständen auf einer wiederholten Basis durchgeführt wurden.

Ausgewählte Aspekte zur Oozytengewinnung bei Stuten

A. Vernunft, F. Becker und W. Kanitz

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) – 18196 Dummerstorf, W.- Stahl – Allee 2

Die Basis für den Erfolg und die zukünftige Weiterentwicklung der In-vitro-Reproduktionstechniken bei Pferden bildet eine zuverlässige Gewinnung und Handhabung von equinen Oozyten. Als Mittel der Wahl für eine gezielte, minimal invasive, wiederholbare und komplikationsfreie Eizellgewinnung bei Stuten wird von Carnevale und Maclellan (Vet Clin North Am Equine Pract, 2006), Galli et al. (2007) und Kanitz (Züchtungskunde, 2008) die ultraschallgeleitete transvaginale Follikelaspiration (Ovum Pick Up) gesehen. Sie kann wöchentlich bei Stuten wiederholt werden und wird ohne negative Einflüsse auf ihre Fruchtbarkeit oder auf eine bestehende Trächtigkeit vertragen. Da bei Stuten die Oozyten durch die Granulosazellen besonders fest und breit mit der Follikelwand verbunden sind (Hawley et al., Biol Reprod Mono, 1995), werden bei Stuten wesentlich geringere Oozytengewinnungsraten, als bei Kühen oder Sauen erreicht. Deshalb bleibt auch die Effektivität der In-vivo-Eizellgewinnung, gemessen an der Oozytengewinnungsrate pro Follikel oder der Anzahl der gewonnenen Oozyten pro Ovar, momentan hinter der In-vitro-Eizellgewinnung bei Stuten (follicle-scaping) zurück.

Die Eizellgewinnung mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelaspiration wird am stehenden Tier vorgenommen. Die Stuten werden sediert und eine zusätzliche Darmrelaxierung durch Propanthelinebromid oder N-Butylscopolaminbromid ist zu empfehlen. Zum Einsatz kommen Ultraschallgeräte mit US-Sonden im Frequenzbereich von 5-6,5 MHz sowie spezielle Aspirationssysteme. Der Durchmesser, der für unsere Arbeiten verwendeten Nadeln reichte von 19 G bis 12 G (2,7 bis 1,1 mm). Die Aspirationssysteme sind doppellumig gestaltet, um jeden Follikel nach dem Rein-Raus-Prinzip viermal zu spülen. Durch den mechanischen Einfluss einer Follikelspülung werden höhere Oozytengewinnungsraten erzielt als bei der einfachen Aspiration von Follikeln (Kanitz et al., Biol Reprod Mono, 1995).

Bei einer wiederholten Nutzung von 12 Mecklenburger Warmblutstuten zur Eizellgewinnung innerhalb einer Zuchtsaison wiesen die einzelnen Stuten im Durchschnitt pro Sitzung zwischen $5,8 \pm 0,6$ und $13,0 \pm 3,7$ aspirierbare Follikel ($> 0,5\text{cm}$) auf. Wir konnten feststellen, dass bei Follikelaspirationen im Zeitraum einer Rosse tendenziell mehr Follikel aspiriert werden als bei Follikelaspirationen, die im wöchentlichen Intervall stattfanden ($9,0 \pm 0,1$ vs. $8,1 \pm 0,3$). Die Anzahl gewonnener Oozyten pro Stute und Sitzung war in der Rosse mit $2,3 \pm$

0,2 signifikant höher als bei Follikelaspirationen im wöchentlichen Intervall, bei denen durchschnittlich nur $1,0 \pm 0,1$ Oozyten pro Tier erzielt wurden. Daraus resultierten signifikant unterschiedliche Oozytengewinnungsraten von $27,8 \pm 2,7\%$ (Rosse) und $13,1 \pm 2,0\%$ (wöchentlicher Intervall). Der Unterschied könnten darin begründet sein, dass sich auf Ovarien von Stuten die wöchentlich einer Follikelaspiration unterzogen wurden, ein größerer Anteil vitaler Follikel befand, während sich zum Zeitpunkt der Rosse viele atretische Follikel auf den Ovarien befanden. In vitalen Follikeln weisen Oozyten durch einen kompakten Kumulus eine festere Verbindung zur Follikelwand auf als in präovulatorischen oder atretischen Follikeln, in denen die Kumuluszellen bereits expandieren (Grondahl et al., Mol Reprod Dev, 1995).

Zur Gewinnung von in vivo gereiften Oozyten aus präovulatorischen Follikeln wird der dominante Follikel ab einem Durchmesser von 30 bis 36 mm durch Applikation von hCG oder GnRH vor der Eizellgewinnung künstlich zur Reifung gebracht (Carnevale and Maclellan, 2006). Während der Follikelreifung kommt es zu einer Expansion der Granulosazellen, wodurch sich die Verbindung der Oozyte zur Follikelwand im Hinblick auf die bevorstehende Ovulation lockert (Grondahl et al., 1995). Aspirationen von dominanten Follikeln, 24 bis 28 Stunden nach einer Ovulationsinduktion, führten bei eigenen Untersuchungen zu einer Oozytengewinnungsrate von 4,2 %, wenn die Follikel mit einer dünnen (19G) Kanüle aspiriert wurden. Bei der Verwendung von größeren doppelumigen 12G Kanülen zur Aspiration von präovulatorischen Follikeln wurde dagegen von uns eine Oozytengewinnungsrate von 70% erreicht. Offensichtlich erfordert die Kumulusexpansion, sowie die zunehmende Viskosität der Follikelflüssigkeit im reifenden equinen Follikel die Verwendung von großlumigen Aspirationskanülen bei der Oozytenewinnung.

Weiterführend verglichen wir die Auswirkungen des Einsatzes von 14G und 19G Kanülen zur Oozytengewinnung aus unreifen Follikeln. Dazu wurden bei 14 Stuten zunächst innerhalb einer Aspirationssitzung alle Follikel eines Ovars mit einer 14G Kanüle aspiriert. Die Follikel des anderen Ovars wurden mit Hilfe einer 19G Kanüle abgesaugt. Nach drei Wochen wurde die Aspiration wiederholt, wobei die entsprechenden Ovarien mit der jeweils anderen Kanüle aspiriert wurden. Die erzielten Oozytengewinnungsraten waren mit 14,9% und 16,1% zwischen den Aspirationen mit den 14G und 19G Kanülen gleich. Bei beiden Aspirationsmethoden wurde jeweils ein hoher Anteil Oozyten gefunden, die nur von den Zellen der Corona radiata umgeben waren. Klinisch ließ sich durch eine ultrasonografische Untersuchung der Ovarien ein Tag nach den Aspirationssitzungen kein Unterschied feststellen. Wir schlussfolgern daraus, dass das alleinige Verwenden von großlumigen

Kanülen keinen positiven Effekt auf die Oozytengewinnung oder Kumulus-Oozyten-Komplex-Qualität bei unreifen Follikeln hat, jedoch auch kein gesundheitlicher Nachteil für die Stuten zu erwarten ist.

Insgesamt betrachtet bleibt die Bereitstellung einer hohen Anzahl Oozyten für In-vitro-Reproduktionstechniken bei Pferden ein limitierender Faktor. Die Steigerung der Oozytengewinnungsrate, sowie die Beeinflussung der Qualität der gewonnenen Oozyten ist daher bei Stuten nach wie vor wichtiger Gegenstand der Forschung.

Konzentration von „Pregnancy Associated Glycoprotein“ bei verschiedenen Rinderrassen

Shahin M, Gauly M, Holtz W, Friedrich M

*Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität,
Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen*

Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAG) sind Makromoleküle, die von den ein- und mehrkernigen Zellen des Trophoblasts sezerniert werden. Sie sind im maternalen Blut mittels Radioimmunoassay (RIA) oder Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachweisbar und dienen als zuverlässige Methode einer genauen und frühen Trächtigkeitsdiagnose beim Rind. Es wurde festgestellt, dass eine hohe Milchleistung bei Milchkühen einen negativen Effekt auf die PAG Konzentration hat. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss einer extensiven Haltung auf die PAG Konzentration während der Trächtigkeit zu untersuchen. Von 35 Mutterkühen (19 Fleckvieh-, 8 Aubrac- und 8 Uckermärker) wurden nach Bedeckung alle 6 Wochen bis zur Abkalbung Blutproben entnommen und mit dem PAG-Verlauf von 585 besamten Holstein Friesian Kühen verglichen. Die PAG-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven ELISA bestimmt. Gereinigtes bovines PAG wurde als Standard und Tracer verwendet. Spezifische Antikörper wurden aus Immuns serum von Kaninchen gewonnen, die mit bovinem PAG immunisiert worden waren.

Wie aus der unteren Abbildung hervorgeht, stieg die PAG-Konzentration bei den Fleckviehkühen von 5 ng/ml in Woche 3 der Trächtigkeit bis 12 ng/ml in Woche 17 weitestgehend kontinuierlich an. Nach einem leichten Abfall in Woche 19 erhöhte sich die Konzentration stetig weiter und erreichte maximale Werte in den letzten zwei Wochen der Trächtigkeit. Bei den Aubrac stieg die PAG Konzentration von 2,9 ng/ml in der fünften Woche auf 33 ng /ml in der 22. Woche und erreichte maximale Werte ebenfalls in der letzten Woche der Trächtigkeit. Uckermärker Kühe zeigten einen ähnlichen PAG-Verlauf bis zur 30. Woche der Trächtigkeit, eine weitere Probensammlung war danach nicht möglich. Bei den Holstein Friesian stieg die PAG Konzentration allmählich an und erreichte Werte von bis zu 300 ng/ml in der 38. Trächtigungswoche. Zwischen den Rinderrassen konnten geringfügige Unterschiede nachgewiesen werden, die jedoch nicht signifikant waren. Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass der ursprünglich für Milchrinder etablierte PAG-ELISA auch bei

anderen Rassen und Nutzungsrichtungen (extensive gehaltene Mutterkühe) problemlos genutzt werden kann.

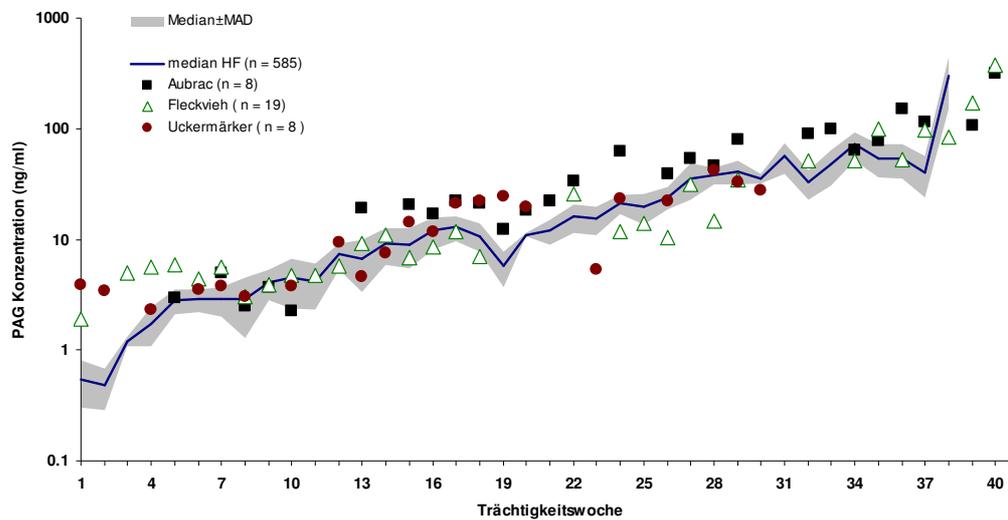


Abb.: PAG Verläufe bei trächtigen Aubrac, Fleckvieh, Uckermärker und Holstein Friesian Kühen

**Genomische Selektion in der Rinderzucht –
zukünftige Entwicklungen im Embryotransfer**

K. Roschlau, A. Kuwer, D. Roschlau, C. Kuhnt, U. Michaelis, J. Reinecke, P. Poppe, G. Kuwer, J. Tetens*

*MASTERRIND GmbH, ET-Station Nückel;
Universität Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung **

Neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie machen es möglich, verschiedene **Zuchtwerte** eines Tieres schon **zu einem sehr frühen Zeitpunkt** zu schätzen. Die notwendigen Untersuchungen werden direkt am Erbmateriale (**Genom**) vorgenommen – allerdings wird nicht nach leistungsbeeinflussenden Genen gesucht, sondern es wird lediglich eine Stichprobe von millionenfach im Genom vorkommenden punktuellen Abweichungen (**SNP** – single nucleotide polymorphism) von der „Standardsequenz“ des Rindes analysiert. Für die routinemäßige Analyse wird heute ein 54 K – Chip der Firma Illumina genutzt, der es erlaubt, das Erbmateriale an 54.000 Orten auf mögliche Abweichungen in der Sequenz (Basenfolge) zu untersuchen.

Die ermittelten SNP's geben zunächst keinerlei Information über spätere Leistungseigenschaften. Erst ein komplizierter mathematischer Abgleich dieser Daten mit solchen aus einer **Referenzgruppe** – das sind Tiere, meist Bullen, bei denen sowohl Informationen über klassische Zuchtwerte als auch aus SNP-Analysen vorliegen – ermöglicht die Erstellung von **genomischen Zuchtwerten** für das zu untersuchende Individuum. Da die Größe der Referenzgruppe die Sicherheit der genomischen Zuchtwerte maßgeblich beeinflusst, fließen Daten von vier großen europäischen Partnern (VikingGenetics, UNCEIA, CRV, DHV) in dem Projekt EuroGenomic zusammen, woraus in der Konsequenz unseren Züchtern der weltweit größte Pool an Informationen für die genomische Zuchtwertschätzung zur Verfügung steht.

Aus diesen neuen Möglichkeiten der Zuchtwertschätzung zu einem sehr frühen Zeitpunkt ergeben sich erhebliche Konsequenzen für den Embryotransfer und natürlich die gesamte Zuchtarbeit!

Durch den **Embryotransfer** werden Gruppen von **Vollgeschwistern** (oder Halbgeschwistern, wenn bei der Besamung zwei Bullen eingesetzt werden) erzeugt. Auf Grund fehlender eigener Leistungsdaten hatten Vollgeschwister bisher zunächst alle den

gleichen Pedigree-Zuchtwert. Wenn sich Besamungsstationen aus solch einer Gruppe ein Bullenkalb zur Aufzucht, Testung und eventuellen viel späteren Nutzung als Besamungsbullen heraussuchten, war das im Grunde genommen nicht mehr, als ein Griff in eine „Blackbox“ – dass Vollgeschwister in Wirklichkeit nicht alle gleich sind, ist jedem Praktiker bekannt. Es lässt sich berechnen (und zeigen), dass die Zuchtwerte von Vollgeschwistern um bis zu 10 Punkte nach oben bzw. unten vom Pedigree-Zuchtwert abweichen können. Folglich sind in der Vergangenheit sicher viele exzellente Bullenkälber unerkant geschlachtet und „Nieten“ aufwendig getestet worden. Heute werden die geborenen Bullenkälber aus exzellenten Anpaarungen genomisch getestet und nur die mit den höchsten genomischen Zuchtwerten kommen auf eine Besamungsstation. Die Chance, einen herausragenden Bullen aus einer Spitzenanpaarung zu erhalten, steigt also (auf Grund der Varianz in den Zuchtwerten von Vollgeschwistern) mit der Anzahl an Nachkommen, die erzeugt werden. **Mehr Embryotransfer zu machen ist die einzige Möglichkeit, um eine solch breite Selektionsbasis zu schaffen!**

Da mehr Embryotransfer natürlich auch mehr Kosten bedeutet, gibt es Überlegungen, die **Selektion** nicht erst bei den Kälbern, sondern schon auf der **Ebene der Embryonen** vorzunehmen und dadurch die Anzahl der notwendigen Transfers zu reduzieren. Grundlegende Forschungen dazu werden insbesondere bei UNCEIA (Frankreich) durchgeführt. Das Genom ist im Moment der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium und der Vereinigung der beiden Vorkerne komplett. In diesem Augenblick steht auch der genomische Zuchtwert des neuen Individuums fest. Ein Embryo, der 7 Tage nach der Besamung ausgespült oder 7 Tage im Brutschrank nach einer In vitro Befruchtung kultiviert wird, besteht aus mehr als 100 Zellen. Erste Voruntersuchungen, die in einem Gemeinschaftsprojekt der ET-Station der MASTERRIND mit dem Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Universität Kiel durchgeführt wurden, zeigen, dass es möglicherweise tatsächlich ausreicht, durch eine Biopsie etwa 10 Zellen zu entnehmen, um nach Amplifikation des Genoms eine genomische Analyse vorzunehmen. Insbesondere ist hier noch abzuklären, inwieweit die „whole-genome DNA amplification“ zu Verzerrungen in den ermittelten Zuchtwerten führt. Weil das Ergebnis der Analyse erst nach Tagen oder Wochen vorliegt, müssen die biopsierten Embryonen in jedem Fall zunächst tiefgefroren werden, was zu einer Reduzierung der Trächtigkeitschance um etwa 10% führt.

Alternativ wäre es möglich, parallel zu den 10 Zellen für die genomische Analyse, weitere drei Zellen für eine Geschlechtsdiagnose zu entnehmen. Wenn nach 1,5 bis 2 Stunden das

Ergebnis vorliegt, könnten alle weiblichen Embryonen ohne weitere genomische Untersuchung direkt transferiert werden – weibliche Nachkommen aus Spitzenanpaarungen sind für den Züchter immer von Interesse. Die männlichen Embryonen würden dann eingefroren werden und nur die allerbesten würden später nach Vorliegen der genomischen Zuchtwerte aufgetaut und übertragen werden.

Viele Züchter **importieren** für viel Geld **Embryonen** aus Spitzenanpaarungen. Damit sich diese Investition züchterisch und wirtschaftlich lohnt, ist es zwingend notwendig, aus den daraus hervorgehenden weiblichen Nachkommen schnell eine **Kuhfamilie** aufzubauen. Dazu ist es essentiell, die genomischen Zuchtwerte auf den jeweiligen Generationsebenen zu ermitteln, um dann von den besten weiblichen Tieren über Embryotransfer immer weitere Nachkommen zu erzeugen. Bullen mit sehr hohen Zuchtwerten können Besamungsstationen angeboten werden. Später können dann auch sehr gute Jungrinder auf Auktionen zu Spitzenpreisen verkauft werden.

Gleichermaßen sollte vorgegangen werden, wenn sehr gute Jungrinder für den Betrieb zugekauft werden.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass es im **Zeitalter der genomischen Selektion** essentiell ist, durch **mehr Embryotransfer** eine möglichst große Anzahl an Nachkommen aus Spitzenanpaarungen zu erzeugen, um eine **breite Basis für die genomische Analyse** zu schaffen und damit eine große Chance zu haben, wirkliche **Top-Nachkommen** zu erhalten! Tendenziell wird es wahrscheinlich zu einer stärkeren **Trennung von Produktions- und Nukleuserden** kommen. In den Nukleuserden werden die absolut besten weiblichen Jungtiere konzentriert sein, die dann überwiegend als **Dauerspender für Embryonen** genutzt werden.

Vier Jahre praktische Erfahrung mit dem Einsatz gesexten Spermas in der Rinderbesamung in OstfrieslandJ Detterer¹; S Meinecke-Tillmann²¹*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland*²*Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover*

Die Verwendung gesexten Spermas in der Rinderbesamung hat in den letzten Jahren weltweit stark zugenommen. Neben dem Wunsch nach zusätzlichen Kuhkälbern, steht inzwischen die problemlosere Abkalbung nach der Insemination mit X-sortiertem Sperma im Vordergrund.

In der vorliegenden Studie werden Fruchtbarkeitsparameter nach Einsatz durchflusszytometrisch sortierten Spermas und das Geschlechtsverhältnis der resultierenden Nachkommen anhand eines größeren Zahlenmaterials dokumentiert. Daneben werden erste Ergebnisse zur Verifizierung der Sortiergenauigkeit im sortierten Sperma mit einem modifizierten Testkit zur Geschlechtsbestimmung von Rinderembryonen (SEX-YTM; Minitüb) gezeigt.

Im Zeitraum von Juli 2007 bis Februar 2011 wurden im Gebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) 11.897 Erstbelegungen (EB) mit gesextem Sperma durchgeführt. Die Non-Return-Rate 56-Tage (NRR-56), die Anzahl der Belegungen (BI) und die Kalberate (KR) wurden mit entsprechenden Ergebnissen aus 116.175 Erstbesamungen mit konventionellem Sperma derselben Bullen (n = 28) verglichen.

5.668 Kälber wurden nach der Besamung mit gesextem Sperma ausgewertet, gegenüber 103.504 Kälbern nach KB mit konventionellem Sperma. Die NRR-56 (-10,1 %) und die KR (-9,3 %) waren nach dem Einsatz geschlechtssortierten Spermas signifikant ($P < 0.001$) niedriger, während der BI (+0,16) im Vergleich zur konventionellen KB signifikant anstieg ($P < 0.001$).

85,5 % Kuhkälber wurden aus den Besamungen mit sortiertem Sperma geboren, wohingegen der Anteil weiblicher Kälber nach der KB mit unsortiertem Sperma wesentlich niedriger lag (47,3 %). Beim Einsatz sortierten Spermas gab es zwischen den Bullen signifikante Unterschiede im Geschlechtsverhältnis der geborenen Nachkommen. Der modifizierte SEX-YTM erwies sich reproduzierbare und effektive Methode zur Messung des Geschlechtsverhältnisses in ausgewählten Spermaportionen und damit zur Qualitätskontrolle des Sortierprozesses.